

# МЕДИЦИНА ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ СИТУАЦИЙ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ ФМБА РОССИИ

**ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР** Вероника Скворцова, д. м. н., профессор, член-корреспондент РАН

**ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА** Игорь Берзин, д. м. н., профессор; Дарья Крючко, д. м. н.

**НАУЧНЫЕ РЕДАКТОРЫ** Всеволод Белоусов, д. м. н., профессор; Антон Кескинов, к. м. н.

**ПЕРЕВОДЧИКИ** Екатерина Третьякова, Вячеслав Витюк

**ДИЗАЙН И ВЕРСТКА** Марины Дорониной

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

В. К. Агапов, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
В. М. Баранов, д. м. н., профессор, академик РАН (Москва, Россия)  
А. В. Богомолов, д. т. н., профессор (Москва, Россия)  
А. Ю. Бушманов, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
Н. А. Дайхес, д. м. н., профессор, член-корр. РАН (Москва, Россия)  
М. В. Дубина, д. м. н., профессор, академик РАН (Санкт-Петербург, Россия)  
С. В. Дударенко, д. м. н., доцент (Санкт-Петербург, Россия)  
Л. А. Ильин, д. м. н., профессор, академик РАН (Москва, Россия)  
Ю. В. Лобзин, д. м. н., профессор, академик РАН (Санкт-Петербург, Россия)  
В. В. Никифоров, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
В. Н. Олесова, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Р. В. Петров, д. м. н., профессор, академик РАН (Москва, Россия)  
А. С. Радиллов, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)  
В. Р. Рембовский, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)  
А. С. Самойлов, д. м. н., профессор, член-корр. РАН (Москва, Россия)  
В. А. Сергиенко, д. м. н., профессор, член-корр. РАН (Москва, Россия)  
А. В. Троицкий, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
И. Б. Ушаков, д. м. н., профессор, академик РАН (Москва, Россия)  
М. Р. Хаитов, д. м. н., профессор, член-корр. РАН (Москва, Россия)  
Р. М. Хаитов, д. м. н., профессор, академик РАН (Москва, Россия)  
А. В. Четкин, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)  
С. М. Юдин, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

А. В. Аклев, д. м. н., профессор (Челябинск, Россия)  
С. А. Аракелов, д. б. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)  
В. П. Баклаушев, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
М. О. Дегтева, к. т. н. (Челябинск, Россия)  
Н. В. Ефименко, д. м. н., профессор (Пятигорск, Россия)  
Е. В. Казакевич, д. м. н., профессор (Архангельск, Россия)  
В. П. Катунцев, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
В. А. Климанов, д. ф.-м. н., профессор (Москва, Россия)  
Д. В. Клинов, к. ф. м. н., (Москва, Россия)  
Н. А. Кошурникова, д. м. н., профессор (Озерск, Россия)  
И. П. Миннуллин, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)

И. Г. Мосягин, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)  
О. М. Панасенко, д. б. н., профессор (Москва, Россия)  
В. А. Рогожников, д. м. н. (Москва, Россия)  
С. А. Романов, к. б. н. (Озерск, Россия)  
С. А. Сотниченко, д. м. н. (Владивосток, Россия)  
Т. Г. Суранова, к. м. н., доцент (Москва, Россия)  
Р. М. Тахауов, д. м. н., профессор (Северск, Россия)  
Н. К. Шандала, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
С. М. Шинкарев, д. т. н. (Москва, Россия)  
Г. А. Шипулин, к. м. н. (Москва, Россия)  
Т. В. Яковлева, д. м. н. (Москва, Россия)

**ПОДАЧА РУКОПИСЕЙ** editor@fmba.press

**ПЕРЕПИСКА С РЕДАКЦИЕЙ** editor@fmba.press

**СОТРУДНИЧЕСТВО** manager@fmba.press

**АДРЕС РЕДАКЦИИ** Волоколамское шоссе, д. 30, стр. 1, г. Москва, 123182

Журнал включен в РИНЦ, IF 2018: 0,570

Журнал включен в Перечень 31.01.2020 (№ 1292)

Здесь находится открытый архив журнала



ВЫСШАЯ  
АТТЕСТАЦИОННАЯ  
КОМИССИЯ (ВАК)



DOI выпуска: 10.47183/mes.2021-03

Свидетельство о регистрации средства массовой информации № ФС77-25124 от 27 июля 2006 года

Учредитель и издатель: Федеральное медико-биологическое агентство fmba.gov.ru

Журнал распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International www.creativecommons.org



Подписано в печать 30.09.2021  
Тираж 500 экз. Отпечатано в типографии PrintFormula  
www.print-formula.ru

# EXTREME MEDICINE

SCIENTIFIC AND PRACTICAL REVIEWED JOURNAL OF FMBA OF RUSSIA

**EDITOR-IN-CHIEF** Veronika Skvortsova, DSc, professor, RAS corresponding member

**DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF** Igor Berzin, DSc, professor; Daria Kryuchko, DSc

**EDITORS** Vsevolod Belousov, DSc, professor; Anton Keskinov, PhD

**TRANSLATORS** Ekaterina Tretiyakova, Vyacheslav Vityuk

**DESIGN AND LAYOUT** Marina Doronina

## EDITORIAL BOARD

Agapov VK, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Baranov VM, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Bogomolov AV, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Bushmanov AY, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Daikhes NA, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Dubina MV, member of RAS, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)  
Dudarenko SV, DSc (Saint-Petersburg, Russia)  
Ilyin LA, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Lobzin YV, member of RAS, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)  
Nikiforov VV, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Olesova VN, DSc, professor (Moscow, Russia)

Petrov RV, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Sadilov AS, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)  
Rembovsky VR, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)  
Samoilov AS, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Sergienko VI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Troitsky AV, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Ushakov IB, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Khaitov MR, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Khaitov RM, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Chechetkin AV, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)  
Yudin SM, DSc, professor (Moscow, Russia)

## ADVISORY BOARD

Aklev AV, DSc, professor (Chelyabinsk, Russia)  
Arakelov SA, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)  
Baklaushev VP, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Degteva MO, PhD (Chelyabinsk, Russia)  
Efimenko NV, DSc, professor (Pyatigorsk, Russia)  
Kazakevich EV, DSc, professor (Arkhangelsk, Russia)  
Katuntsev VP, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Klimanov VA, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Klinov DV, PhD (Moscow, Russia)  
Koshurnikova NA, DSc, professor (Ozersk, Russia)  
Minnullin IP, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)

Mosyagin IG, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)  
Panashenko OM, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Rogozhnikov VA, DSc, (Moscow, Russia)  
Romanov SA, PhD (Ozersk, Russia)  
Sotnichenko SA, DSc (Vladivostok, Russia)  
Suranova TG, PhD, docent (Moscow, Russia)  
Takhauov RM, DSc, professor (Seversk, Russia)  
Shandal NK, DSc, professor (Moscow, Russia)  
Shinkarev SM, DSc (Moscow, Russia)  
Shipulin GA, PhD (Moscow, Russia)  
Yakovleva TV, DSc (Moscow, Russia)

**SUBMISSION** editor@fmba.press

**CORRESPONDENCE** editor@fmba.press

**COLLABORATION** manager@fmba.press

**ADDRESS** Volokolamskoe shosse, 30, str. 1, Moscow, Russia, 123182

Indexed in RSCI. IF 2018: 0,570

Listed in HAC 31.01.2020 (№ 1292)

Open access to archive



ВЫСШАЯ  
АТТЕСТАЦИОННАЯ  
КОМИССИЯ (ВАК)

CYBERLENINKA

Issue DOI: 10.47183/mes.2021-03

The mass media registration certificate № 25124 issued on July 27, 2006

Founder and publisher: Federal medical-biological agency fmba.gov.ru

The journal is distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License [www.creativecommons.org](http://www.creativecommons.org)



Approved for print 30.09.2021  
Circulation: 500 copies. Printed by Print.Formula  
[www.print-formula.ru](http://www.print-formula.ru)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>5</b>  |
| Пул гемопоэтических стволовых клеток в периферической крови хронически облученных лиц в отдаленном периоде<br>А. И. Котикова, Е. А. Блинова, А. В. Аклеев<br><i>Peripheral blood hematopoietic stem cell pool in individuals chronically exposed to radiation over a long-term period</i><br>Kotikova AI, Blinova EA, Akleyev AV                                                                                                                                                                                                                       |           |
| <b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>11</b> |
| Метилирование генов <i>BCL-2</i> , <i>CDKN1A</i> и <i>ATM</i> у лиц, подвергшихся хроническому облучению<br>Е. А. Блинова, В. С. Никифоров, М. А. Янишевская, А. В. Аклеев<br><i>BCL-2, CDKN1A and ATM gene methylation in chronically exposed individuals</i><br>Blinova EA, Nikiforov VS, Yanishevskaya MA, Akleyev AV                                                                                                                                                                                                                               |           |
| <b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>16</b> |
| Выделение и характеристика бактериофагов <i>Pseudomonas aeruginosa</i> — потенциальных агентов для фаговой терапии<br>М. А. Корниенко, Н. С. Купцов, Д. И. Данилов, Р. Б. Городничев, М. В. Малахова, Д. А. Беспятых, В. А. Веселовский, Е. А. Шитиков, Е. Н. Ильина<br><i>Isolation and characterization of Pseudomonas aeruginosa bacteriophages — potential agents for phage therapy</i><br>Kornienko MA, Kuptsov NS, Danilov DI, Gorodnichev RB, Malakhova MV, Bespiatykh DA, Veselovsky VA, Shitikov EA, Ilina EN                                 |           |
| <b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>24</b> |
| Оценка эффективности мефлохина в отношении инфекции, вызванной SARS-CoV-2 в клинических и экспериментальных условиях<br>К. Н. Филин, В. Д. Гладких, В. Н. Быков<br><i>Experimental and clinical evaluation of mefloquine effectiveness against the infection caused by SARS-CoV-2</i><br>Filin KN, Gladkikh VD, Bykov VN                                                                                                                                                                                                                               |           |
| <b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>30</b> |
| Сравнение методов очистки фаговых лизатов грамотрицательных бактерий для персонализированной терапии<br>Р. Б. Городничев, М. А. Корниенко, Н. С. Купцов, А. Д. Ефимов, В. И. Богдан, А. В. Летаров, Е. А. Шитиков, Е. Н. Ильина<br><i>Comparison of methods for purification of bacteriophage lysates of gram-negative bacteria for personalized therapy</i><br>Gorodnichev RB, Kornienko MA, Kuptsov NS, Efimov AD, Bogdan VI, Letarov AV, Shitikov EA, Ilina EN                                                                                      |           |
| <b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>38</b> |
| Взаимодействие катионных антисептиков с кардиолипинсодержащей модельной бактериальной мембраной<br>Е. Г. Холина, М. Е. Боздагянян, М. Г. Страховская, И. Б. Коваленко<br><i>Interaction of cationic antiseptics with cardiolipin-containing model bacterial membranes</i><br>Kholina EG, Bozdaganyan ME, Strakhovskaya MG, Kovalenko IB                                                                                                                                                                                                                |           |
| <b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>46</b> |
| Оценка гепатопротекторного эффекта антиоксидантов на амиодарон-индуцированную цитотоксичность в клетках гепатомы человека линии HepaRG<br>К. С. Филимонова, Н. Ю. Роговская, П. П. Бельтюков, В. Н. Бабаков<br><i>Assessing hepatoprotective effects of antioxidants on amiodarone-induced cytotoxicity in human hepatoma HepaRG cell line</i><br>Filimonova KS, Rogovskaya NYu, Beltyukov PP, Babakov VN                                                                                                                                              |           |
| <b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>55</b> |
| Исследование силы дыхательных мышц у больных, перенесших COVID-19<br>О. И. Савушкина, М. М. Малашенко, А. В. Черняк, Е. В. Крюков, Е. А. Синицын, К. А. Зыков<br><i>Respiratory muscle strength in patients after COVID-19</i><br>Savushkina OI, Malashenko MM, Cherniak AV, Kryukov EV, Sinitsyn EA, Zikov KA                                                                                                                                                                                                                                         |           |
| <b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>61</b> |
| Комплексная гигиеническая оценка территорий в районе размещения строящегося регионального центра по обращению с радиоактивными отходами<br>Ю. Н. Зозуль, С. М. Киселев, Т. Н. Лашченко, В. В. Шлыгин, С. В. Ахромеев, Т. И. Гимадова, А. Н. Малахова, О. Б. Шашкова, К. Ю. Оськина<br><i>Environmental impact assessment of the territories in the vicinity of commissioning regional radioactive waste management facility</i><br>Zozul YuN, Kiselev SM, Laschenova TN, Shlygin VV, Akhromeev SV, Gimadova TI, Malakhova AN, Shashkova OB, Oskina KYu |           |

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

69

Современные тенденции *in vitro* фармакологии прототипов противоопухолевых лекарств: библиометрический анализ за 2020–2021 гг.

П. В. Ершов, А. С. Макарова

Current trends in anticancer drug prototype *in vitro* pharmacology: bibliometric analysis 2019–2021

Ershov PV, Makarova AS

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

84

Оценка методов инактивирования аденовируса птиц при производстве гриппозных вакцин

Н. Н. Савина, А. А. Екимов, В. П. Трухин, А. Э. Евтушенко, Е. Н. Жиренкина, Е. О. Синегубова, А. В. Слита

Evaluation of avian adenovirus inactivation methods used in the production of influenza vaccines

Savina NN, Ekimov AA, Trukhin VP, Evtushenko AE, Zhirenkina EN, Sinegubova EO, Slita AV

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

90

Молекулярно-генетическая характеристика трех новых бактериофагов *Klebsiella pneumoniae*, перспективных для применения в фаговой терапии

Р. Б. Гордичев, М. А. Корниенко, Н. С. Купцов, М. В. Малахова, Д. А. Беспятых, В. А. Веселовский, Е. А. Шитиков, Е. Н. Ильина

Molecular genetic characterization of three new *Klebsiella pneumoniae* bacteriophages suitable for phage therapy

Gordnichyev RB, Kornienko MA, Kuptsov NS, Malakhova MV, Bespiatykh DA, Veselovsky VA, Shitikov EA, Ilina EN

## ОБЗОР

98

Аntenatalная и ранняя постнатальная этиологическая верификация актуальных врожденных вирусных инфекций

В. В. Васильев, А. А. Гринева, Н. В. Рогозина, Р. А. Иванова, Г. М. Ушакова

Antenatal and early postnatal etiological verification of relevant congenital viral infectious diseases

Vasilyev VV, Grineva AA, Rogozina NV, Ivanova RA, Ushakova GM

## ОБЗОР

106

Механизмы участия В-лимфоцитов в патогенезе рассеянного склероза

М. В. Мельников, В. С. Роговский, А. В. Лопатина, А. А. Свиридова, А. И. Волков, А. Н. Бойко

Mechanisms of B lymphocyte involvement in the pathogenesis of multiple sclerosis

Melnikov MV, Rogovskii VS, Lopatina AV, Sviridova AA, Volkov AI, Boyko AN

## ОБЗОР

114

Стратегии управления сахарным диабетом у спортсменов

Л. И. Дергачева, А. А. Деревоедов, И. Т. Выходец, А. А. Павлова, С. А. Парастаев

Diabetes mellitus management strategies in athletes

Dergacheva LI, Derevyedov AA, Vykhodets IT, Pavlova AA, Parastayev SA

## ОБЗОР

123

«Болевые точки» сотрясения головного мозга у юных спортсменов

С. О. Ключников, В. С. Фещенко, А. В. Жолинский, М. С. Тарасова, А. В. Сливин, П. В. Ефимов

Brain concussion in young athletes: major pain points

Klyuchnikov SO, Feshchenko VS, Zholinsky AV, Tarasova MS, Slivin AV, Efimov PV

## КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

131

Использование симптома центральной вены для дифференциальной диагностики демиелинизирующих заболеваний центральной нервной системы

С. Е. Белов, И. Л. Губский, В. Г. Лелюк, А. Н. Бойко

Central vein sign for differential diagnosis of demyelinating diseases of CNS

Belov SE, Gubsky IL, Lelyuk VG, Boyko AN

## ПУЛ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ХРОНИЧЕСКИ ОБЛУЧЕННЫХ ЛИЦ В ОТДАЛЕННОМ ПЕРИОДЕ

А. И. Котикова<sup>1,2</sup> ✉, Е. А. Блинова<sup>1,2</sup>, А. В. Аклев<sup>1,2</sup><sup>1</sup> Уральский научно-практический центр радиационной медицины Федерального медико-биологического агентства, Челябинск, Россия<sup>2</sup> Челябинский государственный университет, Челябинск, Россия

У жителей прибрежных сел реки Течи, подвергавшихся хроническому радиационному воздействию, отмечают изменения клеточного состава периферической крови в отдаленном периоде, что может быть следствием структурных и функциональных нарушений в пуле гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и клеток-предшественников. Целью работы было оценить количественные характеристики пула CD34<sup>+</sup>-клеток периферической крови у хронически облученных лиц в отдаленном периоде. Через 60 лет после начала облучения обследовано 153 человека, которых разделили на четыре группы: лиц, облученных в период внутриутробного и постнатального развития (средняя поглощенная постнатальная доза составила 570 мГр); лиц, облученных только постнатально (средняя поглощенная постнатальная доза составила 790 мГр), а также две группы сравнения, в которых поглощенные постнатальные дозы облучения красного костного мозга (ККМ) не превышали 70 мГр. Оценку абсолютного и относительного количества CD34<sup>+</sup>-клеток в периферической крови у хронически облученных лиц проводили методом проточной цитометрии. В группе лиц, облученных в период внутриутробного и постнатального развития, не выявлено изменение количества CD34<sup>+</sup>-клеток относительно группы сравнения, возрастная зависимость также не зарегистрирована. При этом отмечено значимое снижение абсолютного количества ГСК и клеток-предшественников с увеличением дозы облучения ККМ. В группе лиц, облученных только постнатально, обнаружено значимое увеличение показателей CD34<sup>+</sup>-клеток периферической крови относительно группы сравнения (для абсолютного количества  $p = 0,004$ ; для относительного —  $p = 0,009$ ), отмечено дозозависимое увеличение ГСК и клеток-предшественников в периферической крови (для абсолютного количества  $p = 0,02$ ; для относительного —  $p = 0,03$ ), при этом зарегистрировано снижение данного типа клеток с возрастом (для абсолютного количества  $p = 0,02$ , для относительного —  $p = 0,04$ ).

**Ключевые слова:** гемопоэтические стволовые клетки, хроническое облучение, отдаленные эффекты, периферическая кровь, проточная цитометрия

**Финансирование:** исследование выполнено в рамках государственного задания «Состояние клеточного иммунитета человека в период реализации отдаленных эффектов хронического радиационного воздействия» (код 27.002.20.800).

**Вклад авторов:** А. И. Котикова — постановка методики, лабораторные исследования, статистическая обработка, написание текста статьи; Е. А. Блинова — постановка методики, написание текста статьи; А. В. Аклев — концепция исследования, научное руководство.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГБУН УНПЦ РМ ФМБА России (протокол № 3 от 20 июля 2021 г.). Добровольное информированное согласие было получено от всех участников исследований, проводимых на базе лаборатории молекулярно-клеточной радиобиологии ФГБУН УНПЦ РМ ФМБА России.

✉ **Для корреспонденции:** Алиса Игоревна Котикова  
ул. Воровского, д. 68, корп. А, г. Челябинск, Россия, 454141; kotikovaalisa@gmail.com

**Статья получена:** 21.07.2021 **Статья принята к печати:** 10.08.2021 **Опубликована онлайн:** 03.09.2021

**DOI:** 10.47183/mes.2021.023

## PERIPHERAL BLOOD HEMATOPOIETIC STEM CELL POOL IN INDIVIDUALS CHRONICALLY EXPOSED TO RADIATION OVER A LONG-TERM PERIOD

Kotikova AI<sup>1,2</sup> ✉, Blinova EA<sup>1,2</sup>, Akleyev AV<sup>1,2</sup><sup>1</sup> Ural Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk, Russia<sup>2</sup> Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

Changes in the peripheral blood cellular composition were observed in the long term period in the residents of the Techa riverside villages chronically exposed to radiation, which may be the consequence of structural and functional disorders in the pool of hematopoietic stem cells (HSC) and progenitor cells. Therefore, the study was aimed to quantify peripheral blood CD34<sup>+</sup> cell pool in individuals chronically exposed to radiation over a long-term period. Sixty years after the onset of exposure, a total of 153 individuals were examined, who were divided into four groups: individuals exposed *in utero* and postnatally (the average postnatal absorbed dose was 570 mGy); individuals exposed only postnatally (the average postnatal absorbed dose was 790 mGy), and two comparison groups, in which the average postnatal absorbed dose to red bone marrow did not exceed 70 mGy. Absolute and relative peripheral blood CD34<sup>+</sup> cell counts in chronically exposed individuals were assessed by flow cytometry. No changes in CD34<sup>+</sup> cell counts compared to comparison group were revealed in the group of individuals exposed *in utero* and postnatally; no age-related changes were registered as well. However, a significant decline in absolute HSC and progenitor cell counts with increased absorbed dose to red bone marrow was observed. In the group of individuals exposed only postnatally, there was a significant increase in peripheral blood CD34<sup>+</sup> cell counts compared to comparison group ( $p = 0.004$  for absolute cell count;  $p = 0.009$  for relative cell count), dose-dependent increase in peripheral blood HSC and precursor cell counts ( $p = 0.02$  for absolute cell count;  $p = 0.03$  for relative cell count), along with age-related decline in these cells' counts ( $p = 0.02$  for absolute cell count;  $p = 0.04$  for relative cell count).

**Keywords:** hematopoietic stem cells, chronic exposure, late effects, peripheral blood, flow cytometry

**Funding:** the study was carried out within the framework of the State assignment "Human Cell-Mediated Immunity During Realization of Chronic Radiation Exposure Late Effects" (code 27.002.20.800).

**Author contribution:** Kotikova AI — method design, laboratory tests, statistical analysis, manuscript writing; Blinova EA — method design, manuscript writing; Akleyev AV — study concept, scientific management.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of Urals Research Center for Radiation Medicine (protocol № 3 dated July 20, 2021). All the subjects enrolled in the studies conducted by Laboratory of Molecular and Cellular Radiobiology of Urals Research Center for Radiation Medicine submitted the informed consent.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alisa I. Kotikova  
Vorovskogo, 68, corp. A, Chelyabinsk, Russia, 454141; kotikovaalisa@gmail.com

**Received:** 21.07.2021 **Accepted:** 10.08.2021 **Published online:** 03.09.2021

**DOI:** 10.47183/mes.2021.023

Более 60 лет назад жители сел, расположенных по берегам р. Течи, подвергались хроническому радиационному воздействию вследствие сброса жидких радиоактивных отходов ПО «Маяк». Особенностью указанного воздействия было неравномерное распределение дозы облучения по организму. Наибольшие дозы облучения пришлось на красный костный мозг (ККМ) за счет накопления остеотропного  $^{90}\text{Sr}$  в костной ткани [1]. В результате наблюдалось стабильное снижение показателей тромбоцитов и лейкоцитов в периферической крови облученных лиц в ранние сроки при мощности дозы более 0,3–0,5 Гр/год [2].

В настоящее время отмечают восстановление большинства пулов иммунокомпетентных клеток [3], но при этом регистрируют провоспалительный сдвиг в системе цитокинов и устойчивое снижение количества нейтрофилов на фоне нормальных значений КСФ-Г (гранулоцитарные колониестимулирующие факторы) и КСФ-ГМ (гранулоцитарно-макрофагальные колониестимулирующие факторы) [3, 4]. Причиной наблюдаемых спустя длительное время иммунологических эффектов могут быть структурные и функциональные нарушения пула гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и клеток-предшественников вследствие длительного радиационного воздействия как на ГСК, так и клетки микроокружения.

Целью работы было оценить количественные характеристики пула  $\text{CD34}^+$ -клеток периферической крови у хронически облученных лиц в отдаленном периоде.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 153 пациента клинического отделения Уральского научно-практического центра радиационной медицины. Критерии включения в исследование: проживание в одном из сел, расположенных

по берегам р. Течи, в 1950–1960 гг.; наличие рассчитанных индивидуальных накопленных доз облучения ККМ, тимуса и периферических лимфоидных органов [5]; отсутствие диагностического или терапевтического облучения в течение 6 месяцев до начала исследования; отсутствие в анамнезе онкологических, аутоиммунных, острых или хронических (период обострения) воспалительных заболеваний в течение 6 месяцев до начала исследования; отсутствие приема гормональных, антибиотических, цитостатических препаратов в течение 6 месяцев до начала исследования. Критерии исключения: несоответствие какому-либо из перечисленных выше критериев.

Все исследуемые лица были разделены на несколько групп: лица, рожденные в период с 1950 по 1960 г., лица, подвергшиеся облучению в период внутриутробного и постнатального развития, группа сравнения 1; лица, рожденные до 1949 г. включительно, подвергшиеся облучению только в период постнатального развития, группа сравнения 2. Группы сравнения составили пациенты, проживающие в схожих с облученными лицами экономических и социальных условиях, у которых поглощенная постнатальная доза облучения ККМ не превышала 70 мГр [6]. Характеристика обследованных лиц представлена в табл. 1.

Лица, облученные в период внутриутробного и постнатального развития, были значительно старше лиц из группы сравнения 1 ( $p < 0,001$ ). При этом стоит отметить, что обе группы находились в одном возрастном диапазоне (табл. 1). Значимых различий по этнической принадлежности и полу обнаружено не было (табл. 1).

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) и клетки-предшественники, несущие на своей поверхности рецептор  $\text{CD34}$ , преимущественно сосредоточены в костном мозге, однако небольшую часть таких клеток (около 10% от всех ГСК организма человека) также обнаруживают

Таблица 1. Характеристика исследуемых лиц

| Признак                                                                                                         |         | Лица, рожденные с 1950 по 1960 г. |                                                                              | Лица, рожденные до 1949 г. включительно |                                                                   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                 |         | Группа сравнения 1<br>$n^* = 60$  | Лица, облученные в период внутриутробного и постнатального развития $n = 27$ | Группа сравнения 2<br>$n = 19$          | Лица, облученные только в период постнатального развития $n = 47$ |
| Этническая принадлежность, % ( $n$ )                                                                            | Славяне | 62 (37)                           | 52 (14)                                                                      | 32 (6)                                  | 45 (21)                                                           |
|                                                                                                                 | Тюрки   | 38 (23)                           | 48 (13)<br>$p^{***} = 0,5$                                                   | 68 (13)                                 | 55 (26)<br>$p^{***} = 0,5$                                        |
| Пол, % ( $n$ )                                                                                                  | Мужчины | 40 (24)                           | 30 (8)                                                                       | 37 (7)                                  | 21 (10)                                                           |
|                                                                                                                 | Женщины | 60 (36)                           | 70 (19)<br>$p^{****} = 0,5$                                                  | 63 (12)                                 | 79 (37)<br>$p^{****} = 0,5$                                       |
| Средний возраст, лет, $M \pm SE^{**}$ (min–max)                                                                 |         | 63,71 $\pm$ 0,35 (60–69)          | 68,07 $\pm$ 0,25 (66–71)<br>$p^{*****} < 0,001$                              | 77,05 $\pm$ 1,06 (70–87)                | 74,72 $\pm$ 0,58 (70–84)<br>$p^{*****} = 0,06$                    |
| Поглощенная постнатальная доза облучения ККМ, мГр, $M \pm SE$ (min–max)                                         |         | 20 $\pm$ 2 (0–68)                 | 570 $\pm$ 90 (80–1720)                                                       | 10 $\pm$ 4 (0,4–50)                     | 790 $\pm$ 90 (80–2930)                                            |
| Поглощенная постнатальная доза облучения тимуса и периферических лимфоидных органов, мГр, $M \pm SE$ (min–max)  |         | 0,9 $\pm$ 0,2 (0–8)               | 80 $\pm$ 20 (2–430)                                                          | 8 $\pm$ 2 (0,08–30)                     | 110 $\pm$ 10 (8–370)                                              |
| Поглощенная внутриутробная доза облучения ККМ, мГр, $M \pm SE$ (min–max)                                        |         | 8 $\pm$ 2 (0,2–3)                 | 70 $\pm$ 20 (0–360)                                                          | –                                       | –                                                                 |
| Поглощенная внутриутробная доза облучения тимуса и периферических лимфоидных органов, мГр, $M \pm SE$ (min–max) |         | 0,9 $\pm$ 0,2 (0–8)               | 10 $\pm$ 7 (0–170)                                                           | –                                       | –                                                                 |

Примечание: \* $n$  — количество обследованных лиц; \*\* $M \pm SE$  — среднее  $\pm$  ошибка среднего; \*\*\* — уровень значимости межгрупповых различий по этнической принадлежности; \*\*\*\* — уровень значимости межгрупповых различий по половому признаку; \*\*\*\*\* — уровень значимости межгрупповых различий по возрастному признаку.

Таблица 2. Содержание CD34<sup>+</sup>-клеток в периферической крови исследуемых лиц

| Показатель      |                                                                                    | Абсолютное количество CD34 <sup>+</sup> -клеток, кл/мкл | Относительное количество CD34 <sup>+</sup> -клеток, % |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Me<br>(25%–75%) | Группа сравнения 1, <i>n</i> = 60                                                  | 37,00<br>(24–64)                                        | 0,04<br>(0,03–0,07)                                   |
|                 | Лица, облученные в период внутриутробного и постнатального развития, <i>n</i> = 27 | 31,00<br>(22–61)<br><i>p</i> <sub>1</sub> = 0,32        | 0,04<br>(0,03–0,06)<br><i>p</i> <sub>2</sub> = 0,67   |
|                 | Группа сравнения 2, <i>n</i> = 19                                                  | 20,00<br>(15–28)                                        | 0,03<br>(0,02–0,04)                                   |
|                 | Лица, облученные только в период постнатального развития, <i>n</i> = 47            | 36,00<br>(20–50)<br><i>p</i> <sub>3</sub> = 0,004       | 0,04<br>(0,03–0,07)<br><i>p</i> <sub>4</sub> = 0,009  |

**Примечание:** Me — медиана; *p*<sub>1</sub> — уровень значимости различий абсолютных показателей CD34<sup>+</sup>-клеток в группах лиц, рожденных с 1950 по 1960 г.; *p*<sub>2</sub> — уровень значимости различий относительных показателей CD34<sup>+</sup>-клеток в группах лиц, рожденных с 1950 по 1960 г.; *p*<sub>3</sub> — уровень значимости различий абсолютных показателей CD34<sup>+</sup>-клеток в группах лиц, рожденных до 1949 г. включительно; *p*<sub>4</sub> — уровень значимости различий относительных показателей CD34<sup>+</sup>-клеток в группах лиц, рожденных до 1949 г. включительно.

в периферической крови здоровых взрослых людей [7, 8]. Для исследования количественных показателей CD34<sup>+</sup>-клеток и иммунокомпетентных клеток у пациентов проводили взятие венозной крови из локтевой вены в объеме 9 мл натошак в вакуумную пробирку с K3-EDTA (Greiner Bio-One; Австрия). Определение количественных показателей CD34<sup>+</sup>-клеток в периферической крови исследуемых лиц проводили методом проточной цитометрии с использованием коммерческого набора StemKit Reagents (Beckman Coulter; Франция) на проточном цитометре Epics (Beckman Coulter; США) в соответствии с инструкцией производителя.

Статистическую обработку данных проводили в программе SigmaPlot (Systat Software Inc; США). Для сравнения показателей CD34<sup>+</sup>-клеток в периферической крови пациентов исследуемых групп использовали *U*-критерий Манна–Уитни. Различия считали значимыми при *p* < 0,05. Определение зависимости содержания CD34<sup>+</sup>-клеток в периферической крови от поглощенных доз облучения ККМ, тимуса и периферических лимфоидных органов и возраста проводили с применением непараметрического корреляционного анализа по методу Спирмена, корреляционные связи считали значимыми при *p* < 0,05. Качественную характеристику корреляционной связи давали на основании коэффициента корреляции, оцененного по шкале Чеддока.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию в период внутриутробного и постнатального развития, не были выявлены значимые изменения абсолютного и относительного количества CD34<sup>+</sup>-клеток периферической крови относительно группы сравнения 1 (*p* = 0,32 и *p* = 0,67 соответственно). При этом в группе лиц, облученных только постнатально, было отмечено значимое увеличение количественных показателей CD34<sup>+</sup>-клеток в периферической крови относительно лиц из группы сравнения 2 (табл. 2) (уровень значимости для различий абсолютного количества CD34<sup>+</sup>-клеток *p* = 0,004, а для различий относительного количества CD34<sup>+</sup>-клеток — *p* = 0,009).

Для группы лиц, рожденных с 1950 по 1960 г., было показано слабое значимое снижение абсолютного количества CD34<sup>+</sup>-клеток в зависимости от поглощенной постнатальной дозы облучения ККМ (*r* = –0,24; *p* = 0,03).

Кроме того в этой группе было обнаружено слабое значимое снижение как абсолютного (*r* = –0,26; *p* = 0,02), так и относительного (*r* = –0,23; *p* = 0,03) количества CD34<sup>+</sup>-клеток в периферической крови в зависимости от поглощенной постнатальной дозы облучения тимуса и периферических лимфоидных органов. Не обнаружены значимые зависимости исследуемых показателей от доз облучения, полученных в период внутриутробного развития (уровень значимости для поглощенной внутриутробной дозы облучения ККМ и абсолютного количества CD34<sup>+</sup>-клеток уровень значимости *p* = 0,94, для относительного количества — *p* = 0,98; для поглощенной внутриутробной дозы облучения тимуса и периферических лимфоидных органов и абсолютного количества CD34<sup>+</sup>-клеток *p* = 0,48, для относительного количества — *p* = 0,74). При проведении регрессионного анализа не было выявлено статистически значимых дозовых зависимостей для показателей CD34<sup>+</sup>-клеток в периферической крови лиц, рожденных с 1950 по 1960 г.

В группе лиц, рожденных до 1949 г. включительно, корреляционный анализ дозовой зависимости показателей количества CD34<sup>+</sup>-клеток в периферической крови показал слабое статистически значимое увеличение как абсолютного (*r* = 0,29; *p* = 0,02), так и относительного (*r* = 0,26; *p* = 0,03) количества CD34<sup>+</sup>-клеток в зависимости от поглощенной постнатальной дозы облучения ККМ. Статистически значимых корреляций показателей CD34<sup>+</sup>-клеток и поглощенной постнатальной дозы облучения тимуса и периферических лимфоидных органов обнаружено не было (уровень значимости для абсолютного количества ГСК и клеток-предшественников *p* = 0,14, для относительного количества — *p* = 0,19). Регрессионный анализ не выявил статистически значимых зависимостей количества CD34<sup>+</sup>-клеток от поглощенных постнатальных доз облучения ККМ, а также тимуса и периферических лимфоидных органов.

Чтобы отследить зависимость содержания CD34<sup>+</sup>-клеток от возраста, было принято решение объединить группу сравнения 1 (рожденные с 1950 по 1960 г.) с группой сравнения 2 (рожденные до 1949 г. включительно) для проведения корреляционного анализа. Для объединенной группы сравнения было показано умеренное значимое снижение абсолютного (*r* = –0,58; *p* < 0,001) и относительного (*r* = –0,44; *p* < 0,001) количества CD34<sup>+</sup>-клеток в периферической крови с возрастом. Зависимость количества ГСК и клеток-предшественников

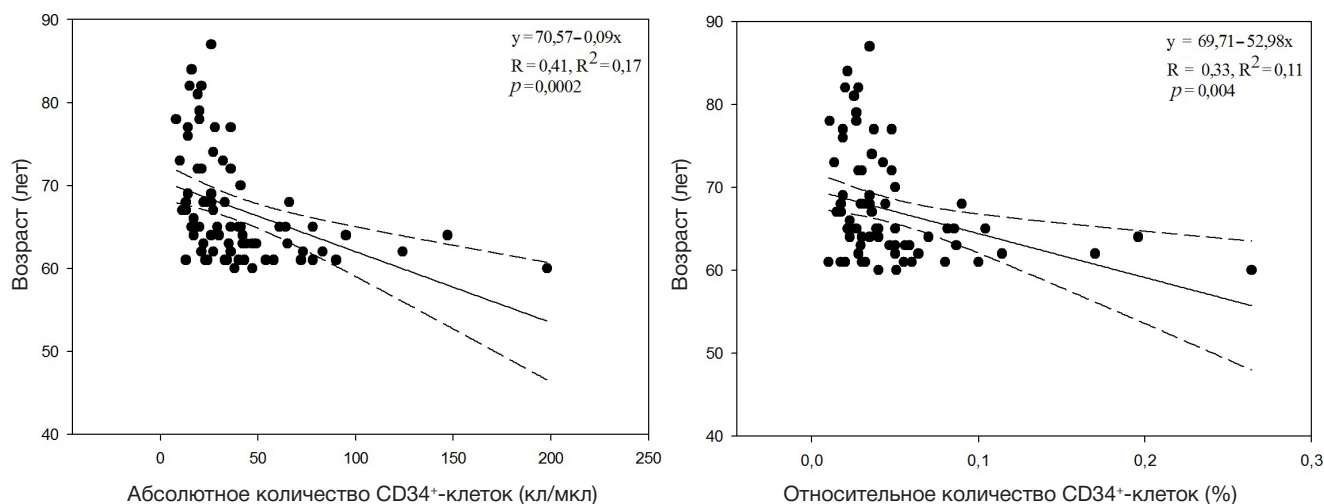


Рис. Зависимость показателей CD34<sup>+</sup>-клеток в периферической крови лиц из объединенной группы сравнения от возраста

в крови лиц из объединенной группы сравнения от возраста исследовали с применением регрессионного анализа. Результаты регрессионного анализа зависимости абсолютного и относительного количества CD34<sup>+</sup>-клеток периферической крови от возраста лиц из объединенной группы сравнения представлены на рис.

В группе лиц, облученных в период внутриутробного и постнатального развития, на момент исследования не было отмечено статистически значимой корреляционной зависимости показателей абсолютного ( $p = 0,14$ ) и относительного ( $p = 0,36$ ) количества CD34<sup>+</sup>-клеток в периферической крови от возраста.

В группе лиц, облученных только в постнатальном периоде, было выявлено статистически значимое снижение количества CD34<sup>+</sup>-клеток в периферической крови с возрастом на момент исследования (уровень значимости для абсолютного количества  $p = 0,02$  ( $r = -0,33$ ), для относительного количества —  $p = 0,04$  ( $r = -0,29$ )). Проведенный регрессионный анализ не выявил значимой зависимости количества ГСК и клеток-предшественников в периферической крови лиц, облученных только в постнатальном периоде, от возраста.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время надежные данные о состоянии пула ГСК в отдаленные сроки после хронического радиационного воздействия отсутствуют. Однако имеются данные, полученные в результате экспериментов на мышах, которые показывают следующие отдаленные эффекты радиационного воздействия: стойкие фенотипические изменения в популяции ГСК красного костного мозга [10], повышение уровня апоптоза ГСК, а также накопление повреждений ДНК гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников [10–12]. Наблюдаемые эффекты предположительно являются результатом асимметричного деления ГСК в костном мозге, при котором одна из двух дочерних клеток остается стволовой и сохраняет в себе возникающие вследствие радиационного воздействия на материнскую клетку нарушения генома, и эффекта свидетеля, зарегистрированного в эксперименте по трансплантации облученных и необлученных ГСК мыши [12]. Результатом всех перечисленных выше долгосрочных проявлений радиационного воздействия может стать функциональная несостоятельность ГСК и клеток-предшественников в отдаленном периоде.

В работе представлены предварительные результаты исследования пула ГСК и клеток-предшественников периферической крови хронически облученных жителей прибрежных сел реки Течи в отдаленные сроки после начала облучения. Исследование количества CD34<sup>+</sup>-клеток в периферической крови хронически облученных лиц проводили на фоне инволюционных изменений спустя 60 лет после начала облучения. Ранее при исследовании в отдаленные сроки у жителей прибрежных сел реки Течи был отмечен высокий уровень нестабильных хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови, который нельзя объяснить текущими дозами облучения [13].

Выявленное в ходе проведенного исследования дозозависимое снижение количества CD34<sup>+</sup>-клеток в периферической крови лиц, облученных в период внутриутробного и постнатального развития, может быть вызвано радиационно-индуцированным повреждением пула ГСК именно в период эмбрионального развития, наиболее чувствительный к воздействию ионизирующего облучения [14]. При этом отсутствие возрастных изменений содержания ГСК и клеток-предшественников в периферической крови указанной группы исследования можно объяснить тем, что возрастной диапазон группы лиц, облученных в период внутриутробного и постнатального развития, был недостаточным (всего пять лет) для обнаружения зависимости. Следует отметить, что в группе лиц, облученных только в постнатальном периоде, обнаружена отрицательная зависимость количества CD34<sup>+</sup>-клеток от возраста обследованных лиц. Обнаруженное в группе лиц, облученных только постнатально, снижение количества CD34<sup>+</sup>-клеток с возрастом не противоречит данным литературы, в которой описано уменьшение пула ГСК и клеток-предшественников в периферической крови японцев, выживших после атомной бомбардировки Хиросимы [7, 9, 15].

Пожилый возраст облученных лиц создает определенную нагрузку для организма. Так, например, показано изменение метаболизма ГСК и клеток-предшественников с возрастом [16], ведущее к ухудшению адаптационных способностей клеток. Подобные инволюционные процессы на фоне хронического облучения позволяют регистрировать эффекты дефицита пула ГСК и клеток-предшественников в отдаленные сроки после хронического радиационного воздействия.

Кроме того, в группе лиц, облученных только в постнатальном периоде, наблюдаются положительная

корреляция количества ГСК и клеток-предшественников с поглощенной постнатальной дозой облучения ККМ и увеличение этих показателей относительно группы сравнения 2. При этом у лиц, облученных только в постнатальном периоде онтогенеза, даже спустя 60 и более лет после начала хронического радиационного воздействия регистрируют изменения клеточного состава периферической крови, а именно пониженное содержание нейтрофилов и лимфоцитов [3]. Таким образом, полученные нами данные могут отражать активацию компенсаторных механизмов, обеспечивающих постоянную пролиферацию ГСК и клеток-предшественников в ответ на описанные выше изменения.

Полученные данные о дозовых зависимостях содержания CD34<sup>+</sup>-клеток в периферической крови хронически облученных лиц отличаются от ранее опубликованных данных [16], не выявивших связанных с дозой облучения изменений количества ГСК и клеток-предшественников в периферической крови стареющей когорты выживших после атомной бомбардировки Хиросимы. Данный факт может быть обусловлен характером радиационного воздействия — жители сел, расположенных по берегам р. Течи, подвергались хроническому облучению в основном от остеотропного <sup>90</sup>Sr, воздействовавшего именно на кроветворные участки ККМ.

## ВЫВОДЫ

Результаты исследования демонстрируют увеличение пула гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и клеток-предшественников в периферической крови лиц, облученных в постнатальном периоде. По количеству CD34<sup>+</sup>-клеток в периферической крови группа лиц, облученных в период внутриутробного и постнатального развития, сопоставима с группой сравнения 1. Установлены слабые значимые дозовые зависимости показателей CD34<sup>+</sup>-клеток для лиц, облученных в период внутриутробного и постнатального развития, и лиц, облученных только в период постнатального развития. При этом зависимости носят разнонаправленный характер: количество ГСК и клеток-предшественников в периферической крови лиц, облученных в период внутриутробного и постнатального развития, дозозависимо снижается, а в крови лиц, облученных только в период постнатального развития — увеличивается. Полученные результаты являются предварительными. Дальнейшие исследования позволят получить более надежные данные о влиянии низкоинтенсивного облучения ККМ на количественный состав ГСК и клеток-предшественников в отдаленные сроки после хронического радиационного воздействия.

## Литература

1. Аклеев А. В. и др., редакторы. Последствия радиоактивного загрязнения реки Течи. Федеральное медико-биологическое агентство, Уральский научно-практический центр радиационной медицины. Челябинск, 2016; 390 с.
2. ICRP Statement on tissue reactions. Early and late effects of radiation in normal tissues and organs — threshold doses for tissue reactions in a radiation protection context. ICRP Publication 118. Ann ICRP. 2012; 41 (1/2); 322 p.
3. Аклеев А. А. Иммунный статус человека в отдаленном периоде хронического радиационного воздействия. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2020; 65 (4): 29–35. DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-4-29-35.
4. Варфоломеева Т. А., Аклеев А. А., Мандрыкина А. С. Показатели гомеостаза в отдаленном периоде у лиц, подвергшихся хроническому облучению на Южном Урале. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2016; 61 (2): 39–45.
5. Дегтева М. О., Напье Б.А., Толстых Е.И., Шишкина Е. А., Бугров Н. Г., Крестинина Л. Ю., Аклеев А. В. Распределение индивидуальных доз в когорте людей, облученных в результате радиоактивного загрязнения реки Течи. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2019; 64 (3): 46–53. DOI: 10.12737/article\_5cf2364cb49523.98590475.
6. СанПин 2.6.1.2523-09 «Нормы радиационной безопасности (НРБ - 99/2009)». М., 2009; 225 с.
7. Kato K, Omori A, Kashiwakura I. Radiosensitivity of human haematopoietic stem/progenitor cells. J Radiol Prot. 2013; 33 (1): 71–80. DOI:10.1088/0952-4746/33/1/71.
8. Mauch P, Constine L, Greenberger J, et al. Hematopoietic stem cell compartment: acute and late effects of radiation therapy and chemotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1995; 31 (5): 1319–39. DOI: 10.1016/0360-3016(94)00430-S.
9. Kato K, Kuwabara M, Kashiwakura I. The influence of gender- and age-related differences in the radiosensitivity of hematopoietic progenitor cells detected in steady-state human peripheral blood. J Radiat Res. 2011; 52 (3): 293–9. DOI: 10.1269/jrr.10142.
10. Simonnet AJ, Nehmé J, Vaigot P, Barroca V, Leboulch P, Tronik-Le Roux D. Phenotypic and functional changes induced in hematopoietic stem/progenitor cells after gamma-ray radiation exposure. Stem Cells. 2009; 27 (6): 1400–9. DOI: 10.1002/stem.66.
11. Lorimore SA, Wright EG. Radiation-induced genomic instability and bystander effects: related inflammatory-type responses to radiation-induced stress and injury? A review. Int J Radiat Biol. 2003; 79 (1): 15–25.
12. Harfouche G, Martin MT. Response of normal stem cells to ionizing radiation: a balance between homeostasis and genomic stability. Mutat Res. 2010; 704 (1–3): 167–74. DOI: 10.1016/j.mrrev.2010.01.007.
13. Vozilova AV, Shagina NB, Degteva MO, Akleyev AV. Chronic radioisotope effects on residents of the Techa river (Russia) region: Cytogenetic analysis more than 50 years after onset of exposure. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2013; 756 (1–2): 115–18. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2013.05.016.
14. Barber RC, Hardwick RJ, Shanks ME, et al. The effects of in utero irradiation on mutation induction and transgenerational instability in mice. Mutat Res. 2009; 664: 6–12. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2009.01.011.
15. Воротеляк Е. А., Васильев А. В., Терских В. В. Проблема дефиниции стволовой клетки. Цитология. 2019; 61 (1): 3–15. DOI: 10.1134/S0041377119010073.
16. Kyoizumi S, Kubo Y, Misumi M, et al. Circulating hematopoietic stem and progenitor cells in aging atomic bomb survivors. Radiat Res. 2016; 185 (1): 69–76. DOI:10.1667/RR14209.1.

## References

1. Akleyev AV, et al., editors. Consequences of radioactive contamination of the Techa River. Federal Medical and Biological Agency, Ural Research Center for Radiation Medicine. Chelyabinsk, 2016; 390 p. Russian.

2. ICRP Statement on tissue reactions. Early and late effects of radiation in normal tissues and organs — threshold doses for tissue reactions in a radiation protection context. ICRP Publication 118. Ann ICRP. 2012; 41 (1/2): 322 p.
3. Akleyev AA. Immune status of a man long after chronic radiation exposure. medical radiology and radiation safety. 2020; 65 (4): 29–35. DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-4-29-35. Russian.
4. Varfolomeyeva TA, Akleyev AA, Mandrykina AS. The characteristics of homeostasis in individuals chronically exposed to radiation in the South Urals at late time after exposure. Medical Radiology and Radiation Safety. 2016; 61 (2): 39–45. Russian.
5. Degteva MO, Napier BA, Tolstykh EI, Shishkina EA, Bougrov NG, Krestinina LYu, Akleyev AV. Individual dose distribution in cohort of people exposed as a result of radioactive contamination of the Techa river. Medical Radiology and Radiation Safety. 2019; 64 (3): 46–53. DOI: 10.12737/article\_5cf2364cb49523.98590475. Russian.
6. SanPin 2.6.1.2523-09 "Standards of radiation safety (NRB - 99/2009)". M., 2009; 225p.
7. Kato K, Omori A, Kashiwakura I. Radiosensitivity of human haematopoietic stem/progenitor cells. J Radiol Prot. 2013; 33 (1): 71–80. DOI:10.1088/0952-4746/33/1/71.
8. Mauch P, Constine L, Greenberger J, et al. Hematopoietic stem cell compartment: acute and late effects of radiation therapy and chemotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1995; 31 (5): 1319–39. DOI: 10.1016/0360-3016(94)00430-S.
9. Kato K, Kuwabara M, Kashiwakura I. The influence of gender- and age-related differences in the radiosensitivity of hematopoietic progenitor cells detected in steady-state human peripheral blood. J Radiat Res. 2011; 52 (3): 293–9. DOI: 10.1269/jrr.10142.
10. Simonnet AJ, Nehmé J, Vaigot P, Barroca V, Leboulch P, Tronik-Le Roux D. Phenotypic and functional changes induced in hematopoietic stem/progenitor cells after gamma-ray radiation exposure. Stem Cells. 2009; 27 (6): 1400–9. DOI: 10.1002/stem.66.
11. Lorimore SA, Wright EG. Radiation-induced genomic instability and bystander effects: related inflammatory-type responses to radiation-induced stress and injury? A review. Int J Radiat Biol. 2003; 79 (1): 15–25.
12. Harfouche G, Martin MT. Response of normal stem cells to ionizing radiation: a balance between homeostasis and genomic stability. Mutat Res. 2010; 704 (1–3): 167–74. DOI: 10.1016/j.mrrev.2010.01.007.
13. Vozilova AV, Shagina NB, Degteva MO, Akleyev AV. Chronic radioisotope effects on residents of the Techa river (Russia) region: Cytogenetic analysis more than 50 years after onset of exposure. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2013; 756 (1–2): 115–18. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2013.05.016.
14. Barber RC, Hardwick RJ, Shanks ME, et al. The effects of in utero irradiation on mutation induction and transgenerational instability in mice. Mutat Res. 2009; 664: 6–12. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2009.01.011.
15. Vorotelyak EA, Vasiliev AV, Terskikh VV. The problem of stem cell definition. Cytology. 2019; 61 (1): 3–15. DOI: 10.1134/S0041377119010073.
16. Kyoizumi S, Kubo Y, Misumi M, et al. Circulating hematopoietic stem and progenitor cells in aging atomic bomb survivors. Radiat Res. 2016; 185 (1): 69–76. DOI:10.1667/RR14209.1.

## МЕТИЛИРОВАНИЕ ГЕНОВ *BCL-2*, *CDKN1A* И *ATM* У ЛИЦ, ПОДВЕРГШИХСЯ ХРОНИЧЕСКОМУ ОБЛУЧЕНИЮ

Е. А. Блинова<sup>1,2</sup>✉, В. С. Никифоров<sup>1,2</sup>, М. А. Янишевская<sup>1</sup>, А. В. Аклев<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Уральский научно-практический центр радиационной медицины Федерального медико-биологического агентства, Челябинск, Россия

<sup>2</sup> Челябинский государственный университет, Челябинск, Россия

Метилирование ДНК является наиболее распространенной эпигенетической модификацией, вызываемой ионизирующим излучением. При этом можно наблюдать как гиперметилирование, которое подавляет транскрипцию промоторных областей генов, так и гипометилирование, приводящее к активации генов. Оба указанных механизма могут принимать участие в канцерогенезе. Целью настоящего исследования было оценить статус метилирования CpG-островков промоторов генов защитных систем *BCL-2*, *CDKN1A* и *ATM* в клетках периферической крови у хронически облученных жителей прибрежных сел р. Течи (Челябинская область) в отдаленные сроки. Оценку метилирования промоторных регионов генов *BCL-2*, *CDKN1A* и *ATM* у 68 человек, проживающих в селах, расположенных по берегам р. Течи, проводили методом метилспецифичной ПЦР в реальном времени. В группу облученных лиц вошли 54 человека, у которых кумулятивные дозы красного костного мозга находились в диапазоне от 0,09 до 3,51 Гр. Группа сравнения состояла из 14 человек, проживающих в схожих социально-экономических условиях с накопленной дозой облучения красного костного мозга менее 70 мГр за весь период своей жизни. В результате проведенного пилотного исследования у облученных лиц в отдаленном периоде после хронического низкоинтенсивного радиационного воздействия не были выявлены значимые изменения в уровне метилирования CpG-островков промоторных регионов генов *CDKN1A*, *BCL-2*, *ATM* относительно группы сравнения, также не были отмечены изменения в дозовых подгруппах «от 87 до 994 мГр» и «более 1000 мГр».

**Ключевые слова:** метилирование ДНК, CpG-островки, отдаленные эффекты облучения, хроническое облучение, метилспецифичная ПЦР

**Финансирование:** исследование в рамках государственного задания Федерального медико-биологического агентства России «Состояние клеточного иммунитета человека в период реализации отдаленных эффектов хронического радиационного воздействия» (27.002.20.800).

**Вклад авторов:** Е. А. Блинова — анализ литературы, экспериментальная часть, обработка данных, написание текста статьи; В. С. Никифоров — анализ литературы, экспериментальная часть, написание текста статьи; М. А. Янишевская — экспериментальная часть, редактирование текста статьи; А. В. Аклев — общее руководство, написание текста статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГБУН УНПЦ РМ ФМБА России (протокол № 2 от 20 июля 2021 г.). Все обследованные лица подписали информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Евгения Андреевна Блинова  
ул. Воровского, д. 68, корп. 1, г. Челябинск, 454141; blinova@urcrm.ru

**Статья получена:** 27.07.2021 **Статья принята к печати:** 29.08.2021 **Опубликована онлайн:** 21.09.2021

**DOI:** 10.47183/mes.2021.028

## *BCL-2*, *CDKN1A* AND *ATM* GENE METHYLATION IN CHRONICALLY EXPOSED INDIVIDUALS

Blinova EA<sup>1,2</sup>✉, Nikiforov VS<sup>1,2</sup>, Yanishevskaya MA<sup>1</sup>, Akleyev AV<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Urals Research Center for Radiation Medicine of the Federal Medical Biological Agency, Chelyabinsk, Russia

<sup>2</sup> Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

DNA methylation is the most common epigenetic modification, caused by ionizing radiation. There may be both hypermethylation, which suppresses transcription of gene promoter regions, and hypomethylation, resulting in gene activation. Both mechanisms may be involved in carcinogenesis. The study was aimed to assess methylation status of CpG islands in the protective system *BCL-2*, *CDKN1A* and *ATM* gene promoters in the peripheral blood cells of the chronically exposed individuals, living in the villages, located along the Techa River, over a long-term period. Methylation of *BCL-2*, *CDKN1A* and *ATM* gene promoter regions in 68 residents of the villages, located along the Techa River (Chelyabinsk region), was assessed by the real-time methylation-specific PCR. The group of exposed individuals included 54 people with accumulated dose to red bone marrow within the range of 0.09–3.51 Gy. The comparison group included 14 people, living in similar economic and social environment, with the dose to red bone marrow, accumulated during the whole life, not exceeding 70 mGy. The pilot study of exposed individuals over a long period of time after chronic low-dose radiation exposure revealed no significant changes in methylation levels of CpG islands in the *CDKN1A*, *BCL-2*, *ATM* gene promoter regions compared to the comparison group. None were revealed in the dose subgroups “87–994 mGy” and “over 1000 mGy”.

**Keywords:** DNA methylation, CpG islands, long-term effects of exposure, chronic exposure, methylation-specific PCR

**Funding:** the study was carried out within the framework of the State assignment of Russian Federal Medical Biological Agency “Human Cell-Mediated Immunity During Realization of Chronic Radiation Exposure Late Effects” (code 27.002.20.800).

**Author contribution:** Blinova EA — literature analysis, experimental procedure, data processing, manuscript writing; Nikiforov VS — literature analysis, experimental procedure, manuscript writing; Yanishevskaya MA — experimental procedure, manuscript editing; Akleyev AV — general management, manuscript writing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of Ural Research Center for Radiation Medicine of Russian Federal Medical Biological Agency (protocol № 2 dated July 20, 2021). The informed consent was submitted by all examined individuals.

✉ **Correspondence should be addressed:** Evgeniya A. Blinova  
Vorovskogo, 68, korp. 1, Chelyabinsk, 454141; blinova@urcrm.ru

**Received:** 27.07.2021 **Accepted:** 29.08.2021 **Published online:** 21.09.2021

**DOI:** 10.47183/mes.2021.028

Метилирование ДНК является наиболее распространенной эпигенетической модификацией, играющей важную роль в регуляции клеточных процессов, прежде всего экспрессии генов и геномной нестабильности [1]. Из всех эпигенетических модификаций наиболее широко изучено гиперметилирование, которое подавляет транскрипцию промоторных областей генов, приводя к уменьшению экспрессии генов или полному их выключению [2]. Однако в последнее время все больше появляется информация о глобальном гипометилировании генов как факторе развития онкогенеза [3].

Являясь достаточно лабильной системой, статус метилирования ДНК в значительной степени зависит от эндогенных факторов (аберрантная активность метилтрансфераз, нарушение работы систем репарации клетки) [4] и экзогенных факторов, в том числе от факторов радиационной природы. Так, в экспериментальных исследованиях на мышах показано выраженное аномальное метилирование промотора гена опухолевого супрессора *p16(INKa)* при хроническом низкодозовом воздействии (50 сГр). При этом авторы указывают, что хроническое воздействие радиации в малых дозах является более сильным индуктором эпигенетических эффектов, а значит и дестабилизации генома, чем острое облучение в той же дозе [5].

Однако, несмотря на активное изучение статуса метилирования у человека при воздействии различных неблагоприятных факторов, в настоящее время существуют единичные работы, свидетельствующие об индукции и сохранении в течение длительного времени эпигенетических модификаций в лейкоцитах периферической крови человека после облучения. Имеющиеся результаты ряда исследований демонстрируют, что ионизирующее излучение опосредует стойкое изменение статуса метилирования ДНК в широком диапазоне доз. Так, в исследовании [6] описано радиационно-индуцированное аберрантное метилирование генов *GSTP1*, *CDKN2A*, *ARF* и *RASSF1A* в отдаленные сроки после облучения у ликвидаторов аварии на ЧАЭС. У рентгенологов, подвергшихся радиационному воздействию в диапазоне малых доз, уровень метилирования генома был достоверно ниже, чем у людей, не подвергавшихся облучению [7]. Гипометилирование было выявлено в исследовании [8]: с увеличением дозы облучения в лимфоцитах крови работников, подвергавшихся профессиональному внешнему облучению, наблюдалось снижение степени метилирования генов апоптоза (*BAD*, *BID*, *HRK*). Подобный эффект может свидетельствовать о дифференциальном характере ответа эпигенома на радиационное воздействие в низких и высоких дозах.

Для того чтобы сделать надежные выводы о влиянии метилирования ДНК на фенотип, изменения в статусе метилирования промоторных участков генов необходимо представить в контексте изменения паттернов экспрессии генов. Ранее нами было показано, что в отдаленные сроки в клетках периферической крови облученных лиц наблюдается изменение со стороны экспрессии мРНК генов системы гомеостаза и иммунного ответа клеток. В частности, в отдаленные сроки у хронически облученных людей отмечали низкие показатели относительного содержания мРНК генов *BCL-2* и *NFKB1* и высокие уровни мРНК генов *BAX* и *PADI4*. Было показано снижение экспрессии мРНК генов *CDKN1A* и *ATM* у лиц с дозами облучения красного костного мозга (ККМ), превышающими 1000 мГр [9].

Целью настоящего исследования было оценить статус метилирования CpG-островков промоторов генов *BCL-2*, *CDKN1A* и *ATM* в клетках периферической крови у хронически облученных жителей сел, расположенных по берегам р. Течи, в отдаленные сроки.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Оценку метилирования промоторных регионов генов осуществляли у лиц, проживающих в селах, расположенных по берегам р. Течи (Челябинская область). Отбор обследованных лиц проводили с использованием медико-дозиметрической базы данных «Человек», разработанной отделом «База данных — «Человек» ФГБУН УНПЦ РМ ФМБА России. Критерии включения: год рождения обследуемого до 1960 включительно, постоянное проживание на прибрежных территориях р. Течи в период 1950–1960 гг., наличие реконструированной индивидуальной поглощенной дозы облучения ККМ, рассчитанной по дозиметрической системе TRDS (Techa River Dosimetry System, версия 2016) специалистами биофизической лаборатории ФГБУН УНПЦ РМ [10]. Критерии исключения: наличие хронических воспалительных, онкологических и аутоиммунных заболеваний, прием антибиотиков, гормональных и цитостатических препаратов, диагностическое облучение в течение 6 месяцев до момента взятия образца крови, наличие контакта с химическими (генотоксичными) агентами в связи с профессиональной деятельностью.

В группу облученных лиц вошли 54 человека, у которых кумулятивные дозы облучения красного костного мозга (ККМ) находились в диапазоне от 87 до 3510 мГр (среднее значение —  $960 \pm 100$  мГр). Суммарные дозы облучения ККМ большинства облученных людей (36 человек (66,7%)) находились в диапазоне промежуточных значений от 100 до 994 мГр. Дозы, превышающие 1000 мГр, получили 18 человек (33,3%). Группа сравнения состояла из 14 человек, проживающих в сходных социально-экономических и хозяйственно-бытовых условиях (сельское население), но с интенсивностью облучения ККМ, не превышавшей 1 мГр/год, и накопленной дозой менее 70 мГр за весь период жизни. Обследуемые группы включали лиц обоего пола, принадлежавших к следующим этническим группам: тюрки (в основном татары, башкиры) и славяне, представленные преимущественно русскими. Характеристика исследуемых групп представлена в табл. 1.

Исследование уровня метилирования ДНК проводили в лейкоцитах периферической крови. Забор материала осуществляли утром натощак в стерильные вакуумные пробирки с ЭДТА-КЗ. ДНК из цельной крови экстрагировали с использованием набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific; CUSA) в соответствии с протоколом производителя.

Метод определения метилирования ДНК был основан на специфической детекции 5-метилцитозина или продуктов его превращения в результате бисульфитной конверсии. Проводили полную денатурацию геномной ДНК и обработку бисульфитом в условиях, при которых цитозин стехиометрически конвертировался в урацил, тогда как 5-метилцитозин модификациям не подвергался. Бисульфитная конверсия была выполнена с использованием набора реагентов EpiJET Bisulfite Conversion Kit (Thermo Scientific; CUSA) в соответствии с протоколом производителя.

Таблица 1. Характеристика обследованной группы лиц

| Характеристика групп                         |         | Группа облученных<br><i>n</i> = 54 | Группа сравнения<br><i>n</i> = 14 |
|----------------------------------------------|---------|------------------------------------|-----------------------------------|
| Возраст, лет, mean ± SD (min–max)            |         | 73,5 ± 0,57 (65–83)                | 74,0 ± 0,97 (68–79)               |
| Пол, N, (%)                                  | Мужчины | 15 (27,8)                          | 4 (28,6)                          |
|                                              | Женщины | 39 (72,2)                          | 10 (79,0)                         |
| Этническая группа, N, (%)                    | Славяне | 29 (46,3)                          | 7 (50,0)                          |
|                                              | Тюрки   | 31 (53,7)                          | 7 (50,0)                          |
| Средняя доза ККМ, мГр<br>mean ± SD (min–max) |         | 960 ± 100<br>(87–3510)             | 22 ± 4<br>(3–49)                  |

После обработки ДНК бисульфитом проводили амплификацию с праймерами, специфичными для метилированных и неметилированных участков ДНК. Поиск праймеров для ПЦР фрагментов промоторных регионов генов системы клеточного гомеостаза (*ATM*, *BCL-2*, *CDKN1A*) был проведен на основании имеющихся литературных данных. Олигонуклеотиды были синтезированы фирмой ДНК-Синтез (Россия). Характеристика праймеров представлена в табл. 2.

Определение статуса метилирования интересующих нас последовательностей генов осуществляли методом метилспецифической ПЦР в реальном времени (МС-ПЦР РВ) на амплификаторе StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems; США). Для проведения МС-ПЦР РВ использовали готовую реакционную смесь qPCRmix-HS SYBR (Евроген; Россия), состоящую из высокопроцессивной Taq ДНК-полимеразы со специфическими моноклональными антителами, красителя SYBR Green I, смеси дНТФ, Mg<sup>2+</sup> и ПЦР буфера. Объемы компонентов ПЦР смеси и условия амплификации соответствовали протоколу и инструкции производителя.

Наличие целевого продукта в ПЦР смеси после проведения реакции амплификации оценивали методом электрофореза в 2%-м агарозном геле. Основываясь на результатах данного анализа, качественно оценивали наличие или отсутствие aberrантного метилирования в исследуемых пробах.

В качестве положительного контроля метилирования для всех генов была использована геномная ДНК человека CpG Methylated Human Genomic DNA (Thermo Scientific; США) с известным уровнем метилирования (≥ 98%).

Для каждой пробы проводили ПЦР с праймерами для метилированных и неметилированных последовательностей генов. Визуализацию результатов

гель-электрофореза проводили с использованием системы гель-документирования Gel Doc XR+ (BioRad; США). Присутствие ампликатов на гель-электрофорезе, нарабатанных в процессе МС-ПЦР РВ с праймерами для метилированных участков генов, указывало на наличие aberrантного метилирования, а наличие ампликатов с праймерами для неметилированных участков генов свидетельствовало об отсутствии метилирования.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного комплекса Statistica (StatSoft; США). Для сравнения данных использовали точный критерий Фишера. Различия считали значимыми при *p* < 0.05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Число случаев метилирования CpG-островков промоторов генов *BCL-2*, *CDKN1A* и *ATM* в клетках периферической крови у хронически облученных лиц представлено в табл. 3.

Частота случаев метилирования CpG-островков промоторных регионов генов *CDKN1A*, *BCL-2*, *ATM* в группе облученных лиц значимо не отличалась от группы сравнения. При оценке случаев метилирования CpG островков у обследованных лиц в дозовых подгруппах «от 87 до 994 мГр» и «более > 1000 мГр» также не выявлено значимых различий с группой сравнения.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Эпигенетическая регуляция, в том числе метилирование ДНК, играет важную роль в клеточных процессах, обеспечивая правильную регуляцию экспрессии генов. Однако aberrантное метилирование может приводить

Таблица 2. Характеристика используемых в работе олигонуклеотидов

| Ген           | Тип праймера | Последовательности праймеров (5'–3')                                | Tm, °C | Длина ампликона, п.н. | Ссылка |
|---------------|--------------|---------------------------------------------------------------------|--------|-----------------------|--------|
| <i>BCL-2</i>  | Meth         | Forward GTTTTTCAGCGTTCGGTATCGG<br>Reverse AAATCTCTATCCACGAAACCGC    | 60     | 192                   | [8]    |
|               | Unmeth       | Forward GGGTTTTTGTGTTTGGTATTGG<br>Reverse AAATCTCTATCCACGAAACCACTTC | 59     | 194                   |        |
| <i>ATM</i>    | Meth         | Forward GGAGTTCGAGTCGAAGGGC<br>Reverse CTACCTACTCCCGCTTCCGA         | 59     | 239                   | [9]    |
|               | Unmeth       | Forward GTTTTGGAGTTTGTGTTGAAGGGT<br>Reverse AACTACCTACTCCCACTTCCAA  | 56     | 246                   |        |
| <i>CDKN1A</i> | Meth         | Forward GTCGAAGTTAGTTTGTGGAGTC<br>Reverse CGAAATCCCCTATTATCTACGC    | 65     | 230                   | [10]   |
|               | Unmeth       | Forward TTGAAGTTAGTTTGTGGAGTTG<br>Reverse CCAAAATCCCCTATTATCTACCAC  | 66     | 230                   |        |

Примечание: Tm — температура плавления; Meth — метилированный праймер; Unmeth — неметилированный праймер.

**Таблица 3.** Частота случаев метилирования CpG-островков промоторов генов *BCL-2*, *CDKN1A* и *ATM* в клетках периферической крови у хронически облученных лиц

| Ген/ <i>n</i> <sup>1</sup> | Группа сравнения с дозами < 49 мГр |                    | Все облученные лица с дозами от 87 до 3510 мГр |                    | Облученные лица с дозами от 87 до 994 мГр |                    | Облученные лица с дозами > 1000 мГр |                    |
|----------------------------|------------------------------------|--------------------|------------------------------------------------|--------------------|-------------------------------------------|--------------------|-------------------------------------|--------------------|
|                            | МП % ( <i>n</i> )                  | НМП % ( <i>n</i> ) | МП % ( <i>n</i> )                              | НМП % ( <i>n</i> ) | МП % ( <i>n</i> )                         | НМП % ( <i>n</i> ) | МП % ( <i>n</i> )                   | НМП % ( <i>n</i> ) |
| <i>CDKN1A</i>              | 7,1 (1)                            | 92,9 (13)          | 0,0 (0)                                        | 100 (53)           | 0 (0)                                     | 100 (36)           | 0 (0)                               | 100 (17)           |
|                            |                                    |                    | F                                              | <i>p</i>           | F                                         | <i>p</i>           | F                                   | <i>p</i>           |
|                            |                                    |                    | 0,21                                           | >0,05              | 0,28                                      | >0,05              | 0,45                                | >0,05              |
| <i>BCL-2</i>               | 18,2 (2)                           | 81,8 (9)           | 40,4 (21)                                      | 59,6 (31)          | 50 (17)                                   | 50 (17)            | 22,2 (4)                            | 77,8 (14)          |
|                            |                                    |                    | F                                              | <i>p</i>           | F                                         | <i>p</i>           | F                                   | <i>p</i>           |
|                            |                                    |                    | 0,3                                            | >0,05              | 0,08                                      | >0,05              | 1                                   | >0,05              |
| <i>ATM</i>                 | 63,6 (7)                           | 36,4 (4)           | 83,7 (41)                                      | 16,3 (8)           | 82,4 (28)                                 | 17,6 (6)           | 86,7 (13)                           | 13,3 (2)           |
|                            |                                    |                    | F                                              | <i>p</i>           | F                                         | <i>p</i>           | F                                   | <i>p</i>           |
|                            |                                    |                    | 0,2                                            | >0,05              | 0,23                                      | >0,05              | >0,05                               | 1                  |

**Примечание:** МП — число лиц с метилированным промотором; НМП — число лиц с неметилированным промотором; F — точный критерий Фишера; *p* — уровень значимости.

к развитию различных патологических состояний, нестабильности генома и раку [11]. Известно, что будучи генотоксическим агентом, ионизирующее излучение способствует как гипер-, так и гипометилированию ДНК. В большинстве исследований *in vitro* и *in vivo*, показано, что в ранние сроки после облучения (часы, дни) эпигенетический статус генома изменяется достаточно динамично [12], при этом имеются лишь единичные исследования статуса метилирования ДНК у человека в отдаленные сроки после радиационного воздействия. Так, у ликвидаторов аварии на ЧАЭС и работников реакторного и радиохимического производств ПО «Маяк» было выявлено гиперметилирование CpG-островков промоторов генов *p16/INKA* и *GSTP1* в лейкоцитах крови в отдаленном периоде после радиационного воздействия [13]. Противоположные результаты получены при исследовании рентгенологов. Так, в работе [7] показано, что низкодозовое облучение (20 мЗв в год или 100 мЗв за 5 лет) способствует гипометилированию геномной ДНК клеток крови.

Результаты настоящего пилотного исследования свидетельствуют об отсутствии изменений в статусе метилирования CpG-островков промоторных регионов генов *CDKN1A*, *BCL-2* и *ATM* в отдаленном периоде у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию.

Следует отметить, что радиационно-индуцированные эффекты, связанные с метилированием ДНК могут зависеть от ряда факторов: типа клеток, подвергшихся облучению, физиологических особенностей обследованных лиц, вида излучения, дозы и времени после облучения.

Полученные результаты являются предварительными. Для более полного понимания влияния хронического низкоинтенсивного радиационного воздействия на уровень метилирования необходимо расширить выборку обследуемых лиц, а также провести количественный анализ с расчетом процента метилирования промоторных областей генов.

## ВЫВОДЫ

В результате проведенного исследования не выявлено различий в количестве случаев метилирования CpG островков промоторных регионов генов *CDKN1A*, *BCL-2* и *ATM* у облученных лиц относительно группы сравнения. Полученные результаты являются предварительными — в дальнейшем планируется расширение линейки изученных генов и определение процентного уровня метилирования по каждому промоторному участку гена в группе обследованных лиц.

## Литература

- Spainhour JC, Lim HS, Yi SV, Qiu P. Correlation patterns between DNA methylation and gene expression in the Cancer Genome Atlas. *Cancer Inform.* 2019; (18): 1–11. DOI: 10.1177/1176935119828776. PMID: 30792573. PMCID: PMC6376553.
- Greenberg MVC, Bourchis D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019; (20): 590–607. DOI: 10.1038/s41580-019-0159-6. PMID: 31399642.
- Van Tongelen A, Lorient A, De Smet C. Oncogenic roles of DNA hypomethylation through the activation of cancer-germline genes. *Cancer Lett.* 2017; 28 (396): 130–7. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.03.029. PMID: 28342986.
- Edwards JR, Yarychivska O, Boulard M, Bestor TH. DNA methylation and DNA methyltransferases. *Epigenetics & Chromatin.* 2017; 10 (23): 1–10. DOI: 10.1186/s13072-017-0130-8.
- Kovalchuk O, Burke P, Besplug J, Slovack M, Filkowski J, Pogridny I. Methylation changes in muscle and liver tissues of male and female mice exposed to acute and chronic low dose X-ray irradiation. *Mutat Res.* 2004; 548 (1–2): 75–84. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2003.12.016. PMID: 15063138.
- Кузьмина Н. С. Изучение aberrантного метилирования в лейкоцитах крови ликвидаторов аварии на ЧАЭС. *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2014; 54 (2): 127–39.
- Cho YH, Jang Y, Woo HD, Kim YJ, Kim SY, Christensen S, et al. LINE-1 Hypomethylation is associated with radiation-induced genomic instability in industrial radiographers. *Environ Mol Mutagen.* 2018; 60 (2): 174–84. DOI: 10.1002/em.22237.
- Исубакова Д. С., Цымбал О. С., Брониковская Е. В., Литвяков Н. В., Мильто И. В., Тахауов Р. М. Метилирование промоторов генов апоптоза в лимфоцитах крови работников, подвергавшихся в процессе профессиональной деятельности долговременному внешнему облучению. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2021; 171 (3): 339–43.
- Никифоров В. С., Блинова Е. А., Акеев А. В. Влияние комплекса факторов радиационной и нерадиационной природы на профиль транскрипционной активности генов у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию.

- Вопросы радиационной безопасности. 2019; 2 (94): 64–70.
10. Degteva MO, Napier BA, Tolstykh EI, Shiskina EA, Bougrov NG, Krestinina LYu, Akleev AV. Individual dose distribution in cohort of people exposed as a result of radioactive contamination of the Techa River. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2019; 64 (3): 46–53. DOI: 10.12737/article\_5cf2364cb49523.98590475.
  11. Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet*. 2010; (70): 27–56. DOI: 10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2. PMID: 20920744.
  12. Jaenisch R. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*. 2003; (33): 245–54. DOI: 10.1038/ng1089. PMID: 12610534.
  13. Kuzmina NS, Lapteva NSh, Rubanovich AB. Hypermethylation of gene promoters in peripheral blood leukocytes in humans long term after radiation exposure. *Environ Res*. 2016; (146): 10–17. DOI: 10.1016/j.envres.2015.12.008.

## References

1. Spainhour JC, Lim HS, Yi SV, Qiu P. Correlation patterns between DNA methylation and gene expression in the Cancer Genome Atlas. *Cancer Inform*. 2019; (18): 1–11. DOI: 10.1177/1176935119828776. PMID: 30792573. PMCID: PMC6376553.
2. Greenberg MVC, Burchis D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019; (20): 590–607. DOI: 10.1038/s41580-019-0159-6. PMID: 31399642.
3. Van Tongelen A, Lorient A, De Smet C. Oncogenic roles of DNA hypomethylation through the activation of cancer-germline genes. *Cancer Lett*. 2017; 28 (396): 130–7. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.03.029. PMID: 28342986.
4. Edwards JR, Yarychivska O, Boulard M, Bestor TH. DNA methylation and DNA methyltransferases. *Epigenetics & Chromatin*. 2017; 10 (23): 1–10. DOI: 10.1186/s13072-017-0130-8.
5. Kovalchuk O, Burke P, Besplug J, Slovack M, Filkowski J, Pogridny I. Methylation changes in muscle and liver tissues of male and female mice exposed to acute and chronic low dose X-ray irradiation. *Mutat Res*. 2004; 548 (1–2): 75–84. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2003.12.016. PMID: 15063138.
6. Kuzmina NS. Izuchenie aberrantnogo metilirovaniya v lejkocitah krovi likvidatorov avarii na ChAJeS. *Radiacionnaya biologiya. Radiojekologiya*. 2014; 54 (2): 127–39. Russian.
7. Cho YH, Jang Y, Woo HD, Kim YJ, Kim SY, Christensen S, et al. LINE-1 Hypomethylation is associated with radiation-induced genomic instability in industrial radiographers. *Environ Mol Mutagen*. 2018; 60 (2): 174–84. DOI: 10.1002/em.22237.
8. Isubakova DS, Cymbal OS, Bronikovskaja EV, Litvjakov NV, Miito IV, Tahauov RM. Metilirovanie promotorov genov apoptoza v limfocitah krovi rabotnikov, podvergavshihsja v processe professional'noj dejatel'nosti dolgovremennomu vneshnemu oblucheniju. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny*. 2021; 171 (3): 339–43. Russian.
9. Nikiforov VS, Blinova EA, Akleev AV. Vlijanie kompleksa faktorov radiacionnoj i neradiacionnoj prirody na profil' transkripcionnoj aktivnosti genov u lic, podvergshihsja hronicheskomu radiacionnomu vozdejstvu. *Voprosy radiacionnoj bezopasnosti*. 2019; 2 (94): 64–70. Russian.
10. Degteva MO, Napier BA, Tolstykh EI, Shiskina EA, Bougrov NG, Krestinina LYu, Akleev AV. Individual dose distribution in cohort of people exposed as a result of radioactive contamination of the Techa River. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2019; 64 (3): 46–53. DOI: 10.12737/article\_5cf2364cb49523.98590475.
11. Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet*. 2010; (70): 27–56. DOI: 10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2. PMID: 20920744.
12. Jaenisch R. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*. 2003; (33): 245–54. DOI: 10.1038/ng1089. PMID: 12610534.
13. Kuzmina NS, Lapteva NSh, Rubanovich AB. Hypermethylation of gene promoters in peripheral blood leukocytes in humans long term after radiation exposure. *Environ Res*. 2016; (146): 10–17. DOI: 10.1016/j.envres.2015.12.008.

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИОФАГОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* — ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АГЕНТОВ ДЛЯ ФАГОВОЙ ТЕРАПИИ

М. А. Корниенко , Н. С. Купцов, Д. И. Данилов, Р. Б. Горodничев, М. В. Малахова, Д. А. Беспятых, В. А. Веселовский, Е. А. Шитиков, Е. Н. Ильина

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Одним из патогенов, характеризующихся критическим показателем доли штаммов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), является *Pseudomonas aeruginosa*. В качестве альтернативы антибиотикам при терапии инфекций, вызванных штаммами с МЛУ, рассматривают фаготерапию. Целью исследования было выделить и охарактеризовать бактериофаг *P. aeruginosa*, потенциально пригодный для терапии инфекционных заболеваний. Выделение проводили методом накопительных культур. Спектр литической активности устанавливали спот-тестированием на коллекции из 40 штаммов *P. aeruginosa*. Полногеномное секвенирование выполняли на платформе MiSeq (Illumina). Филогенетический анализ геномов проводили с помощью VICTOR. Выделенные бактериофаги vB\_PaeA-55-1w и vB\_PaeM-198, принадлежащие к семействам *Autographiviridae* и *Myoviridae* соответственно, обладали широким спектром литической активности (около 50% каждый), в том числе вызывали лизис штаммов с МЛУ. Геномы vB\_PaeA-55-1w и vB\_PaeM-198 представлены двухцепочечной ДНК длиной 42,5 и 66,3 т.п.н. соответственно. В составе геномов аннотировано 52 (vB\_PaeA-55-1w) и 95 (vB\_PaeM-198) открытых рамок считывания, среди них гены интеграз и токсинов не обнаружены. На филогенетическом древе vB\_PaeA-55-1w располагался в кластере совместно с бактериофагами рода *Phikmvvirus* семейства *Autographiviridae*, в том числе с используемыми в фаготерапии, а vB\_PaeM-198 входил в кластер, включающий бактериофаги рода *Pbunavirus* семейства *Myoviridae*. Бактериофаги vB\_PaeA-55-1w и vB\_PaeM-198 можно рассматривать в качестве кандидатов для применения в фаготерапии, в том числе и для лечения инфекций, вызванных штаммами *P. aeruginosa* с МЛУ.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas aeruginosa*, вирулентные бактериофаги, фаготерапия, *Autographiviridae*, *Myoviridae*, полногеномное секвенирование, филогенетический анализ

**Финансирование:** исследование выполнено за счет средств, предоставленных для выполнения государственного задания «Разработка персонализированного подхода терапии инфекционных процессов с применением вирулентных бактериофагов» (ШИФР: Бактериофаг).

**Благодарности:** авторы благодарят Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России за секвенирование геномов бактериофагов.

**Вклад авторов:** М. А. Корниенко — план исследований, набор и обработка данных, написание статьи; Н. С. Купцов — набор и обработка данных, написание статьи; Д. И. Данилов, Р. Б. Горodничев, М. В. Малахова, В. А. Веселовский — набор данных; Д. А. Беспятых — обработка данных, Е. А. Шитиков — план исследований, обработка данных, написание статьи; Е. Н. Ильина — план исследований, написание статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** экспериментальная работа выполнена с соблюдением норм Санитарно-эпидемиологических правил «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» СП 1.3.2322-08; Санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2518-09 — «Дополнения и изменения № 1 к санитарно-эпидемиологическим правилам «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» СП 1.3.2322-08; Санитарно-эпидемиологических правил «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» СанПиН 2.1.7.2790-10, а также Федеральных клинических рекомендаций «Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике».

✉ **Для корреспонденции:** Мария Андреевна Корниенко  
ул. Малая Пироговская, д. 1а, г. Москва, 119435; kornienkomariya@gmail.com

**Статья получена:** 19.07.2021 **Статья принята к печати:** 05.08.2021 **Опубликована онлайн:** 18.09.2021

**DOI:** 10.47183/mes.2021.027

## ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BACTERIOPHAGES — POTENTIAL AGENTS FOR PHAGE THERAPY

Kornienko MA , Kuptsov NS, Danilov DI, Gorodnichiev RB, Malakhova MV, Bespiatykh DA, Veselovsky VA, Shitikov EA, Ilina EN

Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

*Pseudomonas aeruginosa* — is one of the pathogens characterized by the critical number of multidrug-resistant (MDR) strains. Phage therapy is considered an alternative to antibiotics, especially in treatment of infections caused by MDR strains. The aim of this study was to isolate and characterize *P. aeruginosa* phages that could potentially be suitable for treating infectious diseases. To isolate the *P. aeruginosa* phages, enrichment cultures were used. The lytic activity spectrum was confirmed by spot testing on 40 *P. aeruginosa* strains. Whole-genome sequencing was performed using Illumina MiSeq instrument. Phylogenetic analysis was done using VICTOR tool. Isolated phages vB\_PaeA-55-1w and vB\_PaeM-198 from *Autographiviridae* and *Myoviridae* families, respectively, had a broad spectrum of lytic activity (about 50% each), including lysis of MDR strains. The genomes vB\_PaeA-55-1w and vB\_PaeM-198 comprise double-stranded DNA of 42.5 and 66.3 kbp in length, respectively. Open reading frames were annotated for both phages (52 for vB\_PaeA-55-1w, and 95 for vB\_PaeM-198), no integrases and toxins were detected. On a phylogenetic tree, vB\_PaeA-55-1w phage was clustered with phages from the *Phikmvvirus* genus (*Autographiviridae* family), which are also used in phage therapy. vB\_PaeM-198 phage was clustered with phages from the *Pbunavirus* genus (*Myoviridae* family). vB\_PaeA-55-1w and vB\_PaeM-198 phages could be considered as candidates for phage therapy and may be used to treat infections caused by MDR *P. aeruginosa*.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, virulent bacteriophages, phage therapy, *Autographiviridae*, *Myoviridae*, whole genome sequencing, phylogenetic analysis

**Funding:** The study was supported by the State Assignment on the Development of a personalized approach to the therapy of infections using virulent bacteriophages (Code: Bacteriophage) (Russia).

**Acknowledgments:** the authors thank the Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, the Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of the Federal Medical Biological Agency for their help with sequencing the genomes of bacteriophages.

**Author contribution:** Kornienko MA — study plan, data collection and processing, article authoring; Kuptsov NS — data collection and processing, article authoring; Danilov DI, Gorodnichiev RB, Malakhova MV, Veselovsky VA — data collection; Bespiatykh DA — data processing, Shitikov EA — research plan, data processing, article authoring; Ilina EN — research plan, article authoring.

**Compliance with ethical standards:** the experiment was carried out in compliance with the Sanitary and Epidemiological Rules SP 1.3.2322-08 "Safe work with microorganisms of III–IV pathogenicity (hazardousness) groups and pathogens of parasitic diseases"; Sanitary and Epidemiological Rules SP 1.3.2518-09 "Amendments and additions #1 to the sanitary and epidemiological rules" Safe work with microorganisms of III–IV pathogenicity (hazardousness) groups and pathogens of parasitic diseases"; Sanitary and Epidemiological Rules SanPIN 2.1.7.2790-10 "Sanitary and epidemiological requirements for medical waste management"; Federal Clinical Recommendations "Rational use of bacteriophages in medical and anti-epidemic practice."

✉ **Correspondence should be addressed:** Maria A. Kornienko  
Malaya Pirogovskaya, 1a, Moscow, 119435; kornienkomariya@gmail.com

**Received:** 19.07.2021 **Accepted:** 05.08.2021 **Published online:** 18.09.2021

**DOI:** 10.47183/mes.2021.027

По данным Всемирной организации здравоохранения, смертность от устойчивых к антибиотикам бактерий находится на историческом максимуме [1]. При этом первые места в списке патогенов, представляющих наибольшую угрозу для здоровья человека, занимают грамотрицательные бактерии, в том числе *Pseudomonas aeruginosa* [1]. Бактерии этого вида распространены повсеместно, обладают высокой степенью генетической пластичности и приспособляемости к условиям окружающей среды. Инвазия штаммами *P. aeruginosa* нередко приводит к генерализации инфекционного процесса за счет разнообразия механизмов патогенности [2]. *P. aeruginosa* является причиной широкого спектра заболеваний — от интоксикации до обширных гнойно-воспалительных процессов и септического шока [2]. Стабильно занимая лидирующие позиции среди возбудителей нозокомиальных инфекций в России, доля изолятов *P. aeruginosa* среди всех бактериальных возбудителей внутрибольничных инфекций, выделенных за 2015–2020 гг., по данным портала AMRmap, составила, 16,83% [3]. Кроме того, для *P. aeruginosa* характерна высокая доля штаммов в популяции, обладающих множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) (штаммы, устойчивые по крайней мере к одному антибиотику из трех и более групп антибиотиков) (около 30%), а также экстремальной лекарственной устойчивостью (ЭЛУ) (штаммы, устойчивые по крайней мере к одному антибиотику из всех групп антибиотиков, за исключением 1–2 групп) (около 15%), что является одним из факторов высокой смертности пациентов [4].

На сегодняшний день первостепенной задачей становится разработка альтернативных антибиотикам методов терапии инфекционных заболеваний, вызванных патогенами с МЛУ и ЭЛУ. Применение препаратов вирулентных бактериофагов для терапии инфекционных процессов (фаготерапия) является одним из наиболее перспективных вариантов [5]. Это обусловлено тем фактом, что вирулентные бактериофаги лизируют как чувствительные, так и устойчивые к антибиотикам штаммы бактерий. Кроме того, применение бактериофагов не вызывает побочных токсических и аллергических реакций и не имеет противопоказаний [6], а также показано для терапии беременных женщин в сочетании с другими лечебными препаратами [7].

Успех фаговой терапии для лечения инфекций *P. aeruginosa* у животных и людей был подтвержден в ряде публикаций, а также в доклинических и клинических испытаниях [8, 9]. В Российской Федерации выпускают ряд коммерческих терапевтических препаратов для лечения инфекций, вызванных *P. aeruginosa*: «Бактериофаг синегнойный», «Интести-бактериофаг», «Пиобактериофаг поливалентный очищенный» («Микроген»; Россия).

Несмотря на наличие препаратов бактериофагов, активных по отношению к *P. aeruginosa*, и успешный опыт их применения, необходима постоянная работа по обновлению фаговых коллекций, что связано со спецификой современной фаготерапии. Так как вирулентные бактериофаги имеют довольно узкую специфичность, обычно направленную на ряд штаммов, обновление коллекции позволит включить туда фаги, вызывающие лизис актуальных бактериальных штаммов. Кроме того, описан ряд случаев возникновения устойчивых к бактериофагам мутантных форм бактерий [10]. Выделение новых бактериофагов и включение их в состав терапевтических препаратов решают данную проблему.

В связи с вышеизложенным цель данной работы — выделение и характеристика бактериофагов *P. aeruginosa*, потенциально пригодных для терапии инфекционных заболеваний.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Бактериальные штаммы

Исследование проводили на штаммах *P. aeruginosa* ( $n = 40$ ), отобранных из коллекции бактериальных штаммов лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства России. Штаммы коллекции были охарактеризованы по профилю лекарственной чувствительности (к цефтриаксону, гентамицину, ципрофлоксацину и меропенему), а также генотипам согласно результатам мультилокусного секвенирования — типирования (МЛСТ) [11]. Культивирование бактерий проводили в течение 18–24 ч на питательной среде LB (от англ. *lysogeny broth*) (Oxoid; Великобритания) при температуре 37 °C.

### Выделение бактериофагов

Бактериофаги выделяли методом накопительных культур из природных источников (сточных вод, проб воды из различных рек) на штаммах *P. aeruginosa* PA55 и PA198 (табл. 1). Для этого пробу воды в объеме 50 мл пропускали через фильтр Millipore с мембраной из поливинилиденфторида и диаметром пор 0,45 мкм (Merck Millipore; США) и добавляли к ней двукратный бульон LB. В дальнейшем вносили 300 мкл ночной культуры штамма-хозяина и инкубировали на качалке при 37 °C в течение 18 ч. После культивирования бактериальные клетки осаждали центрифугированием при 3500 g в течение 10 мин, надосадок пропускали через фильтр Millipore с мембраной из полиэфирсульфона и диаметром пор 0,22 мкм (Merck Millipore; США). Индивидуальные бактериофаги получали последовательным (трехкратным) выделением из отдельных негативных колоний. В дальнейшем бактериофаги наращивали в 50 мл бульона LB, содержащего 300 мкл ночной культуры бактериального штамма. Концентрацию бактериофага в фаговом лизате оценивали стандартным методом титрования по Грациа [12].

### Определение спектра литической активности бактериофагов

Определение спектра литической активности бактериофагов осуществляли методом спот-тестирования (от англ. *spot*). С целью предотвращения неспецифического лизиса для тестирования использовали фаголизаты с титром  $3 \times 10^6$  БОЕ/мл (бляшкообразующих единиц в мл). Ночную культуру ( $10^{10}$  КОЕ/мл (колониеобразующих единиц в мл)) тестируемого бактериального штамма последовательно разводили в бульоне LB до концентрации клеток  $10^6$  КОЕ/мл, смешивали 0,1 мл с 5 мл полужидкого LB-агара (0,6% агара) и вносили в чашку Петри, содержащую тонкий слой LB агара (1,5%-го агара). После застывания полужидкого агара на поверхность чашки наносили каплю (5 мкл) исследуемого бактериофага. Чашки Петри инкубировали при температуре 37 °C в течение 18–24 ч. Литическую активность оценивали визуально: бактериальный штамм

Таблица 1. Характеристика штаммов-хозяев бактериофагов *P. aeruginosa*

| Штамм | МЛСТ сиквенс-тип | Спектр чувствительности к антибактериальным препаратам |            |                |           |
|-------|------------------|--------------------------------------------------------|------------|----------------|-----------|
|       |                  | цефтриаксон                                            | гентамицин | ципрофлоксацин | меропенем |
| PA198 | ST508            | R                                                      | S          | S              | R         |
| PA55  | ST2690           | R                                                      | S          | S              | S         |

считали чувствительным к действию бактериофага в случае образования прозрачного пятна либо отдельных негативных колоний. При отсутствии пятна лизиса либо наличии мутного пятна бактериальный штамм относили к устойчивым штаммам.

### Выделение ДНК бактериофагов и полногеномное секвенирование

Тотальную ДНК бактериофагов выделяли методом фенол-хлороформной экстракции [13] с предварительной ферментативной обработкой фаговых лизатов РНКазой А, ДНКазой I и протеиназой К (Thermo Fisher Scientific; США) в соответствии с инструкцией производителя.

Для приготовления библиотеки было взято 250 нг геномной ДНК. Фрагментирование ДНК проводили на приборе Covaris S220 System (Covaris; США) до размера (400–500 п.н.). Качество фрагментированных образцов оценивали на биоанализаторе Agilent 2100 (Agilent; США) в соответствии с инструкцией производителя. Набор NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit (New England Biolabs; США) использовали для подготовки геномных библиотек, а набор NEBNext Multiplex Oligos kit for Illumina (96 индексных праймеров, New England Biolabs; США) — для индексации библиотек. Количественный анализ библиотек проводили с помощью набора Quant-iT DNA Assay Kit, High Sensitivity (Thermo Scientific; США). Процедуру секвенирования осуществляли с помощью инструмента MiSeq с использованием набора реагентов для секвенирования MiSeq Reagent Nano Kit v2 (500cycle) (Illumina; США) согласно рекомендациям производителя.

### Биоинформатический анализ геномов бактериофагов

Сборку полногеномных последовательностей бактериофагов выполняли с использованием программного пакета Prokka v1.14.6 [14]. Аннотации геномов бактериофагов получали с помощью Rapid Annotation Using Subsystem Technology (RAST) [15]. Функции некоторых открытых рамок считывания (ОП) предсказывали с помощью BLASTP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и HHpred (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/#/tools/hhpred>). Поиск транспортных РНК (тРНК) осуществляли с помощью программы ARAGORN [16]. Полученные геномы были депонированы в базу данных GenBank под номерами MZ553931 и MZ553930 для бактериофагов vB\_PaeA-55-1w и vB\_PaeM-198 соответственно.

Таксономическую принадлежность исследуемых бактериофагов определяли на основании гомологии их геномных последовательностей с последовательностями бактериофагов, представленных в базе данных GenBank с помощью сервиса BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). В зависимости от таксономического положения бактериофагам присваивали названия в соответствии с рекомендациями ICTV (от англ. International Committee on Taxonomy of Viruses) [17].

Филогенетический анализ геномов проводили с помощью онлайн-инструмента VICTOR, используя

метод GBDP (Genome-BLAST Distance Phylogeny) с рекомендованными настройками для вирусов прокариотов [18]. Обработку ветвей проводили с помощью FASTME [19] по формуле D0, визуализацию — с помощью FigTree [20]. В случае бактериофага vB\_PaeA-55-1w в сравнение включали геномы бактериофагов со следующими номерами в базе данных GenBank: NC\_054890, NC\_047953, NC\_047967, NC\_048201, NC\_047965, NC\_026602, NC\_027375, NC\_047956, NC\_047957, NC\_031014, NC\_016764, NC\_030923, NC\_028836, NC\_013638, NC\_004665, NC\_047922, NC\_015264, NC\_012418, NC\_047827, NC\_009936, NC\_009935, NC\_010326, NC\_022746, NC\_022091, NC\_047955, NC\_047852, NC\_047954, NC\_047933, NC\_047952, NC\_027292, MG250485, NC\_047997, NC\_015208, NC\_005045, NC\_047747, NC\_024362, NC\_021062, NC\_042104, NC\_028661, NC\_023005, NC\_047981, NC\_011107, NC\_011105, NC\_048168, NC\_048200, NC\_047894, NC\_047873, NC\_041885, NC\_047826. Для бактериофага vB\_PaeM-198 использовали следующие геномы: NC\_048675, NC\_048744, NC\_048626, NC\_048662, NC\_048663, NC\_048676, NC\_048745, NC\_011703, NC\_026587, NC\_026600, NC\_042113, NC\_019918, NC\_028745, NC\_028971, NC\_048109, NC\_041870.1, NC\_042080, NC\_042079, NC\_007623, NC\_007810, NC\_041968, NC\_019450, NC\_017674, NC\_042054, NC\_030934, NC\_015272, NC\_019935, NC\_041865, NC\_011165, NC\_011166, NC\_048699.1, NC\_031073, NC\_031073, MN871467, NC\_041994, NC\_041903, NC\_041902.1, NC\_042060, NC\_048806, NC\_022096, NC\_015294, NC\_022967.1, NC\_022966, NC\_022986, NC\_019913, NC\_011810, NC\_041881, NC\_030940, NC\_003278, NC\_004629, NC\_031110, NC\_041880, NC\_028882, NC\_028939, NC\_023601, NC\_042081, NC\_042081, NC\_042081, NC\_011756, NC\_042092, NC\_029065, NC\_041904.

Модульное строение геномов было определено на основании аннотации, а также в ходе выявления гомологии нуклеотидных последовательностей отдельных ОП с помощью BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Выделение бактериофагов и характеристика спектра литической активности

Для выделения бактериофагов, активных в отношении бактерий вида *P. aeruginosa*, из коллекции бактериальных штаммов ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России были выбраны штаммы PA55 и PA198 (см. табл. 1). На данных штаммах-хозяевах были получены два бактериофага, впоследствии названные vB\_PaeA-55-1w и vB\_PaeM-198. Согласно исследованию спектров литической активности, фаг vB\_PaeA-55-1w вызывал лизис 19 штаммов коллекции (47,5%), в то время как vB\_PaeM-198 — 20 штаммов (50%) (табл. 2). Следует также отметить, что из 17 штаммов коллекции, обладающих МЛУ, бактериофаг vB\_PaeA-55-

Таблица 2. Генетическая характеристика штаммов коллекции и спектр литической активности бактериофагов vB\_PaeA-55-1w и vB\_PaeM-198

| МЛСТ сиквентс-тип                 | Общее число штаммов | Доля штаммов, лизируемых vB_PaeA-55-1w, % | Доля штаммов, лизируемых vB_PaeM-198, % |
|-----------------------------------|---------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------|
| ST12                              | 5                   | 0                                         | 100                                     |
| ST17                              | 1                   | 0                                         | 0                                       |
| ST186                             | 1                   | 100                                       | 100                                     |
| ST198                             | 2                   | 100                                       | 50                                      |
| ST207                             | 2                   | 100                                       | 0                                       |
| ST233                             | 1                   | 100                                       | 100                                     |
| ST235                             | 1                   | 0                                         | 0                                       |
| ST244                             | 4                   | 100                                       | 75                                      |
| ST266                             | 1                   | 100                                       | 100                                     |
| ST357                             | 1                   | 100                                       | 0                                       |
| ST395                             | 1                   | 0                                         | 0                                       |
| ST483                             | 1                   | 0                                         | 0                                       |
| ST498                             | 1                   | 0                                         | 0                                       |
| ST499                             | 2                   | 100                                       | 100                                     |
| ST508                             | 1                   | 0                                         | 100                                     |
| ST569                             | 1                   | 0                                         | 0                                       |
| ST589                             | 1                   | 0                                         | 100                                     |
| ST654                             | 3                   | 33,3                                      | 0                                       |
| ST1094                            | 1                   | 100                                       | 100                                     |
| ST1292                            | 1                   | 0                                         | 0                                       |
| ST1527                            | 1                   | 0                                         | 0                                       |
| ST2427                            | 1                   | 0                                         | 0                                       |
| ST2690                            | 1                   | 100                                       | 100                                     |
| Уникальный тип 15-5-11-8-4-4-1*   | 2                   | 0                                         | 50                                      |
| Уникальный тип 15-2-11- 3-3-38-3* | 2                   | 100                                       | 50                                      |
| Уникальный тип 17 -5-12-3-14-4-7* | 1                   | 0                                         | 0                                       |

Примечание: \* — для каждого уникального сиквентс-типа указаны номера аллелей генов, входящих в стандартную схему МЛСТ (*arcC-aroE-glpF-gmk-pta-tri-yqi*) [21].

1w лизировал 8 штаммов (47%), а бактериофаг vB\_PaeM-198 — 6 штаммов (35%).

### Полногеномное секвенирование бактериофагов

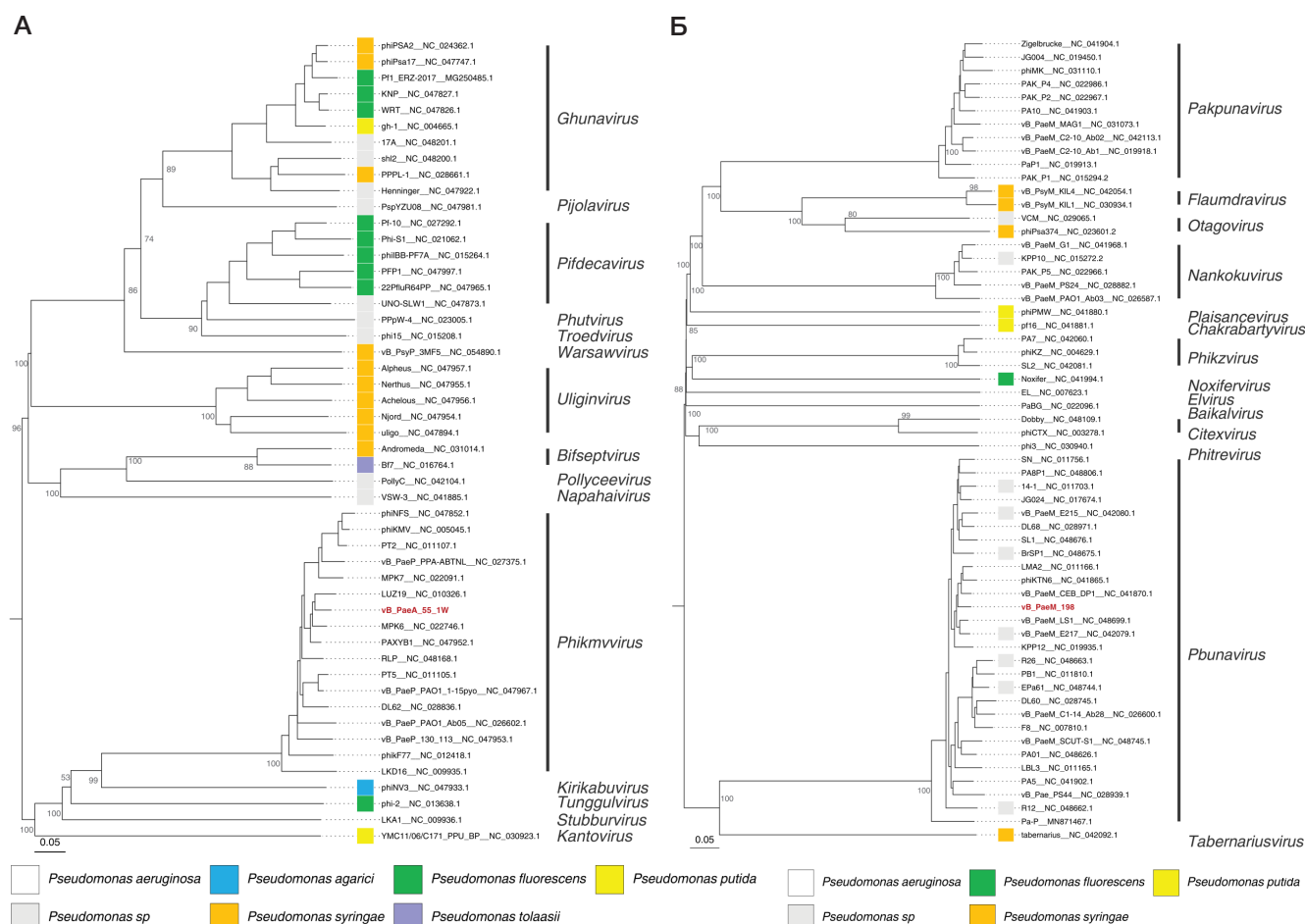
Для детальной характеристики исследуемых бактериофагов были получены данные полногеномного секвенирования и проведена их аннотация. Геномы бактериофагов были представлены двухцепочечной ДНК и имели длину 42,5 т.п.н. (vB\_PaeA-55-1w) и 66,3 т.п.н. (vB\_PaeM-198). Бактериофаг vB\_PaeA-55-1w кодировал 52 ОРС, в то время как vB\_PaeM-198 — 95. Для анализируемых бактериофагов не показано наличие в геноме тРНК.

В ходе сопоставления полученных полногеномных последовательностей с геномами, доступными в базе данных Genbank, было установлено таксономическое положение бактериофагов, а также их ближайший родственник. Бактериофаг vB\_PaeA-55-1w относился к роду *Phikmvvirus* семейства *Autographiviridae*, а наиболее близкий геном соответствовал фагу *Pseudomonas phage* MYU9 (процент идентичности — 95%, длина выравнивания — 97,59%, номер в базе Genbank — MW406975.1). Бактериофаг vB\_PaeM-198 принадлежал к роду *Pbunavirus* семейства *Myoviridae* и имел высокий процент идентичности с фагом *Pseudomonas phage* phiKT28 (процент идентичности — 99%, длина выравнивания — 96,34%, номер в базе Genbank — KP340287.1).

### Филогенетический анализ бактериофагов *Pseudomonas spp*

Для позиционирования исследуемых бактериофагов внутри соответствующих семейств использовали референсные геномы, рекомендованные ICTV [17]. В филогенетический анализ семейства *Autographiviridae* было включено 50 геномов бактериофагов, активных против *Pseudomonas spp* (рис. 1А), для семейства *Myoviridae* — 60 геномов (рис. 1Б).

На филогенетическом древе бактериофагов *Pseudomonas spp* семейства *Autographiviridae* можно выделить два больших кластера (см. рис. 1А). Первый кластер включает бактериофаги, хозяевами которых являются бактерии видов *P. aeruginosa*, а также по одному бактериофагу *Pseudomonas agarici*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*. Надо отметить, что данные филогенетического анализа соответствуют таксономической классификации этих вирусов. Так, бактериофаги *P. aeruginosa* внутри первого кластера группируются отдельно и относятся к роду *Phikmvvirus*, в том числе и исследуемый бактериофаг vB\_PaeA-55-1w. Исключением является бактериофаг *Pseudomonas phage* LKA1, который на филогенетическом древе представлен отдельной веткой. Данный бактериофаг по таксономической классификации относится к другому роду *Stubbvirus*. Что касается бактериофагов



**Рис. 1.** Филогенетический анализ полногеномных последовательностей бактериофагов *Pseudomonas* spp. **А.** Филогенетическое дерево для бактериофагов, относящихся к семейству *Autographiviridae* ( $n = 50$ ). **Б.** Филогенетическое дерево для бактериофагов, относящихся к семейству *Myoviridae* ( $n = 60$ ). Бактериофаги vB\_PaeA-55-1w и vB\_PaeM-198 обозначены красным цветом

*Pseudomonas agarici*, *Pseudomonas putida* и *Pseudomonas fluorescens* в составе первого большого кластера, то каждый из них тоже занимает индивидуальную ветвь на филогенетическом древе и относится к отдельному таксону, а именно родам *Kirikabuvirus*, *Tunggulvirus* и *Kantovirus* соответственно. Второй большой кластер на филогенетическом древе сформирован бактериофагами, хозяева которых — бактерии видов *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas tolaasii*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, а также бактерии рода *Pseudomonas*, чья видовая принадлежность не установлена. Во втором кластере филогенетические подгруппы также соответствуют родам бактериофагов, входящих в них, а именно *Pifdecavirus*, *Ghunavirus*, *Troedvirus*, *Pollyceevirus*, *Phutvirus*, *Napahavirus*, *Pijolavirus*, *Pifdecavirus*, *Bifseptvirus*, *Uliginivirus*. Следует отметить, что несколько родов внутри семейства имели хозяев, принадлежащих к разным видам: *Bifseptvirus* — хозяева *P. syringae* и *P. tolaasii*; *Ghunavirus* — хозяева *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae*.

Бактериофаги *P. aeruginosa* семейства *Myoviridae* были представлены в различных участках филогенетического древа и соответствовали семи родам: *Baikalvirus*, *Citexvirus*, *Elvirus*, *Nankokuvirus*, *Pakpunavirus*, *Pbunavirus* и *Phikzvirus* (см. рис. 1Б). Исследуемый бактериофаг vB\_PaeM-198 располагается на филогенетическом древе совместно с другими 26 бактериофагами рода *Pbunavirus*. Бактериофаги *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae* *Myoviridae* семейства относятся к 6 различным родам: *Chakrabartyvirus*, *Flaumdravirus*, *Noxifervirus*, *Otagovirus*, *Plaisancevirus* и *Tabernariusvirus*.

### Модульное строение бактериофагов vB\_PaeA-55-1w и vB\_PaeM-198

Для описания геномной организации бактериофагов vB\_PaeA-55-1w и vB\_PaeM-198 был проведен анализ функциональных модулей геномов. Надо отметить, что число генов, функции которых удалось установить, было больше для бактериофага vB\_PaeA-55-1w ( $n = 30/52$ , 58%), чем для vB\_PaeM-198 ( $n = 24/95$ , 25%) (рис. 2). В ходе анализа для обоих исследуемых фагов была установлена локализация модулей метаболизма нуклеиновых кислот и морфогенеза и упаковки. Расположение модуля лизиса было установлено для бактериофага vB\_PaeA-55-1w. Прицельный поиск генов известных бактериальных токсинов и различных интеграз в составе геномов vB\_PaeA-55-1w и vB\_PaeM-198 не выявил их наличия.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На фоне кризиса антибиотиков, связанного с распространением бактерий с МЛУ и ЭЛУ, бактериофаги *P. aeruginosa* начинают все чаще применять в терапевтической практике. Для терапии инфекций, вызванных *P. aeruginosa*, наиболее часто используют представителей семейств *Autographiviridae* и *Myoviridae* [22, 23]. В рамках данной работы из природных источников были выделены бактериофаги семейств *Autographiviridae* (vB\_PaeA-55-1w) и *Myoviridae* (vB\_PaeM-198), обладающие широким спектром действия (47,5% и

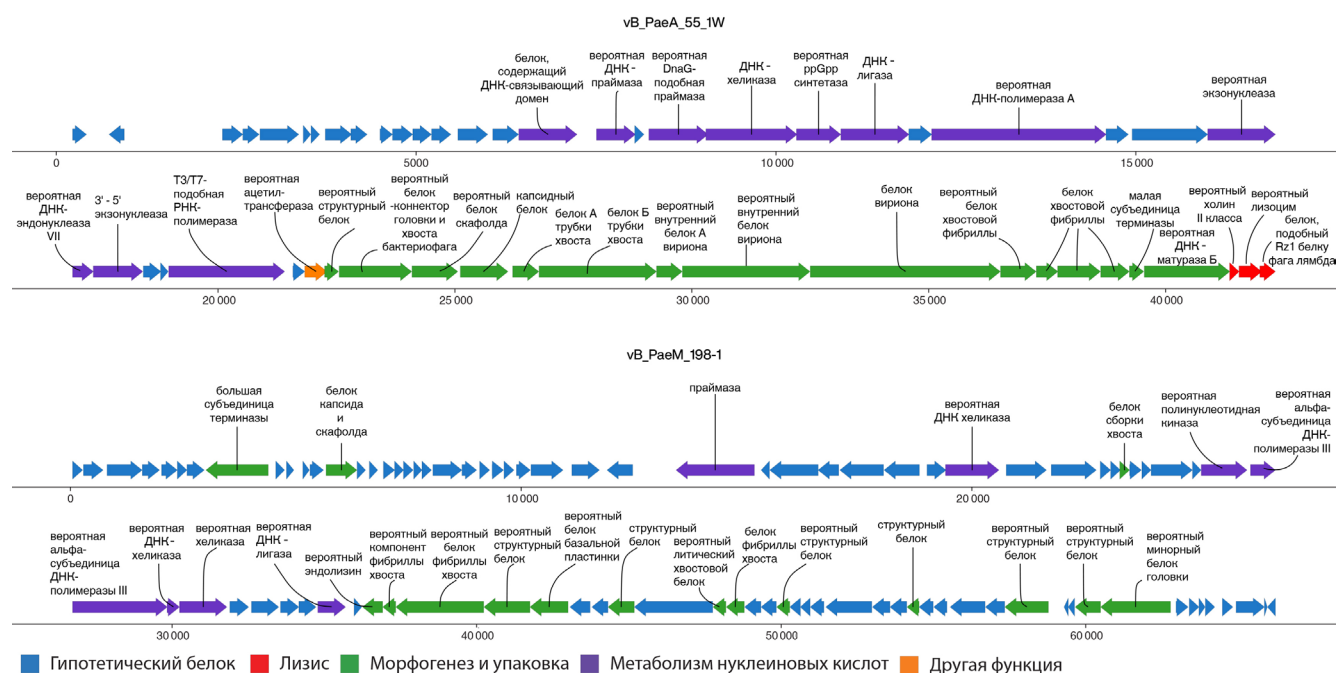


Рис. 2. Основные структурные модули геномов бактериофагов *P. aeruginosa* vB\_PaeA-55-1w и vB\_PaeM-198

50% соответственно), сопоставимым с бактериофагами *P. aeruginosa* соответствующих семейств [24, 25]. Следует отметить, что бактериофаги вызывали лизис различных штаммов, что может увеличить эффективность терапии при использовании фагового коктейля, включающего в себя оба исследуемых бактериофага.

Следует также подчеркнуть, что бактериофаги вызывали лизис штаммов, относящихся к различным сиквенс-типам, в том числе и штаммов ST235 ( $n = 1$ ), ST244 ( $n = 4$ ) и ST395 ( $n = 1$ ). Изоляты, принадлежащие к данным сиквенс-типам, относятся к наиболее распространенным по всему миру, часто связаны со вспышками инфекционных заболеваний, а также характеризуются повышенным уровнем устойчивости к антибактериальным препаратам [26]. Интересным представляется дальнейшее исследование литической активности бактериофагов vB\_PaeA-55-1w и vB\_PaeM-198 на коллекции штаммов *S. aureus*, относящихся к сиквенс-типам высокого эпидемического риска.

По современным требованиям, предъявляемым к терапевтическим препаратам, необходимо их детальное описание, а в случае бактериофагов — обязательно проводить определение их геномных последовательностей [27], что связано с необходимостью подтвердить вирулентный характер бактериофагов, а именно отсутствие генов интеграз в геноме. Умеренные бактериофаги для терапии не применяют по причине того, что они могут способствовать переносу генов бактериальных токсинов, а также детерминант устойчивости к антибиотикам в популяции бактерий [27]. Кроме того, с целью оценки безопасности применения бактериофага в терапии осуществляют поиск генов известных токсинов в составе генома [27].

Для исследуемых бактериофагов обоих семейств было продемонстрировано типичное модульное строение генома [24, 28], включающее модуль метаболизма нуклеиновых кислот, модуль морфогенеза

и упаковки. Кроме того, для vB\_PaeA-55-1w (семейство *Autographiviridae*) была установлена локализация модуля лизиса. В случае бактериофага vB\_PaeM-198 (семейство *Myoviridae*) генов, обладающих высокой степенью идентичности с известными генами лизинов или холинов, обнаружено не было. Нужно отметить, что для обоих исследуемых бактериофагов модуля лизогенности, включающего гены интеграз, обнаружено не было, что подтверждает их вирулентный характер. Также не было выявлено известных генов токсинов, что делает исследуемые бактериофаги потенциально пригодными для терапии.

На основании данных филогенетического анализа бактериофагов *Pseudomonas spp.*, относящихся к семействам *Autographiviridae* и *Myoviridae*, было показано, что бактериофаги *P. aeruginosa* вне зависимости от семейства формируют отдельные кластеры на филогенетических деревьях, соответствующие родам *Phikmvirus* и *Stubburvirus* (семейство *Autographiviridae*), а также *Baikalvirus*, *Citexvirus*, *Elvirus*, *Nankokuvirus*, *Pakpunavirus*, *Pbunavirus*, *Phikzvirus*, *Phitrevirus* (семейство *Myoviridae*). Данный факт указывает на то, что бактериофаги *P. aeruginosa* видоспецифичны. Отдельно надо отметить, что бактериофаги, описанные ранее и применяемые в фаготерапии (phiKMV, PPA-ABTNL, MPK6, RLP), в том числе ФНН-4 (*Pbunaviruses*) и PAK\_P1 (*Pakpunavirus*), показали свою эффективность на животных моделях [29, 30] и также кластеризуются совместно с исследуемыми бактериофагами vB\_PaeA-55-1w и vB\_PaeM-198.

## ВЫВОДЫ

Исходя из проведенного анализа, бактериофаги vB\_PaeA-55-1w и vB\_PaeM-198 можно рекомендовать для потенциального применения в фаготерапии, в том числе и инфекций, вызванных штаммами *P. aeruginosa* с МЛУ.

## Литература

1. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnetet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2018; 18 (3): 318–27.
2. Horcajada JP, Montero M, Oliver A, Sorlí L, Luque S, Gómez-Zorrilla S, et al. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clin Microbiol Rev.* 2019; 32 (4).
3. Kuzmenkov AY, Trushin IV, Vinogradova AG, Avramenko AA, Sukhorukova MV, Malhotra-Kumar S, et al. AMRmap: an interactive web platform for analysis of antimicrobial resistance surveillance data in Russia. *Front Microbiol.* 2021; 12: 620002.
4. Pena C, Cabot G, Gómez-Zorrilla S, Zamorano L, Ocampo-Sosa A, Murillas J, et al. Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clin Infect Dis.* 2015; 60 (4): 539–48.
5. 2020 Antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis. Geneva: World Health Organization, 2021. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240021303>.
6. Gordillo Altamirano FL, Barr JJ. Phage therapy in the postantibiotic era. *Clinical Microbiology Reviews.* 2019; 32 (2): e00066-18. DOI: 10.1128/CMR.00066-18.
7. Акимкин В. Г., Дарбеёва О. С., Колков В.Ф. Бактериофаги: исторические и современные аспекты их применения: опыт и перспективы. *Клиническая практика.* 2010; 1 (4): 48–54.
8. Chen F, Cheng X, Li J, Yuan X, Huang X, Lian M, et al. Novel lytic phages protect cells and mice against *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Virol.* 2021; 95 (8): e01832-20. DOI: 10.1128/JVI.01832-20.
9. Jault P, Cheng X, Li J, Yuan X, Huang X, Lian M, et al. Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis.* 2019; 19 (1): 35–45.
10. Oechslin F. Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy. *Viruses.* 2018; 10 (7): 351. DOI: 10.3390/v10070351.
11. Купцов Н. С. и др. Эффективность препаратов бактериофагов против патогенов группы ESKAPE. *Вестник РГМУ.* 2020; (3): 19–26.
12. Mazzocco A, et al. Enumeration of bacteriophages using the small drop plaque assay system. *Methods Mol Biol.* 2009; 501: 81–85.
13. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Pr. 1989, 2200 p.
14. Seemann T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* Oxford University Press. 2014; 30 (14): 2068–9.
15. Aziz RK, et al. The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics.* BioMed Central. 2008; 9: 75.
16. Laslett D. ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32 (1): 11–16.
17. Lefkowitz EJ, et al. Virus taxonomy: The database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Res.* 2018; 46 (1): 708–17.
18. Meier-Kolthoff JP, Göker M. VICTOR: genome-based phylogeny and classification of prokaryotic viruses. *Bioinformatics.* 2017; 33 (21): 3396–404.
19. Lefort V, Desper R, Gascuel O. FastME 2.0: A comprehensive, accurate, and fast distance-based phylogeny inference program. *Mol Biol.* 2015; 32 (10): 2798–800.
20. FigTree. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. (Дата обращения: 16.07.2021).
21. Enright MC, et al. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2000; 38 (3): 1008–15.
22. Alvi IA, et al. RLP, a bacteriophage of the family Podoviridae, rescues mice from bacteremia caused by multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Virol.* 2020. 165 (6): 1289–97.
23. Farlow J, et al. Complete Genome Sequences of 10 Phages Lytic against Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Resour.* 2020. 9: 29.
24. Alvi IA, Asif M, Rehman S. A single dose of a virulent bacteriophage vB\_PaeP-SaPL, rescues bacteremic mice infected with multi drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Virus Res.* 2021; 292: 198250.
25. Adnan M, et al. Isolation and characterization of bacteriophage to control multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* planktonic cells and biofilm. *Biologicals.* 2020; 63: 89–96.
26. Treepong P, et al. Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. *Clin Microbiol Infect.* 2018; 24 (3): 258–66.
27. Principi N, Silvestri E, Esposito S. Advantages and Limitations of Bacteriophages for the Treatment of Bacterial Infections. *Front Pharmacol.* 2019; 10: 513.
28. Guo Y, Chen P, Lin Z, Wang T. Characterization of Two *Pseudomonas aeruginosa* Viruses vB\_PaeM\_SCUT-S1 and vB\_PaeM\_SCUT-S2. *Viruses.* 2019; 11 (4): 318. DOI: 10.3390/v11040318.
29. Alemayehu D, Casey PG, McAuliffe O, Guinane CM, Martin JG, Shanahan F, et al. Bacteriophages  $\phi$ MR299-2 and  $\phi$ NH-4 can eliminate *Pseudomonas aeruginosa* in the murine lung and on cystic fibrosis lung airway cells. *MBio.* 2012; 3 (2): e00029-12. DOI: 10.1128/mBio.00029-12.
30. Debarbieux L, Leduc D, Maura D, Morello E, Criscuolo A, Grossi O, et al. Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *J Infect Dis.* 2010; 201 (7): 1096–104.

## References

1. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnetet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2018; 18 (3): 318–27.
2. Horcajada JP, Montero M, Oliver A, Sorlí L, Luque S, Gómez-Zorrilla S, et al. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clin Microbiol Rev.* 2019; 32 (4).
3. Kuzmenkov AY, Trushin IV, Vinogradova AG, Avramenko AA, Sukhorukova MV, Malhotra-Kumar S, et al. AMRmap: an interactive web platform for analysis of antimicrobial resistance surveillance data in Russia. *Front Microbiol.* 2021; 12: 620002.
4. Pena C, Cabot G, Gómez-Zorrilla S, Zamorano L, Ocampo-Sosa A, Murillas J, et al. Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clin Infect Dis.* 2015; 60 (4): 539–48.
5. 2020 Antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis. Geneva: World Health Organization, 2021. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240021303>.
6. Gordillo Altamirano FL, Barr JJ. Phage therapy in the postantibiotic era. *Clinical Microbiology Reviews.* 2019; 32 (2): e00066-18. DOI: 10.1128/CMR.00066-18.
7. Акимкин VG, Darbeeva OS, Kolikov VF. Bakteriofagi: istoricheskie i sovremennye aspekty ih primeneniya: opyt i perspektivy. *Klinicheskaja praktika.* 2010; 1 (4): 48–54. Russian.
8. Chen F, Cheng X, Li J, Yuan X, Huang X, Lian M, et al. Novel lytic phages protect cells and mice against *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Virol.* 2021; 95 (8): e01832-20. DOI: 10.1128/JVI.01832-20.
9. Jault P, Cheng X, Li J, Yuan X, Huang X, Lian M, et al. Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis.* 2019; 19 (1): 35–45.

10. Oechslin F. Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy. *Viruses*. 2018; 10 (7): 351. DOI: 10.3390/v10070351.
11. Kuptsov NS, Kornienko MA, Gorodnichev RB, Danilov DI, Malakhova MV, Parfenova TV, et al. Efficacy of commercial bacteriophage products against ESKAPE pathogens. *Bulletin of RSMU*. 2020; (3): 18–24.
12. Mazzocco A, et al. Enumeration of bacteriophages using the small drop plaque assay system. *Methods Mol Biol*. 2009; 501: 81–85.
13. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Pr. 1989, 2200 p.
14. Seemann T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. Oxford University Press. 2014; 30 (14): 2068–9.
15. Aziz RK, et al. The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*. BioMed Central. 2008; 9: 75.
16. Laslett D. ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32 (1): 11–16.
17. Lefkowitz EJ, et al. Virus taxonomy: The database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Res*. 2018; 46 (1): 708–17.
18. Meier-Kolthoff JP, Göker M. VICTOR: genome-based phylogeny and classification of prokaryotic viruses. *Bioinformatics*. 2017; 33 (21): 3396–404.
19. Lefort V, Desper R, Gascuel O. FastME 2.0: A comprehensive, accurate, and fast distance-based phylogeny inference program. *Mol Biol*. 2015; 32 (10): 2798–800.
20. FigTree. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. (Data obrashhenija: 16.07.2021).
21. Enright MC, et al. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2000; 38 (3): 1008–15.
22. Alvi IA, et al. RLP, a bacteriophage of the family Podoviridae, rescues mice from bacteremia caused by multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Virol*. 2020. 165 (6): 1289–97.
23. Farlow J, et al. Complete Genome Sequences of 10 Phages Lytic against Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Resour*. 2020. 9: 29.
24. Alvi IA, Asif M, Rehman S. A single dose of a virulent bacteriophage vB\_PaeP-SaPL, rescues bacteremic mice infected with multi drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Virus Res*. 2021; 292: 198250.
25. Adnan M, et al. Isolation and characterization of bacteriophage to control multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* planktonic cells and biofilm. *Biologicals*. 2020; 63: 89–96.
26. Treepong P, et al. Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. *Clin Microbiol Infect*. 2018; 24 (3): 258–66.
27. Principi N, Silvestri E, Esposito S. Advantages and Limitations of Bacteriophages for the Treatment of Bacterial Infections. *Front Pharmacol*. 2019; 10: 513.
28. Guo Y, Chen P, Lin Z, Wang T. Characterization of Two *Pseudomonas aeruginosa* Viruses vB\_PaeM\_SCUT-S1 and vB\_PaeM\_SCUT-S2. *Viruses*. 2019; 11 (4): 318. DOI: 10.3390/v11040318.
29. Alemayehu D, Casey PG, McAuliffe O, Guinane CM, Martin JG, Shanahan F, et al. Bacteriophages  $\phi$ MR299-2 and  $\phi$ NH-4 can eliminate *Pseudomonas aeruginosa* in the murine lung and on cystic fibrosis lung airway cells. *MBio*. 2012; 3 (2): e00029-12. DOI: 10.1128/mBio.00029-12.
30. Debarbieux L, Leduc D, Maura D, Morello E, Criscuolo A, Grossi O, et al. Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *J Infect Dis*. 2010; 201 (7): 1096–104.

## ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕФЛОХИНА В ОТНОШЕНИИ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ SARS-COV-2 В КЛИНИЧЕСКИХ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

К. Н. Филин, В. Д. Гладких , В. Н. Быков

Научно-производственный центр «Фармзащита» Федерального медико-биологического агентства, Химки, Московская обл., Россия

Эффективность мефлохина в экспериментах *in vivo* и клинических исследованиях у пациентов с COVID-19 не установлена. Целью исследования было оценить влияние мефлохина на накопление SARS-CoV-2 в легких инфицированных животных и изучить эффективность и безопасность мефлохина в сравнении с гидроксихлорохином при лечении пациентов с COVID-19. В ходе эксперимента 96 сирийских хомячков инфицировали SARS-CoV-2. Оценивали накопление вируса в легких в группах животных, которым вводили мефлохин, препарат сравнения рибавирин и контроля. В ходе клинического исследования безопасность и эффективность мефлохина и гидроксихлорохина в лечении пациентов с COVID-19 с легким и средне-тяжелым течением заболевания (172 участника) оценивали по динамике симптомов и результатам компьютерной томографии. В результате эксперимента накопление SARS-CoV-2 в легких сирийских хомячков через 6 суток после заражения и лечения мефлохином составило  $2,2 \pm 0,18$  lg БОЕ/г, что было ниже ( $p < 0,05$ ), чем в группе контроля ( $3,5 \pm 0,21$  lg БОЕ/г) и в группе рибавирина ( $5,2 \pm 0,05$  lg БОЕ/г). В результате клинического исследования 50,0% пациентов в группе мефлохина и 32,4% в группе гидроксихлорохина ( $p < 0,05$ ) достигли легкой степени тяжести заболевания, у 76,5% и 44,6% соответственно зарегистрировали полное разрешение дыхательной недостаточности ( $p < 0,001$ ). Нежелательные явления наблюдались у 86,7 и у 77% пациентов в группах мефлохина и гидроксихлорохина соответственно ( $p > 0,05$ ). Таким образом, мефлохин в эксперименте способствовал более быстрому снижению титра вируса в легких, а в ходе клинических исследований эффективность мефлохина была не хуже, а по некоторым показателям лучше, чем у гидроксихлорохина, при сравнимой безопасности.

**Ключевые слова:** гидроксихлорохин, SARS-CoV-2, мефлохин, противовирусная активность, COVID-19**Вклад авторов:** К. Н. Филин — концепция и дизайн исследования, написание текста; В. Д. Гладких — написание текста, редактирование; В. Н. Быков — сбор литературных данных, сбор и обработка материала, написание текста.

**Соблюдение этических стандартов:** экспериментальное исследование на лабораторных животных одобрено Комиссией по биоэтике АО НПО «Дом Фармации» (протокол № 3.71/20 от 23 декабря 2020 г.); все процедуры с животными проводили в соответствии с Директивой № 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского Союза «О защите животных, использующихся для научных целей» от 22.09.2010. Содержание и обслуживание животных осуществляли в соответствии с ГОСТ Р 53434-2009 (Принципы надлежащей лабораторной практики) и «Руководством по лабораторным животным» (2010). Клиническое исследование одобрено этическими комитетами клинических центров ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России, ФГБУ ФКЦ ВМТ ФМБА России, ФГБУ ФНКЦ СВМП ИТ ФМБА России, ФГБУ НИИЦО ФМБА России; проведено в соответствии с Постановлением Правительства Российской Федерации от 03.04.2020 № 441; все пациенты подписали информированное согласие.

 **Для корреспонденции:** Вадим Дмитриевич Гладких  
Вашутинское шоссе, д. 11, г. Химки, Московская область, 141402, Россия; gladkich2007@rambler.ru

**Статья получена:** 21.07.2021 **Статья принята к печати:** 26.08.2021 **Опубликована онлайн:** 30.09.2021**DOI:** 10.47183/mes.2021.036

## EXPERIMENTAL AND CLINICAL EVALUATION OF MEFLOROQUINE EFFECTIVENESS AGAINST THE INFECTION CAUSED BY SARS-COV-2

Filin KN, Gladkikh VD , Bykov VN

Federal State Unitary Enterprise Research &amp; Production Center "Pharmaceutical Protection" of Federal Medical Biological Agency, Khimki, Moscow Region, Russia

The efficacy of mefloquine has not been studied in the *in vivo* experiments and clinical trials involving COVID-19 patients. The study was aimed to assess the effects of mefloquine on the SARS-CoV-2 accumulation in the lungs of infected animals and to study the efficacy and safety of mefloquine compared to hydroxychloroquine in patients with COVID-19. During the experiment, a total of 96 Syrian hamsters were infected with SARS-CoV-2. Accumulation of the virus in lungs was compared in the groups of animals treated with mefloquine and ribavirin and in the control group. During the clinical trial, the mefloquine and hydroxychloroquine safety and efficacy in patients with mild and moderate COVID-19 (172 individuals) was assessed based on the symptom changes over time and the computed tomography results. The experiment showed that the SARS-CoV-2 accumulation in the lungs of Syrian hamsters 6 days after infection and mefloquine treatment was  $2.2 \pm 0.18$  lg PFU/g, which was lower ( $p < 0.05$ ) than in the control group ( $3.5 \pm 0.21$  lg PFU/g) and ribavirin group ( $5.2 \pm 0.05$  lg PFU/g). During the clinical trial, it was found that 50.0% of patients in the mefloquine group and 32.4% in the hydroxychloroquine group ( $p < 0.05$ ) developed a mild disease, and the completely resolved respiratory failure was registered in 76.5% and 44.6%, respectively ( $p < 0.001$ ). Adverse events were observed in 86.7% and 77% of patients in the mefloquine and hydroxychloroquine groups, respectively ( $p > 0.05$ ). Thus, during the experiment, mefloquine contributed to the faster virus titer reduction in the lungs. During the clinical trial, the mefloquine efficacy was non-inferiority or, based on a number of indicators, higher compared to hydroxychloroquine, with comparable safety.

**Keywords:** hydroxychloroquine, SARS-CoV-2, mefloquine, antiviral activity, COVID-19**Author contribution:** Filin KN — study concept and design, manuscript writing; Gladkikh VD — manuscript writing and editing; Bykov VN — literature analysis, data acquisition and processing, manuscript writing.

**Compliance with ethical standards:** animal experiments were approved by the Bioethics Commission of RMC "Home of Pharmacy" (protocol № 3.71/20 dated December 23, 2020); all the procedures involving animals were performed in accordance with the Directive N 2010/63/EC of the European Parliament and of the Council of the European Union "On the Protection of Animals Used for Scientific Purposes" of September 22, 2010. The animals' housing and care complied with GOST R 53434-2009 (Principles of Good Laboratory Practice) and the Guidelines for Laboratory Animals (2010). The clinical trial was approved by the Ethics Committees of the clinical centers of Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of FMBA, Federal Clinical Center for High Medical Technologies of FMBA, Center for Specialized Medical Assistance and Medical Technologies of FMBA, National Medical Research Center for Otorhinolaryngology of FMBA; the trial was carried out in accordance with the Russian Federation Government Decree № 441 of April 3, 2020; the informed consent was obtained from all patients.

 **Correspondence should be addressed:** Vadim D. Gladkikh  
Vaschutinskoe shosse, 11, g. Himki, Moskovskaja oblast, 141402; gladkich2007@rambler.ru

**Received:** 21.07.2021 **Accepted:** 26.08.2021 **Published online:** 30.09.2021**DOI:** 10.47183/mes.2021.036

К противомаларийным препаратам, показавшим свою эффективность при инфекциях, вызванных коронавирусами, относятся производные хинолина — гидроксихлорохин и хлорохин [1]. Препараты имеют схожую химическую структуру и фармакологическое действие, но гидроксихлорохин обладает меньшей токсичностью [2]. Было показано, что  $EC_{50}$  гидроксихлорохина в отношении SARS-CoV-2 *in vitro* при внесении препарата за 1 ч до заражения составляет 4,51–12,96 мкМ, а цитотоксическая доза была в 100 раз выше [2]. При внесении гидроксихлорохина в среду переживания через 2 ч после заражения SARS-CoV-2  $EC_{50}$  составляет 0,72–6,14 мкМ [3]. Указанные концентрации могут быть достигнуты *in vivo* после приема препарата в терапевтической дозе 400 мг, учитывая, что его концентрация в легких в 6 раз превышает концентрацию в плазме крови.

К числу других противомаларийных препаратов с доказанной активностью в отношении SARS-CoV-2 в условиях *in vitro* относится мефлохин [4, 5]. В эксперименте была установлена активность мефлохина в отношении возбудителей ряда опасных вирусных заболеваний [6, 7], в том числе коронавирусов [8–10]. Показано, что мефлохин блокирует цитопатический эффект коронавируса в культуре клеток и препятствует его репликации в концентрациях не более 10 мкМ (4 мг/л) [9]. Уточнение дозовых диапазонов позволило установить, что подавление репликации *in vitro* в отношении SARS-CoV-2 достигается при добавлении мефлохина к культуре клеток Vero C1008 в концентрациях более 1,25 мкМ (0,5 мг/мл). При этом концентрация мефлохина, при которой происходит элиминация SARS-CoV-2, может быть достигнута через 2–3 суток после начала приема препарата в дозах, соответствующих терапевтическим [5, 10, 11].

На основании положительных результатов, полученных в ходе экспериментальных и клинических исследований [12, 13], гидроксихлорохин был включен в схему терапии пациентов с COVID-19 во многих странах мира, в том числе и в России [14]. Противовирусная активность мефлохина в отношении SARS-CoV-2, выявленная в эксперименте, послужила основанием для его включения в клинические рекомендации по лечению пациентов с COVID-19, выпущенные Минздравом России в 2020 г. [14].

Несмотря на то что мефлохин был разрешен к применению у пациентов с COVID-19, до настоящего времени не проводилось изучения его влияния на течение заболевания в экспериментах *in vivo*, а также клинических исследований его эффективности при новой коронавирусной инфекции. Это определило актуальность исследования.

Цель исследования состояла в оценке влияния мефлохина на накопление SARS-CoV-2 в легких инфицированных животных и изучении его эффективности и безопасности в сравнении с гидроксихлорохином для лечения пациентов с COVID-19.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Экспериментальное исследование

Исследование проводили на самцах сирийских хомяков массой 50–70 г (НПО «Дом Фармации»; Россия). Животных содержали в стандартных условиях вивария, со свободным доступом к корму и воде и световым режимом 12 ч / 12 ч. Мефлохин растворяли в 1%-м растворе крахмала и вводили перорально в объеме 100 мкл ежедневно в течение шести дней по схеме: 1 и 2-й дни — 8,8 мг/кг; 3–6-й дни — 3,3 мг/кг. Контрольным животным по аналогичной схеме вводили 1%-й раствор крахмала. В качестве препарата сравнения использовали рибавирин (Dragon Hwa ChemPharm Co. Ltd; Китай), который вводили внутримышечно в дозе 14,3 мг/кг один раз в день в течение шести дней. Число животных в каждой из групп составляло 10 особей.

В работе использовали вирус SARS-CoV-2, вариант В (ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России). Инфицирующий препарат готовили на культуре клеток Vero C1008, множественность инфицирования составила 1 БОЕ (бляшкообразующая единица) на клетку. Активность рабочей культуры вируса составила 7,4 lg БОЕ/мл, цитопатическое действие (ЦПД) — 6,5 ЦПД<sub>50</sub>/мл. Животных инфицировали перорально в дозе  $3 \times 10^5$  БОЕ, наблюдение продолжали 7 суток. Сравнивали показатель накопления вируса в легких (lg БОЕ/г) у животных, которым вводили мефлохин, с группой контроля и животными, которым вводили рибавирин, на 1, 2, 4 и 6-е сутки после заражения. Дополнительно рассчитывали коэффициент ингибирования и снижение накопления вируса в легких.

### Клиническое исследование

Было проведено открытое рандомизированное многоцентровое сравнительное исследование эффективности и безопасности *off-label* применения мефлохина и гидроксихлорохина для лечения пациентов с новой коронавирусной инфекцией, вызванной SARS-CoV-2 в соответствии с Постановлением Правительства Российской Федерации от 03.04.2020 № 441 в период с 07.04.2020 по 21.07.2020.

Критерии включения пациентов в исследование: пациенты мужского и женского пола в возрасте от 18 лет с

**Таблица 1.** Результаты оценки уровня инфекционного титра вируса SARS-CoV-2 в легких сирийских хомяков

| Препарат  | Параметры                                   | Сутки после инфицирования |                |                |                 |
|-----------|---------------------------------------------|---------------------------|----------------|----------------|-----------------|
|           |                                             | 1-е                       | 2-е            | 4-е            | 6-е             |
| Контроль  | Накопление вируса, lg БОЕ/г, $M \pm \sigma$ | 6,0 $\pm$ 0,21            | 6,0 $\pm$ 0,38 | 6,3 $\pm$ 0,04 | 3,5 $\pm$ 0,21* |
| Мефлохин  | Накопление вируса, lg БОЕ/г, $M \pm \sigma$ | 6,8 $\pm$ 0,07            | 5,8 $\pm$ 0,07 | 6,2 $\pm$ 0,04 | 2,2 $\pm$ 0,18  |
|           | Снижение уровня накопления, $\Delta$ lg     | нет                       | 0,28           | 0,03           | 1,34            |
|           | Коэффициент ингибирования, %                | нет                       | 47,5           | 7,4            | 95,5            |
| Рибавирин | Накопление вируса, lg БОЕ/г, $M \pm \sigma$ | 6,2 $\pm$ 0,04            | 5,0 $\pm$ 0,06 | 6,4 $\pm$ 0,03 | 5,2 $\pm$ 0,05* |
|           | Снижение уровня накопления, $\Delta$ lg     | нет                       | 0,08           | нет            | нет             |
|           | Коэффициент ингибирования, %                | нет                       | 17,1           | нет            | нет             |

**Примечание:** \* — различия с группой «мефлохин» достоверны при  $p < 0,05$ .

Таблица 2. Сравнительная оценка эффективности мефлохина и гидроксихлорохина по первичным конечным точкам

| Показатель                             | Число пациентов, достигших данной точки, n (%) |                   | Среднее время достижения конечной точки (SD), дни |                  |
|----------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------|---------------------------------------------------|------------------|
|                                        | Мефлохин                                       | Гидроксихлорохин  | Мефлохин                                          | Гидроксихлорохин |
| Достижение легкой степени тяжести      | 49/98*<br>(50,0%)                              | 24/74<br>(32,4%)  | 11,3<br>(6,08)                                    | 10,0<br>(10,34)  |
| Разрешение дыхательной недостаточности | 75/98# (76,5 %)                                | 33/74<br>(44,6 %) | 6,5<br>(6,40)                                     | 4,4<br>(5,68)    |

Примечание: \* — различия с группой сравнения статистически значимы,  $p < 0,05$ ; # — различия с группой сравнения статистически значимы,  $p < 0,001$ .

легким и средне-тяжелым течением новой коронавирусной инфекции, подтвержденной по результатам ПЦР-теста на вирусную РНК; госпитализация пациента; наличие информированного согласия на участие в исследовании (всего 172 человека). Пациенты со средне-тяжелым течением составляли более 95%. При определении степени тяжести применяли рекомендованную классификацию [14].

Критерии исключения: тяжелое и крайне тяжелое течение COVID-19; неврологические и психические расстройства; психические заболевания в анамнезе; судороги или повышенная судорожная готовность, эпилепсия; кардиомиопатия, ретинопатия; беременность и период лактации; хронические заболевания печени в стадии печеночной недостаточности или обострения; активное злокачественное новообразование; тяжелое неконтролируемое сердечно-сосудистое заболевание; иные заболевания и состояния, не позволившие принять участия в исследовании.

Средний возраст пациентов составил 52,5 года, соотношение мужчин и женщин составляло 45/55. Все пациенты прошли рандомизацию и были распределены в две группы: пациентам 1-й группы (98 человека) назначали мефлохин; пациентам 2-й группы (74 человека) — гидроксихлорохин. Препараты назначали по схемам, рекомендованным Минздравом России [14].

Средняя продолжительность заболевания до скрининга ( $M \pm SD$ ) составляла  $8,4 \pm 5,35$  дней в группе мефлохина и  $7,9 \pm 4,66$  дней в группе гидроксихлорохина. Основными симптомами заболевания были температура более  $38,5^\circ\text{C}$ , сухой кашель, одышка, утомляемость и ощущение заложенности в грудной клетке. Поражение легких по результатам компьютерной томографии (КТ) соответствовало КТ-II – КТ-III.

Продолжительность приема препаратов в обеих группах составляла 7 дней. Через 11 дней после начала приема препарата фиксировали клинический статус пациента. В случае клинического выздоровления пациента выписывали из стационара, а при необходимости продолжения госпитализации наблюдения продолжали.

В качестве первичных конечных точек эффективности использовали показатели клинического улучшения: достижение легкой степени тяжести коронавирусной инфекции; разрешение дыхательной недостаточности.

Вторичные конечные точки: улучшение состояния пациента по данным КТ; достижение оценки «КТ-1 и

менее»; разрешение пневмонии; достижение дыхательной недостаточности 1-й степени тяжести (ДН-1); оказание кислородной поддержки.

Для оценки безопасности препаратов проводили анализ частоты нежелательных явления (НЯ) и серьезных нежелательных явлений (СНЯ), а также регистрацию состояний, которые послужили основанием для прекращения применения исследуемых препаратов.

Для статистического анализа использовали пакет прикладных программ SAS версии 9.3. (SAS Institute Inc.; США). Сравнительный анализ параметрических данных был проведен с использованием двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) для параметрических показателей, а также сравнения результатов на основе таблиц сопряженности (критерий Хи-квадрат или точный критерий Фишера). Данные проверяли на соответствие закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для сравнения групп использовали критерий Стьюдента (в случае нормального распределения) или критерий Манна-Уитни. Различия между группами считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Экспериментальная оценка влияния мефлохина на накопление вируса в легочной ткани сирийских хомячков, инфицированных SARS-CoV-2

Результаты оценки уровня инфекционного титра вируса SARS-CoV-2 в ткани легких сирийских хомячков представлены в табл. 1. Для групп мефлохина и рибавирина дополнительно приведены значения показателя снижения уровня накопления вируса и коэффициента ингибирования, которые рассчитывались по отношению к контролю.

На 2-е сутки после инфицирования отмечено снижение вирусной нагрузки у животных, которым вводили мефлохин и рибавирин, хотя различия с контрольной группой были не значимы. На 4-е сутки после инфицирования во всех группах отмечали увеличение вирусной нагрузки. На 6-е сутки титр вируса в легочной ткани в группе мефлохина был статистически значимо ниже ( $p < 0,05$ ) по сравнению как с группой контроля, так и с группой рибавирина. Снижение уровня накопления SARS-CoV-2 по сравнению с контролем составил 1,34 lg, коэффициент ингибирования — 95,5%.

Таблица 3. Сравнительная оценка эффективности мефлохина и гидроксихлорохина по вторичным конечным точкам

| Показатель                | Число пациентов, достигших данной точки, n (%) |                  | Среднее время достижения конечной точки (SD), дни |                  |
|---------------------------|------------------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------|------------------|
|                           | Мефлохин                                       | Гидроксихлорохин | Мефлохин                                          | Гидроксихлорохин |
| Улучшение по КТ           | 50 (51,0%)                                     | 32 (43,2%)       | 9,4 (4,48)                                        | 9,0 (4,56)       |
| Оценка «КТ-1 и менее»     | 54 (55,1%)                                     | 36 (48,6%)       | 2,5 (5,62)                                        | 1,1 (4,24)       |
| Разрешение пневмонии      | 15 (15,3%)                                     | 9 (12,2%)        | 7,3 (8,37)                                        | 4,4 (5,15)       |
| Достижение ДН-1           | 77 (78,6%)                                     | 54 (73,0%)       | 1,5 (3,26)                                        | 1,0 (3,02)       |
| Оказание $O_2$ -поддержки | 30 (30,6%)                                     | 18 (24,3%)       | 3,8 (1,93)                                        | 4,1 (3,42)       |

Таблица 4. Нежелательные явления, зарегистрированные в ходе исследования

| Показатель                             | Число субъектов, <i>n</i> (%) |                  | Число событий, <i>n</i> |                  | Значение <i>p</i> (точный критерий Фишера) |
|----------------------------------------|-------------------------------|------------------|-------------------------|------------------|--------------------------------------------|
|                                        | Мефлохин                      | Гидроксихлорохин | Мефлохин                | Гидроксихлорохин |                                            |
| Лабораторные и инструментальные данные |                               |                  |                         |                  |                                            |
| Любое НЯ                               | 54 (55,1%)                    | 29 (39,2%)       | 54                      | 29               | 0,046                                      |
| Повышение трансаминаз                  | 48 (49,0%)                    | 29 (39,2%)       | 48                      | 29               | 0,218                                      |
| Снижение насыщения O <sub>2</sub>      | 5 (5,1%)                      | 0 (0,0%)         | 5                       | 0                | 0,071                                      |
| Нарушения со стороны сосудов           |                               |                  |                         |                  |                                            |
| Любое НЯ                               | 37 (37,8%)                    | 24 (32,4%)       | 37                      | 24               | 0,521                                      |
| Колебания АД                           | 37 (37,8%)                    | 24 (32,4%)       | 37                      | 24               | 0,521                                      |
| Нарушения со стороны нервной системы   |                               |                  |                         |                  |                                            |
| Любое НЯ                               | 30 (30,6%)                    | 23 (31,1%)       | 34                      | 28               | 0,99                                       |
| Головная боль                          | 17 (17,4%)                    | 19 (25,7%)       | 17                      | 19               | 0,192                                      |
| Головокружение                         | 17 (17,4%)                    | 9 (12,2%)        | 17                      | 9                | 0,396                                      |
| Желудочно-кишечные нарушения           |                               |                  |                         |                  |                                            |
| Любое НЯ                               | 20 (20,4%)                    | 18 (24,3%)       | 25                      | 19               | 0,581                                      |
| Диарея                                 | 9 (9,2%)                      | 14 (18,9%)       | 9                       | 14               | 0,073                                      |
| Тошнота                                | 11 (11,2%)                    | 4 (5,4%)         | 11                      | 4                | 0,275                                      |
| Рвота                                  | 4 (4,1%)                      | 0 (0,0%)         | 4                       | 0                | 0,135                                      |
| Боль в животе                          | 1 (1%)                        | 1 (1,4%)         | 1                       | 1                | 0,99                                       |

#### Сравнительная оценка эффективности мефлохина и гидроксихлорохина у пациентов с новой коронавирусной инфекцией

Результаты, полученные при анализе первичных конечных точек, представлены в табл. 2.

Доля пациентов с достижением легкой степени тяжести коронавирусной инфекции в группе мефлохина была значимо ( $p = 0,021$ ) выше, чем в группе гидроксихлорохина. И хотя среднее время до достижения этой конечной точки быстрее происходило после приема гидроксихлорохина, различия между группами не были статистически значимы ( $p > 0,05$ ).

Доля пациентов с полным разрешением дыхательной недостаточности (ДН) в группе мефлохина была выше ( $p < 0,001$ ), чем в группе гидроксихлорохина. Несмотря на то что отмечалось более быстрое разрешение ДН после приема гидроксихлорохина, межгрупповые различия по данному показателю не были статистически значимы.

Результаты, полученные при анализе вторичных конечных точек проведенного клинического исследования, представлены в табл. 3.

При анализе вторичных конечных точек статистически значимых отличий между группами пациентов, принимавших мефлохин и гидроксихлорохин, выявлено не было ни по одному из исследованных показателей. В ходе оценки безопасности в общей сложности было зарегистрировано 165 нежелательных явлений (НЯ) у 85 пациентов (86,73 %) в группе мефлохина и 112 НЯ у 57 пациентов (77,03 %) в группе гидроксихлорохина (различия между группами статистически не значимы,  $p = 0,108$ ). Общее количество серьезных нежелательных явлений (СНЯ) составило 5 у четырех пациентов (86,7%) в группе мефлохина и 1 у одного пациента (1,35%) в группе гидроксихлорохина. Характеристика нежелательных явлений представлена в табл. 4.

Другие НЯ, в том числе психические расстройства (с которыми связывают основной риск приема мефлохина),

наблюдали в единичных случаях. При этом такие НЯ, как делирий и острый психоз, регистрировали только у одного пациента после приема мефлохина.

У большинства пациентов, принимавших участие в исследовании, регистрировали НЯ легкой степени: 81 (82,7%) пациент (160 событий) после приема мефлохина и 56 (75,7%) пациентов (111 событий) после приема гидроксихлорохина ( $p = 0,339$ ). НЯ средней степени тяжести регистрировали у одного (1,02%) пациента (1 событие — острый психоз) после приема мефлохина и у 0 (0,0%) пациентов после приема гидроксихлорохина ( $p = 0,99$ ). НЯ тяжелой степени были зарегистрированы у четверых (4,08%) пациентов (5 событий) после приема мефлохина и у одного (1,35%) пациента (1 событие) после приема гидроксихлорохина ( $p = 0,392$ ):

– в группе мефлохина: снижение насыщения кислородом у четверых пациентов (4,08%), и делирий — у одного (1,02%) пациента;

– в группе сравнения: острый коронарный синдром у одного пациента (1,35%).

Развитие делирия потребовало медикаментозной коррекции (введение нейролептиков), в остальных случаях СНЯ разрешились после отмены препарата.

Связь НЯ с исследуемым препаратом расценивали как «возможная» в одном случае и как «вероятная» в одном случае после приема мефлохина, для остальных НЯ связь была сомнительная или не была установлена как для мефлохина, так и для гидроксихлорохина.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе систематического обзора клинических исследований, связанных с применением гидроксихлорохина при новой коронавирусной инфекции, был сделан вывод, что препарат снижает частоту прогрессирования заболевания и ускоряет регресс клинической симптоматики [15], но не влияет на скорость конверсии ПЦР на SARS-CoV-2 [16], сроки госпитализации, смертность и перевод на ИВЛ [17]. Метаанализ клинических исследований показал,

что применение гидроксихлорохина сопровождается повышенной смертностью пациентов с COVID-19 [18]. Вместе с тем, такой эффект может быть связан с тем, что дозы препарата, применяемые для лечения новой коронавирусной инфекции, зачастую превышают безопасные [19].

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что эффективность мефлохина при назначении пациентам с новой коронавирусной инфекцией, которая оценивалась по уменьшению выраженности клинической симптоматики и динамике результатов компьютерной томографии, была не ниже, а по ряду показателей превышала эффективность гидроксихлорохина. Безопасность применения мефлохина и гидроксихлорохина у пациентов с новой коронавирусной инфекцией была сопоставима.

В настоящее время противомаларийные препараты исключены из клинических рекомендаций по лечению пациентов с COVID-19 в связи с недоказанной эффективностью и риском развития побочных эффектов. Однако результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что эффект мефлохина в отношении SARS-CoV2 в экспериментах *in vivo* может быть достигнут при введении препарата в дозах, которые по результатам межвидового переноса были в 3–10 раз меньше, чем разовая доза, рекомендованная для

применения у человека при развитии COVID-19 [20]. В связи с этим можно предположить, что подтверждение противовирусной активности мефлохина в более низком диапазоне доз позволит пересмотреть взгляды на его применение при COVID-19 и других вирусных инфекциях.

## ВЫВОДЫ

1. При курсовом введении мефлохина в дозах 75–150 мг сирийским хомьям, инфицированным SARS-CoV-2 в дозе  $5 \times 10^5$  БОЕ, отмечено статистически значимое снижение накопления вируса в ткани легких по сравнению с животными группы контроля, не получавшими лечения, и с группой рибавирина. 2. При назначении пациентам с COVID-19 легкой и средней степени тяжести, подтвержденной по результатам ПЦР-теста на вирусную РНК, мефлохин показал не меньшую эффективность, чем гидроксихлорохин, а по отдельным показателям статистически значимо превосходил его. 3. Результаты оценки безопасности позволяют сделать вывод о сравнимом профиле безопасности мефлохина и гидроксихлорохина при их применении для лечения пациентов с COVID-19 (легкое и средне-тяжелое течение). При этом все регистрировавшиеся нежелательные явления были указаны в инструкции по медицинскому применению препарата.

## Литература

- Chan KW, Wong VT, Tang SCW. COVID-19: An Update on the Epidemiological, Clinical, Preventive and Therapeutic Evidence and Guidelines of Integrative Chinese-Western Medicine for the Management of 2019 Novel Coronavirus Disease. *Am J Chin Med*. 2020; 48 (3): 737–762. DOI: 10.1142/S0192415X20500378.
- Liu J, Cao R, Xu M, Wang X, Zhang H, Hu H, et al. Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro. *Cell Discov*. 2020 Mar 18; 6: 16. DOI: 10.1038/s41421-020-0156-0.
- Yao X, Ye F, Zhang M, et al. In Vitro Antiviral Activity and Projection of Optimized Dosing Design of Hydroxychloroquine for the Treatment of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin Infect Dis*. 2020 Jul 28; 71 (15): 732–9. DOI: 10.1093/cid/ciaa237.
- Sweeney TR. The present status of malaria chemotherapy: Mefloquine, a novel antimalarial. *Medicinal Research Reviews*. 1981; 1 (3): 281–301. DOI: 10.1002/med.2610010304.
- Karbwang J, Na-Bangchang K. Clinical application of mefloquine pharmacokinetics in the treatment of *P falciparum* malaria. *Fundam Clin Pharmacol*. 1994; 8 (6): 491–502. DOI: 10.1111/j.1472-8206.1994.tb00830.x.
- Sun W, He S, Martínez-Romero C, et al. Synergistic drug combination effectively blocks Ebola virus infection. *Antiviral Research*. 2017 Jan; 137: 165–72. DOI: 10.1016/j.antiviral.2016.11.017.
- Balasubramanian A, Teramoto T, Kulkarni AA, Bhattacharjee AK, Padmanabhan R. Antiviral activities of selected antimalarials against dengue virus type 2 and Zika virus. *Antiviral Research*. 2017; 137: 141–50. DOI: 10.1016/j.antiviral.2016.11.015.
- McDonagh P, Sheehy PA, Fawcett A, Norris JM. Antiviral effect of mefloquine on feline calicivirus in vitro. *Vet Microbiol*. 2015 Apr 17; 176 (3–4): 370–7. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.02.007.
- Fan HH, Wang LQ, Liu WL, et al. Repurposing of clinically approved drugs for treatment of coronavirus disease 2019 in a 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) related coronavirus model. *Chin Med J (Engl)*. 2020 May 5; 133 (9): 1051–6. DOI: 10.1097/CM9.0000000000000797.
- Филин К. Н., Берзин И. А., Быков В. Н., Гладких В. Д., Логинова С. Я, Савенко С. В., Щукина В. Н. Экспериментальная оценка активности препарата мефлохин в отношении коронавируса SARS-Cov-2. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2020; 3: 13–18. DOI: 10.47183/mes.2020.006.
- Ferreira MVD, Vieira JLF, Almeida ED, et al. Pharmacokinetics of mefloquine administered with artesunate in patients with uncomplicated falciparum malaria from the Brazilian Amazon basin. *Malar J*. 2018 Jul 16; 17 (1): 268. DOI: 10.1186/s12936-018-2416-0.
- Gautret P, Lagier JC, Parola P, Hoang VT, Meddeb L, Sevestre J, et al. Clinical and microbiological effect of a combination of hydroxychloroquine and azithromycin in 80 COVID 19 patients with at least a six-day follow up: A pilot observational study. *Travel Med Infect Dis*. 2020 Mar–Apr; 34: 101663. DOI: 10.1016/j.tmaid.2020.101663.
- Cortegiani A, Ingoglia G, Ippolito M, Giarratano A, Einav S. A systematic review on the efficacy and safety of chloroquine for the treatment of COVID-19. *J Crit Care*. 2020 Jun; 57: 279–83. DOI: 10.1016/j.jccr.2020.03.005.
- Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 5 (08.04.20). Москва: Министерство здравоохранения Российской Федерации. [https://static-1.rosminzdrav.ru/system/attachments/attach/000/049/951/original/09042020\\_MP\\_COVID-19\\_v5.pdf](https://static-1.rosminzdrav.ru/system/attachments/attach/000/049/951/original/09042020_MP_COVID-19_v5.pdf).
- Sama P, Kaur H, Kumar H, Mahendru D, Avti P, Bhattacharyya A, et al. Virological and clinical cure in COVID-19 patients treated with hydroxychloroquine: A systematic review and meta-analysis. *J Med Virol*. 2020 Jul; 92 (7): 776–85. DOI: 10.1002/jmv.25898.
- Tang W, Cao Z, Han M, Wang Z, Chen J, Sun W, et al. Hydroxychloroquine in patients with mainly mild to moderate coronavirus disease 2019: open label, randomised controlled trial. *BMJ*. 2020 May 14; 369: m1849. DOI: 10.1136/bmj.m1849.
- WHO Solidarity Trial Consortium, Pan H, Peto R, Henao-Restrepo AM, Preziosi MP, Sathiyamoorthy V, Abdool Karim Q, et al. Repurposed Antiviral Drugs for Covid-19 — Interim WHO Solidarity Trial Results. *N Engl J Med*. 2021; 384 (6): 497–511. DOI: 10.1056/NEJMoa2023184.
- Axfors C, Schmitt AM, Janiaud P, Vant Hooft J, Abd-Elsalm S, Abdo EF, et al. Mortality outcomes with hydroxychloroquine and chloroquine in COVID-19 from an international collaborative meta-

analysis of randomized trials. *Nat Commun.* 2021. 12 (1): 2349. DOI: 10.1038/s41467-021-22446-z.

19. Li R, Yin K, Zhang K, Wang YY, Wu QP, Tang SB, Cheng JD. Application Prospects of Virtual Autopsy in Forensic Pathological Investigations on COVID-19. *Fa Yi Xue Za Zhi.* 2020 Apr; 36 (2): 149–56. DOI: 10.12116/j.issn.1004-5619.2020.02.001.

## References

1. Chan KW, Wong VT, Tang SCW. COVID-19: An Update on the Epidemiological, Clinical, Preventive and Therapeutic Evidence and Guidelines of Integrative Chinese-Western Medicine for the Management of 2019 Novel Coronavirus Disease. *Am J Chin Med.* 2020; 48 (3): 737–762. DOI: 10.1142/S0192415X20500378.
2. Liu J, Cao R, Xu M, Wang X, Zhang H, Hu H, et al. Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro. *Cell Discov.* 2020 Mar 18; 6: 16. DOI: 10.1038/s41421-020-0156-0.
3. Yao X, Ye F, Zhang M, et al. In Vitro Antiviral Activity and Projection of Optimized Dosing Design of Hydroxychloroquine for the Treatment of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin Infect Dis.* 2020 Jul 28; 71 (15): 732–9. DOI: 10.1093/cid/ciaa237.
4. Sweeney TR. The present status of malaria chemotherapy: Mefloquine, a novel antimalarial. *Medicinal Research Reviews.* 1981; 1 (3): 281–301. DOI: 10.1002/med.2610010304.
5. Karbwang J, Na-Bangchang K. Clinical application of mefloquine pharmacokinetics in the treatment of *P. falciparum* malaria. *Fundam Clin Pharmacol.* 1994; 8 (6): 491–502. DOI: 10.1111/j.1472-8206.1994.tb00830.x.
6. Sun W, He S, Martínez-Romero C, et al. Synergistic drug combination effectively blocks Ebola virus infection. *Antiviral Research.* 2017 Jan; 137: 165–72. DOI: 10.1016/j.antiviral.2016.11.017.
7. Balasubramanian A, Teramoto T, Kulkarni AA, Bhattacharjee AK, Padmanabhan R. Antiviral activities of selected antimalarials against dengue virus type 2 and Zika virus. *Antiviral Research.* 2017; 137: 141–50. DOI: 10.1016/j.antiviral.2016.11.015.
8. McDonagh P, Sheehy PA, Fawcett A, Norris JM. Antiviral effect of mefloquine on feline calicivirus in vitro. *Vet Microbiol.* 2015 Apr 17; 176 (3–4): 370–7. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.02.007.
9. Fan HH, Wang LQ, Liu WL, et al. Repurposing of clinically approved drugs for treatment of coronavirus disease 2019 in a 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) related coronavirus model. *Chin Med J (Engl).* 2020 May 5; 133 (9): 1051–6. DOI: 10.1097/CM9.0000000000000797.
10. Filin KN, Berzin IA, Bykov VN, Gladikh VD, Loginova SYa, Savenko SV, Shhukina VN. Jekspierimental'naja ocenka aktivnosti preparata meflohin v otnoshenii koronavirusa SARS-Cov-2. *Medicina jekstremal'nyh situacij.* 2020; 3: 13–18. DOI: 10.47183/mes.2020.006. Russian.
11. Ferreira MVD, Vieira JLF, Almeida ED, et al. Pharmacokinetics of mefloquine administered with artesunate in patients with uncomplicated falciparum malaria from the Brazilian Amazon basin. *Malar J.* 2018 Jul 16; 17 (1): 268. DOI: 10.1186/s12936-018-2416-0.
12. Gautret P, Lagier JC, Parola P, Hoang VT, Meddeb L, Sevestre J, et al. Clinical and microbiological effect of a combination of hydroxychloroquine and azithromycin in 80 COVID 19 patients with at least a six-day follow up: A pilot observational study. *Travel Med Infect Dis.* 2020 Mar–Apr; 34: 101663. DOI: 10.1016/j.tmaid.2020.101663.
13. Cortegiani A, Ingoglia G, Ippolito M, Giarratano A, Einav S. A systematic review on the efficacy and safety of chloroquine for the treatment of COVID-19. *J Crit Care.* 2020 Jun; 57: 279–83. DOI: 10.1016/j.jcrc.2020.03.005.
14. Vremennye metodicheskie rekomendacii. Profilaktika, diagnostika i lechenie novoj koronavirusnoj infekcii (COVID-19). Versija 5 (08.04.20). Moskva: Ministerstvo zdravooohranenija Rossijskoj Federacii. Available from: [https://static-1.rosminzdrav.ru/system/attachments/attaches/000/049/951/original/09042020\\_MR\\_COVID-19\\_v5.pdf](https://static-1.rosminzdrav.ru/system/attachments/attaches/000/049/951/original/09042020_MR_COVID-19_v5.pdf). Russian.
15. Sarma P, Kaur H, Kumar H, Mahendru D, Avti P, Bhattacharyya A, et al. Virological and clinical cure in COVID-19 patients treated with hydroxychloroquine: A systematic review and meta-analysis. *J Med Virol.* 2020 Jul; 92 (7): 776–85. DOI: 10.1002/jmv.25898.
16. Tang W, Cao Z, Han M, Wang Z, Chen J, Sun W, et al. Hydroxychloroquine in patients with mainly mild to moderate coronavirus disease 2019: open label, randomised controlled trial. *BMJ.* 2020 May 14; 369: m1849. DOI: 10.1136/bmj.m1849.
17. WHO Solidarity Trial Consortium, Pan H, Peto R, Henao-Restrepo AM, Preziosi MP, Sathiyamoorthy V, Abdool Karim Q, et al. Repurposed Antiviral Drugs for Covid-19 — Interim WHO Solidarity Trial Results. *N Engl J Med.* 2021; 384 (6): 497–511. DOI: 10.1056/NEJMoa2023184.
18. Axfors C, Schmitt AM, Janiaud P, Vant Hooft J, Abd-Elsalm S, Abdo EF, et al. Mortality outcomes with hydroxychloroquine and chloroquine in COVID-19 from an international collaborative meta-analysis of randomized trials. *Nat Commun.* 2021. 12 (1): 2349. DOI: 10.1038/s41467-021-22446-z.
19. Li R, Yin K, Zhang K, Wang YY, Wu QP, Tang SB, Cheng JD. Application Prospects of Virtual Autopsy in Forensic Pathological Investigations on COVID-19. *Fa Yi Xue Za Zhi.* 2020 Apr; 36 (2): 149–56. DOI: 10.12116/j.issn.1004-5619.2020.02.001.
20. Filin KN, Bykov VN, Gladikh VD, Lugovik IA, Grebenyuk AN. Evaluation of toxicity and effectiveness of the anti-malaria preparation mefloquine with respect to SARS-CoV-2 in experiments on animals. *Toxicological Review.* 2021; (3): 44–49. DOI: 10.36946/0869-7922-2021-29-3-44-49. Russian.

## СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ОЧИСТКИ ФАГОВЫХ ЛИЗАТОВ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ

Р. Б. Городничев<sup>1</sup>✉, М. А. Корниенко<sup>1</sup>, Н. С. Купцов<sup>1</sup>, А. Д. Ефимов<sup>2</sup>, В. И. Богдан<sup>2</sup>, А. В. Летаров<sup>2</sup>, Е. А. Шитиков<sup>1</sup>, Е. Н. Ильина<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное научно-клиническое центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

<sup>2</sup> Федеральное исследовательский центр биотехнологии, Москва, Россия

Фаготерапия является перспективным методом лечения инфекций, вызванных устойчивыми к антибактериальным препаратам бактериями. Для получения безопасных терапевтических препаратов бактериофагов необходима глубокая очистка лизатов от компонентов бактериальной клетки, в частности эндотоксинов. Целью работы было исследовать применимость различных методов очистки фаголизатов для получения терапевтических препаратов. Фаги vB\_KpnM\_Seu621 (*Myoviridae*) и vB\_KpnP\_Dlv622 (*Autographiviridae*) использовали для получения лизата штамма *Klebsiella pneumoniae* KP9068. Очистку лизатов проводили методом осаждения бактериофагов с использованием полиэтиленгликоля, ультрацентрифугированием в градиенте CsCl, ультрацентрифугированием в градиенте сахарозы, с помощью центрифужных концентраторов (100 кДа), концентрированием на целлюлозных фильтрах 0,22 мкм в присутствии MgSO<sub>4</sub>. Уровень эндотоксинов определяли ЛАЛ-тестированием. В результате действия vB\_KpnM\_Seu621 и vB\_KpnP\_Dlv622 были получены лизаты с титром  $1,25 \times 10^{12} \pm 7,46 \times 10^{10}$  и  $2,25 \times 10^{12} \pm 1,34 \times 10^{11}$  БОЕ/мл и концентрацией эндотоксина  $3806056 \pm 429410$  и  $189456 \pm 12406$  ЕД/мл соответственно. Из традиционных методов оптимальным по снижению уровня эндотоксина и сохранению концентрации фаговых частиц было ультрацентрифугирование в градиенте CsCl ( $303 \pm 20 - 313 \pm 35$  ЕД/мл,  $1,5 - 2,75 \times 10^{12} \pm 1,71 \times 10^{11}$  БОЕ/мл); из альтернативных — очистка в градиенте сахарозы и фильтрация в присутствии MgSO<sub>4</sub>. Метод очистки лизатов следует подбирать для каждого препарата бактериофагов отдельно. Из способов очистки лизатов, пригодных для внутривенного и интратекального введения, перспективны метод ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы и фильтрация в присутствии MgSO<sub>4</sub>.

**Ключевые слова:** бактериофаги, бактериофаговая терапия, методы очистки, бактериальные лизаты, микробиология, эндотоксины, *Klebsiella pneumoniae*

**Финансирование:** исследование выполнено за счет средств, предоставленных для выполнения государственного задания «Разработка персонализированного подхода терапии инфекционных процессов с применением вирулентных бактериофагов» (ШИФР: Бактериофаг).

**Вклад авторов:** Р. Б. Городничев — план исследований, набор и обработка данных, написание статьи; М. А. Корниенко, А. В. Летаров, Е. А. Шитиков — план исследований, обработка данных, написание статьи; Н. С. Купцов, А. Д. Ефимов, В. И. Богдан — набор данных; Е. Н. Ильина — план исследований, написание статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** вся экспериментальная работа выполнена с соблюдением норм Санитарно-эпидемиологических правил «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» СП 1.3.2322-08; Санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2518-09 — «Дополнения и изменения № 1 к санитарно-эпидемиологическим правилам «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» СП 1.3.2322-08; Санитарно-эпидемиологических правил «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» СанПиН 2.1.7.2790-10, а также Федеральных клинических рекомендаций «Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике».

✉ Для корреспонденции: Роман Борисович Городничев  
ул. Малая Пироговская, д. 1а, г. Москва, 119435; gorodnichev.r.b@gmail.com

Статья получена: 20.07.2021 Статья принята к печати: 25.08.2021 Опубликовано онлайн: 22.09.2021

DOI: 10.47183/mes.2021.029

## COMPARISON OF METHODS FOR PURIFICATION OF BACTERIOPHAGE LYSATES OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA FOR PERSONALIZED THERAPY

Gorodnichev RB<sup>1</sup>✉, Kornienko MA<sup>1</sup>, Kuptsov NS<sup>1</sup>, Efimov AD<sup>2</sup>, Bogdan VI<sup>2</sup>, Letarov AV<sup>2</sup>, Shitikov EA<sup>1</sup>, Ilina EN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Federal Research Center of Biotechnology, Moscow, Russia

Phage therapy is a promising method of treating antibiotic-resistant infections. To obtain a safe therapeutic formulation, bacterial cell components, including endotoxins, must be removed from the phage lysate. This study was aimed at comparing the efficacy of purification methods for phage lysates intended for therapeutic use. Phages vB\_KpnM\_Seu621 (*Myoviridae*) and vB\_KpnP\_Dlv622 (*Autographiviridae*) were grown using the KP9068 strain of *Klebsiella pneumoniae* as a host. The obtained lysates were purified using phage precipitation with polyethylene glycol, CsCl density gradient ultracentrifugation, sucrose density gradient ultracentrifugation, precipitation with 100 kDa centrifugal filter units, and phage concentration on 0.22 µm cellulose filters in the presence of MgSO<sub>4</sub>. Endotoxin concentrations were determined by LAL testing. The obtained lysates contained  $1.25 \times 10^{12} \pm 7.46 \times 10^{10}$  and  $2.25 \times 10^{12} \pm 1.34 \times 10^{11}$  PFU/ml of vB\_KpnM\_Seu621 and vB\_KpnP\_Dlv622, respectively, and had endotoxin concentrations of  $3,806,056 \pm 429,410$  and  $189,456 \pm 12,406$  EU/ml, respectively. CsCl gradient ultracentrifugation was found to be the optimal conventional purification method in terms of reducing endotoxin concentrations and maintaining phage titers ( $303 \pm 20 - 313 \pm 35$  EU/ml,  $1.5 - 2.75 \times 10^{12} \pm 1.71 \times 10^{11}$  PFU/ml). Sucrose gradient ultracentrifugation and filtration in the presence of MgSO<sub>4</sub> were found to be the optimal non-traditional purification methods. A method for phage lysate purification should be selected for each phage preparation individually. Sucrose gradient ultracentrifugation and filtration in the presence of MgSO<sub>4</sub> hold promise as purification methods that can produce phage preparations suitable for intravenous administration.

**Keywords:** bacteriophage, phage therapy, purification methods, bacterial lysate, microbiology, endotoxin, *Klebsiella pneumoniae*

**Funding:** all study expenses were covered by the funds allocated for the State Assignment on the Development of a personalized approach to the therapy of infections using virulent bacteriophages (Code: Bacteriophage).

**Author contribution:** Gorodnichev RB — planned the study, conducted the experiments, and wrote the manuscript; Kornienko MA, Letarov AV, Shitikov EA — planned the study, analyzed its results, and wrote the manuscript; Kuptsov NS, Efimov AD, Bogdan VI — conducted the experiments; Ilina EN — planned the study and wrote the manuscript.

**Compliance with ethical standards:** the experiments were conducted in full compliance with Biosafety Guidelines for working with risk group III–IV pathogens (SP 1.3.2322-08), Amendment 1 to Biosafety Guidelines for working with risk group III–IV pathogens (SP 1.3.2518-09), medical waste regulations (SanPin 2.1.7.2790-10), and Federal Clinical Guidelines on the rational use of bacteriophages for therapy and prevention of diseases.

✉ Correspondence should be addressed: Roman B. Gorodnichev  
Malaya Pirogovskaya, 1a, Moscow, 119435; gorodnichev.r.b@gmail.com

Received: 20.07.2021 Accepted: 25.08.2021 Published online: 22.09.2021

DOI: 10.47183/mes.2021.029

Нерациональное использование антибактериальных препаратов в медицинской практике привело к появлению и повсеместному распространению устойчивых к ним микроорганизмов. По данным Всемирной организации здравоохранения, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli*, а также *Enterobacter spp.* являются приоритетными видами для поиска новых антимикробных препаратов вследствие нарастания доли изолятов с множественной лекарственной устойчивостью [1].

Одной из наиболее перспективных альтернатив антибиотикам для терапии инфекций, вызванных бактериями с множественной лекарственной устойчивостью, является терапия с использованием препаратов вирулентных бактериофагов [2]. Вирулентные бактериофаги — природные антагонисты бактерий, способные избирательно и эффективно поражать микроорганизм. Основное достоинство фаготерапии заключается в способности бактериофагов вызывать гибель бактерий вне зависимости от их профиля чувствительности к антибиотикам [3]. Кроме того, специфичность фаготерапии настолько высока, что позволяет элиминировать возбудителя инфекции, не нарушая естественную микробиоту пациента.

Практика применения бактериофагов для терапии инфекций позволила выработать критерии, которым должны соответствовать бактериофаги и терапевтические коктейли: вирулентный характер бактериофагов; отсутствие в геноме бактериофага генов токсинов и детерминант устойчивости к антибиотикам; широкий спектр хозяев, определенный на основании данных об эффективности посева; высокий уровень продукции фаговых частиц на клетку, а также действующая концентрация бактериофага не менее  $10^9$  БОЕ/мл [4–7].

Однако стоит отметить, что, являясь типичными представителями вирусов, они могут размножаться только внутри бактериальной клетки, как правило, приводя к ее лизису. Таким образом, основными элементами, контаминирующими терапевтические препараты бактериофагов, являются бактериальные клетки и их компоненты, в частности эндотоксины [6]. К бактериальным эндотоксинам прежде всего относят липополисахариды внешней мембраны клеток грамотрицательных бактерий [8]. Эндотоксины обладают высокой иммуногенностью и в больших количествах могут вызывать септический (эндотоксический) шок, приводящий к внутрисосудистой коагуляции, отказу органов и даже летальному исходу [9].

В настоящее время для культивирования и очистки терапевтических препаратов бактериофагов предложено несколько подходов, из которых в лабораторной практике наиболее распространены методы осаждения бактериофагов с использованием полиэтиленгликоля (ПЭГ) и ультрацентрифугирование в градиенте CsCl [10]. К недостаткам этих подходов относят присутствие солей цезия (80 нг/мл) в конечном продукте, что существенно снижает их применимость для нужд фаготерапии [10]. В свою очередь, в качестве альтернативы можно рассматривать метод ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы, который широко применяют в вирусологии [11, 12]. Кроме того, в последние годы в качестве способов очистки фаговых лизатов используют методы, ранее применяемые для концентрирования фагов из природных источников (ультрафильтрация 100 кДа, фильтрация в присутствии солей) [10, 12–14]. Идет также разработка хроматографических методов очистки: на основании аффинной хроматографии предложены

коммерческие продукты, позволяющие очистить фаговые лизаты от эндотоксинов, в частности колонки серии EndoTrap® (Lionex GmbH; Германия). Однако, по результатам серии исследований, было показано, что их однократное применение без предварительной очистки лизата лишь незначительно снижает концентрацию эндотоксина [13, 15, 16].

Цель данной работы состояла в оценке эффективности различных методов очистки фаговых лизатов для подготовки терапевтических препаратов бактериофагов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Бактериальные штаммы, фаги и среды

Штамм *K. pneumoniae* KP9068 был взят из бактериологической коллекции лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства России. Штамм устойчив к цефалоспорином (цефотаксиму, цефтазидиму, цефтриаксону, цефиксиму), фторхинолонам (ципрофлоксацину, офлоксацину), тетрациклину, азитромицину, хлорамфениколу, гентамицину, ампициллину и обладает переходной чувствительностью к меропенему. На основании мультислокусного секвенирования-типирования штамм относится к сиквенс-типу 11. Методом типирования гена *wzi* [17] было установлено, что штамм KP9068 обладает типом капсулы K23. Бактериальные культуры выращивали в лизогенном бульоне (LB) (от англ. *lysogeny broth*) (HiMedia; Индия) при температуре 37 °C.

С учетом литературных данных о филогенетическом разнообразии бактериофагов в коммерческих коктейлях из коллекции лаборатории были выбраны два литических бактериофага, относящиеся к разным семействам и активные против штаммов *K. pneumoniae* с капсульным типом K23 [18].

Бактериофаги vB\_KpnM\_Seu621 (MT939253.1) и vB\_KpnP\_Dlv622 (MT939252.1) вызывают лизис штаммов *K. pneumoniae* и относятся к семействам *Myoviridae* и *Autographiviridae* соответственно [19]. Бактериофаг vB\_KpnM\_Seu621 характеризуется следующими морфологическими признаками: изометрической головкой размером 75 нм в диаметре и длинным сократительным хвостом длиной 104 нм. Бактериофаг vB\_KpnP\_Dlv622 представлен изометрической головкой размером 57 нм и коротким несократительным хвостом длиной 12 нм. Геномы бактериофагов были проанализированы ранее и не содержали генов токсинов и интеграз, которые могли бы исключать возможность их применения в терапии [19].

Наращивание бактериофагов в высоком титре осуществляли в термостатируемом шейкере при 100 об./мин и 37 °C в течение 18 ч, используя штамм *K. pneumoniae* KP9068 в качестве штамма-хозяина. Для получения максимального титра бактериофагов штамм-хозяин выращивали в жидкой среде LB до середины логарифмической фазы роста ( $OD_{600\text{ нм}} = 0,3$ ) и инокулировали фаговым лизатом для получения множественности инфекции 0,001. Полученные фаговые лизаты очищали от клеточного дебриса центрифугированием при 3500 g в течение 15 мин и последовательным фильтрованием через фильтры 0,45 мкм (Merck Millipore; США) и 0,22 мкм (Merck Millipore; США). Концентрацию бактериофага в фаголизате оценивали стандартным методом титрования по Грациа. Титр бактериофагов

указывали в количестве бляшкообразующих единиц на мл (БОЕ/мл) [20].

### Осаждения бактериофагов с использованием ПЭГ

Осаждение фагов с помощью ПЭГ 6000 (Диа-М; Россия) проводили по описанной ранее методике, с небольшими модификациями [21]. К 10 мл фагового лизата добавляли 2,5 мл стерильного раствора 20%-го ПЭГ 6000 в 2,5 М хлориде натрия. Пробу перемешивали путем переворачивания без использования вортекса, охлаждали во льду в течение часа и центрифугировали 20 мин при 20 000 g. Осторожно удаляли большую часть надосадочной жидкости. Повторяли центрифугирование в течение 10 мин при 20 000 g, надосады удаляли. Полученный осадок, содержащий частицы бактериофага, ресуспендировали в 1 мл стерильного SM-буфера (100 mM NaCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM Трис-HCl, pH 7,5, и 0,01% (вес/объем) желатина). Пробу перемешивали с помощью вортекса и инкубировали в течение часа на льду. Затем образцы вновь перемешивали с помощью вортекса для удаления остатков ПЭГ и центрифугировали в течение 1 мин при 13 000 g; супернатант переносили в новую пробирку для дальнейших исследований.

### Ультрацентрифугирование в градиенте хлористого цезия

Очистку бактериофагов методом ультрацентрифугирования в градиенте CsCl осуществляли по методике, описанной ранее [21]. Фаговые лизаты (аликвота 70 мл) центрифугировали в течение часа при 75 000 g и 20 °C (ротатор Beckman Type 45Ti (Beckman Coulter; США)). Супернатант аккуратно сливали, а полученный осадок ресуспендировали в 800 мкл SM-буфера. Далее готовили растворы с различной концентрацией хлористого цезия в SM-буфере (1,3–1,4–1,45–1,5–1,6 г/мл). Полученные растворы CsCl были использованы для создания градиента, начиная с раствора с наибольшей концентрацией хлористого цезия и заканчивая раствором с его минимальной концентрацией. Растворы CsCl наносили по 800 мкл в каждый слой. Последним в центрифужный стакан добавляли один из концентрированных фаговых образцов (800 мкл). Пробу центрифугировали в течение часа при 75 000 g и 20 °C на роторе Beckman SW50.1 (Beckman Coulter; США). Опалесцирующий слой, богатый бактериофагами, отбирали, доводили SM-буфером до объема 1 мл и помещали в мешок для диализа (Thermo FS; США). Диализ проводили в течение 18 ч против десятикратного объема SM-буфера при 4 °C и постоянном перемешивании жидкости с заменой буфера каждые 4 ч. После проведения диализа образцы дополнительно стерилизовали пропусканием через фильтры 0,22 мкм (Merck Millipore; США).

### Ультрацентрифугирование в градиенте сахарозы

Очистку бактериофагов методом ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы проводили в соответствии со стандартной методикой с небольшими модификациями [11].

Фаговые лизаты (аликвота 70 мл) центрифугировали в течение часа при 75 000 g и 20 °C на роторе Beckman Type 45Ti (Beckman Coulter; США). Каждый из полученных осадков ресуспендировали в 800 мкл SM-буфера. Далее готовили растворы с различной концентрацией сахарозы

(20, 30, 40, 50 и 60%) в буфере 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl pH 7,5. Растворы сахарозы были использованы для создания градиента, начиная с раствора с наибольшей концентрацией сахарозы (60%) и заканчивая раствором с минимальной концентрацией (20%). Каждый раствор наносили по 800 мкл. Последним в центрифужный стакан добавляли один из концентрированных фаговых лизатов (800 мкл). Центрифугирование проводили в течение часа при 75 000 g и 20 °C на роторе Beckman Type SW50.1 (Beckman Coulter; США). Свободные фаговые частицы образовывали видимый опалесцирующий слой между слоями, содержащими 50 и 60%-е растворы сахарозы. Этот слой собирали и доводили SM-буфером до объема 1 мл.

### Очистка с применением центрифужных концентраторов (100 кДа)

Фаговые лизаты в объеме 1 мл наносили на центрифужные концентраторы Microcon с пределом отсека по молекулярной массе 100 кДа (Millipore; США) и центрифугировали при 10 000 g в течение 10 мин. Для того чтобы получить частицы бактериофага, осевшие на фильтре концентратора, на фильтр добавляли 300 мкл стерильного SM-буфера, после чего фильтр концентратора переворачивали, вставляли в новую стерильную пробирку и центрифугировали 3 мин при 1000 g. Очищенный лизат доводили до 1 мл стерильным SM-буфером.

### Концентрирование на целлюлозных фильтрах диаметром 0,22 мкм в присутствии MgSO<sub>4</sub>

Для очистки бактериофагов методом концентрирования на фильтре 0,22 мкм в присутствии MgSO<sub>4</sub> использовали аликвоты фаговых лизатов (50 мл), предварительно очищенные от клеточного дебриса [14]. В лизаты добавляли сухой MgSO<sub>4</sub> ч.д.а. («Диа-М»; Россия) до конечной концентрации 50 mM. Пробу перемешивали путем переворачивания без использования вортекса до полного растворения MgSO<sub>4</sub>. Полученные суспензии медленно фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм с мембраной из сложных эфиров целлюлозы (mixed cellulose ester GSWP filter) (Millipore; США). Фильтр разрезали на мелкие части (~ 1 мм<sup>2</sup>) и погружали в 5 мл стерильного SM-буфера. Для полной элюции частиц бактериофага с поверхности фильтра суспензию инкубировали на ультразвуковой бане в течение 4 мин. После обработки ультразвуком крупные частицы фильтра осаждали с помощью центрифугирования при 3500 g в течение 10 мин, надосады отбирали для дальнейшей работы.

### Определение концентрации эндотоксина в исследуемых образцах

Концентрацию эндотоксинов определяли количественно турбидиметрическим методом ЛАЛ с использованием коммерческих наборов Endosafe® (Charles River; США) в соответствии с инструкцией. Анализ мутности проводили с использованием планшетного спектрофотометра и длины волны 405 нм (Multiskan Ascent, Thermo; США).

### Статистический анализ данных

Статистический анализ данных (ANOVA-тест, расчет стандартных отклонений) проводили с использованием

программы GraphPad Prisma (v.8.0.1) (GraphPad Software; США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Дизайн исследования

В исследовании было проведено сравнение пяти различных методов очистки фаговых лизатов: осаждение бактериофагов с использованием ПЭГ, ультрацентрифугирование в градиенте CsCl, ультрацентрифугирование в градиенте сахарозы, очистка с помощью центрифужных концентраторов 100 кДа, концентрирования на целлюлозных фильтрах с порами 0,22 мкм в присутствии  $MgSO_4$ . Очистку лизатов каждым из используемых способов проводили в трех независимых биологических повторах. Для оценки эффективности анализировали изменение титра бактериофага и концентрацию эндотоксина в конечном препарате.

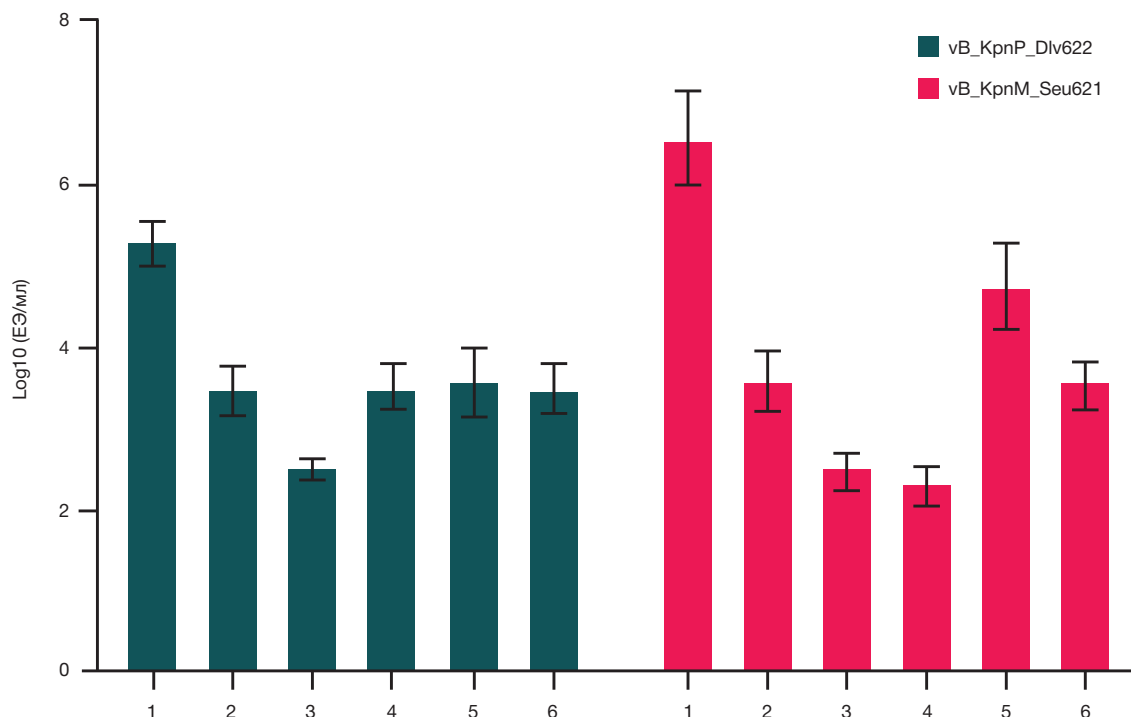
На первом этапе были получены фаговые лизаты с титром  $1,25 \times 10^{12} \pm 7,46 \times 10^{10}$  БОЕ/мл и  $2,25 \times 10^{12} \pm 1,34 \times 10^{11}$  БОЕ/мл для vB\_KpnM\_Seu621 и vB\_KpnP\_Dlv622 соответственно. Предварительную очистку от бактериального дебриса и живых клеток бактерий проводили фильтрацией через фильтры 0,22 мкм (Millipore; США). Концентрация эндотоксина в исходном фаговом лизате составила  $3\,806\,056 \pm 429\,410$  ЕЭ/мл для фага vB\_KpnM\_Seu621 и  $189\,456 \pm 12\,406$  ЕЭ/мл для фага vB\_KpnP\_Dlv622 (рис. 1).

Все полученные препараты были протестированы на стерильность путем посева аликвоты 50 мкл на агаризованную питательную среду. Для полученных значений концентрации частиц бактериофага и уровня эндотоксина были подсчитаны средние значения и стандартное отклонение. Кроме того, проведен расчет содержания эндотоксина в единоразовой терапевтической дозе. Согласно литературным данным, за эффективную терапевтическую дозу было принято значение фаговых частиц, равное  $10^9$  [22–24].

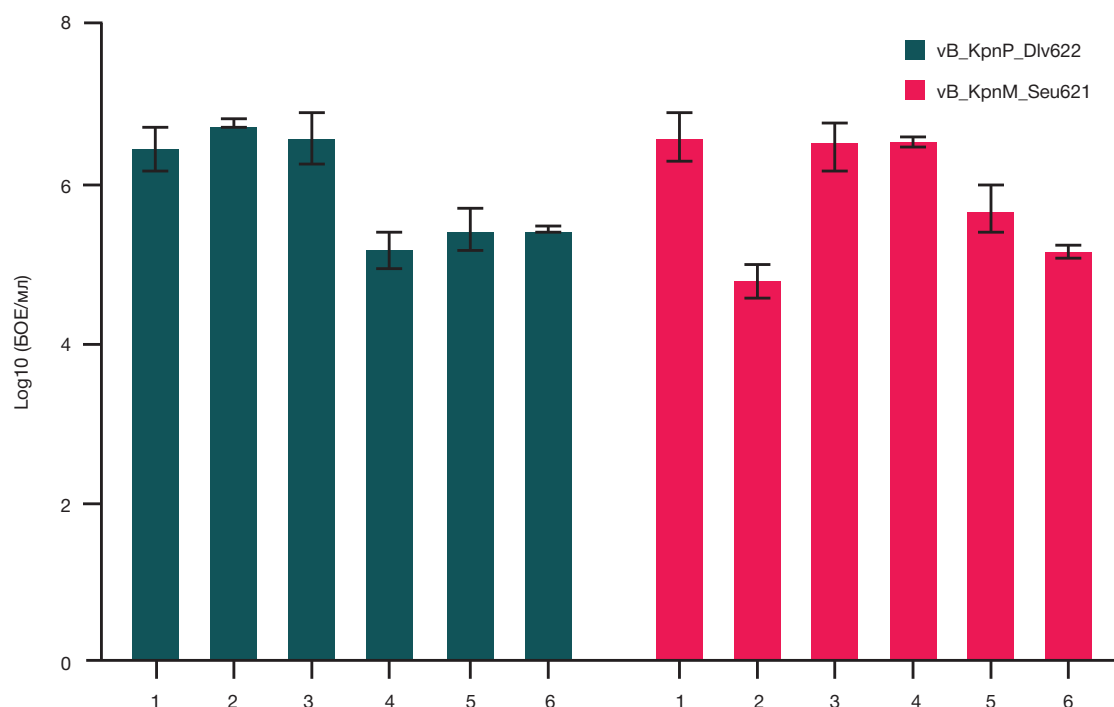
### Изменение концентрации эндотоксина в зависимости от метода очистки

На первом этапе исследования проводили анализ эффективности традиционных лабораторных методов очистки: переосаждение бактериофагов в присутствии ПЭГ и ультрацентрифугирование в градиенте CsCl. Переосаждение бактериофагов с использованием ПЭГ снижало концентрацию эндотоксина на 2–3 порядка ( $p$ -value < 0,0001) до значений от  $3000 \pm 324$  до  $3817 \pm 486$  ЕЭ/мл. Ультрацентрифугирование в градиенте CsCl, являющееся золотым стандартом очистки фаговых лизатов, позволило снизить уровень эндотоксина более существенно: от  $303 \pm 35$  до  $313 \pm 20$  ЕЭ/мл ( $p$ -value < 0,0001) (см. рис. 1).

В качестве альтернативных методов очистки, позволяющих в дальнейшем беспрепятственно использовать бактериофаги в терапии, были выбраны ультрацентрифугирование в градиенте сахарозы, очистка с использованием центрифужных концентраторов 100 кДа и медленная фильтрация через целлюлозные фильтры с порами 0,22 мкм в присутствии  $MgSO_4$ . Ультрацентрифугирование в градиенте сахарозы снизило концентрацию эндотоксина в лизате фага vB\_KpnM\_Seu621 на четыре порядка ( $p$ -value < 0,0001) до  $200 \pm 28$  ЕЭ/мл, а для фагового лизата vB\_KpnP\_Dlv622 — всего на два порядка ( $p$ -value < 0,0001) до  $3368 \pm 348$  ЕЭ/мл. Использование концентраторов 100 кДа единообразно снизило концентрацию эндотоксина примерно на 1,5 порядка ( $p$ -value < 0,0001) для каждого из препаратов:  $56\,148 \pm 7832$  ЕЭ/мл для фага vB\_KpnM\_Seu621 и  $3850 \pm 593$  ЕЭ/мл для vB\_KpnP\_Dlv622. Метод фильтрации в присутствии  $MgSO_4$  показал эффективность, сравнимую с переосаждением с ПЭГ ( $p$ -value > 0,9999), и приводил к снижению концентрации эндотоксина на два-три порядка — от  $3187 \pm 368$  до  $3502 \pm 372$  ЕЭ/мл ( $p$ -value < 0,0001) (см. рис. 1).



**Рис. 1.** Уровень эндотоксина в очищенных различными методами лизатах бактериофагов vB\_KpnM\_Seu621 и vB\_KpnP\_Dlv622. 1 — исходный лизат; 2 — осаждение с ПЭГ; 3 — ультрацентрифугирование в градиенте CsCl; 4 — ультрацентрифугирование в градиенте сахарозы; 5 — концентратор 100 кДа; 6 — фильтрация через поры 0,22 мкм в присутствии  $MgSO_4$ .



**Рис. 2.** Концентрация частиц бактериофага в очищенных различными методами лизатах бактериофагов vB\_KpnM\_Se621 и vB\_KpnP\_Dlv622. 1 — исходный лизат; 2 — осаждение с ПЭГ; 3 — ультрацентрифугирование в градиенте CsCl; 4 — ультрацентрифугирование в градиенте сахарозы; 5 — концентратор 100 кДа; 6 — фильтрация через поры 0,22 мкм в присутствии MgSO<sub>4</sub>

#### Изменение титра бактериофагов в зависимости от метода очистки

Важной характеристикой при терапии бактериофагами является титр фаговых частиц в препарате, в связи с чем, при очистке требуется сохранение или даже увеличение (за счет концентрирования) титра фаговых частиц.

Изменение концентрации частиц бактериофагов в очищенном препарате при использовании общепринятых лабораторных методов было различным. При переосаждении бактериофагов с использованием ПЭГ фаг vB\_KpnM\_Se621 достоверно не менялся, а титр фага vB\_KpnP\_Dlv622 напротив резко снизился на три порядка ( $p$ -value < 0,0001) до  $1 \times 10^9 \pm 5,7 \times 10^7$  БОЕ/мл (рис. 2). Золотой стандарт очистки, метод ультрацентрифугирования в градиенте CsCl, продемонстрировал более стабильный результат: титр обоих фагов достоверно не изменялся ( $p$ -value > 0,9999) (см. рис. 2).

Ультрацентрифугирование в градиенте сахарозы снизило ( $p$ -value < 0,0001) концентрацию фага vB\_KpnM\_Se621 до  $5 \times 10^9 \pm 2,9 \times 10^8$  БОЕ/мл, в то время как концентрация фага vB\_KpnP\_Dlv622 достоверно не изменялась. Использование центрифужных концентраторов 100 кДа также снизило ( $p$ -value < 0,0001) титр обоих фагов до  $1,5-5 \times 10^{10} \pm 3,1 \times 10^9$  БОЕ/мл. Фильтрация в присутствии MgSO<sub>4</sub> снизило ( $p$ -value < 0,0001) титр бактериофагов на 2–3 порядка до  $1,5 \times 10^{10} \pm 1,1 \times 10^9$  БОЕ/мл и  $5 \times 10^9 \pm 2,5 \times 10^8$  БОЕ/мл для фагов vB\_KpnM\_Se621 и vB\_KpnP\_Dlv622 соответственно (см. рис. 2).

Использование центрифужных концентраторов 100 кДа также снизило ( $p$ -value < 0,0001) титр обоих фагов до  $1,5-5 \times 10^{10} \pm 3,1 \times 10^9$  БОЕ/мл. Фильтрация в присутствии MgSO<sub>4</sub> снизило ( $p$ -value < 0,0001) титр бактериофагов на 2–3 порядка до  $1,5 \times 10^{10} \pm 1,1 \times 10^9$  БОЕ/мл и  $5 \times 10^9 \pm 2,5 \times 10^8$  БОЕ/мл для фагов vB\_KpnM\_Se621 и vB\_KpnP\_Dlv622 соответственно (см. рис. 2).

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Фаговую терапию применяют в клинической практике с начала XX в., и она эффективна при лечении и профилактике инфекционных процессов различной этиологии, в особенности гнойно-воспалительных ран, отитов и кишечных инфекций [25–27]. В связи с ростом доли бактерий с множественной лекарственной устойчивостью в ряде случаев необходимо использование препаратов бактериофагов внутривенно либо интратекально.

**Таблица.** Число доз терапевтического коктейля бактериофагов vB\_KpnM\_Se621 и vB\_KpnP\_Dlv622 и содержание эндотоксина в дозе из расчета на 100 мл исходного фаголизата

| Способ очистки                                                 | Бактериофаг    |                                            |                |                                            |
|----------------------------------------------------------------|----------------|--------------------------------------------|----------------|--------------------------------------------|
|                                                                | vB_KpnM_Se621  |                                            | vB_KpnP_Dlv622 |                                            |
|                                                                | Число доз, шт. | Содержание эндотоксина, ЕЭ/доза $10^9$ БОЕ | Число доз, шт. | Содержание эндотоксина, ЕЭ/доза $10^9$ БОЕ |
| Исходный фаголизат                                             | 125 000        | 3045                                       | 225 000        | 84                                         |
| Осаждение с ПЭГ                                                | 50 000         | 0,76                                       | 10             | 3000                                       |
| Ультрацентрифугирование в градиенте CsCl                       | 3850           | 0,11                                       | 2100           | 0,21                                       |
| Ультрацентрифугирование в градиенте сахарозы                   | 7              | 40                                         | 2800           | 2                                          |
| Концентратор 100 кДа                                           | 15             | 3743                                       | 50             | 77                                         |
| Фильтрация через поры 0,22 мкм в присутствии MgSO <sub>4</sub> | 150            | 47                                         | 50             | 128                                        |

Согласно современным стандартам фармакологии, для внутривенного применения препараты бактериофагов должны соответствовать определенным критериям чистоты и эффективности. По рекомендации фармакопейной статьи «ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины», число единиц эндотоксина, содержащихся в препаратах, не должно превышать 5 ЕЭ/кг в час для внутривенного и 0,2 ЕЭ/кг в час для интратекального введения [28]. Согласно литературным данным, рекомендуемая доза введенного бактериофага, обеспечивающая стабильный бактерицидный эффект, должна быть не ниже  $10^9$  БОЕ на дозу [22–24].

В описанных случаях внутривенного введения фаговых лизатов для терапии инфекционного процесса, как правило, использовались препараты бактериофагов, очищенные от эндотоксина с применением стандартных лабораторных методов: осаждением бактериофага с ПЭГ, ультрацентрифугированием в градиенте CsCl и аффинной хроматографии [10, 22–24]. Представленные способы хорошо отработаны для фагов семейства *Myoviridae* и нитчатых фагов *E. coli*, однако их эффективность для бактериофагов других семейств, равно как и для других видов бактерий-хозяев, остается не до конца изученной.

В качестве объектов настоящего исследования были выбраны два бактериофага, относящиеся к разным семействам. Бактериофаги vB\_KpnM\_Seu621 и vB\_KpnP\_Dlv622 вызывали лизис штамма хозяина и имели близкую концентрацию фаговых частиц в лизате ( $1,25\text{--}2,25 \times 10^{12} \pm 1,34 \times 10^{11}$  БОЕ/мл), однако детектируемое количество эндотоксина в лизатах отличалось в 20 раз (см. рис. 1), что соответствует литературным данным, согласно которым уровень эндотоксина в лизатах варьирует в значительных пределах ( $101\text{--}105$  ЕЭ/ $10^9$  БОЕ) в зависимости от таксономического положения фагов [10, 12, 13]. Следуя общепринятым рекомендациям по минимальному титру бактериофагов в терапевтической дозе  $10^9$  БОЕ/мл и максимальной концентрации эндотоксина в 325 ЕЭ/мл для внутривенного введения (из расчета однократного введения дозы в 1 мл пациенту с массой тела 65 кг), можно отметить, что разбавление исходного лизата бактериофага vB\_KpnP\_Dlv622 позволяет применять его для внутривенного введения, однако концентрация эндотоксина в лизате бактериофага vB\_KpnM\_Seu621 при аналогичной подготовке была на порядок выше допустимой (табл.).

Являющийся золотым стандартом метод ультрацентрифугирования в градиенте CsCl показал наивысшую эффективность очистки (см. табл.). В литературе описано несколько случаев успешной терапии при внутривенном введении очищенных этим способом фаговых лизатов [22, 23]. Однако использование солей цезия в качестве градиента накладывает ограничения на метод, так как даже после процедуры диализа в составе очищенного препарата может содержаться остаточное количество металла [10]. По литературным данным, методом ультрацентрифугирования в градиенте CsCl можно удалить до 99,6% всего эндотоксина, однако даже для данного метода эффективность может колебаться от 18 до 99,6% [13].

Распространенный в лабораторной практике метод осаждения бактериофагов в присутствии ПЭГ показал неодинаковую способность к осаждению бактериофагов разных семейств. Так, для бактериофага vB\_KpnM\_Seu621 семейства *Myoviridae* этим методом был получен очищенный препарат с достаточно высоким титром. В то

же время для бактериофага семейства *Autographiviridae* отмечена значительная потеря титра, что снизило эффективность метода. Данные об эффективности переосаждения фагов с ПЭГ в литературе также не однозначны: этот метод не одинаково эффективен для переосаждения морфологически разных фагов и может требовать изменения состава солевой фракции или длины молекулы ПЭГ [10, 12, 29]. Было показано, например, что для нитчатого фага *E. coli* M13 переосаждение с ПЭГ удаляет до 88% эндотоксина из лизата, тогда как для фага семейства *Myoviridae* этим же методом удалось снизить количество эндотоксина в 20 раз [12].

Метод ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы широко применяют для очистки вирусных суспензий, однако редко — для очистки фаговых лизатов [11]. Согласно полученным результатам, данный метод позволил получить очищенные от эндотоксина препараты бактериофагов, пригодные для внутривенного и даже, в случае фага vB\_KpnP\_Dlv622, интратекального введения. При этом следует отметить, что падение титра фага vB\_KpnM\_Seu621 позволило получить лишь семь доз очищенного препарата, что может быть недостаточным для одного полного курса персонализированного лечения. Подбор правильной концентрации градиента, скорости и времени центрифугирования может решить эту проблему и позволить оптимизировать протокол для каждого конкретного фага.

Размер молекулы эндотоксина обычно не превышает 10–20 кДа, поэтому ультрафильтрация с применением концентраторов 100 кДа может быть эффективной для очистки фаговых лизатов. Данный метод показал не одинаковую эффективность очистки и приводил к падению титра обоих бактериофагов. Высокая концентрация эндотоксина в случае фага *Myoviridae* может быть вызвана образованием мицелл эндотоксина, которые достигают размера 1000 кДа и не проходят сквозь поры фильтра [30]. Модифицированная версия данного метода в виде тангенциальной фильтрации показала эффективную элиминацию до 90% всего эндотоксина из фаголизата, однако данная методика не тестировалась на фагах семейства *Podoviridae* [10].

Медленную фильтрацию через целлюлозные фильтры с порами 0,22 мкм в присутствии  $\text{MgSO}_4$  наиболее часто используют для концентрирования бактериофагов из природных источников воды, однако данный метод может быть применен и для очистки фаговых лизатов. Несмотря на падение титра бактериофага в процессе очистки, этим методом удалось получить достаточное число доз препаратов, подходящих для внутривенного лечения. Стоит отметить, что метод показал удовлетворительные результаты независимо от таксономической принадлежности бактериофагов и был фактически единственным альтернативным методом, позволившим получить очищенный препарат фага *Myoviridae*.

По времязатратности обсуждаемых методов очистки наиболее быстрыми являются ультрафильтрация с применением концентраторов 100 кДа и медленная фильтрация в присутствии  $\text{MgSO}_4$ , занимающие в среднем 1 и 2 ч соответственно. Ультрацентрифугирование в градиенте CsCl, сахарозы и осаждение с ПЭГ занимают в среднем по 3,5 ч, однако для безопасного применения фаговые лизаты, очищенные методами ультрацентрифугирования в градиенте CsCl и осаждением с ПЭГ, требуют последующей очистки диализом, что увеличивает время очистки на 18 ч. В связи с этим

наименее времязатратными методами подготовки фаговых лизатов для применения в терапии являются ультрафильтрация с применением концентраторов 100 кДа, медленная фильтрация в присутствии  $MgSO_4$  и ультрацентрифугирование в градиенте сахарозы.

По результатам данного исследования и литературным данным, количество эндотоксина и эффективность различных методов неодинаковы для бактериофагов разных семейств. Вследствие различия в размерах и/или константы седиментации фагов оптимальный метод очистки или комбинацию таких методов следует рекомендовать к применению в зависимости от филогенетического положения конкретного бактериофага.

## ВЫВОД

Вследствие индивидуальных особенностей фагов оптимально подбирать метод очистки или их комбинацию индивидуально для каждого фага. Несмотря на это, самыми перспективными методами очистки фаговых лизатов семейств *Myoviridae* и *Autographiviridae* можно назвать ультрацентрифугирование в градиенте сахарозы и медленную фильтрацию в присутствии  $MgSO_4$ . Данные методы не только позволяют в достаточной мере очистить лизат от эндотоксина и компонентов среды, но и реализуются без применения потенциально токсичных для человека реактивов.

## Литература

1. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018; 18 (3): 318–27. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3.
2. Lin DM, Koskella B, Lin HC. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2017; 8 (3): 162. DOI: 10.4292/wjgpt.v8.i3.162.
3. Акимкин В. Г., Дарбеева О. С., Колков В. Ф. Бактериофаги: исторические и современные аспекты их применения: опыт и перспективы. *Клиническая практика*. 2010; 4 (4): 48–54.
4. Pirnay JP, Blasdel BG, Bretaudeau L, Buckling A, Chanishvili N, Clark JR, et al. Quality and safety requirements for sustainable phage therapy products. *Pharm Res*. 2015; 32 (7): 2173–9. DOI: 10.1007/s11095-014-1617-7.
5. Шкода А. С., Митрохин С. Д., Ведяшкина С. Г., Орлова О. Е., Бастрикин С. Ю., Галицкий А. А., и др. Персонализированная фаготерапия пациентов, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи: методические рекомендации. 2019; 37 с. Доступно по ссылке: <https://niioz.ru/upload/iblock/259/259f65904e633b948cd2e6a1d04742f0.pdf>.
6. Petrovic-Fabijan A, Khalid A, Maddocks S, Ho J, Gilbey T, Sandaradura I, et al. Phage therapy for severe bacterial infections: a narrative review. *Med J Aust*. 2020; 212 (6): 279–85. DOI: 10.5694/mja2.50355.
7. Aleshkin AV, Shkoda AS, Bochkareva SS, Ershova ON, Mitrokhin SD, Kiseleva IA, et al. Concept of individualized medicine based on personalized phage therapy for intensive care unit patients suffering from healthcare-associated infections. *Infektsionnye Bolezni*. 2017; 15 (4): 49–54. DOI: 10.20953/1729-9225-2017-4-49-54.
8. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J*. 1994; 8 (2): 217–25. DOI: 10.1096/FASEBJ.8.2.8119492.
9. Raetz CRH, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*. 2002; 71 (1): 635–700. DOI: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.
10. Luong T, Salabarria AC, Edwards RA, Roach DR. Standardized bacteriophage purification for personalized phage therapy. *Nat Protoc*. 2020; 15 (9): 2867–90. DOI: 10.1038/s41596-020-0346-0.
11. Guo Y, Cheng A, Wang M, Zhou Y. Purification of anadid herpesvirus 1 particles by tangential-flow ultrafiltration and sucrose gradient ultracentrifugation. *J Virol Methods*. 2009; 161 (1): 1–6. DOI: 10.1016/J.JVIROMET.2008.12.017.
12. Hietala V, Horsma-Heikkinen J, Carron A, Skurnik M, Kiljunen S. The Removal of Endo- and Enterotoxins From Bacteriophage Preparations. *Front Microbiol*. 2019; 10: 1674. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01674.
13. Van Belleghem JD, Merabishvili M, Vergauwen B, Lavigne R, Vanechoutte M. A comparative study of different strategies for removal of endotoxins from bacteriophage preparations. *J Microbiol Methods*. 2017; 132: 153–9. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.11.020.
14. Van Twest R, Kropinski AM. Bacteriophage enrichment from water and soil. *Methods Mol Biol*. 2009; 501: 15–21. DOI: 10.1007/978-1-60327-164-6\_2.
15. Cooper CJ, Denyer SP, Maillard J-Y. Stability and purity of a bacteriophage cocktail preparation for nebulizer delivery. *Lett Appl Microbiol*. 2014; 58 (2): 118–22. DOI: 10.1111/lam.12161.
16. Merabishvili M, Pirnay J-P, Verbeken G, Chanishvili N, Tediashvili M, Lashkhi N, et al. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS One*. 2009; 4 (3): 4944. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0004944.
17. Brisse S, Passet V, Haugaard AB, Babosan A, Kassis-Chikhani N, Struve C et al. Wzi gene sequencing, a rapid method for determination of capsulartype for *klebsiella* strains. *J Clin Microbiol*. 2013; 51 (12): 4073–8. DOI: 10.1128/JCM.01924-13.
18. Gorodnichev RB, Volozhantsev NV, Krasilnikova VM, Bodoev IN, Kornienko MA, Kuptsov NS, et al. Novel *Klebsiella pneumoniae* K23-specific bacteriophages from different families: similarity of depolymerases and their therapeutic potential. *Front Microbiol*. 2021; 12: 669618. DOI: 10.3389/FMICB.2021.669618.
19. Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of bacteriophages using the small drop plaque assay system. *Bacteriophages*. 2009; 81–85. DOI: 10.1007/978-1-60327-164-6.
20. Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed. Inglis J. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1984; 2230 p.
21. Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, Hernandez-Morales A, Lancaster J, Lessor L, et al. Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61 (10): 1–15. DOI: 10.1128/AAC.00954-17.
22. Dedrick RM, Guerrero-Bustamante CA, Garlena RA, Russell DA, Ford K, Harris K, et al. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat Med Springer US*. 2019; 25 (5): 730–33. DOI: 10.1038/s41591-019-0437-z.
23. Rubalskii E, Ruemke S, Salmoukas C, Boyle EC, Warnecke G, Tudorache I, et al. Bacteriophage therapy for critical infections related to cardiothoracic surgery. *Antibiotics*. 2020; 9 (5): 1–12. DOI: 10.3390/ANTIBIOTICS9050232.
24. Pinto AM, Cerqueira MA, Bañobre-López M, Pastrana LM, Sillankorva S. Bacteriophages for chronic wound treatment: from traditional to novel delivery systems. *Viruses*. 2020; 12 (2): 1–29. DOI: 10.3390/v12020235.
25. Wills QF, Kerrigan C, Soothill JS. Experimental bacteriophage protection against *Staphylococcus aureus* abscesses in a rabbit model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49 (3): 1220–1. DOI: 10.1128/AAC.49.3.1220-1221.2005.
26. Fish R, Kutter E, Wheat G, Blasdel B, Kutateladze M, Kuhl S. Bacteriophage treatment of intransigent diabetic toe ulcers: a

- case series. *Journal of wound care*. 2016; 25 (Sup 7): 27–33. DOI: 10.12968/JOWC.2016.25.SUP7.S27.
27. ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины. Фармакопей. рф [Электронный ресурс]. Доступно по ссылке: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-4-0006-15-bakterialnye-endotoksiny/> (дата обращения: 30.08.2021).
  28. Zhang ZR, Shen JT, Dai JY, Sun YQ, Dong YS, Xiu ZL. Separation and purification of Klebsiella phage by two-step salting-out extraction. *Sep Purif Technol*. 2020; 242 (2): 116784. DOI: 10.1016/j.seppur.2020.116784.
  29. Bergstrand A, Svanberg C, Langton M, Nydén M. Aggregation behavior and size of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O55:B5. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2006; 53 (1): 9–14. DOI: 10.1016/J.COLSURFB.2006.06.007.
- ## References
1. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018; 18 (3): 318–27. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3.
  2. Lin DM, Koskella B, Lin HC. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2017; 8 (3): 162. DOI: 10.4292/wjgpt.v8.i3.162.
  3. Akimkin VG, Darbeeva OS, Kolkov VF. Bakteriofagi: istoricheskie i sovremennye aspekty ih primeneniya: opyt i perspektivy. *Klinicheskaya praktika*. 2010; 4 (4): 48–54. Russian.
  4. Pirnay JP, Blasdel BG, Bretaudeau L, Buckling A, Chanishvili N, Clark JR, et al. Quality and safety requirements for sustainable phage therapy products. *Pharm Res*. 2015; 32 (7): 2173–9. DOI: 10.1007/s11095-014-1617-7.
  5. Shkoda AS, Mitrohin SD, Vedjashkina SG, Orlova OE, Bastrikin SYu, Galickij AA, i dr. Personalizirovannaja fagoterapija pacientov, stradajushih infekcijami, svjazannymi s okazaniem medicinskoj pomoshhi: metodicheskie rekomendacii. 2019; 37 s. Dostupno po ssylke: <https://niioz.ru/upload/iblock/259/259f65904e633b948cd2e6a1d04742f0.pdf>. Russian.
  6. Petrovic-Fabijan A, Khalid A, Maddocks S, Ho J, Gilbey T, Sandaradura I, et al. Phage therapy for severe bacterial infections: a narrative review. *Med J Aust*. 2020; 212 (6): 279–85. DOI: 10.5694/mja2.50355.
  7. Aleshkin AV, Shkoda AS, Bochkareva SS, Ershova ON, Mitrokhin SD, Kiseleva IA, et al. Concept of individualized medicine based on personalized phage therapy for intensive care unit patients suffering from healthcare-associated infections. *Infektsionnye Bolezni*. 2017; 15 (4): 49–54. DOI: 10.20953/1729-9225-2017-4-49-54.
  8. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J*. 1994; 8 (2): 217–25. DOI: 10.1096/FASEBJ.8.2.8119492.
  9. Raetz CRH, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*. 2002; 71 (1): 635–700. DOI: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.
  10. Luong T, Salabarria AC, Edwards RA, Roach DR. Standardized bacteriophage purification for personalized phage therapy. *Nat Protoc*. 2020; 15 (9): 2867–90. DOI: 10.1038/s41596-020-0346-0.
  11. Guo Y, Cheng A, Wang M, Zhou Y. Purification of anadid herpesvirus 1 particles by tangential-flow ultrafiltration and sucrose gradient ultracentrifugation. *J Virol Methods*. 2009; 161 (1): 1–6. DOI: 10.1016/J.JVIROMET.2008.12.017.
  12. Hietala V, Horsma-Heikkinen J, Carron A, Skurnik M, Kiljunen S. The Removal of Endo- and Enterotoxins From Bacteriophage Preparations. *Front Microbiol*. 2019; 10: 1674. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01674.
  13. Van Belleghem JD, Merabishvili M, Vergauwen B, Lavigne R, Vaneechoutte M. A comparative study of different strategies for removal of endotoxins from bacteriophage preparations. *J Microbiol Methods*. 2017; 132: 153–9. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.11.020.
  14. Van Twest R, Kropinski AM. Bacteriophage enrichment from water and soil. *Methods Mol Biol*. 2009; 501: 15–21. DOI: 10.1007/978-1-60327-164-6\_2.
  15. Cooper CJ, Denyer SP, Maillard J-Y. Stability and purity of a bacteriophage cocktail preparation for nebulizer delivery. *Lett Appl Microbiol*. 2014; 58 (2): 118–22. DOI: 10.1111/lam.12161.
  16. Merabishvili M, Pirnay J-P, Verbeken G, Chanishvili N, Tediashvili M, Lashkhi N, et al. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS One*. 2009; 4 (3): 4944. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0004944.
  17. Brisse S, Passet V, Haugaard AB, Babosan A, Kassis-Chikhani N, Struve C et al. Wzi gene sequencing, a rapid method for determination of capsulartype for klebsiella strains. *J Clin Microbiol*. 2013; 51 (12): 4073–8. DOI: 10.1128/JCM.01924-13.
  18. Gorodnichev RB, Volozhantsev NV, Krasnikova VM, Bodoev IN, Kornienko MA, Kuptsov NS, et al. Novel Klebsiella pneumoniae K23-specific bacteriophages from different families: similarity of depolymerases and their therapeutic potential. *Front Microbiol*. 2021; 12: 669618. DOI: 10.3389/FMICB.2021.669618.
  19. Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of bacteriophages using the small drop plaque assay system. *Bacteriophages*. 2009; 81–85. DOI: 10.1007/978-1-60327-164-6.
  20. Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF. Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. Inglis J. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1984; 2230 p.
  21. Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, Hernandez-Morales A, Lancaster J, Lessor L, et al. Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61 (10): 1–15. DOI: 10.1128/AAC.00954-17.
  22. Dedrick RM, Guerrero-Bustamante CA, Garlena RA, Russell DA, Ford K, Harris K, et al. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat Med Springer US*. 2019; 25 (5): 730–33. DOI: 10.1038/s41591-019-0437-z.
  23. Rubalskii E, Ruemke S, Salmoukas C, Boyle EC, Warnecke G, Tudorache I, et al. Bacteriophage therapy for critical infections related to cardiothoracic surgery. *Antibiotics*. 2020; 9 (5): 1–12. DOI: 10.3390/ANTIBIOTICS9050232.
  24. Pinto AM, Cerqueira MA, Bañobre-López M, Pastrana LM, Sillankorva S. Bacteriophages for chronic wound treatment: from traditional to novel delivery systems. *Viruses*. 2020; 12 (2): 1–29. DOI: 10.3390/v12020235.
  25. Wills QF, Kerrigan C, Soothill JS. Experimental bacteriophage protection against *Staphylococcus aureus* abscesses in a rabbit model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49 (3): 1220–1. DOI: 10.1128/AAC.49.3.1220-1221.2005.
  26. Fish R, Kutter E, Wheat G, Blasdel B, Kutateladze M, Kuhl S. Bacteriophage treatment of intransigent diabetic toe ulcers: a case series. *Journal of wound care*. 2016; 25 (Sup 7): 27–33. DOI: 10.12968/JOWC.2016.25.SUP7.S27.
  27. ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины. Фармакопей. рф [Электронный ресурс]. Доступно по ссылке: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-4-0006-15-bakterialnye-endotoksiny/> (дата обращения: 30.08.2021). Russian.
  28. Zhang ZR, Shen JT, Dai JY, Sun YQ, Dong YS, Xiu ZL. Separation and purification of Klebsiella phage by two-step salting-out extraction. *Sep Purif Technol*. 2020; 242 (2): 116784. DOI: 10.1016/j.seppur.2020.116784.
  29. Bergstrand A, Svanberg C, Langton M, Nydén M. Aggregation behavior and size of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O55:B5. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2006; 53 (1): 9–14. DOI: 10.1016/J.COLSURFB.2006.06.007.

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КАТИОННЫХ АНТИСЕПТИКОВ С КАРДИОЛИПИНСОДЕРЖАЩЕЙ МОДЕЛЬНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ МЕМБРАНОЙ

Е. Г. Холина<sup>1,2</sup>, М. Е. Боздаганян<sup>1,2</sup>, М. Г. Страховская<sup>1,2</sup>, И. Б. Коваленко<sup>1,2</sup> ✉

<sup>1</sup> Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Плазматическая мембрана является одной из главных мишеней действия катионных антисептиков (КА). Целью исследования было изучить на молекулярном уровне действие относящихся к разным химическим классам КА на кардиолипинсодержащие участки плазматической бактериальной мембраны. Исследование выполнено с применением крупнозернистого молекулярного моделирования. На основе созданных крупнозернистых молекулярных моделей КА, включая мирамистин, хлоргексидин, пиклоксидин и октенидин, изучено их взаимодействие с липидным кардиолипинсодержащим бислоем. КА снижали коэффициенты латеральной диффузии липидов и увеличивали площадь поверхности мембраны, приходящуюся на липид. Кроме мирамистина, все КА снижали параметры порядка жирнокислотных цепей липидов. Добавление октенидина в соотношении КА : липид как 1 : 4 приводило к кластеризации кардиолипина с последующим вырыванием из модельного бислоя нейтральных молекул фосфатидилэтаноламина. Выявлено, что КА обладают способностью сорбироваться на липидном бислое, вызывая кластеризацию отрицательно заряженных липидов. Антисептик октенидин вызывает образование кардиолипиновых микродоменов. Нарушение латерального распределения липидов и вырывание молекул фосфатидилэтаноламина может привести к повышению проницаемости липидного бислоя. Наиболее значимое уменьшение коэффициента латеральной диффузии липида кардиолипина в  $2,8 \pm 0,4$  раза отмечено в присутствии КА хлоргексидина при соотношении антисептик : липид как 1 : 4.

**Ключевые слова:** антисептик, бактериальная мембрана, молекулярное моделирование, мирамистин, хлоргексидин, пиклоксидин, октенидин

**Финансирование:** исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90045 и государственного задания «Влияние липидного состава бактериальных мембран на процессы взаимодействия с антимикробными соединениями», шифр: «Мембрана».

**Вклад авторов:** Е. Г. Холина — создание молекулярных моделей исследуемых веществ, проведение расчетов, написание текста статьи; М. Е. Боздаганян — проведение расчетов, написание текста статьи; М. Г. Страховская — идея исследования, написание текста статьи, анализ результатов; И. Б. Коваленко — идея исследования, создание вычислительной инфраструктуры, написание текста статьи, анализ результатов.

✉ **Для корреспонденции:** Илья Борисович Коваленко  
ул. Ореховый бульвар, д. 28, 115682, г. Москва; ikovalenko78@gmail.com

**Статья получена:** 19.07.2021 **Статья принята к печати:** 21.08.2021 **Опубликована онлайн:** 11.09.2021

**DOI:** 10.47183/mes.2021.024

## INTERACTION OF CATIONIC ANTISEPTICS WITH CARDIOLIPIN-CONTAINING MODEL BACTERIAL MEMBRANES

Kholina EG<sup>1,2</sup>, Bozdaganyan ME<sup>1,2</sup>, Strakhovskaya MG<sup>1,2</sup>, Kovalenko IB<sup>1,2</sup> ✉

<sup>1</sup> Federal Scientific and Clinical Center of Specialized Medical Care and Medical Technology of FMBA, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Plasma membrane is one of the major targets for cationic antiseptics (CA). The study was aimed to assess molecular effects of CAs of different chemical classes on cardiolipin-containing regions of bacterial plasma membranes. The study was carried out using coarse-grained molecular modeling. Interaction of CAs, such as miramistin, chlorhexidine, picloxidine, and octenidine, with cardiolipin-containing bilayer was assessed based on the CA coarse-grained models. CAs reduced lipid lateral diffusion coefficients and increased the membrane area per lipid. All CAs, except miramistin, reduced the lipid fatty acid chain order parameters. Adding octenidine at a CA : lipid ratio of 1 : 4 resulted in cardiolipin clustering with subsequent pulling the neutral phosphatidylethanolamine molecules out of the model bilayer. It was found that CAs have the potential for sorption to lipid bilayer, causing clustering of negatively charged lipids. Antiseptic octenidine causes formation of cardiolipin microdomains. Abnormal lateral lipid distribution together with pulling out phosphatidylethanolamine molecules can result in increased lipid bilayer permeability. The most significant reduction of cardiolipin lateral diffusion coefficient by  $2.8 \pm 0.4$  times was observed in the presence of CA chlorhexidine at an antiseptic : lipid ratio of 1 : 4.

**Keywords:** antiseptic, bacterial membrane, molecular modeling, miramistin, chlorhexidine, picloxidine, octenidine

**Funding:** the research was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research (project № 19-34-90045) and the State assignment "The influence of the lipid composition of bacterial membranes on the processes of interaction with antimicrobial compounds" (code: "Membrane").

**Author contribution:** Kholina EG — constructing molecular models of studied substances, calculations, manuscript writing; Bozdaganyan ME — calculations, manuscript writing; Strakhovskaya MG — study concept, manuscript writing, analysis of the results; Kovalenko IB — study concept, building a computing infrastructure, manuscript writing, analysis of the results.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ilya B. Kovalenko  
Orehovyi bulvar, 28, Moscow, 115682; ikovalenko78@gmail.com

**Received:** 19.07.2021 **Accepted:** 21.08.2021 **Published online:** 11.09.2021

**DOI:** 10.47183/mes.2021.024

Антисептики относятся к одной из ключевых групп соединений, активно применяемых для профилактики и борьбы с инфекционными заболеваниями. Активность антисептиков связана с их способностью ингибировать рост (бактериостатический эффект) и инактивировать клетки микроорганизмов (бактерицидный эффект). Среди антисептиков одними из наиболее эффективных являются

катионные соединения, которые электростатически связываются с отрицательно заряженными группами компонентов клеточных стенок бактерий, вытесняя стабилизирующие их двухвалентные катионы. Исследования антимикробной природы действия антисептиков выявили дезинтеграцию клеточной мембраны с последующим вытеканием внутриклеточных

компонентов [1], нарушение клеточного метаболизма [2, 3], ингибирование ферментов, угнетение электронного транспорта и окислительного фосфорилирования [4, 5]. В частности, с помощью электронной микроскопии показаны специфические разрывы бактериальных клеточных стенок [6, 7].

Среди КА наиболее обширной группой веществ являются четвертичные аммониевые соединения (QAC) и бигуаниды [8]. Первые получили свое название за счет того, что в их структуре присутствует четвертичный азот с ковалентно присоединенным к нему гидрофобным заместителем [8]. К представителям негетероциклических QAC относится мирамистин (MIR), несущий один положительный заряд. Пространственная структура MIR обладает изогнутой формой и напоминает крюк, в котором голова наклонена к алкильному хвосту [9]. Предполагается, что положительно заряженный азот MIR взаимодействует с отрицательно заряженными фосфолипидами, что приводит к нарушению нормального распределения зарядов на поверхности мембраны, а гидрофобный хвост встраивается в бактериальные мембраны, результатом чего становится нарушение их физических и биологических функций. К представителям гетероциклических QAC относится антисептик октенидин (OCT), в структуре которого два пиридиновых атома азота соединены посредством длинного алкильного линкера, а в пара-положениях пиридиновых колец находятся остатки алкиламинов [10]. Несущий два положительных заряда OCT проявляет высокое сродство к липидам в составе бактериальной мембраны, особенно к отрицательно заряженному кардиолипину (CL). Бигуаниды относятся к виду соединений, где амидиновая группа присоединена к гуанидиновой с образованием  $-C=N-C=N-$  конъюгированной системы. Наиболее изученный представитель группы бигуанидов — хлоргексидин (CHL). В состав симметричной химической структуры CHL входят две соединенные гидрофобным линкером гидрофильные бигуанидиновые группы, к каждой из которых присоединено хлорфенольное кольцо. Для CHL характерна пространственная конформация в виде скобки [11]. При физиологических значениях pH молекула CHL несет два положительных заряда [10]. Большое распространение CHL получил благодаря антимикробной активности по отношению ко многим микроорганизмам, включая широкий ряд грамположительных и грамотрицательных бактерий, вирусы и грибы. Однако в отношении грамположительных бактерий CHL более эффективен. Некоторые виды грамотрицательных видов, такие как *Proteus mirabilis* (минимальная ингибирующая концентрация (МИК) составляет 115 мг/л), *Providencia stuartii* (МИК составляет 102 мг/л), проявляют высокую устойчивость по отношению к CHL [12].

Бактериальная плазматическая мембрана играет важную роль в функционировании клетки и выполняет множество функций, включая регуляцию транспорта веществ и участие в делении. Липиды, составляющие бактериальную плазматическую мембрану, варьируют по количеству и длине жирных кислот, количеству и расположению содержащихся в них двойных связей, структуре и заряду гидрофильной части [13]. Общими для большинства бактерий являются нейтральный фосфатидилэтанолламин (PE) и отрицательно заряженные фосфолипиды, фосфатидилглицерол (PG) и CL, составляющие по крайней мере 15% от общего содержания [14]. В отличие от PE и PG, CL имеет более массивную

структуру за счет содержания в ней двух фосфатных остатков и четырех жирных кислот.

Для бактериальной плазматической мембраны характерно гетерогенное распределение липидов [15]. Фосфолипид PE распределен равномерно в клетках широкого ряда грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas putida*, *Azotobacter vinelandii*, *Proteus vulgaris*), в то время как в клетках видов *Bacillus* показана его локализация в септальных участках [16]. Для анионных липидов показано формирование микродоменов. В частности, на полюсах клеток грамотрицательных бактерий в составе плазматической мембраны присутствуют микродомены из молекул CL. Считается, что локализация CL на полюсах связана с его участием в процессах клеточного деления, в частности, с взаимодействием с белками клеточного деления DnaA, MinD, FtsA. DnaA отвечает за инициацию репликации ДНК, MinD в составе системы MinCDE препятствует локализации дивисомы вблизи полюсов клетки, FtsA — бактериальный актин, линкерный белок для бактериального тубулина FtsZ, формирующего в середине клетки Z-кольцо. Данные белки реагируют преимущественно с анионными липидами бактериальной плазматической мембраны за счет наличия в своей структуре амфитропных мотивов, обогащенных положительно заряженными аминокислотами [17]. Другие важные клеточные процессы, в которых участвует CL за счет взаимодействия с белками — передача энергии, осмоадаптация и транслокация белков. С помощью рентгеноструктурного анализа продемонстрировано присутствие CL в структурах реакционного центра и цитохром-с-оксидазы *Rhodobacter sphaeroides*, формат-и сукцинат дегидрогеназы *E. coli* [13]. На *E. coli* показана колокализация CL с осмосенсорным транспортером ProP [18], реагирующим на изменение осмоляльности путем усиления транспорта в клетку органических осмолитов, а на *Vibrio cholerae* — колокализация с системой Eps, отвечающей за экспорт холерного токсина [19].

Несмотря на объем экспериментальных данных по механизмам действия катионных антисептиков, эти сведения не позволяют четко ответить на вопрос, что служит первопричиной бактерицидного действия антисептиков — дезинтеграция мембраны или угнетение клеточного метаболизма. Таким образом, точные молекулярные механизмы действия данной группы антимикробных веществ не до конца исследованы. Учитывая высказанные ранее предположения о возможной роли молекул CL как центров связывания КА [6], целью данной работы было исследовать влияние КА на CL-содержащие участки плазматической мембраны бактериальных клеток методами молекулярного моделирования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Крупнозернистые молекулярные модели КА описаны ранее [20]. Для исследования влияния КА на модельный бислой были выбраны представители бигуанидов — CHL, пиклоксидин (PIC), QAC — (MIR, OCT). Все КА, кроме MIR, несут двойной положительный заряд. Химические структуры КА с разбиением их на крупнозернистые частицы в соответствии с силовым полем MARTINI представлены на рис. 1. Тип частиц C1 был выбран для описания гидрофобных участков КА по аналогии с параметризацией липидов, SC2/SC3/SC4 — для ароматических фрагментов, P5 — для фрагментов, содержащих пептидные связи, по аналогии с параметризацией аминокислот во второй

версии силового поля MARTINI. Антисептики мы добавляли к модельному бислою при двух разных соотношениях КА : липид 1 : 8 и 1 : 4 в соответствии с концентрациями, применяемыми в медицинских растворах.

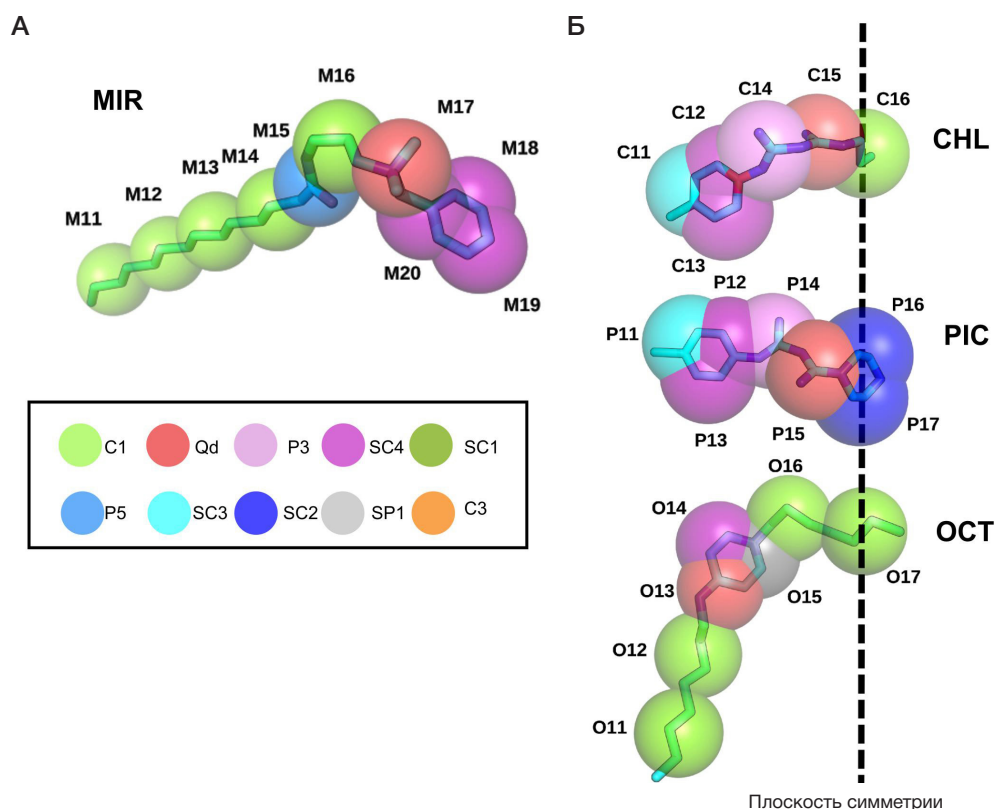
Молекулярную крупнозернистую модель бислоя мы создавали с помощью CHARMM-GUI MARTINI Maker [21], разработанного научной группой профессора Има в Лихайском университете (Lehigh University; США), в силовом поле MARTINI [22]. Модель плазматической мембраны, имитирующей липидный состав на полюсах бактериальной клетки, состояла из липидов пальмитоил-олеил-PE (POPE), POPG и CL, несущих заряд -2 (CDL2), в соотношении 81 : 7 : 12 по массе. Расчеты крупнозернистой молекулярной динамики (МД) мы проводили с использованием программного пакета Gromacs 2019.4 (разработан в университетах Уппсалы и Стокгольма, а также Королевском Технологическом Институте, Швеция) [23] в течение 5 мкс для систем КА : липид 1 : 8 и в течение 35 мкс для систем КА : липид 1 : 4. Моделирование проводили в ансамбле NPT с использованием термостата V-rescale ( $T = 320$  K;  $\tau_T = 1$  пс) и баростата Парринелло-Рамана ( $p_{ref} = 1$  бар;  $\tau_p = 12$  пс) [23]. МД-расчеты мы выполняли с добавлением поляризуемой воды [24], с диэлектрической постоянной  $\epsilon_r = 2,5$ , с шагом интегрирования 20 фс. Характеристики модельных бислоев в присутствии КА вычисляли с использованием встроенных утилит программного пакета Gromacs 2019.4. Площадь на липид была рассчитана с помощью *gmx energy*, коэффициенты латеральной диффузии — *gmx msd*. Профили плотности компонентов молекулярно-динамических систем относительно центра бислоя, радиальные функции распределения, оценка количества липидов вне плоскости бислоя мы оценивали с помощью программ, написанных нами на языке Python с применением функций библиотеки

MDAnalysis. Значения толщины модельных мембран мы определяли по профилям плотности как разность положений пиков плотности фосфатов относительно центра бислоя. Характеристики модельных бислоев для каждой системы мы подсчитывали по двум последним мкс МД-траектории.

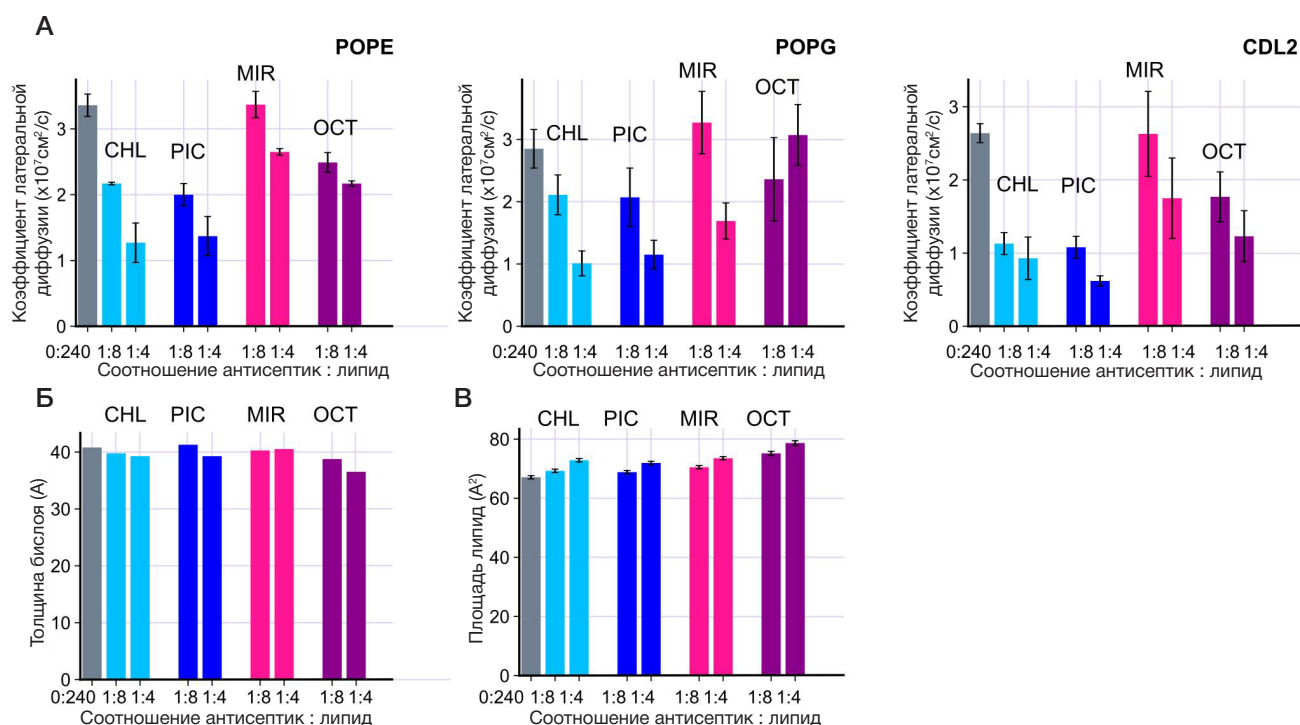
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В присутствии всех исследованных КА наблюдалось снижение коэффициентов латеральной диффузии липидов (рис. 2А), незначительное снижение толщины бислоя (рис. 2Б) и увеличение площади на липид (рис. 2В). В присутствии всех типов КА, кроме MIR, отмечено снижение параметров порядка для жирнокислотных цепей липидов (данные не показаны), что можно объяснить принципиально другой химической природой MIR по сравнению с остальными КА. Обладая более длинными гидрофобными участками, молекулы MIR более глубоко проникали в модельный бислой и их взаимодействие с жирными кислотами приводило к упорядочиванию липидов в модельной мембране.

Добавление ОСТ в высокой концентрации способствовало формированию в бислое CL микродомена. При этом вначале происходило встраивание в бислой части молекул ОСТ с последующим стягиванием отрицательно заряженных липидов CL и PG в кластер. Часть молекул ОСТ, оставшаяся в «растворе», довольно быстро собиралась в один мицеллярный агрегат. Такое поведение молекул связано с большим числом гидрофобных участков в молекуле ОСТ (помимо терминальных концевых участков, между фрагментами пиридина присутствует длинный гидрофобный линкер). Мицеллярный агрегат сорбировался на молекулы ОСТ, находящиеся на



**Рис. 1.** Химические структуры КА с наложенными на них крупнозернистыми частицами. **А.** Мирамистин (MIR). **Б.** Хлоргексидин (CHL). **В.** Пиклоксидин (PIC); **Г.** Октенидин (ОСТ). Крупнозернистые частицы выделены разными цветами в соответствии с выбранными типами частиц в силовом поле MARTINI (нижняя часть панели А)



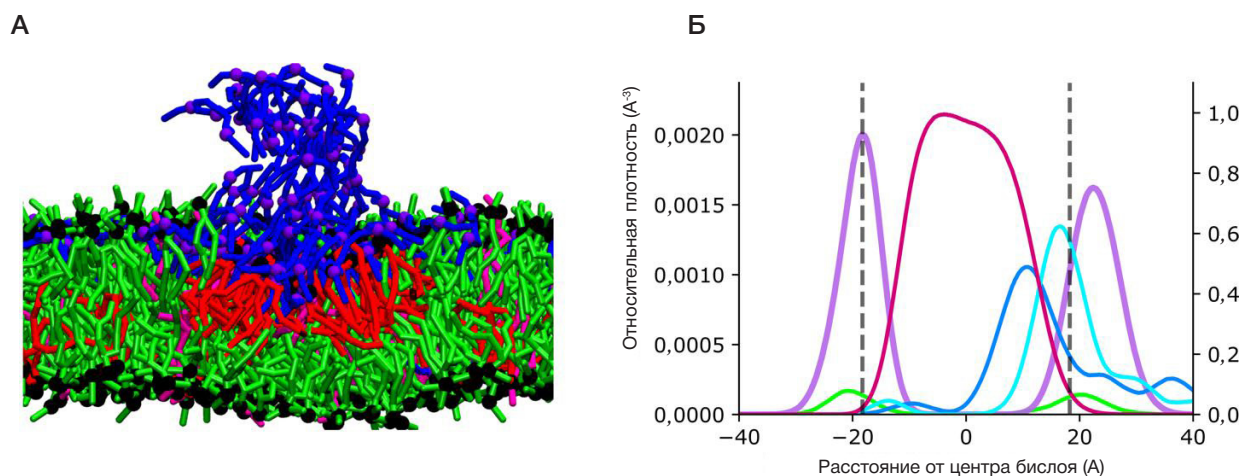
**Рис. 2.** Характеристики модельной мембраны состава POPE:POPG:CDL2 в присутствии КА в различной концентрации. **А.** Коэффициенты латеральной диффузии для липидов POPE (слева), POPG (посередине) и для CDL2 (справа). **Б.** Толщина бислоя. **В.** Площадь на липид. (Значения параметров для модельной мембраны без добавления КА показаны серым цветом)

сформированном CL микродомене (рис. 3А), и существовал в таком состоянии несколько микросекунд. При этом происходило нарушение симметричности расположения молекул POPE во внешнем и внутреннем монослое. Последнее подтверждается смещением пиков полярных голов липидов POPE во внешнем монослое относительно среднего положения фосфатов на профилях относительной плотности компонентов системы (рис. 3Б). Это происходит за счет того, что находящиеся рядом с CL доменом фосфаты полярных голов POPE липидов притягиваются к мицеллярному агрегату из молекул OCT. Начиная с момента времени примерно через 18 мкс МД расчета происходило постепенное вырывание молекул POPE, находящихся рядом с CL микродоменом (рис. 4А). Процесс вырывания длился около 2 мкс (рис. 4Б).

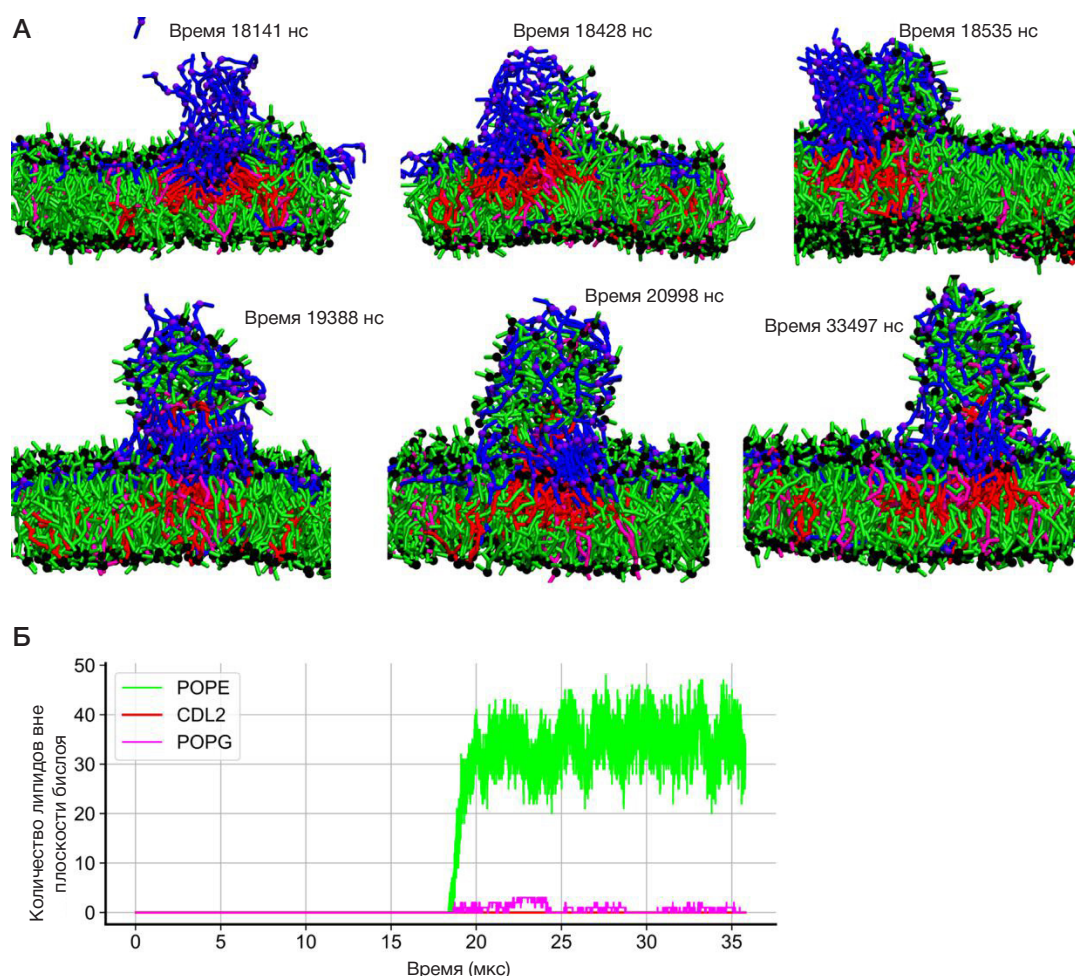
## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Плазматические мембраны грамотрицательных и грамположительных бактерий различаются по составу. Для наиболее изученных модельных видов в таблице указаны соотношения между тремя преобладающими липидами. Из этих данных видно, что липид PE наиболее представлен в мембранах большинства видов грамотрицательных клеток по сравнению с грамположительными. Содержание CL, как правило, составляет не более 20% от общего количества, за исключением видов, в которых отсутствует PE. В плазматических мембранах таких видов содержание CL может достигать 50%.

На основании проведенных крупнозернистых МД расчетов нами показано, что все изученные КА встраиваются



**Рис. 3.** Эффект кластеризации CDL2 в присутствии антисептика OCT в соотношении КА : липид 1 : 4. **А.** Кадр МД расчета в момент времени 15 мкс. Липиды POPE показаны зеленым, POPG — розовым, CDL2 — красным, OCT — синим. Остатки фосфатов показаны черным, заряженные частицы молекул OCT — фиолетовым. **Б.** Профили плотности различных компонентов модельной мембраны. Профиль плотности для жирнокислотных цепей липидов показан розовым, заряженные частицы OCT — циановым, терминальные частицы OCT — голубым, NH<sub>3</sub> частица (этанол) POPE липида — фиолетовым, GLO частица (глицерол) POPG липида — зеленым. Серыми пунктирными линиями отмечены положения фосфатов, проведенные через центры соответствующих пиков. Профили плотности для жирнокислотных цепей, нормированные на максимум пикового значения, показаны по второй оси ординат (справа)



**Рис. 4.** Эффект вырывания липидов молекулами ОСТ из модельного бислоя. Соотношение КА : липид равно 1 : 4. **А.** Последовательные кадры МД расчета в разные моменты времени. Липиды POPE показаны зеленым, POPG — розовым, CDL2 — красным, ОСТ — синим. Остатки фосфатов показаны черным, заряженные частицы молекул ОСТ — фиолетовым. **Б.** Количество вырванных из бислоя липидов в зависимости от времени МД расчета

в модельный липидный бислой. Все исследованные КА снижали коэффициенты латеральной диффузии как нейтральных POPE, так и отрицательно заряженных липидов POPG и CDL2 (см. рис. 2А). Подвижность липидов жидкостно-мозаичных биологических мембран [25] играет важную роль для поддержания активности мембранных белков, участвующих во всех клеточных процессах, включая рост и дифференциацию клетки, транспорт веществ, клеточное дыхание. Подвижность липидов является мерой того, насколько легко данные биомолекулы могут перемещаться в плоскости бислоя, и оценивается через коэффициенты латеральной диффузии

[26], которые могут быть получены из результатов молекулярной динамики [27]. Уменьшение коэффициентов латеральной диффузии до 20% от исходного уровня выявлено при соотношении концентраций антимикробное вещество : липид как 1 : 5 [28, 29], что может негативно влиять на функциональное состояние мембраны.

Наиболее заметно снижение латеральной диффузии проявлялось по отношению к липиду CDL2, обладающему большим отрицательным зарядом (–2 по сравнению с –1 у POPG) и более массивной структурой. Наиболее слабый эффект на снижение латеральной диффузии проявлял MIR. Это может быть связано с тем, что молекулы MIR,

**Таблица.** Соотношение фосфатидилэтаноламина (PE), фосфатидилглицерола (PG), кардиолипина (CL) в составе плазматической мембраны некоторых видов грамотрицательных (–) и грамположительных (+) бактерий [13, 14]

| Вид                                 | PE, % | PG, % | CL, % |
|-------------------------------------|-------|-------|-------|
| <i>Escherichia coli</i> (–)         | 80    | 15    | 5     |
| <i>Yersinia kristensenii</i> (–)    | 60    | 20    | 20    |
| <i>Proteus mirabilis</i> (–)        | 80    | 10    | 5     |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> (–)    | 82    | 5     | 6     |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (–)   | 60    | 21    | 11    |
| <i>Caulobacter crescentus</i> (–)   | 0     | 78    | 9     |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (+)    | 0     | 58    | 42    |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> (+) | 0     | 50    | 50    |
| <i>Bacillus cereus</i> (+)          | 43    | 40    | 17    |
| <i>Bacillus polymyxa</i> (+)        | 60    | 3     | 8     |

в отличие от остальных исследуемых КА, несут один положительный заряд и поэтому не способны связывать несколько липидов и образовывать протяженные участки относительно иммобилизованных липидов. Яркое выраженное замедление латеральной диффузии липидов в присутствии бигуанидов CHL и PIC также можно объяснить их химической природой. CHL и PIC, обладающие зарядом +2 и коротким линкером между заряженными частицами, способствовали формированию полужесткого каркаса, связывающего липиды в упорядоченные области в мембране.

При добавлении всех исследованных КА незначительно снижалась средняя толщина модельной мембраны и увеличивалась площадь, приходящаяся на одну молекулу липида (см. рис. 2). Все антисептики, за исключением MIR, нарушали упаковку жирных кислот липидов за счет расталкивания ацильных цепей своими встроенными в мембрану терминальными участками. Длинный хвост MIR напоминает по химической природе жирные кислоты липидов, поэтому его добавление приводило к упорядочиванию липидов в модельной мембране. Выявленные нами изменения в модельном бислое могут объяснять деструктивное действие антисептиков на функциональные и барьерные свойства плазматических мембран бактериальных клеток.

Антисептик OCT способствовал формированию в бислое CL микродомена, на который молекулы антисептика сорбировались в виде мицеллярного агрегата, вырывая из бислоя находящиеся рядом нейтральные липиды POPE. Подобные эффекты могут привести к наблюдаемому в эксперименте увеличению проницаемости везикул при добавлении OCT. На основе полученных экспериментальных результатов [30] был предложен следующий молекулярный механизм бактерицидного действия OCT. На начальном этапе OCT связывается с наружной бактериальной мембраной, вследствие чего происходит нейтрализация поверхностного заряда. Гидрофобные участки OCT взаимодействуют с ацильными цепями липида А, в результате чего возникает гидрофобное

несоответствие и нарушаются структура и целостность мембраны. Подобным образом молекулы OCT влияют и на плазматическую мембрану, вызывая ее деполяризацию, нарушение текучести и упаковки ацильных цепей фосфолипидов. В результате такого неспецифического действия в итоге обе мембраны клеточной стенки повреждаются, и внутриклеточное содержимое вытекает наружу. Полученные нами данные молекулярного моделирования о сорбции OCT на липидный бислой, снижении в присутствии OCT коэффициентов латеральной диффузии липидов и параметров порядка ацильных цепей подтверждают описанный в работе [30] механизм бактерицидного действия этого антисептика.

## ВЫВОДЫ

На основе созданных крупнозернистых моделей КА из групп бигуанидов (CHL, PIC) и QAC (MIR, OCT) изучено их взаимодействие с CL-содержащим модельным бислоем, имитирующим состав плазматической мембраны на полюсах клеток палочковидных бактерий. Результаты МД-моделирования выявили как сходство, так и различие во влиянии различных КА на модельный бислой. При добавлении всех исследованных КА снижались коэффициенты латеральной диффузии липидов, незначительно уменьшалась средняя толщина мембраны и увеличивалось значение площади на липид. OCT при высокой концентрации способствовал образованию CL микродоменов с последующим вырыванием POPE липидов из модельной плазматической мембраны. Изучение взаимодействия КА с модельной бактериальной плазматической мембраной методами компьютерного моделирования позволило подтвердить на молекулярном уровне экспериментально установленные факты. Сравнение эффективности КА разной химической природы может оказать существенный вклад в создание новых эффективных препаратов и способствовать рациональному использованию антисептиков.

## Литература

- Denyer SP, Hugo WB. Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. *Soc Appl Bacteriol Tech Ser.* 1991; 27: 171–87.
- Kroll RG, Patchett RA. Biocide-induced perturbations of aspects of cell homeostasis : intracellular pH, membrane potential and solute transport. *Soc Appl Bacteriol Tech Ser.* 1991; 27: 189–202.
- Russell AD, Hugo WB. Perturbation of homeostatic mechanisms in bacteria by pharmaceuticals. In: Whittenbury R, Gould GW, Banks JG, Board RG, editors. *Homeostatic mechanisms in microorganisms.* Bath University Press, Bath, England. 1988; p. 206–19.
- Fuller SJ. Biocide-induced enzyme inhibition. *Soc Appl Bacteriol Tech Ser.* 1991; 27: 235–49.
- Kuyyakanond T, Quesnel LB. The mechanism of action of chlorhexidine. *FEMS Microbiol Lett Oxford Academic.* 1992; 100 (1–3): 211–15.
- Cheung, HY, Wong MM, Cheung SH, Liang LY, Lam YW, Chiu SK. Differential actions of chlorhexidine on the cell wall of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *PLoS One.* 2012; 7 (5): e36659.
- Страховская М. Г., Халатян А. С., Будзинская М. В., Холина Е. Г., Колышкина Н. А., Коваленко И. Б. и др. Чувствительность антибиотикорезистентных коагулазонегативных стафилококков к антисептику пиклоксидину. *Клиническая практика.* 2020; 11 (1): 42–48.
- Gilbert P, Moore LE. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J Appl Microbiol.* 2005; 99 (4): 703–15.
- Dolgushin FM, Goloveshkin AS, Ananyev IV, Osintseva SV, Torubaev YV, Krylov SS, et al. Interplay of noncovalent interactions in antiseptic quaternary ammonium surfactant Miramistin. *Acta Crystallogr Sect C International Union of Crystallography (IUCr).* 2019; 75 (4): 402–11.
- Vereshchagin AN, Frolov NA, Egorova KS, Seitkalieva MM, Ananikov VP. Quaternary Ammonium Compounds (QACs) and Ionic Liquids (ILs) as Biocides: From Simple Antiseptics to Tunable Antimicrobials. *Int J Mol Sci.* 2021; 22 (13): 67–93.
- Van Oosten B, Marquardt D, Komljenović I, Bradshaw JP, Sternin E, Harroun TA. Small molecule interaction with lipid bilayers: a molecular dynamics study of chlorhexidine. *J Mol Graph Model.* 2014; 48: 96–104.
- Amsterdam D, Ostrov BE. Disinfectants and antiseptics: Modes of action, mechanisms of resistance, and testing regimens. *Antibiotics in Laboratory Medicine.* Wolters Kluwer Health Adis (ESP), 2014; p. 1135–230.
- Lin TY, Weibel DB. Organization and function of anionic phospholipids in bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016; 100 (10): 4255–67.
- Epand RM, Epand RF. Bacterial membrane lipids in the action of antimicrobial agents. *J Pept Sci.* 2011; 17 (5): 298–305.

15. Matsumoto K, Kusaka J, Nishibori A, Hara H. Lipid domains in bacterial membranes. *Mol Microbiol*. 2006; 61 (5): 1110–17.
16. Strahl H, Errington J. Bacterial Membranes: Structure, Domains, and Function. *Annu Rev Microbiol*. 2017; 71: 519–38.
17. Mileykovskaya E, Dowhan W. Cardiolipin membrane domains in prokaryotes and eukaryotes. *Biochim Biophys Acta — Biomembr*. Elsevier B.V. 2009; 1788 (10): 2084–91.
18. Romantsov T, Battle AR, Hendel JL, Martinac B, Wood JM. Protein localization in *Escherichia coli* cells: comparison of the cytoplasmic membrane proteins ProP, LacY, ProW, AqpZ, MscS, and MscL. *Journal of bacteriology*. 2010; 192 (4): 912–24.
19. Camberg JL, Johnson TL, Patrick M, Abendroth J, Hol WG, Sandkvist M. Synergistic stimulation of EpsE ATP hydrolysis by EpsL and acidic phospholipids. *The EMBO journal*. 2007; 26 (1): 19–27.
20. Kholina EG, Kovalenko IB, Bozdaganyan ME, Strakhovskaya MG, Orekhov PS. Cationic antiseptics facilitate pore formation in model bacterial membranes. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2020; 124 (39): 8593–600.
21. Qi Y, Inglyfsson HI, Cheng X, Lee J, Marrink SJ, Im W. CHARMM-GUI martini maker for coarse-grained simulations with the martini force field. *Journal of chemical theory and computation*. 2015; 11 (9): 4486–94.
22. Marrink SJ, Risselada HJ, Yefimov S, Tieleman DP, De Vries AH, et al. The MARTINI Force Field: Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations. *J Phys Chem B*. 2007; 111 (27): 7812–24.
23. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Pall S, Smith JC, Hess B, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *Software X*. 2015; 1: 19–25.
24. Yesylevskyy SO, Schäfer LV, Sengupta D, Marrink SJ. Polarizable water model for the coarse-grained MARTINI force field. *PLoS computational biology*. 2010; 6 (6): e1000810.
25. Singer SJ, Nicolson GL. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science*. 1972; 175 (4023): 720–31.
26. Macháň R, Hof M. Lipid diffusion in planar membranes investigated by fluorescence correlation spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2010; 1798 (7): 1377–91.
27. Moradi S, Nowroozi A, Shahlaei M. Shedding light on the structural properties of lipid bilayers using molecular dynamics simulation: a review study. *RSC Adv. The Royal Society of Chemistry*. 2019; 9 (8): 4644–58.
28. John T, Thomas T, Abel B, Wood BR, Chalmers DK, Martin LL. How kanamycin A interacts with bacterial and mammalian mimetic membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2017; 1859 (11): 2242–52.
29. Berglund NA, Piggot TJ, Jefferies D, Sessions RB, Bond PJ, Khalid S. Interaction of the antimicrobial peptide polymyxin B1 with both membranes of *E. coli*: a molecular dynamics study. *PLoS computational biology*. 2005; 11 (4): e1004180.
30. Malanovic N, Ön A, Pabst G, Zellner A, Lohner K. Octenidine: Novel insights into the detailed killing mechanism of Gram-negative bacteria at a cellular and molecular level. *Int J Antimicrob Agents*. 2020; 56 (5): 106146.

## References

1. Denyer SP, Hugo WB. Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. *Soc Appl Bacteriol Tech Ser*. 1991; 27: 171–87.
2. Kroll RG, Patchett RA. Biocide-induced perturbations of aspects of cell homeostasis: intracellular pH, membrane potential and solute transport. *Soc Appl Bacteriol Tech Ser*. 1991; 27: 189–202.
3. Russell AD, Hugo WB. Perturbation of homeostatic mechanisms in bacteria by pharmaceuticals. In: Whittenbury R, Gould GW, Banks JG, Board RG, editors. *Homeostatic mechanisms in microorganisms*. Bath University Press, Bath, England. 1988; p. 206–19.
4. Fuller SJ. Biocide-induced enzyme inhibition. *Soc Appl Bacteriol Tech Ser*. 1991; 27: 235–49.
5. Kuyyakanond T, Quesnel LB. The mechanism of action of chlorhexidine. *FEMS Microbiol Lett Oxford Academic*. 1992; 100 (1–3): 211–15.
6. Cheung, HY, Wong MM, Cheung SH, Liang LY, Lam YW, Chiu SK. Differential actions of chlorhexidine on the cell wall of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2012; 7 (5): e36659.
7. Strakhovskaya MG, Khalatyan AS, Budzinskaya MV, Kholina EG, Kolyshkina NA, Kovalenko IB, Zhukhovitsky VG. Chuvstvitel'nost' antibiotikorezistentnykh koagulazonegativnykh stafilokokkov k antiseptiku pikloksidinu. *Klinicheskaja praktika*. 2020; 11 (1): 42–48. Russian.
8. Gilbert P, Moore LE. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J Appl Microbiol*. 2005; 99 (4): 703–15.
9. Dolgushin FM, Goloveshkin AS, Ananyev IV, Osintseva SV, Torubaev YV, Krylov SS, et al. Interplay of noncovalent interactions in antiseptic quaternary ammonium surfactant Miramistin. *Acta Crystallogr Sect C International Union of Crystallography (IUCr)*. 2019; 75 (4): 402–11.
10. Vereshchagin AN, Frolov NA, Egorova KS, Seitkalieva MM, Ananikov VP. Quaternary Ammonium Compounds (QACs) and Ionic Liquids (ILs) as Biocides: From Simple Antiseptics to Tunable Antimicrobials. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 (13): 67–93.
11. Van Oosten B, Marquardt D, Komljenović I, Bradshaw JP, Sternin E, Harroun TA. Small molecule interaction with lipid bilayers: a molecular dynamics study of chlorhexidine. *J Mol Graph Model*. 2014; 48: 96–104.
12. Amsterdam D, Ostrov BE. Disinfectants and antiseptics: Modes of action, mechanisms of resistance, and testing regimens. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Wolters Kluwer Health Adis (ESP), 2014; p. 1135–230.
13. Lin TY, Weibel DB. Organization and function of anionic phospholipids in bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016; 100 (10): 4255–67.
14. Epand RM, Epand RF. Bacterial membrane lipids in the action of antimicrobial agents. *J Pept Sci*. 2011; 17 (5): 298–305.
15. Matsumoto K, Kusaka J, Nishibori A, Hara H. Lipid domains in bacterial membranes. *Mol Microbiol*. 2006; 61 (5): 1110–17.
16. Strahl H, Errington J. Bacterial Membranes: Structure, Domains, and Function. *Annu Rev Microbiol*. 2017; 71: 519–38.
17. Mileykovskaya E, Dowhan W. Cardiolipin membrane domains in prokaryotes and eukaryotes. *Biochim Biophys Acta — Biomembr*. Elsevier B.V. 2009; 1788 (10): 2084–91.
18. Romantsov T, Battle AR, Hendel JL, Martinac B, Wood JM. Protein localization in *Escherichia coli* cells: comparison of the cytoplasmic membrane proteins ProP, LacY, ProW, AqpZ, MscS, and MscL. *Journal of bacteriology*. 2010; 192 (4): 912–24.
19. Camberg JL, Johnson TL, Patrick M, Abendroth J, Hol WG, Sandkvist M. Synergistic stimulation of EpsE ATP hydrolysis by EpsL and acidic phospholipids. *The EMBO journal*. 2007; 26 (1): 19–27.
20. Kholina EG, Kovalenko IB, Bozdaganyan ME, Strakhovskaya MG, Orekhov PS. Cationic antiseptics facilitate pore formation in model bacterial membranes. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2020; 124 (39): 8593–600.
21. Qi Y, Inglyfsson HI, Cheng X, Lee J, Marrink SJ, Im W. CHARMM-GUI martini maker for coarse-grained simulations with the martini force field. *Journal of chemical theory and computation*. 2015; 11 (9): 4486–94.
22. Marrink SJ, Risselada HJ, Yefimov S, Tieleman DP, De Vries AH, et al. The MARTINI Force Field: Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations. *J Phys Chem B*. 2007; 111 (27): 7812–24.
23. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Pall S, Smith JC, Hess B, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *Software X*. 2015; 1: 19–25.
24. Yesylevskyy SO, Schäfer LV, Sengupta D, Marrink SJ. Polarizable water model for the coarse-grained MARTINI force field. *PLoS computational biology*. 2010; 6 (6): e1000810.
25. Singer SJ, Nicolson GL. The Fluid Mosaic Model of the Structure

- of Cell Membranes. *Science*. 1972; 175 (4023): 720–31.
26. Macháň R, Hof M. Lipid diffusion in planar membranes investigated by fluorescence correlation spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2010; 1798 (7): 1377–91.
  27. Moradi S, Nowroozi A, Shahlaei M. Shedding light on the structural properties of lipid bilayers using molecular dynamics simulation: a review study. *RSC Adv. The Royal Society of Chemistry*. 2019; 9 (8): 4644–58.
  28. John T, Thomas T, Abel B, Wood BR, Chalmers DK, Martin LL. How kanamycin A interacts with bacterial and mammalian mimetic membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2017; 1859 (11): 2242–52.
  29. Berglund NA, Piggot TJ, Jefferies D, Sessions RB, Bond PJ, Khalid S. Interaction of the antimicrobial peptide polymyxin B1 with both membranes of *E. coli*: a molecular dynamics study. *PLoS computational biology*. 2005; 11 (4): e1004180.
  30. Malanovic N, Ön A, Pabst G, Zellner A, Lohner K. Octenidine: Novel insights into the detailed killing mechanism of Gram-negative bacteria at a cellular and molecular level. *Int J Antimicrob Agents*. 2020; 56 (5): 106146.

## ОЦЕНКА ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОГО ЭФФЕКТА АНТИОКСИДАНТОВ НА АМИОДАРОН-ИНДУЦИРОВАННУЮ ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ В КЛЕТКАХ ГЕПАТОМЫ ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ *HEPARG*

К. С. Филимонова, Н. Ю. Роговская, П. П. Бельтюков, В. Н. Бабаков ✉

Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека Федерального медико-биологического агентства, Ленинградская область, Россия

Для эффективной терапии амиодарон-индуцированной гепатотоксичности необходимы изучение механизмов токсического действия амиодарона на гепатоциты и оценка возможного влияния гепатопротекторов. Целью работы было исследовать гепатопротекторный эффект антиоксидантов на амиодарон-индуцированную цитотоксичность с использованием immortalized гепатомы человека линии *HepaRG*. Жизнеспособность клеток оценивали при действии амиодарона и в смеси с витамином E, N-ацетилцистеином и S-аденозилметионином методом импедансометрии, а также определяли содержание некоторых биомаркеров гепатотоксичности с использованием технологии Luminex xMAP. В результате исследования установлен дозозависимый эффект токсического действия амиодарона,  $IC_{50}$  амиодарона для линии *HepaRG* составил 3,5 мкМ. Показано, что в присутствии витамина E, N-ацетилцистеина и S-аденозилметионина снижается цитотоксический эффект и увеличивается значение  $IC_{50}$ . Амиодарон снижает активность регуляторов клеточного цикла: киназ AKT, JNK и белка p53. В результате действия амиодарона уменьшается содержание АТФ в клетках и наблюдается выход внутриклеточных ферментов (малатдегидрогеназы 1, глутатион-S-трансферазы, сорбитолдегидрогеназы, 5'-нуклеотидазы) в кондиционную среду, что свидетельствует о клеточной гибели по типу некроза. Таким образом, витамин E, S-аденозилметионин и N-ацетилцистеин снижают цитотоксичность амиодарона в модели амиодарон-индуцированного повреждения гепатоцитов и могут быть рассмотрены в качестве гепатопротекторов при необходимости защиты тканей печени от гепатотоксических эффектов амиодарона.

**Ключевые слова:** *HepaRG*, амиодарон, лекарственная гепатотоксичность, витамин E, N-ацетилцистеин, S-аденозилметионин

✉ Для корреспонденции: Владимир Николаевич Бабаков  
ст. Капитолово, к. 93, п. Кузьмоловский, Ленинградская область, 188663; babakov@gpech.ru

**Статья получена:** 20.07.2021 **Статья принята к печати:** 11.08.2021 **Опубликована онлайн:** 23.09.2021

**DOI:** 10.47183/mes.2021.030

## ASSESSING HEPATOPROTECTIVE EFFECTS OF ANTIOXIDANTS ON AMIODARONE-INDUCED CYTOTOXICITY IN HUMAN HEPATOMA *HEPARG* CELL LINE

Filimonova KS, Rogovskaya NYu, Beltyukov PP, Babakov VN ✉

Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of the Federal Medical Biological Agency, Leningrad Region, Russia

Effective therapy of amiodarone-induced hepatotoxicity requires studying the mechanisms of the toxic effects of amiodarone on hepatocytes and assessing the potential impact of hepatoprotective agents. The study was aimed to assess hepatoprotective effects of antioxidants on the amiodarone-induced hepatotoxicity with the use of immortalized human hepatoma cells of the *HepaRG* cell line. Cell viability was evaluated upon exposure to amiodarone and in the mixture with vitamin E, N-acetylcysteine and S-adenosylmethionine by impedance measurement; the levels of some hepatotoxicity biomarkers were defined using the Luminex xMAP technology. As a result of the research, the dose-dependent toxic effects of amiodarone were established. The  $IC_{50}$  value of amiodarone in the *HepaRG* cell line was 3.5  $\mu$ M. It is shown that cytotoxic effects decrease and the  $IC_{50}$  value increases in the presence of vitamin E, N-acetylcysteine and S-adenosylmethionine. Amiodarone reduces the activity of cell cycle regulators: AKT, JNK kinases, and p53 protein. Exposure to amiodarone results in reduced intracellular ATP levels and the release of intracellular enzymes (malate dehydrogenase 1, glutathione S-transferase, sorbitol dehydrogenase, 5'-nucleotidase) into conditioned medium, indicating the necrotic cell death. Thus, vitamin E, S-adenosylmethionine and N-acetylcysteine reduce amiodarone cytotoxicity in the model of amiodarone-induced damage to hepatocytes and can be considered as hepatoprotective agents in case of the need to protect liver against the hepatotoxic effects of amiodarone.

**Keywords:** *HepaRG*, amiodarone, drug hepatotoxicity, vitamin E, N-acetylcysteine, S-adenosylmethionine

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladimir N. Babakov  
Kapitolovo, 93, p/o Kuzmolovsky, Leningradskaja oblast, 188663; babakov@gpech.ru

**Received:** 20.07.2021 **Accepted:** 11.08.2021 **Published online:** 23.09.2021

**DOI:** 10.47183/mes.2021.030

Симптомы лекарственно-индуцированного повреждения печени (*drug-induced liver injury*) составляют около 10% побочных реакций, вызываемых лекарственными средствами, и являются основной причиной прекращения клинических испытаний или изъятия уже используемых в терапии лекарственных препаратов. Гепатотоксическими эффектами обладают препараты различных фармакологических групп: антибиотики (амоксциллин-клавуланат), анальгетики (ацетаминофен), противоэпилептические средства (вальпроат) и др. [1].

Снижение дозировки лекарственного препарата или его полная отмена позволяют предотвратить необратимые поражения печени. Однако в ряде случаев необходимо продолжить применение лекарства, обладающего гепатотоксическим действием на фоне применения

гепатопротекторов. Эффективность применяемых в клинической практике гепатопротекторов обусловлена наличием в их составе компонентов с различными механизмами действия. Потребность в разработке новых фармацевтических препаратов для защиты печени от возможных токсических эффектов сохраняется, поскольку далеко не всегда гепатопротекторы могут минимизировать вредные эффекты ксенобиотика, а применение специфических антидотов ограничено использованием N-ацетилцистеина при передозировке парацетамола [2]. Разработка эффективных методов терапии лекарственных поражений печени требует исследования механизмов развития токсических поражений клеток печени и выбора потенциальных гепатопротекторов и специфичных антидотов.

Для антиаритмического средства амиодарона характерны частые побочные эффекты, проявляющиеся симптомами лекарственного поражения печени. Благодаря высокой эффективности и широкому спектру действия амиодарон является одним из наиболее часто назначаемых антиаритмических средств [3].

В 10–15% случаев прием амиодарона сопровождается появлением побочных эффектов в виде повышения уровня сывороточных трансаминаз, фосфолипидоза и стеатогепатита. Длительное применение амиодарона может приводить к развитию острой печеночной недостаточности, иногда приводящей к летальным исходам [4].

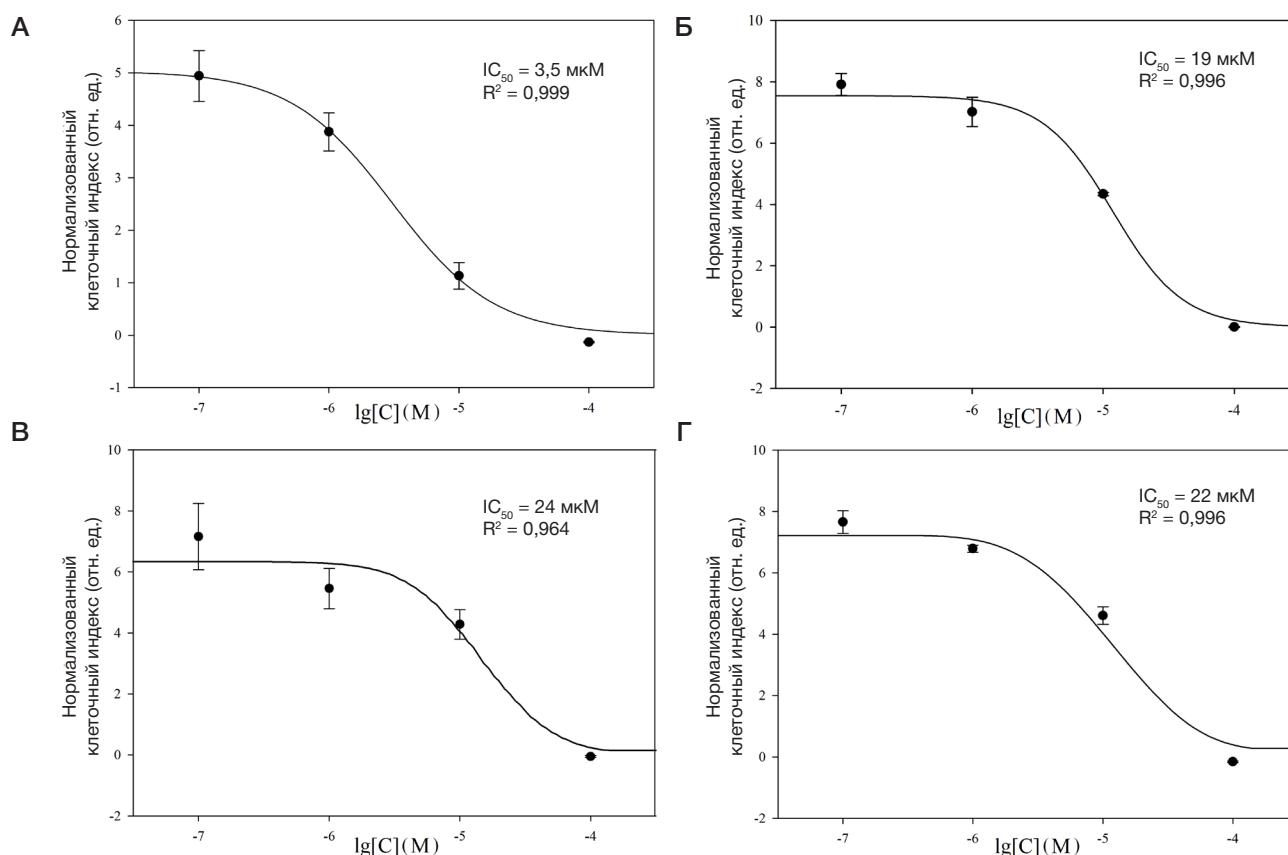
Развитие поражения печени в результате приема амиодарона обусловлено его цитотоксическими эффектами. Известно, что амиодарон и его метаболиты (в основном моно- и ди-N-деэтиламиодарон) подавляют работу электронтранспортной цепи и разобщают окислительное фосфорилирование, что должно сопровождаться накоплением активных форм кислорода и развитием окислительного стресса [5, 6]. Об окислительном стрессе свидетельствует увеличение количества маркеров пероксидного окисления липидов после воздействия амиодарона [7]. Кроме того, амиодарон обладает способностью ингибировать фосфолипазу A и  $\beta$ -окисление длинноцепочечных жирных кислот, что способствует накоплению липидов в клетках печени [8, 9]. Одновременно снижаются уровни АТФ внутри клетки и ионов кальция, развиваются повреждения эндоплазматического ретикула [10].

Ранее на клеточной линии фибробластов мыши L929 было показано, что применение антиоксидантов аскорбиновой

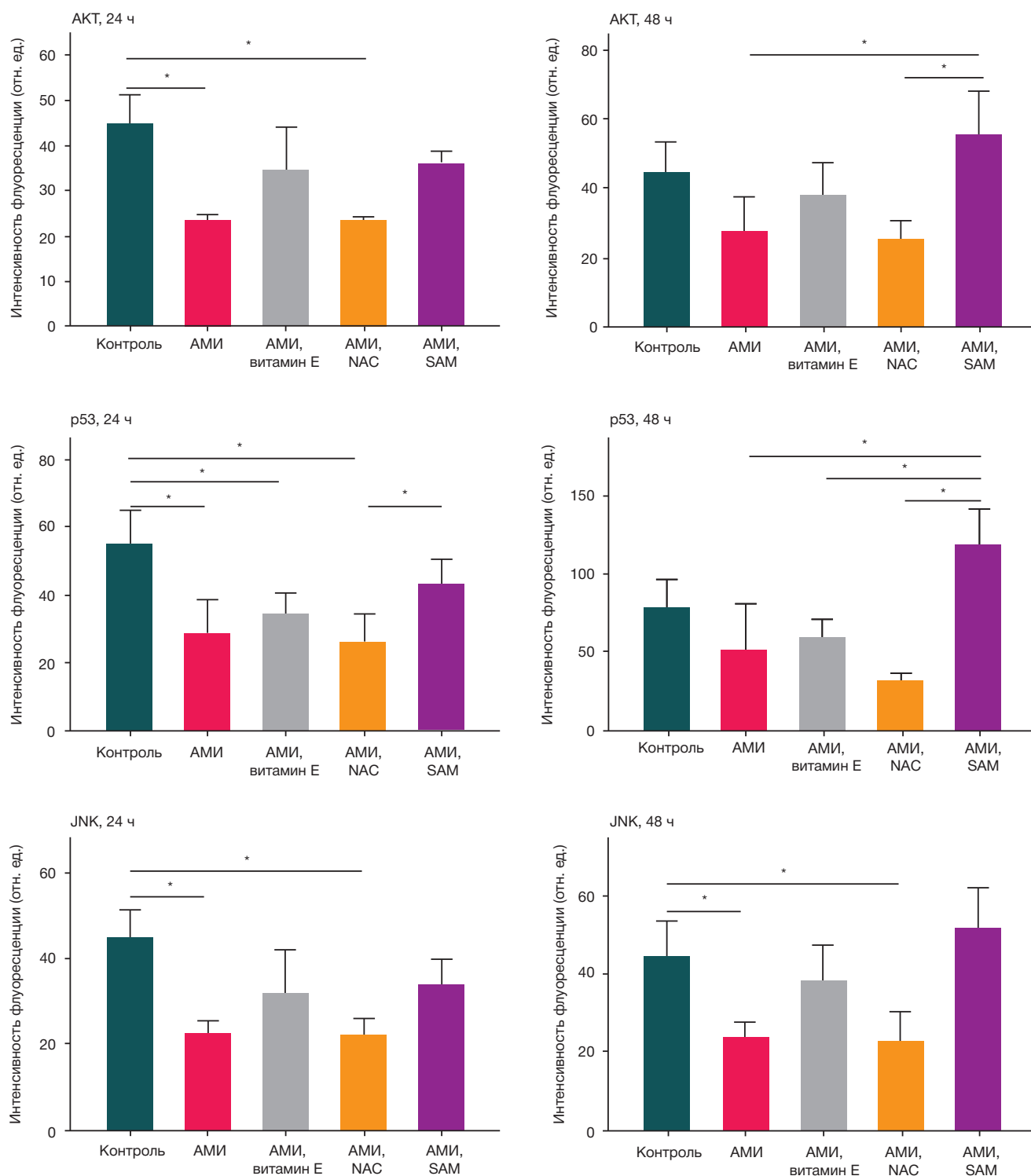
кислоты и N-ацетилцистеина, способствует снижению цитотоксичности амиодарона [11]. Нами исследована способность неспецифических гепатопротекторных соединений с антиоксидантными свойствами (витамина Е и серосодержащих N-ацетилцистеина и S-аденозилметионина) оказывать влияние на цитотоксические свойства амиодарона.

Витамин Е давно известен как цитопротекторный агент и рекомендован к применению в терапии воспалительных и дегенеративных заболеваний печени, в частности при неалкогольной жировой болезни печени и стеатогепатите [12]. N-ацетил-L-цистеин (NAC) является эффективным антидотом при передозировке парацетамола. Также его предлагают использовать в терапии поражения печени другими лекарствами [13]. S-аденозил-L-метионин (SAM) — главный донор метильных групп в организме, а также играет важную роль в метаболизме ксенобиотиков в печени. В связи с этим его тоже рассматривают в качестве гепатопротектора при различных заболеваниях печени. Однако в клинической практике гепатопротекторное действие SAM не подтверждено рандомизированными плацебо-контролируемыми исследованиями [14].

Для исследований цитотоксических эффектов в отношении гепатоцитов *in vitro* применяют клеточные тест-системы на основе первичных культур гепатоцитов человека или immortalized клеточных линий. В своем исследовании мы использовали клеточную линию гепатомы человека *HepaRG*. Клетки этой линии обеспечивают экспрессию ферментов биотрансформации (в частности, цитохромов P450) и транспортных белков на уровнях, близких к первичным гепатоцитам человека, что позволяет считать данную линию



**Рис. 1.** Зависимость клеточного индекса клеток линии HepaRG от логарифма концентрации амиодарона (клеточный индекс нормализован по времени добавления среды, содержащей исследуемое вещество). **А.** Изменение клеточного индекса при действии амиодарона в концентрациях 0,1, 1, 10 и 100 мкМ. **Б.** Изменение клеточного индекса при действии серии разведений амиодарона в присутствии 100 мкМ витамина Е. **В.** Изменение клеточного индекса при действии серии разведений амиодарона в присутствии 100 мкМ N-ацетилцистеина. **Г.** Изменение клеточного индекса при действии серии разведений амиодарона в присутствии 100 мкМ S-аденозилметионина



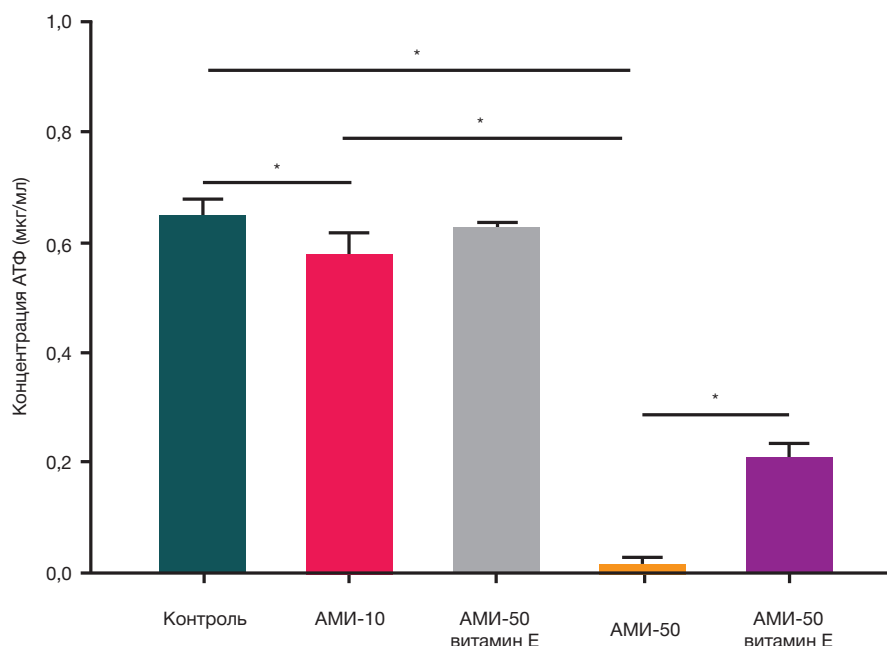
**Рис. 2.** Интенсивность флуоресценции фосфорилированных АКТ киназы (Ser473), белка p53 (Ser46), JNK киназы (Thr183/Tyr185) в лизатах клеток линии *HepaRG* после воздействия амиодарона в концентрации 10 мкМ (АМИ) и на фоне действия 100 мкМ витамина Е, 100 мкМ N-ацетилцистеина (NAC) и 100 мкМ S-аденозилметионина (SAM) при инкубации 24 и 48 ч. \* —  $p < 0,05$

оптимальной для моделирования гепатотоксических эффектов *in vitro* [15, 16]. В исследованиях оценки потенциальной гепатотоксичности лекарственных средств с использованием многопараметрического анализа клеточная линия *HepaRG* показала наибольшую чувствительность [17, 18].

Таким образом, целью работы было исследование цитопротекторного действия антиоксидантов в модели амиодарон-индуцированной цитотоксичности клеток гепатомы человека линии *HepaRG*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клетки гепатомы человека линии *HepaRG* (Gibco; США) культивировали в полной питательной среде, которая состояла из среды Williams'E с 10% фетальной бычьей сыворотки, 5 мкг/мл инсулина, 10 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 50 мкМ гидрокортизона гемисукцината и 2 мМ L-глутамин в атмосфере CO<sub>2</sub>-инкубатора (5% CO<sub>2</sub>) при температуре 37 °C и насыщающей влажности.



**Рис. 3.** Концентрация АТФ в лизатах клеток линии *HepaRG* после 24 ч воздействия амиодарона в концентрациях 10 мкМ (АМИ-10) и 50 мкМ (АМИ-50) и на фоне действия витамина Е. \* —  $p < 0,05$

Для определения цитотоксичности амиодарона использовали оборудование xCELLigence RTCA (ACEA; США). С помощью программного обеспечения RTCA Software 2.0 (ACEA; США) на основании анализа изменений импеданса во времени рассчитывали клеточный индекс, характеризующий жизнеспособность клеток. До начала эксперимента измеряли значение импеданса для питательной среды в отсутствие клеток, затем в каждую лунку 96-луночного планшета вносили по 10 тыс. клеток линии *HepaRG* и культивировали в течение суток. После этого в среду добавляли амиодарон (в диапазоне концентраций от 0,1 до 100 мкМ) и исследуемые антиоксиданты (витамин Е, NAC и SAM в концентрации 100 мкМ). В качестве контроля использовали клетки в полной питательной среде.

Оценку молекулярных маркеров повреждения клеток проводили с использованием иммунофлуоресцентного анализатора Bio-Plex 200 (Bio-Rad; США). Маркеры апоптоза оценивали в клеточных лизатах, а маркеры повреждения гепатоцитов в кондиционных средах. Для получения кондиционных сред и лизатов клетки гепатомы человека линии *HepaRG* вносили в 24-луночный планшет в количестве 400 тыс. клеток на лунку и культивировали в полной питательной среде. На следующий день после пассажа осуществляли замену среды на среду, содержащую амиодарон в концентрации 10 мкМ, исследуемые антиоксиданты в концентрации 100 мкМ. Инкубировали образцы в течение 24 и 48 ч. Каждую экспериментальную концентрацию изучаемых соединений вносили не менее чем в трех повторах. Для мультиплексного анализа использовали следующие наборы: MILLIPLEX MAP Human Liver Injury Magnetic Bead Panel (Cat.HLINJMAG-75K; Merck, США), MILLIPLEX MAP Human Early Apoptosis Magnetic Bead 6-Plex Kit (Cat. 48-669MAG; Merck, США) и панель Bio-PlexPro™ Human Cytokine 27-plex (Cat.M500KCAF0Y; Bio-Rad, США).

Определение АТФ в лизатах клеток линии *HepaRG* выполняли с использованием набора ATP Bioluminescent Assay Kit (Cat. FLASC; Sigma-Aldrich, США). Интенсивность люминесценции измеряли на планшетном флуориметре

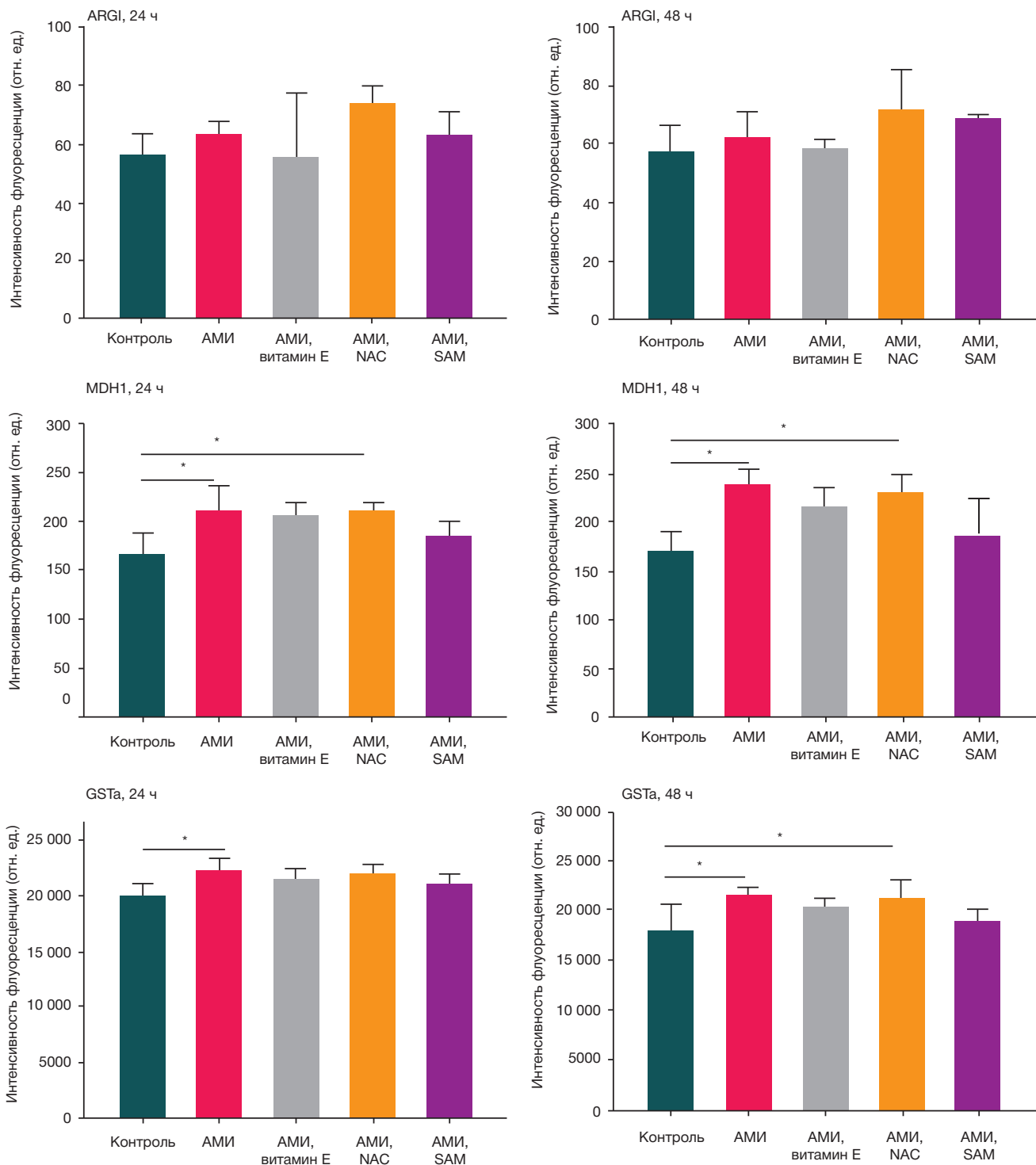
FLx800 (BioTek; США). Первичную обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения Gen5 1.10 (BioTek; США).

Для статистического анализа и построения графиков использовали программное обеспечение SigmaPlot 12.5 (SystatSoftware Inc; США). Нормальность выборки оценивали по критерию Шапиро-Уилка. Для сравнения значимости различий средних использовали однофакторный дисперсионный анализ в случае нормального распределения и тест Краскела-Уоллиса в случае распределения, отличающегося от нормального. Статистическую значимость различий принимали при  $p < 0,05$ . Результаты выражали как среднее  $\pm$  стандартное отклонение.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рассчитанная в результате мониторинга цитотоксичности  $IC_{50}$  амиодарона для клеток гепатомы человека линии *HepaRG* составила 3,5 мкМ (рис. 1). Использование гепатопротекторов с антиоксидантными свойствами привело к статистически значимому повышению клеточного индекса по сравнению с амиодароном. Так, значение  $IC_{50}$ , определенное для амиодарона в присутствии витамина Е, оказалось равным 19 мкМ, для N-ацетилцистеина — 24 мкМ, для S-аденозилметионина — 22 мкМ.

Для оценки механизмов цитотоксичности амиодарона проанализировали содержание некоторых киназ, регулирующих клеточный цикл в клеточных лизатах, а также содержание внутриклеточных ферментов в кондиционных средах. Воздействие амиодарона (10 мкМ) на клетки в течение 24 и 48 ч приводило к снижению уровней фосфорилированных AKT и JNK киназ, а также белка p53 (рис. 2). Иными словами, амиодарон вызывает снижение активности факторов, регулирующих клеточный цикл, и способствует запуску клеточной гибели, чем можно объяснить его высокую цитотоксичность. В лизатах клеток после обработки амиодароном (10 мкМ) в присутствии витамина Е или S-аденозилметионина содержание активных форм AKT и JNK киназ не отличалось от контроля.



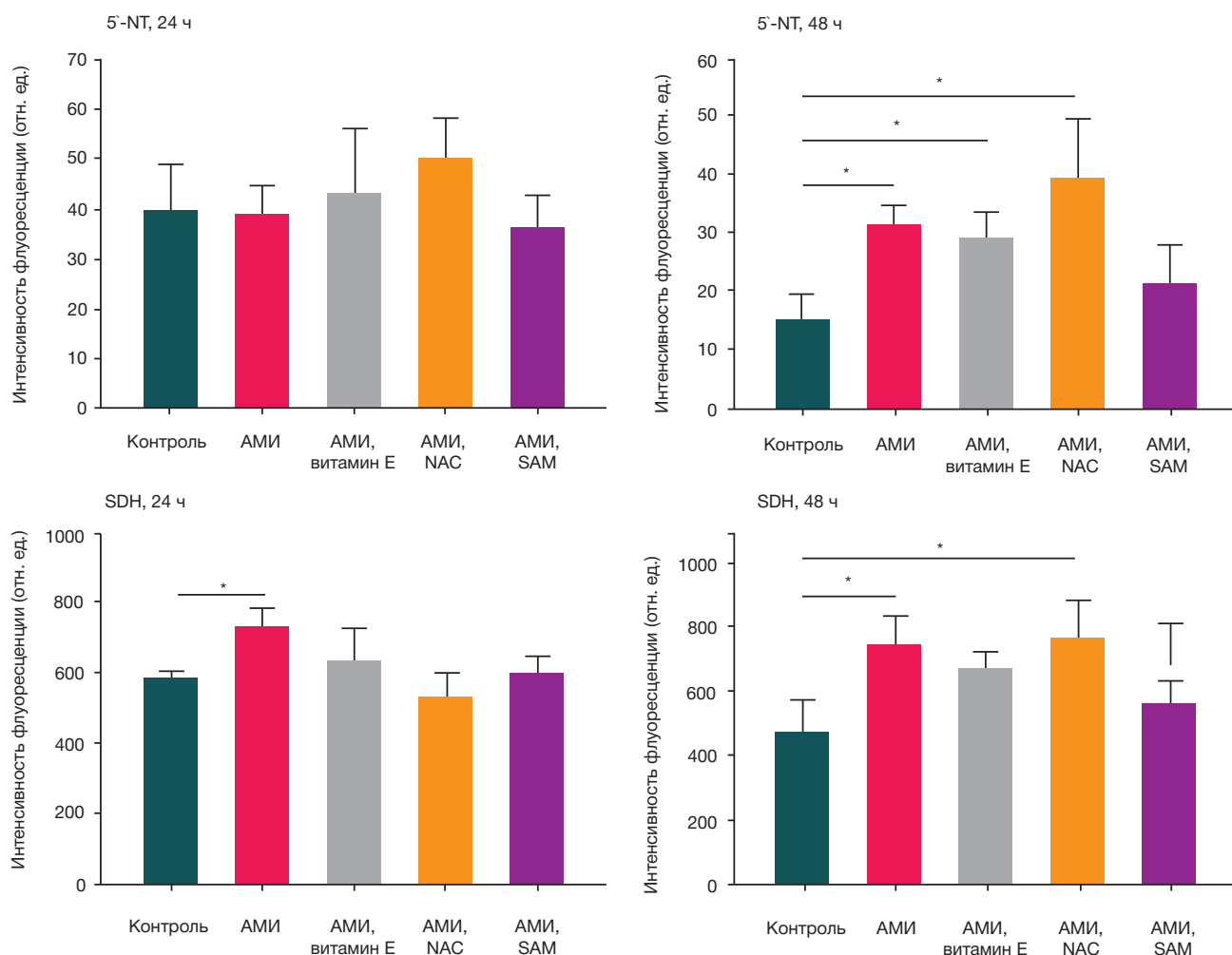
**Рис. 4.** Интенсивность флуоресценции аргиназы 1 (ARG1), малатдегидрогеназы 1 (MDH1), глутатион-S-трансферазы (GSTα) в кондиционной среде клеток линии *НераRG* после воздействия амиодарона в концентрации 10 мкМ (АМИ) и на фоне действия 100 мкМ витамина Е, 100 мкМ N-ацетилцистеина (NAC) и 100 мкМ S-аденозилметионина (SAM) при инкубации 24 и 48 ч. \* —  $p < 0,05$

В результате исследования установлено, что амиодарон в концентрациях 10 и 50 мкМ приводит к существенному снижению уровня АТФ в лизатах клеток *НераRG*, при этом снижение АТФ было дозозависимым (рис. 3). Витамин Е обеспечивал статистически значимое увеличение содержания внутриклеточного АТФ при обработке клеток амиодароном.

При оценке внеклеточных уровней ферментов было показано, что после обработки клеток амиодароном не происходит статистически значимого повышения уровня аргиназы 1 (рис. 4). Через 24 ч инкубации в присутствии

амиодарона наблюдали повышение содержания малатдегидрогеназы 1, глутатион-S-трансферазы и сорбитолдегидрогеназы в кондиционной среде (рис. 4, 5). Содержание 5'-нуклеотидазы статистически значимо повышалось через 48 ч. В присутствии витамина Е и S-аденозилметионина отмечено снижение содержания внутриклеточных ферментов MDH1, GSTα и SDH в кондиционной среде.

Анализ содержания цитокинов после инкубации клеток линии *НераRG* в среде с амиодароном (10 мкМ) показал, что в результате действия амиодарона происходит



**Рис. 5.** Интенсивность флуоресценции нуклеотидазы (5'-NT), сорбитолдегидрогеназы (SDH) в кондиционной среде клеток линии *HepaRG* после воздействия амиодарона в концентрации 10 мкМ (АМИ) и на фоне действия 100 мкМ витамина Е, 100 мкМ N-ацетилцистеина (NAC) и 100 мкМ S-аденозилметионина (SAM) при инкубации 24 и 48 ч. \* —  $p < 0,05$

статистически значимое и наиболее выраженное увеличение содержания провоспалительных факторов IL1 $\beta$ , IL6, IL8, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  (рис. 6). Одновременно отмечено и увеличение содержания противовоспалительного цитокина IL10. Эффект антиоксидантов проявился в снижении содержания анализируемых цитокинов в кондиционных средах.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сообщения о побочных эффектах применения амиодарона появились в конце XX в., после начала его широкого использования в качестве антиаритмического средства [19]. По своей структуре амиодарон относится к катионным амфифильным веществам, кроме того, он имеет длительный период полувыведения в завершающей фазе элиминации, который может достигать 150 дней [8]. Амиодарон и его метаболиты способны накапливаться в легких, скелетных мышцах, жировой ткани, печени и оказывать токсическое действие. При этом степень повреждения печени существенно варьирует от незначительного повышения уровня трансаминаз в сыворотке крови до острой печеночной недостаточности [4].

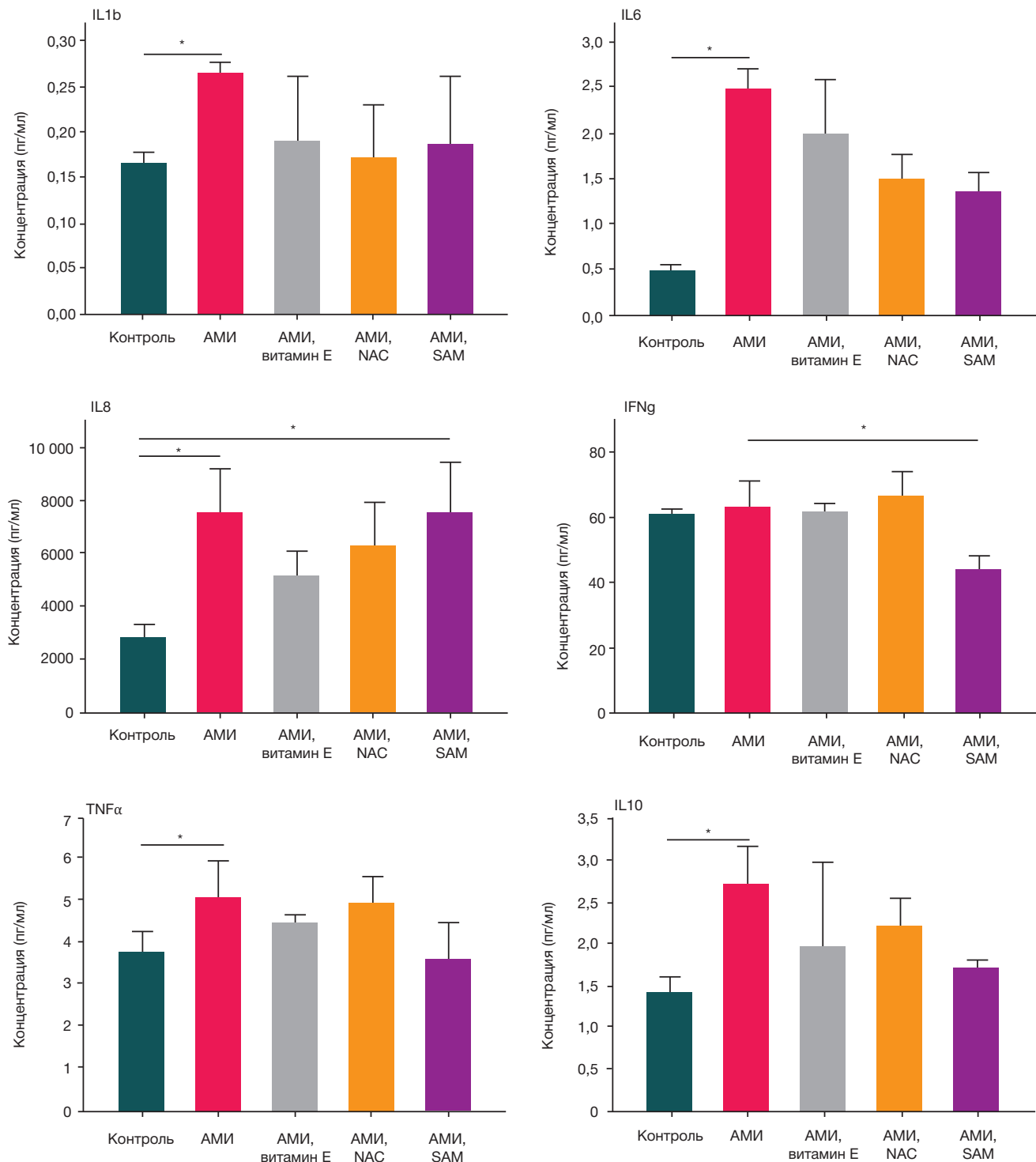
Длительный прием амиодарона *per os* приводит к накоплению жирных кислот и полярных липидов в гепатоцитах в результате угнетения фосфолипазы А и ферментов  $\beta$ -окисления жирных кислот. Накопление амиодарона отмечено в лизосомных липидных бислоях, что препятствует нормальной внутриклеточной деградации

мембранных фосфолипидов и приводит к фосфолипидозу [8, 20]. На клеточной линии гепатомы человека *HepaRG* было показано накопление триглицеридов и липидных капель после 14-дневной инкубации с амиодароном в концентрации 20 мкМ [21].

При этом механизмы развития гепатотоксических эффектов амиодарона до сих пор малоизучены.

Мы определили дозозависимое цитотоксическое действие амиодарона на клетки линии *HepaRG* в течение трех суток и рассчитали  $IC_{50}$ , которая составила 3,5 мкМ. Ранее цитотоксичность амиодарона была показана на клетках линии *HepG2*, где  $IC_{50}$  составила 105 мкМ [7]. При этом клетки линии *HepaRG* демонстрируют более высокий уровень экспрессии ферментов системы цитохромов P450 по сравнению с линией *HepG2*. А метаболиты амиодарона (моно- и ди-N-деэтиламиодарон), образующиеся после трансформации цитохромами, могут проявлять более высокую гепатотоксичность по сравнению с амиодароном [18].

Увеличение внутриклеточного содержания активных (фосфорилированных) форм киназ, регулирующих клеточный цикл, указывает на тип клеточной гибели и пути ее активации [22]. В нашем исследовании воздействие амиодарона привело к снижению уровня активных форм АКТ и JNK киназ и белка p53. Это указывает на то, что основным механизмом, запускающим клеточную гибель при воздействии амиодарона, является повреждение



**Рис. 6.** Концентрация цитокинов IL1 $\beta$ , IL6, IL8, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  и IL10 в кондиционной среде клеток линии *HepaRG* при инкубации 48 ч и воздействии амиодарона в концентрации 10 мкМ (АМИ) и на фоне действия 100 мкМ витамина E, 100 мкМ N-ацетилцистеина (NAC), 100 мкМ S-аденозилметионина (SAM). \* —  $p < 0,05$

митохондрий. Уровень активной инициаторной каспазы-8 также снижается после обработки клеточной культуры амиодароном, что позволяет говорить о том, что гибель клетки идет по пути некроза, а не апоптоза.

Известно, что количество внутриклеточного АТФ является одним из показателей жизнеспособности клеток [23]. Истощение внутриклеточных запасов АТФ относят к одной из характерных черт некроза [24]. Выявленное снижение содержания АТФ в клетках и выход внутриклеточных ферментов в кондиционную среду также свидетельствуют о клеточной гибели по типу некроза.

Установлено также, что воздействие амиодарона приводит к увеличению содержания в кондиционной среде провоспалительных цитокинов IL1 $\beta$ , IL6, IL8, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  и противовоспалительного IL10.

Вывождаемые при повреждении клеток внутриклеточные ферменты, цитокины и молекулярные паттерны DAMP, ассоциированные с повреждениями (danger associated molecular patterns), вызывают активацию иммунных клеток врожденного иммунитета [25]. Активированные клетки Купфера, нейтрофилы и другие резидентные клетки печени выделяют различные цитокины, что может приводить

к запуску апоптоза через рецепторы смерти и развитию воспалительного ответа [22]. Таким образом, воздействие амиодарона может вызывать как некроз, так и апоптоз, что согласуется с ранее опубликованными данными о цитостатических эффектах амиодарона [26, 27].

Таким образом, на модели гепатомы человека линии *HepaRG* показано, что гибель клеток, вызванная воздействием амиодарона в течение 48 ч, происходит в результате некроза.

Предполагается, что одной из основных причин цитотоксичности амиодарона является окислительный стресс [7]. Ранее на различных клеточных моделях (первичные гепатоциты крыс, клетки линии *HepG2*, *L929*) было продемонстрировано, что антиоксиданты защищают клетки от цитотоксического действия амиодарона [7, 11, 28]. Мы исследовали влияние соединений с антиоксидантными свойствами на амиодарон-индуцированную цитотоксичность в клетках гепатомы человека линии *HepaRG*. Витамин E, S-аденозилметионин и N-ацетилцистеин снижают цитотоксичность амиодарона и приводят к увеличению величины  $IC_{50}$ . Витамин E и S-аденозилметионин обеспечивали снижение секреции ключевых провоспалительных цитокинов IL1 $\beta$  и IL6, индуцированное амиодароном.

Вышеперечисленные результаты подтверждают, что амиодарон может индуцировать в клетке развитие окислительного стресса. Исследованные нами витамин E, S-аденозилметионин и N-ацетилцистеин являются зарегистрированными лекарственными средствами и могут быть рекомендованы в качестве гепатопротекторов при терапии амиодароном.

## ВЫВОДЫ

Амиодарон оказывает на клетки гепатомы человека линии *HepaRG* цитотоксическое действие ( $IC_{50}$  — 3,5 мкМ). Клеточная гибель развивается на фоне снижения активных форм факторов, регулирующих клеточный цикл, таких как киназы AKT, JNK и белок p53. Действие амиодарона приводит к цитолизу, сопровождающемуся повышением содержания внутриклеточных ферментов (MDH1, GST $\alpha$ , SDH и 5'-NT) в кондиционной среде. Исследованные соединения с антиоксидантными свойствами витамин E, N ацетилцистеин и S-аденозилметионин снижают цитотоксичность амиодарона в клетках гепатомы человека линии *HepaRG* и могут быть рассмотрены как потенциальные гепатопротекторы при лечении амиодароном.

## Литература

1. Ивашкин В. Т., Барановский А. Ю., Райхельсон К. Л. и др. Лекарственные поражения печени (клинические рекомендации для врачей). Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2019; 29 (1): 101–31.
2. Stine JG, Lewis JH. Current and future directions in the treatment and prevention of drug-induced liver injury: a systematic review. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016; 10 (4): 517–36.
3. Mujović N, Dobrev D, Marinković M, et al. The role of amiodarone in contemporary management of complex cardiac arrhythmias. *Pharmacol Res*. 2020; 151: 104521.
4. Hashmi A, Keswani NR, Kim S, et al. Hepatic dysfunction in patients receiving intravenous amiodarone. *South Med J*. 2016; 109 (2): 83–6.
5. Waldhauser KM, Török M, Ha H-R, et al. Hepatocellular toxicity and pharmacological effect of amiodarone and amiodarone derivatives. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006; 319 (3): 1413–23.
6. Serviddio G, Bellanti F, Giudetti AM, et al. Mitochondrial oxidative stress and respiratory chain dysfunction account for liver toxicity during amiodarone but not dronedarone administration. *Free Radic Biol Med*. 2011; 51 (12): 2234–42.
7. Golli-Bennour EE, Bouslimi A, Zouaoui O, et al. Cytotoxicity effects of amiodarone on cultured cells. *Exp Toxicol Pathol*. 2012; 64 (5): 425–30.
8. Schumacher JD, Guo GL. Mechanistic review of drug-induced steatohepatitis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015; 289 (1): 40–7.
9. Grünig D, Duthaler U, Krähenbühl S. Effect of Toxicants on Fatty Acid Metabolism in HepG2 Cells. *Front Pharmacol*. 2018; 9: 257.
10. Erez N, Hubel E, Avraham R, et al. Hepatic amiodarone lipotoxicity is ameliorated by genetic and pharmacological inhibition of endoplasmic reticulum stress. *Toxicol Sci*. 2017; 159 (2): 402–12.
11. Durukan AB, Erdem B, Durukan E, et al. May toxicity of amiodarone be prevented by antioxidants? A cell-culture study. *J Cardiothorac Surg*. 2012; 7 (1): 61.
12. Galli F, Azzi A, Birringer M, et al. Vitamin E: Emerging aspects and new directions. *Free Radic Biol Med*. 2017; 102: 16–36.
13. Chughlay MF, Kramer N, Spearman CW, et al. N-acetylcysteine for non-paracetamol drug-induced liver injury: a systematic review. *Br J Clin Pharmacol*. 2016; 81: 1021–9.
14. Anstee QM, Day CP. S-adenosylmethionine (SAME) therapy in liver disease: A review of current evidence and clinical utility. *J Hepatol*. 2012; 57 (5): 1097–109.
15. Aninat C, Piton A, Glaise D, et al. Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos*. 2006; 34 (1): 75–83.
16. Yokoyama Y, Sasaki Y, Terasaki N, et al. Comparison of drug metabolism and its related hepatotoxic effects in HepaRG, cryopreserved human hepatocytes, and HepG2 cell cultures. *Biol Pharm Bull*. 2018; 41 (5): 722–32.
17. Tomida T, Okamura H, Yokoi T, et al. A modified multiparametric assay using HepaRG cells for predicting the degree of drug-induced liver injury risk. *J Appl Toxicol*. 2017; 37 (3): 382–90.
18. Wu Y, Geng X, Wang J, et al. The HepaRG cell line, a superior in vitro model to L-02, HepG2 and hiHeps cell lines for assessing drug-induced liver injury. *Cell Biol Toxicol*. 2016; 32 (1): 37–59.
19. McGovern B, Garan H, Ruskin JN. Serious adverse effects of amiodarones. *Clin Cardiol*. 1984; 7 (3): 131–7.
20. Pessayre D, Fromenty B, Berson A, et al. Central role of mitochondria in drug-induced liver injury. *Drug Metab Rev*. 2012; 44 (1): 34–87.
21. Anthérieu S, Rogue A, Fromenty B, et al. Induction of vesicular steatosis by amiodarone and tetracycline is associated with up-regulation of lipogenic genes in heparg cells. *Hepatology*. 2011; 53 (6): 1895–905.
22. Ye H, Nelson LJ, Gómez del Moral M, et al. Dissecting the molecular pathophysiology of drug-induced liver injury. *World J Gastroenterol*. 2018; 24 (13): 1373–85.
23. Yuan L, Kaplowitz N. Mechanisms of drug induced liver injury. *Clin Liver Dis*. 2013; 17 (4): 507–18.
24. Iorga A., Dara L. Cell death in drug-induced liver injury. *Adv Pharmacol*. 2019; 85: 31–74.
25. Ali SE, Waddington JC, Park BK, et al. Definition of the Chemical and Immunological Signals Involved in Drug-Induced Liver Injury. *Chem Res Toxicol*. 2020; 33 (1): 61–76.
26. Bognar Z, Fekete K, Antus C, et al. Desethylamiodarone — A metabolite of amiodarone — Induces apoptosis on T24 human bladder cancer cells via multiple pathways. *PLoS One*. 2017; 12 (12): e0189470.
27. Steinberg E, Fluksman A, Zemmour C, et al. Low dose amiodarone reduces tumor growth and angiogenesis. *Sci Rep*. 2020; 10 (1): 18034.
28. Abdulkhaleq F, Alhussainy T, Badr M, et al. Antioxidative stress effects of vitamins C, E, and B12, and their combination can protect the liver against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Drug Des Devel Ther*. 2018; 12: 3525–33.

## References

- Ivashkin VT, Baranovsky AY, Raikhelson KL, i dr. Lekarsvennye porazheniya pecheni (klinicheskie rekomendacii dlja vrachej). Rossijskij zhurnal gastrojenterologii, gepatologii, koloproktologii. 2019; 29 (1): 101–31. Russian.
- Stine JG, Lewis JH. Current and future directions in the treatment and prevention of drug-induced liver injury: a systematic review. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016; 10 (4): 517–36.
- Mujović N, Dobrev D, Marinković M, et al. The role of amiodarone in contemporary management of complex cardiac arrhythmias. *Pharmacol Res*. 2020; 151: 104521.
- Hashmi A, Keswani NR, Kim S, et al. Hepatic dysfunction in patients receiving intravenous amiodarone. *South Med J*. 2016; 109 (2): 83–6.
- Waldhauser KM, Török M, Ha H-R, et al. Hepatocellular toxicity and pharmacological effect of amiodarone and amiodarone derivatives. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006; 319 (3): 1413–23.
- Serviddio G, Bellanti F, Giudetti AM, et al. Mitochondrial oxidative stress and respiratory chain dysfunction account for liver toxicity during amiodarone but not dronedarone administration. *Free Radic Biol Med*. 2011; 51 (12): 2234–42.
- Golli-Bennour EE, Bouslimi A, Zouaoui O, et al. Cytotoxicity effects of amiodarone on cultured cells. *Exp Toxicol Pathol*. 2012; 64 (5): 425–30.
- Schumacher JD, Guo GL. Mechanistic review of drug-induced steatohepatitis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015; 289 (1): 40–7.
- Grünig D, Duthaler U, Krähenbühl S. Effect of Toxicants on Fatty Acid Metabolism in HepG2 Cells. *Front Pharmacol*. 2018; 9: 257.
- Erez N, Hubel E, Avraham R, et al. Hepatic amiodarone lipotoxicity is ameliorated by genetic and pharmacological inhibition of endoplasmic reticulum stress. *Toxicol Sci*. 2017; 159 (2): 402–12.
- Durukan AB, Erdem B, Durukan E, et al. May toxicity of amiodarone be prevented by antioxidants? A cell-culture study. *J Cardiothorac Surg*. 2012; 7 (1): 61.
- Galli F, Azzi A, Birringer M, et al. Vitamin E: Emerging aspects and new directions. *Free Radic Biol Med*. 2017; 102: 16–36.
- Chughlay MF, Kramer N, Spearman CW, et al. N-acetylcysteine for non-paracetamol drug-induced liver injury: a systematic review. *Br J Clin Pharmacol*. 2016; 81: 1021–9.
- Anstee QM, Day CP. S-adenosylmethionine (SAME) therapy in liver disease: A review of current evidence and clinical utility. *J Hepatol*. 2012; 57 (5): 1097–109.
- Aninat C, Piton A, Glaise D, et al. Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos*. 2006; 34 (1): 75–83.
- Yokoyama Y, Sasaki Y, Terasaki N, et al. Comparison of drug metabolism and its related hepatotoxic effects in HepaRG, cryopreserved human hepatocytes, and HepG2 cell cultures. *Biol Pharm Bull*. 2018; 41 (5): 722–32.
- Tomida T, Okamura H, Yokoi T, et al. A modified multiparametric assay using HepaRG cells for predicting the degree of drug-induced liver injury risk. *J Appl Toxicol*. 2017; 37 (3): 382–90.
- Wu Y, Geng X, Wang J, et al. The HepaRG cell line, a superior in vitro model to L-02, HepG2 and hiHeps cell lines for assessing drug-induced liver injury. *Cell Biol Toxicol*. 2016; 32 (1): 37–59.
- McGovern B, Garan H, Ruskin JN. Serious adverse effects of amiodarones. *Clin Cardiol*. 1984; 7 (3): 131–7.
- Pessayre D, Fromenty B, Berson A, et al. Central role of mitochondria in drug-induced liver injury. *Drug Metab Rev*. 2012; 44 (1): 34–87.
- Anthérieu S, Rogue A, Fromenty B, et al. Induction of vesicular steatosis by amiodarone and tetracycline is associated with up-regulation of lipogenic genes in heparg cells. *Hepatology*. 2011; 53 (6): 1895–905.
- Ye H, Nelson LJ, Gómez del Moral M, et al. Dissecting the molecular pathophysiology of drug-induced liver injury. *World J Gastroenterol*. 2018; 24 (13): 1373–85.
- Yuan L, Kaplowitz N. Mechanisms of drug induced liver injury. *Clin Liver Dis*. 2013; 17 (4): 507–18.
- Iorga A., Dara L. Cell death in drug-induced liver injury. *Adv Pharmacol*. 2019; 85: 31–74.
- Ali SE, Waddington JC, Park BK, et al. Definition of the Chemical and Immunological Signals Involved in Drug-Induced Liver Injury. *Chem Res Toxicol*. 2020; 33 (1): 61–76.
- Bognar Z, Fekete K, Antus C, et al. Desethylamiodarone — A metabolite of amiodarone — Induces apoptosis on T24 human bladder cancer cells via multiple pathways. *PLoS One*. 2017; 12 (12): e0189470.
- Steinberg E, Fluksman A, Zemmour C, et al. Low dose amiodarone reduces tumor growth and angiogenesis. *Sci Rep*. 2020; 10 (1): 18034.
- Abdulkhaleq F, Alhussainy T, Badr M, et al. Antioxidative stress effects of vitamins C, E, and B12, and their combination can protect the liver against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Drug Des Devel Ther*. 2018; 12: 3525–33.

## ИССЛЕДОВАНИЕ СИЛЫ ДЫХАТЕЛЬНЫХ МЫШЦ У БОЛЬНЫХ, ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19

О. И. Савушкина<sup>1,2</sup> ✉, М. М. Малашенко<sup>2</sup>, А. В. Черняк<sup>1</sup>, Е. В. Крюков<sup>2</sup>, Е. А. Синицын<sup>1</sup>, К. А. Зыков<sup>1</sup><sup>1</sup> Научно-исследовательский институт пульмонологии Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия<sup>2</sup> Главный военный клинический госпиталь имени Н. Н. Бурденко, Москва, Россия

Дыхательные мышцы (ДМ) — важнейшее звено респираторной системы, обеспечивающее легочную вентиляцию. Целью исследования было оценить силу инспираторных (МIP) и экспираторных (МЕР) ДМ после COVID-19 и выявить взаимосвязь показателей МIP и МЕР с функциональными показателями системы дыхания. Проанализированы данные 36 пациентов (72% мужчин; медиана возраста — 47 лет), которым проводили спирометрию и бодиплетизмографию, определяли диффузионную способность легких (DLCO) и измеряли МIP/МЕР. Медиана срока проведения исследований от начала COVID-19 составила 142 дня. Пациенты были разделены на две подгруппы. Медиана максимального объема поражения легочной ткани в острый период заболевания по КТ в подгруппе 1 составила 27%, в подгруппе 2 — 76%. Наиболее частым функциональным нарушением было снижение DLCO (выявлено у 20 (55%) пациентов). Снижение МIP и МЕР было отмечено у 5 и 11 пациентов соответственно. Статистически значимых различий по показателям МIP и МЕР между подгруппами выявлено не было, однако частота снижения МIP во второй подгруппе была выше (18%). Статистически значимых связей показателей МIP и МЕР с параметрами вентиляции и легочного газообмена выявлено не было. Таким образом, у пациентов, перенесших COVID-19, обнаружено снижение МIP и МЕР в 14 и 31% случаев соответственно. Исследование силы ДМ целесообразно включать в план обследования пациентов, перенесших COVID-19, для выявления их дисфункции и проведения медицинской реабилитации.

**Ключевые слова:** сила дыхательных мышц, спирометрия, бодиплетизмография, диффузионный тест, пост-COVID-19, новая коронавирусная инфекция, SARS-CoV-2

**Финансирование:** в рамках выполнения государственного задания по теме: «Влияние новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 на функциональные показатели системы дыхания в период реконвалесценции» (шифр: «Пост-COVID-функциональная диагностика»).

**Благодарности:** инженеру ЗАО «Медицинские системы» М. Р. Зайтову за техническую поддержку.

**Вклад авторов:** О. И. Савушкина — разработка дизайна исследования, набор клинического материала, анализ и интерпретация результатов, написание текста; М. М. Малашенко — набор клинического материала, интерпретация результатов; А. В. Черняк — разработка дизайна исследования, набор клинического материала, анализ и интерпретация результатов, редактирование текста; Е. В. Крюков — концепция статьи, редактирование текста; Е. А. Синицын — интерпретация результатов, редактирование текста; К. А. Зыков — редактирование текста, утверждение итогового варианта текста рукописи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом НИИ пульмонологии ФМБА России (протокол № 01-21, от 14 мая 2021 г.). Все участники исследования подписали информированное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Ольга Игоревна Савушкина  
Ореховый бульвар, д. 28, 115682, г. Москва; olga-savushkina@yandex.ru

**Статья получена:** 19.07.2021 **Статья принята к печати:** 09.08.2021 **Опубликована онлайн:** 16.09.2021

**DOI:** 10.47183/mes.2021.025

## RESPIRATORY MUSCLE STRENGTH IN PATIENTS AFTER COVID-19

Savushkina OI<sup>1,2</sup> ✉, Malashenko MM<sup>2</sup>, Cherniak AV<sup>1</sup>, Kryukov EV<sup>2</sup>, Sinitsyn EA<sup>1</sup>, Zikov KA<sup>1</sup><sup>1</sup> Pulmonology Scientific Research Institute under Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia<sup>2</sup> Main Military Clinical Hospital named after academician N. N., Ministry of Defense, Moscow, Russia

Respiratory muscles (RM) are a very important part of the respiratory system that enables pulmonary ventilation. This study aimed to assess the post-COVID-19 strength of RM by estimating maximum static inspiratory (MIP or P<sub>imax</sub>) and expiratory (MEP or P<sub>Emax</sub>) pressures and to identify the relationship between MIP and MEP and the parameters of lung function. We analyzed the data of 36 patients (72% male; median age 47 years) who underwent spirometry, and body plethysmography, diffusion test for carbon monoxide (DLCO) and measurement of MIP and MEP. The median time between the examinations and onset of COVID-19 was 142 days. The patients were divided into two subgroups. In subgroup 1, as registered with computed tomography, the median of the maximum lung tissue damage volume in the acute period was 27%, in subgroup 2 it reached 76%. The most common functional impairment was decreased DLCO, detected in 20 (55%) patients. Decreased MIP and MEP were observed in 5 and 11 patients, respectively. The subgroups did not differ significantly in MIP and MEP values, but decreased MIP was registered in the second subgroup more often (18%). There were identified no significant dependencies between MIP/MEP and the parameters of ventilation and pulmonary gas exchange. Thus, in patients after COVID-19, MIP and MEP were reduced in 14 and 31% of cases, respectively. It is reasonable to add RM tests to the COVID-19 patient examination plan in order to check them for dysfunction and carry out medical rehabilitation.

**Keywords:** respiratory muscle strength, spirometry, body plethysmography, diffusion test, post-COVID-19, new coronavirus infection

**Funding:** ordered by the state under the research topic "Impact of the new coronavirus infection SARS-CoV-2 on the functional parameters of respiratory system during the convalescence period" (code: "Post-COVID functional diagnostics").

**Acknowledgements:** we would like to thank Zaitov M. R., engineer of ZAO Meditsinskoye Sistemy, for technical support.

**Author contribution:** Savushkina OI — study design development, clinical material collection, analysis and interpretation of the results, article authoring; Malashenko MM — clinical material collection, interpretation of the results; Cherniak AV — study design development, clinical material collection, analysis and interpretation of the results, article editing; Kryukov EV — article concept development, editing; Sinitsyn EA — interpretation of the results, article editing; Zikov KA — article editing, approval of the final version of the manuscript.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Pulmonology Scientific Research Institute of the FMBA of Russia (minutes № 01-21 of May 14, 2021). All study participants signed informed consent.

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga I. Savushkina  
Orehovyy bulvar, 28, Moscow, 115682; olga-savushkina@yandex.ru

**Received:** 19.07.2021 **Accepted:** 09.08.2021 **Published online:** 16.09.2021

**DOI:** 10.47183/mes.2021.025

COVID-19 — инфекционное высококонтагиозное заболевание, вызываемое новым коронавирусом SARS-CoV-2, одной из главных мишеней которого является респираторная система, что стало основной причиной госпитализации таких больных. Большинство научных исследований COVID-19 было сосредоточено на изучении патогенеза и лечении острой фазы заболевания с целью минимизировать летальные исходы. Однако по мере накопления знаний стало понятно, что COVID-19 — мультисистемное заболевание, последствия которого в настоящий момент изучены недостаточно.

С точки зрения поражения респираторной системы основным функциональным нарушением в постковидный период является снижение диффузионной способности легких (ДСЛ), реже выявляется рестриктивный тип вентиляционных нарушений и еще реже — обструкция дыхательных путей (ДП) [1–3]. Полученные данные принимают во внимание при составлении индивидуальных программ медицинской реабилитации пациентов, перенесших COVID-19. Однако объектами медицинской реабилитации после перенесенного COVID-19 являются не только респираторная, но и сердечно-сосудистая система, а также периферическая скелетная мускулатура, слабость и утомляемость которой развиваются в результате тяжелого и крайне тяжелого течения COVID-19.

К скелетной мускулатуре относят также дыхательные мышцы (ДМ), которые являются важнейшим звеном респираторной системы, обеспечивающим легочную вентиляцию. Патологические изменения респираторной мускулатуры были хорошо изучены после перенесенной внебольничной пневмонии (ВП) [4, 5], после торакальных вмешательств [6]. При проведении сравнительного анализа силы ДМ при ВП с различной тяжестью эндогенной интоксикации показано, что основным внелегочным механизмом развития дисфункции ДМ является эндогенная интоксикация, которая вызывает локальное воспаление и повреждение миофибрилл [5]. Кроме того, утомлению ДМ способствует гипервентиляционный синдром, обусловленный артериальной гипоксемией. Слабость ДМ может также развиваться при приеме глюкокортикостероидов [7, 8]. Однако в доступной нам литературе найдены лишь единичные данные об исследовании силы дыхательных мышц после COVID-19 [9, 10].

Наиболее распространенным методом оценки силы ДМ является измерение максимального статического ротового давления, которое возникает у пациента при закрытых ДП во время максимального вдоха (MIP) и выдоха (MEP). Таким образом, целью данного исследования было оценить силу ДМ у больных, перенесших COVID-19, и выявить взаимосвязь показателей MIP и MEP с другими функциональными показателями системы дыхания.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В обсервационное поперечное исследование были включены 36 пациентов (26 мужчин, медиана возраста составила 47 лет), госпитализированных в медицинские стационары с диагнозом «интерстициальный процесс в легких вследствие перенесенной новой коронавирусной инфекции» (J98.4). Критерий включения пациентов в исследование: наличие подтвержденного диагноза перенесенной новой коронавирусной инфекции COVID-19 среднетяжелого или тяжелого течения, двустороннего вирусного поражения легких. Во всех случаях диагноз был подтвержден методом полимеразной цепной реакции.

Критерий исключения: хроническое заболевание легких в анамнезе. В настоящем исследовании пациентам в процессе одного визита были проведены функциональные исследования системы дыхания, такие как форсированная спирометрия, бодиплетизмография, измерение ДСЛ и силы ДМ на оборудовании MasterScreen Body/Diff (Viasys Healthcare / ErichJager, Vyair Medical / ErichJager; Германия).

Все исследования были выполнены с учетом отечественных и международных стандартов [11–14], в том числе в соответствии с рекомендациями Российского респираторного общества по проведению функциональных исследований системы дыхания в период пандемии COVID-19 [15].

Диффузионную способность легких оценивали по монооксиду углерода (CO) методом однократного вдоха с задержкой дыхания посредством анализатора быстрого реагирования (RGA).

Анализировали показатели:

1) спирометрии (форсированную жизненную емкость легких (ФЖЕЛ), объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ<sub>1</sub>), ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЕЛ, объемную скорость на кривой поток–объем форсированного выдоха между 25 и 75% выдохнутой ФЖЕЛ (СОС<sub>25-75</sub>));

2) бодиплетизмографии (спокойную жизненную емкость легких (ЖЕЛ), общую емкость легких (ОЕЛ), остаточный объем легких (ООЛ) и его отношение к ОЕЛ (ООЛ/ОЕЛ), внутригрудной объем газа (ВГО), емкость вдоха (Е<sub>вд</sub>), общее бронхиальное сопротивление (Raw<sub>общ</sub>));

3) ДСЛ (трансфер-фактор CO, скорректированный на уровень гемоглобина (DLCO) и его отношение к альвеолярному объему (VA) — DLCO/VA);

4) MIP и MEP.

Анализируемые данные представляли в процентах от должных значений (%<sub>долж.</sub>), которые были рассчитаны по уравнениям Европейского сообщества стати и угла [16] с учетом пола, возраста и роста пациента. Должные значения для показателей MIP и MEP рассчитывали по описанным ранее уравнениям [17]. За норму принимали значения более 75%<sub>долж.</sub> [18].

На момент выполнения функциональных исследований системы дыхания по данным компьютерных томограмм органов грудной клетки высокого разрешения (КТ) у обследованных пациентов сохранялись поствоспалительные изменения в легких различной степени выраженности. Общая группа обследованных была разделена на две подгруппы в зависимости от максимальной площади поражения легких, обусловленного SARS-CoV-2 в острый период заболевания. Пациентов с площадью поражения легочной ткани 50% и менее включили в подгруппу 1, с площадью более 50% — в подгруппу 2.

Сопутствующие заболевания имели 16 (44%) пациентов: 7 пациентов — гипертоническую болезнь (ГБ), 4 пациента — ГБ и сахарный диабет (СД) 2-го типа, по одному пациенту — СД 1-го типа, варикозное расширение вен, миокардит, псориаз, железодефицитную анемию.

Статистический анализ проводили с помощью программы STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc.; США). Для оценки нормальности распределения переменных применяли W-тест Шапиро–Уилка. Количественные переменные, распределение которых отличалось от нормального, представляли в виде медиан (Me) и интерквартильного размаха (Q<sub>1</sub>–Q<sub>3</sub>), номинативные переменные — количеством пациентов (n). Сравнение непараметрических количественных показателей двух групп проводили с

применением непараметрического критерия Манна–Уитни для независимых выборок, качественных переменных — с применением точного критерия Фишера. Корреляционный анализ выполняли с использованием ранговой корреляции Спирмена. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Медиана срока проведения функциональных исследований системы дыхания от начала COVID-19 составила 142 (108–186) дня.

Характеристика пациентов всей группы в целом, а также подгрупп 1 и 2 представлена в табл. 1.

Статистически значимых различий между подгруппами по возрасту, полу, росту, индексу массы тела выявлено не было.

Большинство пациентов в обеих подгруппах были некурящие, и лишь незначительное количество курящих было в подгруппе 1.

Медиана максимального объема поражения легочной ткани (КТмакс.) в острый период заболевания составила в 1-й подгруппе 27%, в подгруппе 2 статистически значимо выше — 76%. Длительность пребывания в медицинском стационаре во время COVID-19 в подгруппе 2 была статистически значимо больше.

Анализ данных функциональных исследований системы дыхания всей группы в целом, а также подгрупп 1 и 2 представлен в табл. 2.

В общей группе медианы всех анализируемых функциональных показателей системы дыхания сохранялись в пределах нормальных значений, за исключением снижения показателя DLCO у 20 (55%) пациентов. Кроме того, у 5 (14%) пациентов было выявлено снижение показателя ОЕЛ, у одного пациента — снижение ЖЕЛ и ОФВ<sub>1</sub>/ЖЕЛ (ОФВ<sub>1</sub>/ЖЕЛ < 0,7), у 5 (14%) и у 11 (31%) — снижение показателей МIP и МЕР соответственно. Необходимо обратить внимание, что снижение ОЕЛ было выявлено преимущественно у пациентов подгруппы 2 и лишь в одном случае в подгруппе 1. У 8 пациентов был снижен ООЛ, у 3 из них изолированно при сохранении ОЕЛ в пределах нормальных значений.

Между подгруппами 1 и 2 были выявлены различия по показателям ООЛ и DLCO, которые были статистически значимо ниже в подгруппе 2. Статистически значимых различий по показателям МIP и МЕР между подгруппами выявлено не было, однако частота снижения МIP в подгруппе 2 была выше (18%), тогда как МЕР снижался практически с одинаковой частотой.

При проведении корреляционного анализа статистически значимых связей показателей МIP и МЕР

с изучаемыми параметрами вентиляции и легочного газообмена выявлено не было.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наблюдение за COVID-19-реконвалесцентами указывает на то, что после выписки из медицинского стационара в течение длительного времени полного функционального восстановления не происходит. Пациенты продолжают жаловаться на одышку, общую слабость, повышенную утомляемость, снижение качества жизни. Кроме того, выявляются нарушения функции системы дыхания, сердечно-сосудистой системы, а также нейропатии и миопатии, обусловленные в первую очередь крайне тяжелым течением COVID-19, требующим искусственной вентиляции легких.

Вместе с тем, даже при легком и среднетяжелом течении COVID-19 в той или иной степени имеет место данная симптоматика. Снижение силы ДМ — это часть общего синдрома нейропатии и миопатии, обусловленного течением COVID-19, что указывает на необходимость коррекции данной симптоматики методами медицинской реабилитации.

Так, в Консенсусном соглашении экспертов по дыхательным техникам, рекомендуемым для включения в программу медицинской реабилитации больных COVID-19, особое внимание уделено тренингу инспираторных мышц для улучшения вентиляционно-перфузионных отношений и оксигенации [19]. Однако в настоящем исследовании частота выявления снижения максимального экспираторного усилия была в два раза больше по сравнению с инспираторным, что дает основание для рассмотрения дыхательных техник для тренировки экспираторных ДМ.

Вместе с тем, физиотерапевтические факторы, такие как электростимуляция, массаж грудной клетки с коррекцией мышечных триггеров и миофасциальным релизом, инфракрасная лазерная терапия и магнитотерапия по зонам грудной клетки способствуют улучшению микроциркуляции и функционального состояния как инспираторных, так и экспираторных ДМ.

В настоящем исследовании обращает на себя внимание отсутствие статистически значимых различий параметров МIP и МЕР между подгруппами, т. е. в зависимости от площади поражения легочной ткани в острый период заболевания. Полученные результаты согласуются с литературными данными [9, 10], что дает основание судить о иных факторах, возможно биохимических, в том числе влияющих на центральные механизмы регуляции акта дыхания и, соответственно, на функциональное состояние ДМ после перенесенного COVID-19.

Таблица 1. Характеристика пациентов

| Показатель                                       | Общая группа<br><i>n</i> = 36 | Подгруппа 1<br><i>n</i> = 14 | Подгруппа 2<br><i>n</i> = 22 | <i>p</i> * |
|--------------------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------|
| Пол, мужчины, <i>n</i> (%)                       | 26 (72)                       | 8 (57)                       | 18 (82)                      | NS         |
| Возраст, годы                                    | 47 (40–58)                    | 46 (39–59)                   | 48 (42–57)                   | NS         |
| Рост, см                                         | 174 (165–181)                 | 170 (165–183)                | 174 (165–179)                | NS         |
| ИМТ, кг/м <sup>2</sup>                           | 29 (26–32)                    | 30 (25–32)                   | 29 (27–31)                   | NS         |
| Табакокурение,<br>нет/экс-курящие/курящие, %     | 69/28/3                       | 72/21/7                      | 68/32                        | –          |
| Длительность госпитализации во время<br>COVID-19 | 18 (13–25)                    | 14 (8–16)                    | 23 (15–27)                   | 0,01       |

Примечание: данные представлены как количество (*n*) или медиана (нижний квартиль — верхний квартиль). ИМТ — индекс массы тела; \* — сравнивали подгруппы 1 и 2 с помощью критерия Манна–Уитни; NS — статистических различий между подгруппами 1 и 2 не выявлено.

Таблица 2. Показатели спирометрии, бодиплетизмографии, диффузионного теста, силы дыхательных мышц

| Показатель                                         | Общая группа<br><i>n</i> = 36 | Подгруппа 1<br><i>n</i> = 14 | Подгруппа 2<br><i>n</i> = 22 | <i>p</i> |
|----------------------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------|
| ЖЕЛ, % <sub>долж</sub>                             | 106 (95–120)                  | 111 (103–123)                | 104 (92–112)                 | NS       |
| ЖЕЛ < 80% <sub>долж</sub> *, <i>n</i>              | 1                             | 0                            | 1                            | NS       |
| ФЖЕЛ, % <sub>долж</sub>                            | 109 (99–123)                  | 116 (106–125)                | 107 (96–114)                 | NS       |
| ОФВ <sub>1</sub> , % <sub>долж</sub>               | 105 (98–125)                  | 119 (102–128)                | 103 (97–116)                 | NS       |
| ОФВ <sub>1</sub> < 80% <sub>долж</sub> *, <i>n</i> | 1                             | 0                            | 1                            | NS       |
| ОФВ <sub>1</sub> /ЖЕЛ, %                           | 82 (78–84)                    | 82 (78–84)                   | 83 (78–86)                   | NS       |
| ОФВ <sub>1</sub> /ЖЕЛ < 0,7, <i>n</i>              | 1                             | 0                            | 1                            | NS       |
| ОФВ <sub>1</sub> /ФЖЕЛ, %                          | 83 (80–85)                    | 82 (80–84)                   | 83 (80–86)                   | NS       |
| СОС <sub>25–75</sub> , % <sub>долж</sub>           | 109 (93–123)                  | 110 (103–121)                | 105 (92–125)                 | NS       |
| ОЕЛ, % <sub>долж</sub>                             | 100 (90–109)                  | 108 (98–114)                 | 97 (85–105)                  | NS       |
| ОЕЛ < 80% <sub>долж</sub> *, <i>n</i>              | 5                             | 1                            | 4                            | NS       |
| ВГО, % <sub>долж</sub>                             | 87 (75–101)                   | 93 (75–105)                  | 85 (75–95)                   | NS       |
| Е <sub>вд</sub> , % <sub>долж</sub>                | 114 (102–126)                 | 114 (109–137)                | 114 (95–125)                 | NS       |
| ООЛ, % <sub>долж</sub>                             | 88 (81–97)                    | 89 (81–97)                   | 85 (73–89)                   | 0,03     |
| ООЛ < 80% <sub>долж</sub> *, <i>n</i>              | 8                             | 0                            | 8                            | 0,011    |
| ООЛ/ОЕЛ, % <sub>долж</sub>                         | 83 (78–89)                    | 108 (98–119)                 | 82 (79–86)                   | NS       |
| Raw <sub>общ</sub> , кПа·с/л                       | 0,22 (0,17–0,29)              | 0,23 (0,19–0,30)             | 0,2 (0,17–0,29)              | NS       |
| DLCO, % <sub>долж</sub>                            | 77 (68–89)                    | 87 (76–95)                   | 72 (67–83)                   | 0,014    |
| DLCO < 80% <sub>долж</sub> *, <i>n</i>             | 20                            | 5                            | 15                           | 0,058    |
| DLCO/VA, % <sub>долж</sub>                         | 90 (82–98)                    | 96 (86–103)                  | 87 (79–93)                   | NS       |
| MIP, % <sub>долж</sub>                             | 108 (89–135)                  | 114 (91–137)                 | 102 (85–129)                 | NS       |
| MIP снижена, <i>n</i>                              | 5                             | 1                            | 4                            | NS       |
| MEP, % <sub>долж</sub>                             | 87 (72–105)                   | 86 (74–108)                  | 87 (71–103)                  | NS       |
| MEP снижена, <i>n</i>                              | 11                            | 4                            | 7                            | NS       |

**Примечание:** данные представлены как медиана (нижний квартиль — верхний квартиль); \* — сравнивали подгруппы 1 и 2 с помощью критерия Манна-Уитни; NS — статистических различий между подгруппами 1 и 2 не выявлено.

В настоящем исследовании, медиана срока проведения которого составила 142 дня от начала COVID-19, наиболее частым функциональным нарушением было снижение ДСЛ (в 55% случаев) преимущественно у пациентов с площадью поражения легочной ткани в острый период заболевания более 50% (подгруппа 2), рестриктивный тип вентиляционных нарушений был выявлен у 5 (14%) пациентов, из них у 4 (18%) — тоже в подгруппе 2, обструкция ДП — у 1 пациента. В метаанализе, проведенном в ранний период реконвалесценции после COVID-19 (от 1 до 3 месяцев), было установлено, что после перенесенного COVID-19 распространенность снижения ДСЛ составляет 39% (ДИ: 24–56%;  $p < 0,01$ ; индекс гетерогенности ( $I^2$ ) — 86%), рестриктивного типа вентиляционных нарушений — 15% (ДИ: 9–22%;  $p = 0,03$ ;  $I^2 = 59\%$ ), обструкции ДП — 7% (ДИ: 4–11%;  $p = 0,31$ ;  $I^2 = 16\%$ ) [3].

Результаты, полученные в настоящем исследовании, согласуются с приведенными данными метаанализа, однако настоящее исследование было проведено в более поздние сроки выздоровления после COVID-19, что может указывать на медленную динамику восстановления функции системы дыхания после перенесенного заболевания.

Статистически значимых корреляционных связей между максимальным статическим ротовым давлением и функциональными показателями системы дыхания выявлено не было, что еще раз подтверждает важность измерения силы ДМ, особенно у пациентов, жалующихся

на одышку и быструю утомляемость при сохраненных в пределах нормальных значений параметров традиционных легочных функциональных тестов.

Работы по изучению влияния COVID-19 на силу ДМ необходимо продолжить с целью исследования взаимосвязи параметров MIP и MEP с количественной оценкой силы мышц по шкале MRC Weakness, а также с тяжестью одышки по шкале mMRC.

Особое внимание изучению силы ДМ следует уделить в случаях крайне тяжелого течения COVID-19, т. е. у пациентов с синдромом последствий интенсивной терапии (ПИТ-синдромом), при котором выявляются такие проблемы, как общая мышечная слабость, уменьшение объема мышечной массы, снижение физической работоспособности и мышечной силы, в том числе силы инспираторных мышц с возможным развитием атрофии диафрагмы, ведущей к ее дисфункции. Измерение параметров MIP и MEP в динамике у таких пациентов позволит более корректно подобрать программу медицинской реабилитации (МП) и прогнозировать исход выявленных нарушений.

Кроме того, учитывая, что сила мышц напрямую зависит от белкового обмена, целесообразно проанализировать взаимосвязь общего белка крови с показателями MIP и MEP, и в случае их снижения рассмотреть вопрос о нутритивной поддержке таких пациентов.

Таким образом, исследование силы ДМ является важным дополнением к традиционно используемым легочным функциональным тестам, которое позволяет

получать информацию о функциональном состоянии ДМ с целью профилактики патологических состояний и адекватного клинического лечения.

## ВЫВОДЫ

У пациентов, перенесших COVID-19 различной степени тяжести, выявляется снижение максимального статического

ротового давления, в большей степени экспираторного — в 31% случаев, инспираторного — в 14% случаев. Статистически значимой взаимосвязи параметров MIP и MEP с показателями вентиляции и легочного газообмена выявлено не было. Исследование силы дыхательных мышц целесообразно включать в план обследования пациентов, перенесших COVID-19, с целью выявления их дисфункции и своевременного проведения медицинской реабилитации.

## Литература

1. Савушкина О. И., Черняк А. В., Крюков Е. В., Кулагина И. Ц., Самсонова М. В., Калманова Е. Н. и др. Функциональные нарушения системы дыхания в период раннего выздоровления после COVID-19. Медицинский алфавит. 2020; 25: 7–12. DOI: 10.33667/2078-5631-2020-25-7-12.
2. Зайцев А. А., Савушкина О. И., Черняк А. В., Кулагина И. Ц., Крюков Е. В. Клинико-функциональная характеристика пациентов, перенесших новую коронавирусную инфекцию COVID-19. Практическая пульмонология. 2020; 1: 78–81.
3. Torres-Castro R, Vasconcello-Castillo L, Alsina-Restoy X, Solis-Navarro L, Burgos F, Puppo H, et al. Respiratory function in patients post-infection by COVID-19: a systematic review and meta-analysis. Pulmonology. 2021; 27 (4): 328–37. DOI: 10.1016/j.pulmoe.2020.10.013.
4. Дей А. А., Кожанов А. Г., Гельцер Б. И. Результаты исследования силы дыхательных мышц у лиц молодого возраста с внебольничной пневмонией. Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2020; 77: 34–40. DOI: 10.36604/1998-5029-2020-77-34-40.
5. Гельцер Б. И., Дей А. А., Титоренко И. Н., Котельников В. Н. Сравнительный анализ силы дыхательных мышц при внебольничной пневмонии с различной тяжестью эндогенной интоксикации. Терапевтический архив. 2020; 92 (3): 19–24. DOI: 10.26442/00403660.2020.03.000372.
6. Кожанов А. Г., Копеев В. А., Гельцер Б. И. Оценка силы дыхательных мышц в ранние сроки после торакальных вмешательств. Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2020; 75: 32–39. DOI: 10.36604/1998-5029-2020-75-32-39.
7. Авдеев С. Н. Оценка силы дыхательных мышц в клинической практике. Пульмонология и аллергология. 2008; 4: 12–17.
8. Сегизбаева М. О., Александрова Н. П. Оценка функционального состояния дыхательных мышц: методические аспекты и интерпретация данных. Физиология человека. 2019; 45 (2): 115–27. DOI: 10.1134/S0131164619010120.
9. Huang Y, Tan C, Wu J, Chen M, Wang Z, Luo L, et al. Impact of coronavirus disease 2019 on pulmonary function in early convalescence phase. Respir Res. 2020; 21 (1): 163. DOI: 10.1186/s12931-020-01429-6.
10. Guler SA, Ebner L, Beigelman C, Bridevaux P, Brutsche M, Clarenbach C, et al. Pulmonary function and radiological features four months after COVID-19: first results from the national prospective observational Swiss COVID-19 lung study. Eur Respir J. 2021; 57 (4): 2003690. DOI: 10.1183/13993003.2003690-2020.
11. Чучалин А. Г., Айсанов З. Р., Чикина С. Ю., Черняк А. В., Калманова Е. Н. Федеральные клинические рекомендации Российского респираторного общества по использованию метода спирометрии. Пульмонология. 2014; 6: 11–23.
12. Graham BL, Steenbruggen I, Miller MR, Barjaktarevic IZ, Cooper BG, Hall GL, et al. Standardization of spirometry 2019 update an official American thoracic society and European respiratory society technical statement. Am J Respir Crit Care Med. 2019; 200 (8): 70–88. DOI: 10.1164/rccm.201908-1590ST.
13. Wanger J, Clausen JL, Coates A, Pedersen OF, Brusasco V, Burgos F, et al. Standardisation of the measurement of lung volumes. Eur Respir J. 2005; 26 (3): 511–22. DOI: 10.1183/09031936.05.00035005.
14. Graham BL, Brusasco V, Burgos F, Cooper BG, Jensen R, Kendrick A, et al. 2017 ERS/ATS standards for single-breath carbon monoxide uptake in the lung. Eur Respir J. 2017; 49: 1600016. DOI: 10.1183/13993003.00016-2016.
15. Айсанов З. Р., Калманова Е. Н., Каменева М. Ю., Кирюхина Л. Д., Лукина О. Ф., Науменко Ж. К. и др. Рекомендации Российского респираторного общества по проведению функциональных исследований системы дыхания в период пандемии COVID-19. Версия 1.1. от 19.05.2020. Доступно по ссылке: [https://spulmo.ru/upload/rekomendacii\\_rro\\_fvd\\_COVID\\_19\\_rev1\\_1\\_01062020.pdf](https://spulmo.ru/upload/rekomendacii_rro_fvd_COVID_19_rev1_1_01062020.pdf).
16. Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R, Yernault JC. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. Eur Respir J. 1993; 6 (Suppl.16): 5–40. PMID: 8499054.
17. Laveneziana P, Albuquerque A, Aliverti A, Babb T, Barreiro E, Dreset M, et al. ERS statement on respiratory muscle testing at rest and during exercise. Eur Respir J. 2019; 53: 1801214. DOI: 10.1183/13993003.01214-2018.
18. Evans JA, Whitelaw W. The assessment of maximal respiratory mouth pressures in adults. Respir Care. 2009; 54 (10): 1348–59.
19. Бубнова М. Г., Шляхто Е. В., Аронов Д. М., Белевский А. С., Герасименко М. Ю., Глезер М. Г. и др. Новая коронавирусная инфекционная болезнь COVID-19: особенности комплексной кардиологической и респираторной реабилитации. Российский кардиологический журнал. 2021; 26 (5): 4487. DOI: 10.15829/1560-4071-2021-4487.

## References

1. Savushkina OI, Cherniak AV, Kryukov EV, Kulagina ITs, Samsonova MV, Kalmanova EN et al. Pulmonary function after COVID-19 in early convalescence phase. Medical alphabet. 2020; (25): 7–12. DOI: 10.33667/2078-5631-2020-25-7-12. Russian.
2. Zaitsev AA, Savushkina OI, Cherniak AV, Kulagina ITs, Kryukov EV. Clinical and functional characteristics of patients who recovered from the novel coronavirus infection (COVID-19). Practical pulmonology. 2020; 1: 78–81. Russian.
3. Torres-Castro R, Vasconcello-Castillo L, Alsina-Restoy X, Solis-Navarro L, Burgos F, Puppo H, et al. Respiratory function in patients post-infection by COVID-19: a systematic review and meta-analysis. Pulmonology. 2021; 27 (4): 328–37. DOI: 10.1016/j.pulmoe.2020.10.013.
4. Dei AA, Kozhanov AG, Geltser BI. Results of respiratory muscle strength study in young persons with community-acquired pneumonia. Bulletin Physiology and Pathology of Respiration. 2020; 77: 34–40. DOI: 10.36604/1998-5029-2020-77-34-40. Russian.
5. Geltser BI, Dei AA, Titorenko IN, Kotelnikov VN. Comparative analysis of the strength of the respiratory muscles in community-

- acquired pneumonia with different severity of endogenous intoxication. *Terapevticheskii arkhiv*. 2020; 92 (3): 19–24. DOI: 10.26442/00403660.2020.03.000372. Russian.
6. Kozhanov AG, Kopaev VA, Geltzer BI. Assessment of the strength of the respiratory muscles in the early stages after thoracic interventions. *Bulletin Physiology and Pathology of Respiration*. 2020; Issue 75: 32–39. DOI: 10.36604/1998-5029-2020-75-32-39. Russian.
  7. Avdeev SN. Assessment of the strength of the respiratory muscles in the clinical practice. *Pulmonology and allergology*. 2008; 4: 12–17. Russian.
  8. Segizbaeva MO, Aleksandrova NP. Assessment of the functional status of respiratory muscles: methodical aspects and interpretation of data. *Human Physiology*. 2019; 45 (2): 115–27. DOI: 10.1134/S0131164619010120. Russian.
  9. Huang Y, Tan C, Wu J, Chen M, Wang Z, Luo L, et al. Impact of coronavirus disease 2019 on pulmonary function in early convalescence phase. *Respir Res*. 2020; 21 (1): 163. DOI: 10.1186/s12931-020-01429-6.
  10. Guler SA, Ebner L, Beigelman C, Bridevaux P, Brutsche M, Clarenbach C, et al. Pulmonary function and radiological features four months after COVID-19: first results from the national prospective observational Swiss COVID-19 lung study. *Eur Respir J*. 2021; 57 (4): 2003690. DOI: 10.1183/13993003.03690-2020.
  11. Chuchalin AG, Aysanov ZR, Chikina SYu, Chernyak AV, Kalmanova EN. Federal guidelines of Russian Respiratory Society on spirometry. *Pulmonology*. 2014; (6): 11–23. Russian.
  12. Graham BL, Steenbruggen I, Miller MR, Barjaktarevic IZ, Cooper BG, Hall GL, et al. Standardization of spirometry 2019 update an official American thoracic society and European respiratory society technical statement. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019; 200 (8): 70–88. DOI: 10.1164/rccm.201908-1590ST.
  13. Wanger J, Clausen JL, Coates A, Pedersen OF, Brusasco V, Burgos F, et al. Standardisation of the measurement of lung volumes. *Eur Respir J*. 2005; 26 (3): 511–22. DOI: 10.1183/09031936.05.00035005.
  14. Graham BL, Brusasco V, Burgos F, Cooper BG, Jensen R, Kendrick A, et al. 2017 ERS/ATS standards for single-breath carbon monoxide uptake in the lung. *Eur Respir J*. 2017; 49: 1600016. DOI: 10.1183/13993003.00016-2016.
  15. Aysanov ZR, Kalmanova EN, Kameneva MYu, Kirukhina LD, Lukina OF, Naumenko JK, et al. Guideline of the Russian Respiratory Society for functional diagnostics of the respiratory system during the COVID-19 pandemic. Ver. 1.1. from 19.05.2020. Available from: [https://spulmo.ru/upload/rekomendacii\\_rrro\\_fvd\\_COVID\\_19\\_rev1\\_1\\_01062020.pdf](https://spulmo.ru/upload/rekomendacii_rrro_fvd_COVID_19_rev1_1_01062020.pdf). Russian.
  16. Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R, Yernault JC. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J*. 1993; 6 (Suppl.16): 5–40. PMID: 8499054.
  17. Laveneziana P, Albuquerque A, Aliverti A, Babb T, Barreiro E, Dreset M, et al. ERS statement on respiratory muscle testing at rest and during exercise. *Eur Respir J*. 2019; 53: 1801214. DOI: 10.1183/13993003.01214-2018.
  18. Evans JA, Whitelaw W. The assessment of maximal respiratory mouth pressures in adults. *Respir Care*. 2009; 54 (10): 1348–59.
  19. Bubnova MG, Shlyakhto EV, Aronov DM, Belevsky AS, Gerasimenko MYu, Glezer MG et al. Coronavirus disease 2019: features of comprehensive cardiac and pulmonary rehabilitation. *Russian Journal of Cardiology*. 2021; 26 (5): 4487. DOI: 10.15829/1560-4071-2021-4487.

## КОМПЛЕКСНАЯ ГИГИЕНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ТЕРРИТОРИЙ В РАЙОНЕ РАЗМЕЩЕНИЯ СТРОЯЩЕГОСЯ РЕГИОНАЛЬНОГО ЦЕНТРА ПО ОБРАЩЕНИЮ С РАДИОАКТИВНЫМИ ОТХОДАМИ

Ю. Н. Зозуль , С. М. Киселев, Т. Н. Лашенцова, В. В. Шлыгин, С. В. Ахромеев, Т. И. Гимадова, А. Н. Малахова, О. Б. Шашкова, К. Ю. Оськина

Федеральный медицинский биофизический центр имени А. И. Бурназяна, Москва, Россия

В Приморском крае, где вопросы обращения с радиоактивными отходами (РАО) стоят весьма остро, ведется строительство Регионального центра кондиционирования и долговременного хранения радиоактивных отходов (РЦКДХ). Проект предполагает интенсификацию работ по обращению с РАО, а также строительство нового технологического корпуса по переработке РАО, пункта хранения и котельной. Целью исследования было дать комплексную гигиеническую оценку территорий в районе расположения РЦКДХ перед вводом его в эксплуатацию. Оценку радиационных параметров выполняли с использованием методов радиометрии и спектрометрии, содержания тяжелых металлов — методом атомно-абсорбционной спектрометрии. В почвах и грунтах выявлено присутствие тяжелых металлов (свинец, никель, медь и др.) и мышьяка в концентрациях, превышающих фоновые значения и в ряде случаев предельно допустимую концентрацию (ПДК). Радиационную обстановку характеризуют фоновые значения активности техногенных радионуклидов  $^{137}\text{Cs}$  и  $^{90}\text{Sr}$  в объектах окружающей среды. Качество воды колодцев и скважин в основном соответствует требованиям для подземных вод, используемых для нецентрализованного водоснабжения, за исключением скважин, где присутствует мышьяк в концентрации выше ПДК. Среднегодовая интегральная доза облучения населения за вычетом естественного регионального фона составила 0,046 мЗв, что ниже предела дозы. Канцерогенный риск для здоровья населения от воздействия радиационного и химического фактора составил  $4 \times 10^{-6}$  и  $6 \times 10^{-6}$  соответственно. Полученные результаты являются основой для установления референсных значений состояния загрязнения окружающей среды перед вводом в эксплуатацию РЦКДХ и могут быть использованы в практике регулирующего надзора в процессе его эксплуатации.

**Ключевые слова:** объект ядерного наследия, радиационно-гигиенический мониторинг, канцерогенный риск, техногенные радионуклиды, тяжелые металлы, здоровье населения, радиационная обстановка

**Вклад авторов:** Ю. Н. Зозуль — анализ и подготовка материалов исследования; С. М. Киселев, Т. Н. Лашенцова — общее руководство, анализ материалов исследования; В. В. Шлыгин — проведение исследований радиационной обстановки, обработка данных; С. В. Ахромеев — проведение исследований методом спектрометрии, сбор информации; Т. И. Гимадова — проведение исследований методом интегральной ТЛ-дозиметрии; А. Н. Малахова — сбор информации, работа с ТЛ-дозиметрами; О. Б. Шашкова — проведение исследований методом атомно-абсорбционной спектрометрии; К. Ю. Оськина — проведение радиохимических исследований.

**Соблюдение этических стандартов:** все работы проведены с соблюдением мер радиационной безопасности и требований охраны труда.

✉ **Для корреспонденции:** Юлия Николаевна Зозуль  
ул. Живописная, д. 46, 123098, г. Москва; julnik@list.ru

**Статья получена:** 15.07.2021 **Статья принята к печати:** 11.08.2021 **Опубликована онлайн:** 27.08.2021

**DOI:** 10.47183/mes.2021.022

## ENVIRONMENTAL IMPACT ASSESSMENT OF THE TERRITORIES IN THE VICINITY OF COMMISSIONING REGIONAL RADIOACTIVE WASTE MANAGEMENT FACILITY

Zozul YuN , Kiselev SM, Laschenova TN, Shlygin VV, Akhromeev SV, Gimadova TI, Malakhova AN, Shashkova OB, Oskina KYu

Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

The Regional center of conditioning and long-term storage of radioactive waste is being constructed in Primorsky Krai, where radioactive waste (RW) management concerns have been especially acute. The project involves intensification of activities related to RW management, as well as to building the new technology block for RW reprocessing, storage facility and boiler house. The study was aimed to perform environmental impact assessment of the territories in the vicinity of the Regional center of conditioning and long-term storage of radioactive waste prior to the facility commissioning. Radiation situation was assessed by radiometric and spectrometric methods; the levels of heavy metals were evaluated by atomic absorption spectrometry. Heavy metal (lead, nickel, copper, etc.) and arsenic levels exceeding or, in certain cases, similar to maximum permissible concentration (MPC) were found in soil and ground. Radiation situation is characterized by background levels of artificial radionuclides  $^{137}\text{Cs}$  and  $^{90}\text{Sr}$  in environmental media. Quality of water in wells and boreholes was largely compliant with the requirements established for groundwater used in decentralized water supply systems, with the exception of boreholes, in which the arsenic levels exceeding MPC were detected. The average annual public dose was 0.046 mSv excluding natural regional background radiation, which was below the dose limit. Carcinogenic health risks induced by radiation and chemical factors was  $4 \times 10^{-6}$  and  $6 \times 10^{-6}$  respectively. The obtained results form the basis for setting reference values of environmental contamination prior to the Regional center of conditioning and long-term storage of radioactive waste commissioning and can be used for regulatory supervision during the facility operation.

**Keywords:** nuclear legacy site, radiological monitoring, carcinogenic risk, artificial radionuclides, heavy metals, public health, radiation situation

**Author contribution:** Zozul YuN — preparation and analysis of research data; Kiselev SM, Laschenova TN — overall management, analysis of research data; Shlygin VV — assessment of radiological situation, data processing; Akhromeev SV — spectrometry, data acquisition; Gimadova TI — thermoluminescence dosimetry; Malakhova AN — data acquisition, working with TL-dosimeters; Shashkova OB — atomic absorption spectrometry; Oskina KYu — radiochemistry research.

**Compliance with ethical standards:** the study was carried out in full compliance with radiation safety measures and labour protection requirements. No research involving human subjects or animals was performed.

✉ **Correspondence should be addressed:** Yilia N. Zozul  
Zhivopisnaya, 46, 123098, Moscow; julnik@list.ru

**Received:** 15.07.2021 **Accepted:** 11.08.2021 **Published online:** 27.08.2021

**DOI:** 10.47183/mes.2021.022

В Российской Федерации формируется современная технологическая платформа обращения с радиоактивными отходами. В рамках ее реализации создаются региональные центры, предназначенные для приема, переработки и приведения в безопасное состояние накопленных и вновь образующихся отходов. В Приморском крае с 2016 г. ведется строительство Регионального центра кондиционирования и долговременного хранения радиоактивных отходов (РЦКДХ) вблизи территории промышленной площадки бухта Сысоева отделения Фокино Дальневосточного центра по обращению с радиоактивными отходами — филиала ФГУП «Федеральный экологический оператор» (площадка б. Сысоева). Согласно проекту создаваемая производственная структура предназначена для переработки и приведения в безопасное состояние радиоактивных отходов РАО, накопленных на площадке б. Сысоева и образующихся в процессе эксплуатации и вывода из эксплуатации его объектов. Региональный статус предприятия предполагает также прием и переработку радиоактивных материалов, образованных в результате деятельности других предприятий Дальневосточного региона, в том числе задействованных в утилизации атомного флота России. Государственный санитарно-эпидемиологический надзор на территориях, где осуществляется деятельность по обращению с РАО, входит в сферу ответственности Федерального медико-биологического агентства России [1].

Исследуемый радиационно опасный объект расположен на юго-восточной оконечности Дунайского полуострова. В районе размещения площадки б. Сысоева находится территория частного сектора поселка городского типа Дунай (п. Старый Дунай) с постоянно проживающим населением. Частный сектор расположен вдоль линии железной дороги к бухте Конюшкова и федеральной трассы, по которой осуществляли транспортировку отработавшего ядерного топлива в защитных контейнерах на предприятие. Местное население проживает в одноэтажных деревянных и каменных домах, ведет приусадебное хозяйство. Водоснабжение нецентрализованное, для питьевых и хозяйственных нужд используют воду подземных источников (колодцы и скважины). Рацион питания жителей включает молоко местного производства, выращенные на приусадебных участках овощи. Население п. Старый Дунай является критической группой, проживающей в зоне потенциального воздействия предприятия.

Территория РЦКДХ находится в пределах санитарно-защитной зоны (СЗЗ) площадки б. Сысоева в непосредственной близости от производственной площадки. Гигиеническая обстановка на территории расположения вводимого в эксплуатацию объекта обусловлена производственной деятельностью площадки б. Сысоева, которое уже более 20 лет осуществляет комплекс работ по обращению с РАО, накопленными в ходе предыдущей военной деятельности в качестве береговой технической базы обслуживания атомных подводных лодок [2]. В настоящее время стационарным источником выбросов техногенных радионуклидов в атмосферу являются действующие объекты площадки б. Сысоева: комплекс переработки жидких радиоактивных отходов, радиохимическая лаборатория и пункт дезактивации автотехники ПД-8 [3]. По данным Росгидромета, содержание радионуклидов техногенного происхождения в атмосферных выпадениях на территории Приморского края за 2017–2019 гг. находится на пределе чувствительности метода определения. Максимальное содержание в атмосферном воздухе

( $^{137}\text{Cs}$  —  $0,9 \times 10^{-7}$  Бк/м<sup>3</sup>;  $^{90}\text{Sr}$  —  $2,7 \times 10^{-7}$  Бк/м<sup>3</sup>) на порядки ниже допустимой среднегодовой активности [4]. Среднегодовое значение МАЭД по Приморскому краю составляет 0,13 мкЗв/ч [5]. С введением в эксплуатацию РЦКДХ появится дополнительный источник выброса радиоактивных и химических веществ вытяжной вентиляции технологического корпуса по переработке и кондиционированию РАО. Основной состав принимаемых РАО — радиоактивные отходы, сопутствующие утилизации атомных подводных лодок и реабилитации РАО с доминирующим составом радионуклидов:  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{90}\text{Sr}$ .

Учитывая приведенные обстоятельства, а также планируемую интенсификацию деятельности по обращению с РАО в регионе, актуальной задачей является оценка техногенного воздействия на окружающую среду и население на современном этапе производственной деятельности на площадке б. Сысоева. Полученные данные будут использованы в качестве референсных показателей для гигиенической оценки состояния окружающей среды в ходе дальнейшей производственной деятельности по обращению с РАО.

Цель данной работы — дать комплексную гигиеническую оценку территорий в районе размещения РЦКДХ в Приморском крае перед его вводом в эксплуатацию.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Измерения, отбор и анализ проб в рамках исследования проводили в соответствии со стандартными методиками аккредитованного испытательного лабораторного центра ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна (аттестат RA.RU.21БУ01).

Оценку радиационной обстановки на местности выполняли по результатам измерений мощности AMBIENTного эквивалента дозы гамма-излучения (МАЭД) «Мультирад-М» («Амплитуда»; Россия) методом пешеходной гамма-съемки.

Определение радионуклидного состава и удельной активности техногенных радионуклидов проводили методами спектрометрии с помощью гамма-спектрометра с полупроводниковым германиевым детектором («CANBERRA»; США) и радиометрии с применением радиометра УМФ-2000 (ООО НПП «Доза»; Россия) и методов предварительного радиохимического выделения радионуклидов.

Оценку доз облучения населения выполняли для ситуации фактического радиационного воздействия с учетом регионального радиационного фона. Годовую дозу облучения населения рассчитывали как сумму доз внешнего облучения за текущий год и ожидаемой дозы вследствие поступления радионуклидов в организм за год [4].

Консервативную оценку средней годовой эффективной дозы (далее СГЭД) внешнего облучения населения на местности и в жилых домах выполняли по результатам экспонирования термoluminesцентных дозиметров (ТЛ-дозиметры) с детекторами на основе фтористого лития (ДТГ-4) в тканеэквивалентной кассете толщиной 1 г/см<sup>2</sup> [7].

Дозу внутреннего облучения за счет перорального поступления радионуклидов с водой и пищевыми продуктами рассчитывали по удельной активности техногенных радионуклидов [8].

Оценку содержания тяжелых металлов в пробах окружающей среды выполняли методом атомно-абсорбционной спектрометрии на приборе «Квант 2АТ»,

(«КОРТЭК»; Россия). Из спектра определенных элементов в работе представлены данные по содержанию тяжелых металлов, присутствующих в пробах в значимых количествах.

Уровень химического загрязнения почв оценивали согласно нормативным документам [9] на основе ПДК (при отсутствии — ОДК) с использованием коэффициента концентрации химического вещества относительно регионального фона (Кс) и суммарного показателя загрязнения (Zс) [10].

Оценку содержания тяжелых металлов в питьевой воде выполняли на основании ПДК, установленных в нормативных документах [10].

Оценку риска для здоровья населения проводили по консервативному сценарию в отношении гипотетического человека, подвергающегося существующему максимальному воздействию в течение всей жизни. Расчет индивидуального канцерогенного риска выполняли с учетом путей воздействия техногенных радионуклидов и тяжелых металлов, присутствующих в почве, питьевой воде и местных пищевых продуктах.

Риск от воздействия радиационного фактора рассчитывали на основе СГЭД, используя линейный коэффициент риска злокачественных новообразований для всего населения  $5,5 \times 10^{-2}$  [11]. Риск по путям облучения оценивали по удельному содержанию техногенных радионуклидов в почве, питьевой воде и пищевых продуктах согласно рекомендациям [12].

Риск от воздействия тяжелых металлов оценивали по сценарию постоянного проживания с использованием данных о величине экспозиции и установленных значений факторов канцерогенного потенциала, характеризующих дополнительный индивидуальный канцерогенный риск или степень увеличения вероятности развития рака в зависимости от пути поступления канцерогенов [13].

Статистическую обработку результатов проводили посредством Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation; США). Ввиду несоответствия распределения измеренных значений нормальному и логнормальному закону, в качестве показателя центральной тенденции использовали медиану и границы ее доверительного интервала (ДИ) при  $P = 0,95$  [6]. Согласно принципу консервативности, представленные значения приведены с запасом на расширенную неопределенность измерений.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Гигиеническая оценка территории в зоне строительства РЦКДХ

По результатам исследований в СЗЗ площадки б. Сысоева в 2018–2020 гг. МАЭД на территории зоны строительства РЦКДХ находится в диапазоне 0,03–0,23 мкЗв/ч, медианное значение — 0,09 мкЗв/ч, что соответствует характерным значениям для Приморского края (0,09–0,18 мкЗв/ч), обусловленным естественным радиационным фоном региона [5]. Основными техногенными радионуклидами в объектах окружающей среды (почва, подземные воды) являются  $^{137}\text{Cs}$  и  $^{90}\text{Sr}$  [14].

Значения удельной активности техногенных радионуклидов в почве существенно ниже критерия неограниченного использования  $A_{\text{ни}}$  [15]: медианное содержание  $^{137}\text{Cs}$  — 17 Бк/кг (максимальное — 63 Бк/кг),  $^{90}\text{Sr}$  — 3 Бк/кг (максимальное — 4 Бк/кг). По содержанию тяжелых металлов выявлено превышение ПДК по мышьяку, свинцу, цинку, никелю, меди, ванадию и марганцу (табл. 1). Значения суммарного показателя загрязнения (Zс) грунта, рассчитанные относительно региональных фоновых значений, не превышают 16, что характеризуют степень химического загрязнения как «допустимая».

### Гигиеническая оценка территории проживания населения в районе размещения РЦКДХ (п. Старый Дунай)

Радиационная обстановка на территории п. Старый Дунай, характеризующаяся значениями МАЭД в пределах 0,05–0,21 мкЗв/ч (медианное значение — 0,10 мкЗв/ч), соответствует уровню радиационного фона Шкотовского района (медианное значение — 0,10 мкЗв/ч; ДИ — 0,07–0,13 мкЗв/ч) и характерным значениям для Приморского края (0,09–0,18 мкЗв/ч) [5]. Основными дозообразующими техногенными радионуклидами, присутствующими в объектах окружающей среды и пищевых продуктах, являются  $^{137}\text{Cs}$  и  $^{90}\text{Sr}$ .

В почвах п. Старый Дунай содержание  $^{137}\text{Cs}$  и  $^{90}\text{Sr}$  в основном находится на уровне значений регионального фона Шкотовского района (медианное значение удельной

**Таблица 1.** Содержание тяжелых металлов и мышьяка в грунте в зоне строительства РЦКДХ в 2017 и 2019 г.

| Элемент | Класс химической опасности | Содержание тяжелых металлов, мг/кг |          | Критерий, мг/кг   |            |                      |
|---------|----------------------------|------------------------------------|----------|-------------------|------------|----------------------|
|         |                            | Медиана                            | Максимум | Региональный фон* | ПДК/ ОДК** | $k_{\text{max}}$ *** |
| Pb      | 1                          | 66 (38–180)                        | 180      | 62                | 65         | 260                  |
| Cd      | 1                          | 0,17 (0,17–0,18)                   | 0,18     | 0,2               | 1          | –                    |
| As      | 1                          | 8 (8–9)                            | 9        | 12                | 5          | 15                   |
| Zn      | 1                          | 200 (100–350)                      | 350      | 130               | 110        | –                    |
| Ni      | 2                          | 46 (27–100)                        | 100      | 35                | 40         | –                    |
| Cu      | 2                          | 74 (22–230)                        | 230      | 18                | 66         | –                    |
| Cr      | 2                          | 130 (110–170)                      | 170      | 110               | –          | –                    |
| V       | 3                          | 180 (130–310)                      | 310      | 110               | 150        | 350                  |
| Mn      | 3                          | 2200 (770–2700)                    | 2700     | 1000              | 1500       | 15000                |
| Ba      | 3                          | 890 (570–1400)                     | 1400     | 700               | –          | –                    |
| Sr      | 3                          | 180 (150–500)                      | 500      | 200               | –          | –                    |
| Zc      |                            | 6 (5–8)                            | 13       | –                 | –          | –                    |

**Примечание:** \* — результаты собственных исследований; \*\* — значения гигиенических нормативов приведены для валовых форм для суглинистых и глинистых почв при pH < 5,5 [10]; \*\*\* — максимальное значение допустимого уровня содержания элемента по одному из четырех показателей вредности.

Таблица 2. СГЭД внутреннего облучения населения п. Старый Дунай за счет употребления питьевой воды и местных пищевых продуктов

| Объект                  | Удельная активность, Бк/л (кг)   |         |                                  |         | Потребление, кг/год | СГЭД внутреннего облучения, мЗв |                          |                    |
|-------------------------|----------------------------------|---------|----------------------------------|---------|---------------------|---------------------------------|--------------------------|--------------------|
|                         | <sup>137</sup> Cs                |         | <sup>90</sup> Sr                 |         |                     | За счет <sup>137</sup> Cs       | За счет <sup>90</sup> Sr | Суммарно           |
|                         | п. Старый Дунай*                 | УВ/ДУ** | п. Старый Дунай*                 | УВ/ДУ** |                     |                                 |                          |                    |
| Питьевая подземная вода | $\frac{0,005 \div 0,040}{0,012}$ | 11      | $\frac{0,002 \div 0,143}{0,051}$ | 4,9     | 730                 | 4×10 <sup>-5</sup>              | 9×10 <sup>-4</sup>       | 9×10 <sup>-4</sup> |
| Молоко                  | $\frac{0,02 \div 0,62}{0,24}$    | 100     | $\frac{0,03 \div 0,64}{0,24}$    | 25      | 136,5               | 3×10 <sup>-4</sup>              | 1×10 <sup>-3</sup>       | 2×10 <sup>-3</sup> |
| Картофель               | $\frac{0,02 \div 0,38}{0,11}$    | 80      | $\frac{0,01 \div 7,3}{0,63}$     | 40      | 50,4                | 1×10 <sup>-4</sup>              | 4×10 <sup>-3</sup>       | 4×10 <sup>-3</sup> |
| Огурцы                  | $\frac{0,01 \div 0,16}{0,06}$    | 60      | $\frac{0,04 \div 0,19}{0,12}$    | 25      | 5,6                 | 8×10 <sup>-6</sup>              | 8×10 <sup>-5</sup>       | 1×10 <sup>-4</sup> |
| Свекла, морковь         | $\frac{0,01 \div 0,06}{0,04}$    | 60      | $\frac{0,04 \div 0,28}{0,12}$    | 25      | 10                  | 9×10 <sup>-6</sup>              | 5×10 <sup>-4</sup>       | 5×10 <sup>-4</sup> |

Примечание: \* в числителе — диапазон колебаний, \* в знаменателе — медиана; \*\* для питьевой воды — уровень вмешательства (УВ) [4]; \*\* для пищевых продуктов — допустимый уровень (ДУ) [16].

активности <sup>137</sup>Cs — 6 Бк/кг, <sup>90</sup>Sr — 2 Бк/кг). Превышение значений регионального фона по удельной активности <sup>137</sup>Cs (медианное значение удельной активности <sup>137</sup>Cs — 46 Бк/кг) до уровня критерия неограниченного использования ( $A_{\text{нп}} = 100$  Бк/кг) отмечено в пробах грунта, отобранных по обочинам автотрассы. Почвы приусадебных участков по удельной активности техногенных радионуклидов (медианное значение удельной активности <sup>137</sup>Cs — 9 Бк/кг, <sup>90</sup>Sr — 2 Бк/кг) отвечают требованиям неограниченного использования твердых материалов в хозяйственной деятельности [15].

Воды подземных источников питьевого водоснабжения по содержанию техногенных радионуклидов соответствуют требованиям качества питьевой воды (табл. 2) [4]. Удельная активность <sup>137</sup>Cs и <sup>90</sup>Sr в воде подземных источников (колодцы, скважины) на 3–4 порядка ниже уровня вмешательства (УВ).

В продуктах местного производства (молоко, выращиваемые на приусадебных участках овощи) удельная активность техногенных радионуклидов на 2–4 порядка ниже допустимого уровня для пищевых продуктов (ДУ) (табл. 2) [16].

Оценка доз внутреннего облучения населения техногенными радионуклидами на основе данных содержания радионуклидов в питьевой воде и пищевых продуктах местного производства показала, что основной вклад вносит облучение от употребления питьевой воды, молока и картофеля (см. табл. 2). СГЭД внутреннего облучения населения за счет техногенных радионуклидов составила 0,008 мЗв: за счет <sup>137</sup>Cs — 0,0005 мЗв, за счет <sup>90</sup>Sr — 0,007 мЗв.

Оценка доз внешнего облучения населения методом интегральной дозиметрии (по результатам измерений ТЛ-дозиметров, размещенных на местности и в жилых домах п. Старый Дунай в течение года) показала, что СГЭД

внешнего облучения на открытой местности не превышает 1,70 мЗв с медианным значением 1,03 мЗв (табл. 3), что соответствует значениям регионального фона, обусловленным естественным радиационным фоном. Доза внешнего облучения населения в домах на 20% превышает аналогичный показатель на открытой местности. С учетом стандартного времени пребывания в домах (6600 ч) и на открытой местности (2200 ч) медианное значение СГЭД внешнего облучения населения, проживающего в районе размещения РЦКДХ, составляет 1,18 мЗв (региональный фон — 1,15 мЗв).

Суммарная СГЭД населения п. Старый Дунай за вычетом естественного регионального фона составила 0,046 мЗв, что на два порядка ниже предела дозы, установленного нормативно [4]. Основной вклад (более 65%) вносит внешнее облучение — 0,030 мЗв. СГЭД внутреннего облучения составила 0,008 мЗв: за счет пищевых продуктов питания — 0,007 мЗв, питьевой воды — 0,0009 мЗв.

Содержание металлов и мышьяка в почве и питьевой воде на территории п. Старый Дунай представлены в табл. 4.

Сравнение содержания металлов в почве п. Старый Дунай с региональным фоном показало повышенное содержание свинца, меди, хрома, цинка и марганца. Наибольшее превышение ПДК отмечено по цинку, свинцу и меди. Повышенное содержание цинка, превышающее ПДК, отмечено и для регионального фона, что характеризует региональные особенности территории. По результатам гигиенической оценки содержания тяжелых металлов по значению суммарного показателя концентрации Zс, большая часть проб почвы (78%) населенного пункта относится к категории загрязнения «допустимая» ( $Zс < 16$ ). К категории загрязнения «умеренно опасная» ( $16 < Zс < 32$ ) относится 22% проб за счет повышенного содержания меди, свинца и цинка.

Таблица 3. Среднегодовая интегральная доза внешнего облучения населения п. Старый Дунай

| Территория           | Число измерений | СГЭД внешнего облучения, мЗв |          |                  |
|----------------------|-----------------|------------------------------|----------|------------------|
|                      |                 | Минимум                      | Максимум | Медиана (ДИ)     |
| Региональный фон:    |                 |                              |          |                  |
| – открытая местность | 19              | 0,46                         | 1,5      | 1,00 (0,50–1,48) |
| – жилые дома         | 7               | 0,49                         | 2,07     | 1,20 (0,57–1,25) |
| п. Старый Дунай:     |                 |                              |          |                  |
| – открытая местность | 37              | 0,49                         | 1,7      | 1,03 (0,55–1,51) |
| – жилые дома         | 18              | 0,6                          | 2,13     | 1,23 (0,67–1,70) |

Таблица 4. Содержание тяжелых металлов и мышьяка в почве и подземных водах в районе размещения РЦКДХ

| Элемент                            | Класс химической опасности | Содержание тяжелых металлов, мг/кг (л) |          |                               | Критерий, мг/кг (л) |           | K <sub>c</sub> |
|------------------------------------|----------------------------|----------------------------------------|----------|-------------------------------|---------------------|-----------|----------------|
|                                    |                            | Минимум                                | Максимум | Медиана                       | Региональный фон    | ПДК / ОДК |                |
| Почва                              |                            |                                        |          |                               |                     |           |                |
| Pb                                 | 1                          | 41                                     | 250      | 110 (67–180)*                 | 62                  | 65        | 2              |
| Cd                                 | 1                          | < 0,12                                 | 0,51     | 0,23 (0,12–0,51)*             | 0,2                 | 1         | 1              |
| As                                 | 1                          | < 1                                    | 3        | 2 (1–3)*                      | 12                  | 5         | < 1            |
| Zn                                 | 1                          | 100                                    | 820      | 215 (140–460)*                | 130                 | 110       | 2              |
| Ni                                 | 2                          | 22                                     | 47       | 42 (34–45)*                   | 35                  | 40        | 1              |
| Cu                                 | 2                          | 19                                     | 260      | 67 (41–130)*                  | 18                  | 66        | 4              |
| Cr                                 | 2                          | 55                                     | 300      | 155 (130–160)*                | 110                 | –         | 1              |
| V                                  | 3                          | 83                                     | 180      | 125 (120–130)*                | 110                 | 150       | 1              |
| Mn                                 | 3                          | 670                                    | 2000     | 1300 (1200–1400)*             | 1000                | 1500      | 1              |
| Ba                                 | 3                          | 510                                    | 1200     | 635 (560–720)*                | 700                 | –         | 1              |
| Sr                                 | 3                          | 130                                    | 310      | 160 (140–220)*                | 200                 | –         | 1              |
| Zc                                 |                            | 2                                      | 21       | 6 (3–9)*                      | –                   | –         | –              |
| Подземные воды (скважины, колодцы) |                            |                                        |          |                               |                     |           |                |
| As                                 | 1                          | < 0,005                                | 0,025    | <0,005 / 0,010**<br><0,005    | < 0,005             | 0,01      | –              |
| Ba                                 | 2                          | 0,01                                   | 0,04     | 0,02 / 0,01**<br>0,02         | 0,03                | 0,7       | –              |
| Cd                                 | 2                          | < 0,0001                               | 0,0005   | 0,0001 / <0,0001**<br>0,0001" | < 0,0001            | 0,001     | –              |
| Cr                                 | 2                          | 0,001                                  | 0,005    | 0,002 / 0,003**<br>0,002      | 0,001               | 0,05      | –              |
| Pb                                 | 2                          | < 0,001                                | 0,008    | 0,001 / 0,007**<br>0,001      | < 0,001             | 0,1       | –              |
| Sr                                 | 2                          | 0,1                                    | 0,4      | 0,19 / < 0,10**<br>0,12       | 0,36                | 7         | –              |
| Al                                 | 3                          | 0,05                                   | 0,33     | 0,05 / 0,05**<br>0,06         | 0,12                | 0,2       | –              |
| Cu                                 | 3                          | < 0,01                                 | 0,11     | 0,01 / 0,02**<br>0,04         | < 0,01              | 1         | –              |
| Fe                                 | 3                          | 0,01                                   | 1,36     | 0,02 / 0,06**<br>0,10         | 0,36                | 0,3       | –              |
| Mn                                 | 3                          | 0,01                                   | 0,64     | 0,02 / 0,01**<br>0,02         | 0,33                | 0,1       | –              |
| Zn                                 | 3                          | 0,01                                   | 1,5      | 0,05 / 0,01**<br>0,01         | 0,01                | 1         | –              |

Примечание: \* — медиана и границы ее доверительного интервала; \*\* в числителе — медиана содержания в скважинах (глубина 70 м / 30–40 м); \*\* в знаменателе — медиана содержания в колодцах.

Гигиеническая оценка содержания металлов в питьевой воде подземных источников показала, что качество воды колодцев и большинства скважин по содержанию тяжелых металлов и мышьяка соответствует нормативным требованиям [10] (см. табл. 4).

В основной массе проб питьевой воды содержание элементов 1-го и 2-го классов опасности не превышает 0,1 ПДК. Превышение ПДК по железу (3-й класс опасности) отмечено в 40% проб воды из колодцев. В скважинах глубиной 30–40 м, используемых для питьевого водоснабжения частных домов, выявлено присутствие мышьяка (1-й класс опасности) на уровне ПДК и выше.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Гигиеническая обстановка в районе размещения вводимого в эксплуатацию на базе ПВХ б. Сысоева РЦКДХ характеризуется рядом особенностей. Грунты зоны строительства РЦКДХ по удельной активности

техногенных радионуклидов удовлетворяют требованиям неограниченного использования твердых материалов в хозяйственной деятельности согласно ОСПОРБ-99/2010. МАЭД соответствует уровню естественного радиационного фона региона. Гигиеническая обстановка осложняется присутствием элементов первого класса опасности (свинец, мышьяк) в содержаниях выше ПДК. Радиационная обстановка на территории проживания населения в районе размещения РЦКДХ соответствует региональным фоновым значениям, что наблюдается и в районах размещения хранилищ РАО бывших береговых технических баз Северного флота на Северо-западе России [17]. При этом необходимым параметром контроля является загрязнение подземных вод как радиационное, так и химическое.

На основе данных, полученных в результате натурных и лабораторных исследований, проведен анализ канцерогенных рисков для здоровья населения от воздействия радиационного и химического факторов.

Таблица 5. Содержание тяжелых металлов и мышьяка в почве и подземных водах в районе размещения РЦКДХ

| Параметр          | Удельная активность, Бк/кг(л) | Индивидуальный радиационный риск |                    |                    |
|-------------------|-------------------------------|----------------------------------|--------------------|--------------------|
|                   |                               | Вид облучения                    |                    | Суммарный          |
|                   |                               | внутреннее                       | внешнее            |                    |
| Почва             |                               | $3 \times 10^{-8}$               | $3 \times 10^{-6}$ | $3 \times 10^{-6}$ |
| $^{137}\text{Cs}$ | 89                            | $3 \times 10^{-10}$              | $2 \times 10^{-6}$ | $2 \times 10^{-6}$ |
| $^{90}\text{Sr}$  | 160                           | $3 \times 10^{-8}$               | $2 \times 10^{-6}$ | $2 \times 10^{-6}$ |
| Вода              |                               | $4 \times 10^{-7}$               | –                  | $4 \times 10^{-7}$ |
| $^{137}\text{Cs}$ | 0,04                          | $2 \times 10^{-8}$               | –                  | $2 \times 10^{-8}$ |
| $^{90}\text{Sr}$  | 0,14                          | $4 \times 10^{-7}$               | –                  | $4 \times 10^{-7}$ |
| Пищевые продукты  |                               | $8 \times 10^{-7}$               | –                  | $8 \times 10^{-7}$ |
| $^{137}\text{Cs}$ |                               | $7 \times 10^{-8}$               | –                  | $7 \times 10^{-8}$ |
| $^{90}\text{Sr}$  |                               | $7 \times 10^{-7}$               | –                  | $7 \times 10^{-7}$ |
| Общий риск        |                               | $1 \times 10^{-6}$               | $3 \times 10^{-6}$ | $4 \times 10^{-6}$ |

Расчет радиационного риска для населения п. Старый Дунай по путям облучения техногенными радионуклидами, присутствующими в почве, питьевой воде и продуктах, показал, что основной вклад вносит внешнее облучение от техногенных радионуклидов почвы (табл. 5). Радиационный риск возникновения злокачественных новообразований для всего населения от техногенного облучения, оцененный по суммарной СГЭД [11], составил  $3 \times 10^{-6}$ , что соответствует области приемлемых значений.

Канцерогенный риск химического фактора за счет тяжелых металлов, присутствующих в почве, находится на уровне приемлемого  $1 \times 10^{-6}$  (табл. 6). Риск от использования питьевой воды колодцев и скважин  $5 \times 10^{-6}$  соответствует уровню приемлемого риска для населения. Исключение составляет использование в питьевых целях воды скважин глубиной 30–40 м, где риск за счет присутствия мышьяка, достигает  $5 \times 10^{-4}$ , что неприемлемо для населения в целом [13] и требует детальных исследований. Как отмечалось выше, источники хозяйственно-питьевого водоснабжения п. Старый Дунай расположены на значительном удалении от ПВХ б. Сысоева и не подвергаются техногенному воздействию источников выбросов и сбросов промышленной площадки. Присутствие мышьяка выше ПДК в воде скважин глубиной 30–40 м может быть обусловлено природной особенностью водоносного горизонта данной местности.

Проведенные исследования показали, что канцерогенный риск здоровью населения п. Старый Дунай, проживающего в районе размещения РЦКДХ, обусловленный воздействием

радиационного фактора, составляет  $4 \times 10^{-6}$  и не превышает риск химического фактора  $6 \times 10^{-6}$  (с учетом мышьяка в воде риск достигает  $5 \times 10^{-4}$ ).

## ВЫВОДЫ

В работе представлены результаты комплексной гигиенической оценки территории расположения РЦКДХ в Дальневосточном регионе России перед вводом его в эксплуатацию. На основе проведенных исследований показано, что радиационная обстановка на территории объекта строительства и прилегающей селитебной территории характеризуется фоновыми значениями мощности дозы  $\gamma$ -излучения и содержания техногенных радионуклидов  $^{137}\text{Cs}$  и  $^{90}\text{Sr}$  в объектах окружающей среды. Наряду с этим отмечено повышенное содержание тяжелых металлов и мышьяка в грунтах на территории строительства производственного комплекса и в почве приусадебных участков селитебной территории. Качественный состав химического загрязнения в зоне строительства РЦКДХ определяется повышенным содержанием мышьяка, свинца, цинка, никеля, меди, ванадия и марганца, в селитебной зоне — цинка, свинца и меди. В целом согласно гигиенической оценке содержания тяжелых металлов в почвах исследуемых территорий степень их химического загрязнения можно охарактеризовать как «допустимая», в ряде проб отмечается превышение ПДК. Качество питьевой воды в селитебной зоне соответствует требованиям, предъявляемым для подземных вод,

Таблица 6. Индивидуальный канцерогенный риск химического фактора для населения п. Старый Дунай

| Параметр                                 | Концентрация, мг/кг (л) | Индивидуальный канцерогенный риск |                     |                    |                    |
|------------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
|                                          |                         | Путь поступления                  |                     |                    | Суммарный          |
|                                          |                         | перорально                        | ингаляционно        | накожно            |                    |
| Почва                                    |                         | 4×10 <sup>-8</sup>                | 9×10 <sup>-7</sup>  | 3×10 <sup>-8</sup> | 1×10 <sup>-6</sup> |
| Cr                                       | 300                     | –                                 | 9×10 <sup>-7</sup>  | –                  | 9×10 <sup>-7</sup> |
| Pb                                       | 250                     | 4×10 <sup>-8</sup>                | 8×10 <sup>-10</sup> | 3×10 <sup>-8</sup> | 7×10 <sup>-8</sup> |
| Ni                                       | 47                      | –                                 | 2×10 <sup>-9</sup>  | –                  | 3×10 <sup>-9</sup> |
| Питьевая вода*                           |                         | 4×10 <sup>-6</sup>                | –                   | 8×10 <sup>-7</sup> | 5×10 <sup>-6</sup> |
| As                                       | 0,025                   | 5×10 <sup>-4</sup>                | –                   | 1×10 <sup>-5</sup> | 5×10 <sup>-4</sup> |
| Cd                                       | 0,00052                 | 2×10 <sup>-6</sup>                | –                   | 6×10 <sup>-7</sup> | 3×10 <sup>-6</sup> |
| Pb                                       | 0,02                    | 2×10 <sup>-6</sup>                | –                   | 2×10 <sup>-7</sup> | 2×10 <sup>-6</sup> |
| Общий канцерогенный риск* (вода + почва) |                         | 4×10 <sup>-6</sup>                | 9×10 <sup>-7</sup>  | 8×10 <sup>-7</sup> | 6×10 <sup>-6</sup> |

Примечание: \* — рассчитано без учета скважин глубиной 30–40 м.

используемых для децентрализованного водоснабжения, за исключением локальных скважин, где выявлено присутствие мышьяка выше ПДК. Наличие мышьяка в исследуемых подземных водах и почвах может быть обусловлено природной особенностью региона, связанной с повышенным содержанием этого элемента в объектах окружающей среды, что требует уточнения и проведения дальнейших исследований. Сравнительная оценка канцерогенного риска для здоровья населения от воздействия радиационного фактора и химического загрязнения окружающей среды показала сопоставимые результаты, ориентировочный уровень риска не превышает  $10^{-6}$  и является пренебрежимо малым. Результаты исследований позволяют заключить, что гигиеническая обстановка, определяемая прошлой и текущей

производственной деятельностью предприятия (до ввода в эксплуатацию РЦКДХ), не формирует дополнительных рисков для здоровья, обусловленных воздействием техногенных радионуклидов и тяжелых металлов на окружающую среду и население, проживающее в районе его расположения.

Результаты комплексной гигиенической оценки, полученные перед вводом в эксплуатацию РЦКДХ, являются основой для установления референсных значений содержания техногенных радионуклидов и тяжелых металлов в окружающей среде и могут быть использованы в практике регулирующего надзора за обеспечением безопасности населения в процессе эксплуатации предприятия.

## Литература

1. Удалова А. А., Гераскин С. А., Алексахин Р. М., Киселев С. М., Современные подходы к оценке радиационного воздействия на окружающую среду. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2013; 58 (4): 23–33.
2. Шандала Н. К., Киселев С. М., Титов А. В., Серёгин В. А., Исаев Д. В., Ахромеев С. В. и др. Регулирующий надзор и оценка радиационной обстановки в районах размещения бывших военных технических баз. Гигиена и санитария. 2013; 92 (3): 15–19.
3. Отчет по экологической безопасности Дальневосточного центра по обращению с радиоактивными отходами — филиала федерального государственного унитарного предприятия «Предприятие по обращению с радиоактивными отходами «РосРАО» (ДВЦ «ДальРАО» — филиала ФГУП «РосРАО»). 2019 г. Доступно по ссылке: <https://www.rosatom.ru/upload/iblock/109/109b27982c8cfd90a72224db545c17be.pdf>.
4. Нормы радиационной безопасности (НРБ-99/2009) от 02.07.2009. СанПиН 2.6.1.2523-09. Доступно по ссылке: [https://www.np-ciz.ru/userfiles/2\\_6\\_1\\_2523-09.pdf](https://www.np-ciz.ru/userfiles/2_6_1_2523-09.pdf).
5. Радиационная обстановка на территории России и сопредельных государств в 2019 г. Ежегодник. Министерство природных ресурсов и экологии Российской Федерации. Обнинск, 2020; 343 с. Доступно по ссылке: [https://www.rpatyphoon.ru/upload/medialibrary/187/ezhegodnik\\_ro\\_2019.pdf](https://www.rpatyphoon.ru/upload/medialibrary/187/ezhegodnik_ro_2019.pdf).
6. Статистические методы. Статистическое представление данных. Медиана. Определение точечной оценки и доверительных интервалов. ГОСТ Р ИСО 16269-7-2004. Доступно по ссылке: <https://docs.cntd.ru/document/1200035332>.
7. Ионизирующее излучение, радиационная безопасность. Проведение комплексного экспедиционного радиационно-гигиенического обследования населенного пункта для оценки доз облучения населения. Методические рекомендации. МР 2.6.1.0006-10. Доступно по ссылке: <https://docs.cntd.ru/document/1200085909>.
8. Ионизирующее излучение, радиационная безопасность. Контроль доз облучения населения, проживающего в зоне наблюдения радиационного объекта, в условиях его нормальной эксплуатации и радиационной аварии. Методические рекомендации. МР 2.6.1.0063-12. Доступно по ссылке: <https://docs.cntd.ru/document/1200095229>.
9. Почва, очистка населенных мест, бытовые и промышленные отходы, санитарная охрана почвы. Гигиеническая оценка качества почвы населенных мест. Методические указания. МУ 2.1.7.730-99. Доступно по ссылке: <https://docs.cntd.ru/document/1200003852>.
10. Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания. СанПиН 1.2.3685-21. Доступно по ссылке: <https://docs.cntd.ru/document/573500115>.
11. Оценка радиационного риска у населения за счет длительного равномерного техногенного облучения в малых дозах. Методические указания. МУ 2.1.10.3014-12. Доступно по ссылке: <https://docs.cntd.ru/document/1200095241>.
12. Методика оценки радиационных рисков на основе данных мониторинга радиационной обстановки. Рекомендации. Р 52.18.787-2013. Обнинск: ФГБУ «ВНИИГМИ-МЦД», 2014; 116 с. Доступно по ссылке: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293754/4293754569.pdf>.
13. Руководство по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду. Рекомендации. Р 2.1.10.1920-04. Доступно по ссылке: <https://docs.cntd.ru/document/1200037399>.
14. Ахромеев С. В., Киселев С. М., Титов А. В., Серёгин В. А., Шлыгин В. В., Старинская Р. А. Исследование радиационной обстановки на объектах ядерного наследия в Дальневосточном регионе России. АНРИ. 2016; 1 (84): 65–71.
15. Основные санитарные правила обеспечения радиационной безопасности (ОСПОРБ-99/2010). СП 2.6.1.2612-10. Доступно по ссылке: [https://orfi.ru/files/doc/uchcenter/osporb\\_2612612-10.pdf](https://orfi.ru/files/doc/uchcenter/osporb_2612612-10.pdf).
16. Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. СанПиН 2.3.21078-01. Доступно по ссылке: <https://docs.cntd.ru/document/901806306>.
17. Shandala NK, Sneve MK, Titov AV, Smith GM, Novikova NYa, Romanov VV, et al. Radiological criteria for the remediation of sites for spent fuel and radioactive waste storage in the Russian Northwest. Journal of Radiological Protection. 2008; 28: 479–97.

## References

1. Udalova AA, Geraskin SA, Aleksahin RM, Kiselev SM, Sovremennye podhody k ocenke radiacionnogo vozdeystviya na okruzhajushhuyu sredu. Medicinskaja radiologija i radiacionnaja bezopasnost'. 2013; 58 (4): 23–33. Russian.
2. Shandala NK, Kiselev SM, Titov AV, Serjogin VA, Isaev DV, Ahromeev SV, i dr. Regulirujushhij nadzor i ocenka radiacionnoj obstanovki v rajonah razmeshhenija byvshih voennyh tehniceskikh baz. Gigiena i sanitarija. 2013; 92 (3): 15–19. Russian.
3. Otchet po jekologicheskoj bezopasnosti Dal'nevostochnogo centra po obrashheniju s radioaktivnymi othodami — filiala federal'nogo gosudarstvennogo unitarnogo predprijatija «Predpriatie po obrashheniju s radioaktivnymi othodami «RosRAO» (DVC «Dal'RAO» — filiala FGUP «RosRAO»). 2019 g. Dostupno po ssylke: <https://www.rosatom.ru/upload/iblock/109/109b27982c8cfd90a72224db545c17be.pdf>. Russian.
4. Normy radiacionnoj bezopasnosti (NRB-99/2009) ot 02.07.2009.

- SanPiN 2.6.1.2523-09. Dostupno po ssylke: [https://www.np-ciz.ru/userfiles/2\\_6\\_1\\_2523-09.pdf](https://www.np-ciz.ru/userfiles/2_6_1_2523-09.pdf). Russian.
5. Radiacionnaja obstanovka na territorii Rossii i sopredel'nyh gosudarstv v 2019 g. Ezhegodnik. Ministerstvo prirodnyh resursov i jekologii Rossijskoj Federacii. Obninsk, 2020; 343 s. Dostupno po ssylke: [https://www.rpatyphoon.ru/upload/medialibrary/187/ezhegodnik\\_ro\\_2019.pdf](https://www.rpatyphoon.ru/upload/medialibrary/187/ezhegodnik_ro_2019.pdf). Russian.
  6. Statisticheskie metody. Statisticheskoe predstavlenie dannyh. Mediana. Opredelenie tochechnoj ocenki i doveritel'nyh intervalov. GOST R ISO 16269-7-2004. Dostupno po ssylke: <https://docs.cntd.ru/document/1200035332>. Russian.
  7. Ionizirujushhee izluchenie, radiacionnaja bezopasnost'. Provedenie kompleksnogo jekspedicionnogo radiacionnogo-gigienicheskogo obsledovaniya naselennogo punkta dlja ocenki doz oblucheniya naselenija. Metodicheskie rekomendacii. MR 2.6.1.0006-10. Dostupno po ssylke: <https://docs.cntd.ru/document/1200085909>. Russian.
  8. Ionizirujushhee izluchenie, radiacionnaja bezopasnost'. Kontrol' doz oblucheniya naselenija, prozhivajushhego v zone nabljudeniya radiacionnogo ob"ekta, v uslovijah ego normal'noj jekspluatcii i radiacionnoj avarii. Metodicheskie rekomendacii. MR 2.6.1.0063-12. Dostupno po ssylke: <https://docs.cntd.ru/document/1200095229>. Russian.
  9. Pochva, ochistka naselennyh mest, bytovye i promyshlennye othody, sanitarnaja ohrana pochvy. Gigienicheskaja ocenka kachestva pochvy naselennyh mest. Metodicheskie ukazaniya. MU 2.1.7.730-99. Dostupno po ssylke: <https://docs.cntd.ru/document/1200003852>. Russian.
  10. Gigienicheskie normativy i trebovaniya k obespečeniju bezopasnosti i (ili) bezvrednosti dlja cheloveka faktorov sredy obitaniya. SanPiN 1.2.3685-21. Dostupno po ssylke: <https://docs.cntd.ru/document/573500115>. Russian.
  11. Ocenka radiacionnogo riska u naselenija za schet dlitel'nogo ravnomernogo tehnogennogo oblucheniya v malyh dozah. Metodicheskie ukazaniya. MU 2.1.10.3014-12. Dostupno po ssylke: <https://docs.cntd.ru/document/1200095241>. Russian.
  12. Metodika ocenki radiacionnyh riskov na osnove dannyh monitoringa radiacionnoj obstanovki. Rekomendacii. R 52.18.787-2013. Obninsk: FGBU «VNIIGMI-MCD», 2014; 116 s. Dostupno po ssylke: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293754/4293754569.pdf>. Russian.
  13. Rukovodstvo po ocenke riska dlja zdorov'ja naselenija pri vozdejstvii himicheskikh veshhestv, zagraznjajushhih okruzhajushhuju sredu. Rekomendacii. R 2.1.10.1920-04. Dostupno po ssylke: <https://docs.cntd.ru/document/1200037399>. Russian.
  14. Akhromeev SV, Kiselev SM, Titov AV, Seregin VA, Shlygin VV, Starinskaja RA. Issledovanie radiacionnoj obstanovki na ob"ektah jadernogo nasledija v Dal'nevostochnom regione Rossii. ANRI. 2016; 1 (84): 65–71. Russian.
  15. Osnovnye sanitarnye pravila obespechenija radiacionnoj bezopasnosti (OSPORB-99/2010). SP 2.6.1.2612-10. Dostupno po ssylke: [https://orfi.ru/files/doc/uchcenter/osporb\\_2612612-10.pdf](https://orfi.ru/files/doc/uchcenter/osporb_2612612-10.pdf).
  16. Gigienicheskie trebovaniya k bezopasnosti i pishhevoj cennosti pishhevyh produktov. SanPiN 2.3.21078-01. Dostupno po ssylke: <https://docs.cntd.ru/document/901806306>. Russian.
  17. Shandala NK, Sneve MK, Titov AV, Smith GM, Novikova NYa, Romanov VV, et al. Radiological criteria for the remediation of sites for spent fuel and radioactive waste storage in the Russian Northwest. Journal of Radiological Protection. 2008; 28: 479–97.

## СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ *IN VITRO* ФАРМАКОЛОГИИ ПРОТОТИПОВ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛЕКАРСТВ: БИБЛИОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЗА 2020–2021 ГГ.

П. В. Ершов , А. С. Макарова

Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Выявление новых низкомолекулярных соединений, обладающих противоопухолевой активностью, является первым важным шагом на пути создания кандидатных лекарств и популярным направлением в *in vitro* фармакологии. Целью исследования было оценить ключевые тенденции и ранжировать научные приоритеты в области дизайна противоопухолевых лекарств с применением библиометрического анализа. Протокол предполагал использование панели библиографических баз данных (PubMed, Scopus, Cortellis) и аналитических ресурсов PubChem, FACTA+, ClustVis, Reaxys, PathwayStudio и VOSviewer для исследования выборки из 1657 публикаций за 2020–2021 гг. В работе также систематизирован материал по 70 новым перспективным производным на основе базовых химических структур, нацеленных на ингибирование отдельных про-опухолевых белковых молекул и сигнальных каскадов. Установлено, что серин-треониновые протеинкиназы, рецепторные тирозинкиназы, ДНК-топоизомеразы и тубулины, а также сигнальные пути PI3K, mTOR, AKT1, STAT3, HIF-1a и p53 составляют до 60% в общей структуре клеточных мишеней для дизайна противоопухолевых лекарств. Отмечен рост научного интереса к инновационным ингибиторам опухоли-ассоциированных белковых комплексов, факторов транскрипции и метаболических ферментов. Соединения из класса гетероциклов, гликозидов, хинонов и терпенов в 71% работ служат базовыми структурами для дизайна противоопухолевых производных. Лидирующие позиции по цитированию занимают вышедшие в 2019 г. публикации, в которых рассмотрены такие соединения, как лапахон, лутеолин, кверцетин, монастrol и кризоспленол D, в контексте дизайна новых прототипов лекарств. Системный библиометрический подход с использованием панели аналитических ресурсов позволяет оценить тенденции в области разработки и дизайна противоопухолевых лекарств и выявить приоритеты научного интереса, органично дополняя классические обзорные работы в периодических изданиях.

**Ключевые слова:** рак, лекарства, фармакология, библиометрический анализ, публикационная активность, белковые мишени

**Вклад авторов:** П. В. Ершов — поиск литературы, написание и оформление текста статьи, концептуализация статьи; А. С. Макарова — поиск литературы, редактирование статьи.

✉ **Для корреспонденции:** Павел Викторович Ершов  
ул. Погодинская, д. 10, стр. 1, г. Москва, 119121; pavel79@inbox.ru

**Статья получена:** 21.07.2021 **Статья принята к печати:** 18.08.2021 **Опубликована онлайн:** 27.09.2021

**DOI:** 10.47183/mes.2021.033

## CURRENT TRENDS IN ANTICANCER DRUG PROTOTYPE *IN VITRO* PHARMACOLOGY: BIBLIOMETRIC ANALYSIS 2019–2021

Ershov PV , Makarova AS

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

Identification of novel low molecular weight compounds with antitumor activity is the first important step towards the development of candidate drugs and a popular trend in *in vitro* pharmacology. The aim of the study was to assess the key trends and rank the scientific priorities in anticancer drug design using bibliometric analysis. The protocol involved using the panel of bibliographic databases (PubMed, Scopus, Cortellis) and analytical web-based tools PubChem, FACTA+, ClustVis, Reaxys, PathwayStudio and VOSviewer software to review a sample of 1657 papers issued 2020–2021. The work was also focused on 70 new promising basic structures and derivatives targeted at inhibiting both individual pro-tumor proteins and signaling cascades. It was found that serine-threonine protein kinases, receptor tyrosine kinases, DNA topoisomerases and tubulins as well as signaling pathways PI3K, mTOR, AKT1, STAT3, HIF-1a, and p53 account for up to 60% of the total structure of cellular targets for the design of anticancer drugs. The increasing scientific interest in innovative inhibitors of tumor-associated protein complexes, transcription factors and metabolic enzymes has been found. The compounds, which belong to heterocycles, glycosides, quinones and terpenes, were mentioned in 71% of papers as the basic structures for antitumor derivatives design. Papers, published in 2019, in which the compounds, such as lapachone, luteolin, quercetin, monastrol, and crisosplenol D are studied in the context of the design of new drug prototypes, have the highest citation rate. The systematic bibliometric approach involving the use of a panel of analytical resources makes it possible to assess R&D trends and scientific priorities in anticancer drug design, thus organically complementing the classic reviews in periodicals.

**Keywords:** cancer, drugs, pharmacology, bibliometric analysis, publication activity, protein target

**Author contribution:** Ershov PV — literature search, manuscript writing and formatting, conceptualization of the paper; Makarova AS — literature search, manuscript editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Pavel V. Ershov  
Pogodinskaya, 10, korp 1, Moscow, 119121; pavel79@inbox.ru

**Received:** 21.07.2021 **Accepted:** 18.08.2021 **Published online:** 27.09.2021

**DOI:** 10.47183/mes.2021.033

Прогресс в фармакотерапии социально значимых заболеваний, в том числе злокачественных новообразований (ЗНО), органично связан с успехом идентификации и разработки (R&D) новых прототипов противоопухолевых лекарств. Эти исследования сосредоточены на селекции лидерных фармакологически активных малых молекул с наибольшим противоопухолевым действием и максимальным соответствием физико-химических параметров каноническим лекарствовподобным (drug-like) структурам [1]. Один из научно обоснованных подходов к поиску лекарств состоит в направленном дизайне молекул, которые обладают заданными свойствами

и воздействуют на известные клинически значимые белковые мишени [2–4]. Определение молекулярных механизмов действия прототипов противоопухолевых лекарств, как и картирование всего возможного спектра специфических или неспецифических белковых мишеней, на которые они потенциально могут воздействовать, необходимо для оптимизации дизайна высокоселективных препаратов с минимальным побочным действием.

Разработка усовершенствованных противоопухолевых лекарств обусловлена свойствами самих опухолей: меж- и внутриопухолевой гетерогенностью, а также многообразием механизмов развития резистентности [5].

С другой стороны, для многих терапевтических подходов необходимо добиться улучшения показателей «польза–вред», поскольку многие существующие препараты могут вызывать тяжелые побочные эффекты [6].

Ежегодное число публикаций, посвященных идентификации новых малых молекул пептидной и непептидной природы с новым спектром противоопухолевой активности, репозиционированию известных лекарств и выявлению новых назначений среди существующих противоопухолевых препаратов, составляет около 2700–3400 (за пятилетний период по данным ресурса PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) на 20 мая 2021 г.). Следует отметить, что тематические обзорные статьи главным образом направлены либо на систематизацию данных по прототипам противоопухолевых лекарств, принадлежащих к определенной группе согласно химической классификации, или к производным веществ на основе какой-либо одной базовой химической структуры, либо сфокусированы на рассмотрении узкого спектра биологически активных веществ в контексте одной молекулярной мишени. Политематические обзорные работы являются одним из основных результатов анализа периодической научной информации для описания существующих трендов. Так, работы [7, 8] охватывают актуальные молекулярные мишени для противоопухолевых лекарств, оценку биологических эффектов и концепций дизайна, который в последние годы неразрывно связан с компьютерным моделированием лекарств (QSAR и другие программы) [9]. Вместе с тем, поиск актуальных тенденций разработок прототипов лекарств и трактовка медико-биологических эффектов разных веществ, обладающих противоопухолевой активностью, приводят к необходимости анализа массива данных большой выборки литературных источников, что без применения специализированных алгоритмов и ресурсов автоматизированных методов извлечения информации (т. н. text mining) требует больших временных затрат. При этом использование адаптированных алгоритмов библиометрического анализа для составления актуального «аналитического портрета», включающего в себя более разнородный репертуар результатов исследований в области идентификации прототипов лекарств и их молекулярных мишеней, уже показало свою эффективность в выявлении современных трендов в молекулярной онкологии и фармакологии [10–13].

По этой причине в рамках настоящего исследования были проведены актуализация и выявление приоритетных ветвей в дизайне и разработке новых прототипов лекарств с противоопухолевым действием с помощью панели инструментов библиометрического анализа. Целью исследования было оценить ключевые тенденции и ранжировать научные приоритеты в области дизайна противоопухолевых лекарств с применением библиометрического анализа.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Ресурс PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) использовали для поиска журнальных публикаций (глубина поиска 20.05.2020–19.05.2021) по ключевым словам: «antitumor and anticancer activity». Критерии включения: максимальное соответствие «наибольшему совпадению» (best match) и тип публикации «оригинальная экспериментальная работа», описывающая новые научные данные в области идентификации прототипов противоопухолевых лекарств. Критерии исключения

составляли следующие типы публикаций: «Books and Documents», «Clinical Trial», «Meta-Analysis», «Randomized Controlled Trial», «Review», и «Systematic Review». Всего было найдено 1902 документов, из которых впоследствии были исключены 240 обзоров (Review) и пять клинических исследований (Clinical trials). Из оставшихся 1657 экспериментальных работ, после анализа содержания их рефератов, в целевую выборку были отобраны 402 публикации.

Программа свободного доступа VOSviewer [14] была использована для анализа ко-встречаемости (от англ. co-occurrence) ключевых слов в файлах с библиографическими данными публикаций целевой выборки, выгруженных с ресурса PubMed (формат файлов nbib) и для анализа частоты встречаемости ключевых слов (группы MeSH термины и авторских терминов) в рефератах публикаций.

Извлеченные из рефератов (abstract) публикаций и перечня ключевых слов названия соединений непептидной природы с охарактеризованным спектром противоопухолевой активности анализировали на предмет принадлежности к классификационным группам MeSH (Classification/Ontologie/MeSH-Tree, ресурс PubChem Национальной Медицинской Библиотеки США (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)).

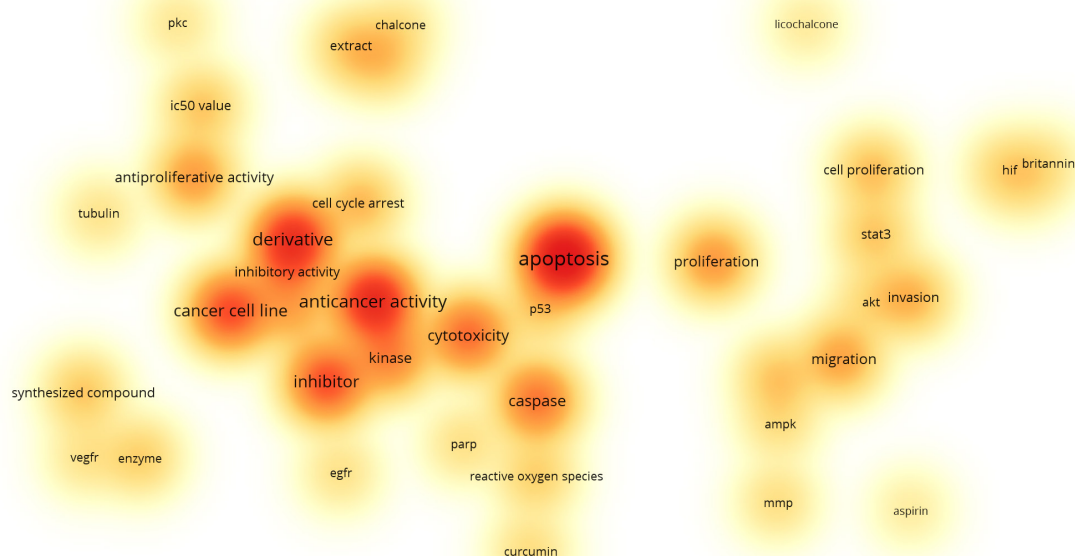
Анализ трендов публикационной активности за пятилетний период (2016–2020 г.) выполняли при помощи аналитического ресурса Scopus (Elsevier; Нидерланды). В качестве поисковых запросов использовался следующий ключ: «название соединения and tumor», например, «magnolol and tumor». Научный интерес к публикациям, вышедшим в 2019 г., оценивали по общему числу цитирующих их публикаций, вышедших до 19 мая 2021 г., с поправкой на самоцитирование всех соавторов публикации. Еще одним параметром оценки было среднее число цитирований на одну публикацию, вышедшую в 2019 г.

Ассоциации между белковыми мишенями организма, вовлеченностью их в канцерогенез и прототипами лекарств определяли при помощи онлайн-ресурсов Pathway studio и Reaxys (Elsevier; Нидерланды). Они позволяют извлекать информацию о взаимосвязях между биологическими, медицинскими и молекулярными сущностями из двух десятков миллионов рефератов и нескольких миллионов полнотекстовых публикаций, используя программу Medscan, выполнять поиск и предсказание мишеней для лекарств, а также конструировать и анализировать сигнальные пути из внутренней курируемой базы данных. Для создания карты взаимодействий в Pathway studio был проведен поиск связей конкретных молекулярных мишеней с ключевыми биологическими процессами «malignant transformation» и «cancer progression».

Онлайн-ресурс FACTA+ (<http://www.nactem.ac.uk/facta/>) v.0.9 (29/06/2019) использовали для поиска биологических ассоциаций по полнотекстовым документам базы MEDLINE.

Онлайн-ресурс Cortellis (Clarivate Analytics; Великобритания) был использован для патентного поиска.

Анализ главных компонент (principal component analysis, PCA) по методу *k*-средних (*k*-means clustering) и построение тепловой карты (heat map) выполняли с использованием ресурса ClustVis [15]. Для PCA использовали метод разложения по сингулярным числам с импутацией (Singular Values Decomposition with imputation), который позволяет сгенерировать и визуализировать геометрическую структуру массива числовых данных, при этом восстанавливая недостающие значения (импутация).



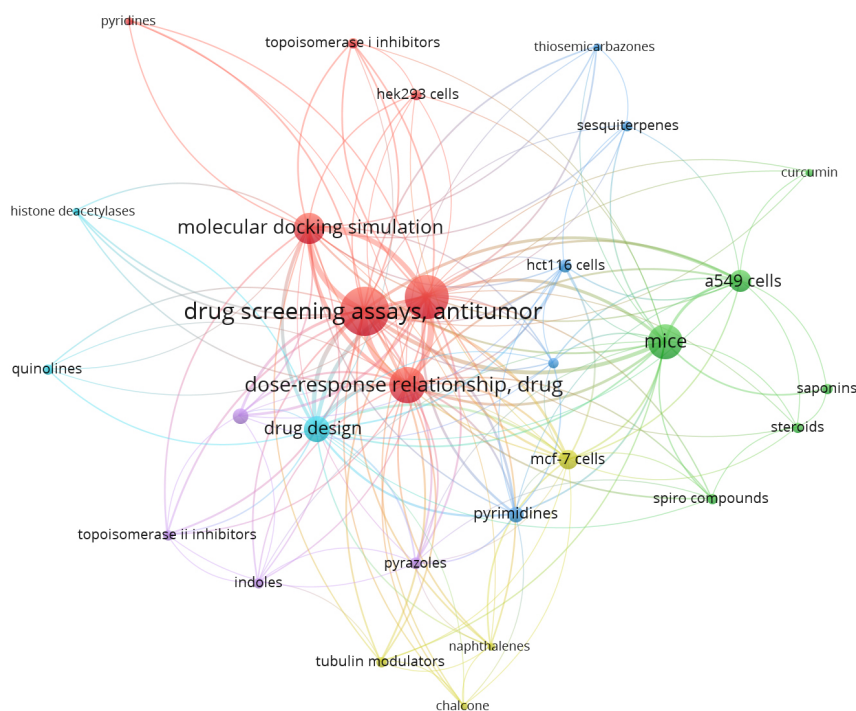
**Рис. 1.** Тепловая карта частоты встречаемости ключевых слов (MeSH термины и авторские термины) при анализе текстов синопсисов (abstract) публикаций. MeSH — медицинские предметные рубрики (Medical Subject Headings)

Опции пре-процессинга данных: трансформация данных — «no transformation»; масштабирование ряда — «no scaling». Опции тепловой карты: кластерное расстояние для рядов и столбцов — корреляция по Пирсону или «correlation»; метод кластеризации для рядов и столбцов — «average».

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ текстов рефератов в целевой выборке из 402 публикаций позволил выявить распределение частоты встречаемости терминов, которые имели отношение к

идентификации прототипов противоопухолевых лекарств и были упомянуты в текстовом массиве более 10 раз (рис. 1). На рисунке представлены акценты в изучении фармакологического таргетирования сигнальных путей с участием RAC серин/треонин киназы — (АКТ1), активатора транскрипции 3 (STAT3), индуцируемого гипоксией фактора 1- $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) и p53. Также можно выделить непосредственные белковые мишени, ассоциированные с канцерогенезом: протеинкиназы (РКС и АМПК), тубулин, металлопротеиназы (ММР), поли-(АДФ-рибоза)-полимераза 1 (PARP1), рецептор эпидермального фактора



**Рис. 2.** Распределение ко-встречаемости ключевых слов (MeSH термины и авторские термины) при анализе массива библиографических данных для выборки публикаций. MeSH — медицинские предметные рубрики (Medical Subject Headings)



Рис. 3. Количественное распределение групп органических соединений неперпидной природы, которые позиционируются в качестве новых прототипов противоопухолевых лекарств

роста (EGFR), рецептор фактора роста эндотелия (VEGFR). Помимо того, таргетирование каспаз с целью активации апоптотической программы в опухолевых клетках является еще одним важным направлением исследований.

Визуальное представление результатов ко-встречаемости ключевых слов, которые были упомянуты более чем в трех публикациях, приведено на рис. 2. На нем представлены пять кластеров с семантическими связями между ключевыми словами. Так, выраженная ко-встречаемость

имела место в следующих парах: гистондеацетилаза – хинолины; ингибиторы топоизомеразы – индолы (или пиразолы, или пиримидины); модуляторы тубулина – халконы (или нафталены). Итак, анализ текстов синопсисов публикаций и ко-встречаемости ключевых слов (рис. 1 и 2) позволил выявить наличие исследований по дизайну производных с противоопухолевой активностью на основе халкона и ликохалкона (флавоноидов с незамкнутым пирановым кольцом), нафталена, сапонины,

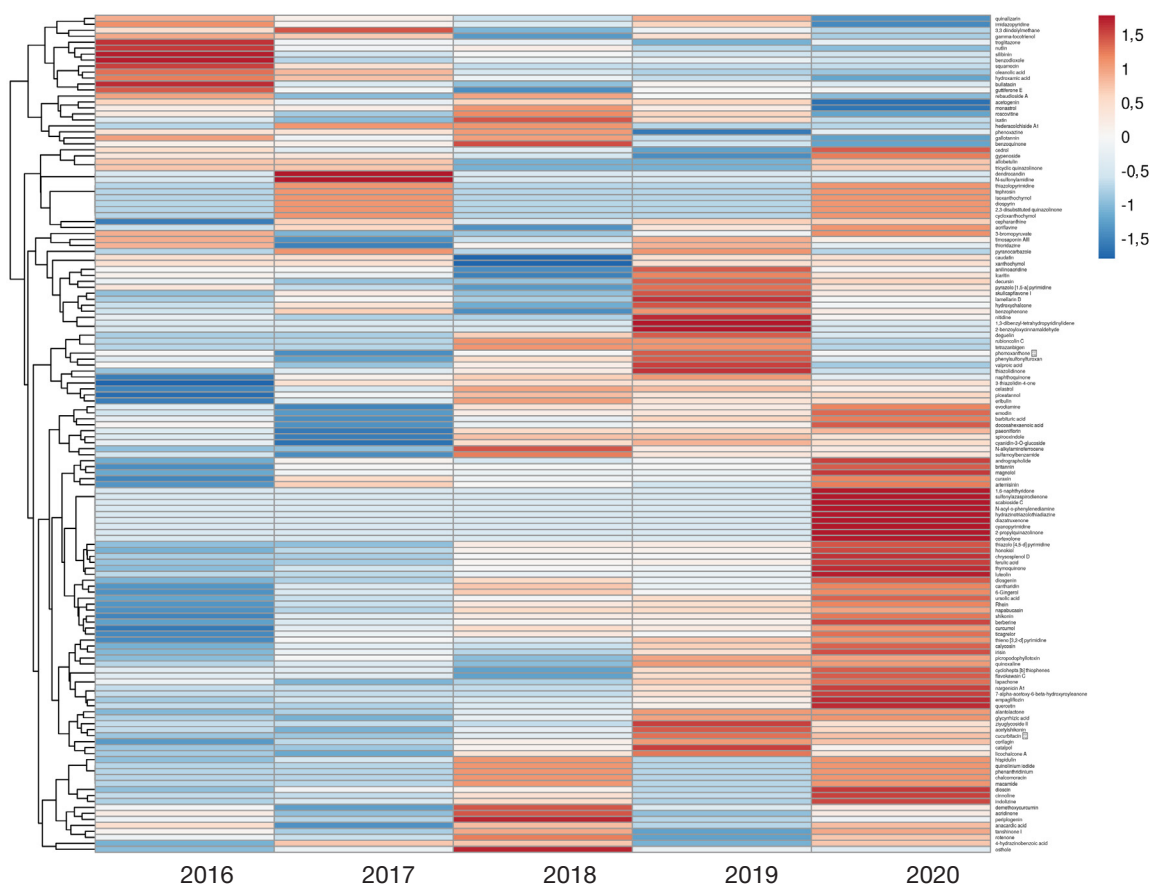
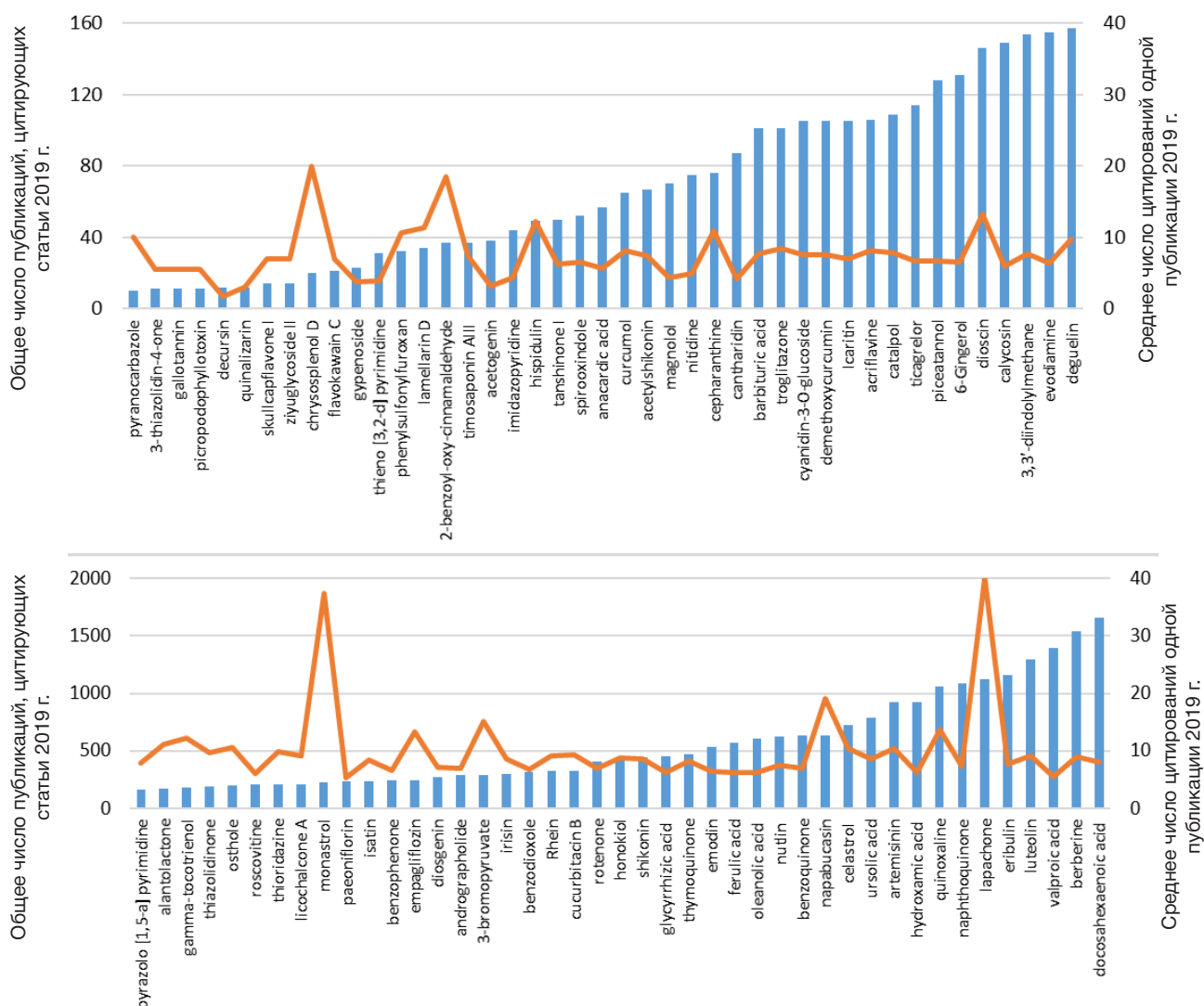


Рис. 4. Тепловая карта динамики публикационной активности за 2016–2020 гг. по тематике идентификации новых прототипов лекарств с противоопухолевой активностью. Обозначения: шкала в легенде — кластерное расстояние; снижение и увеличение числа публикаций по годам выделено красным и синим цветом соответственно

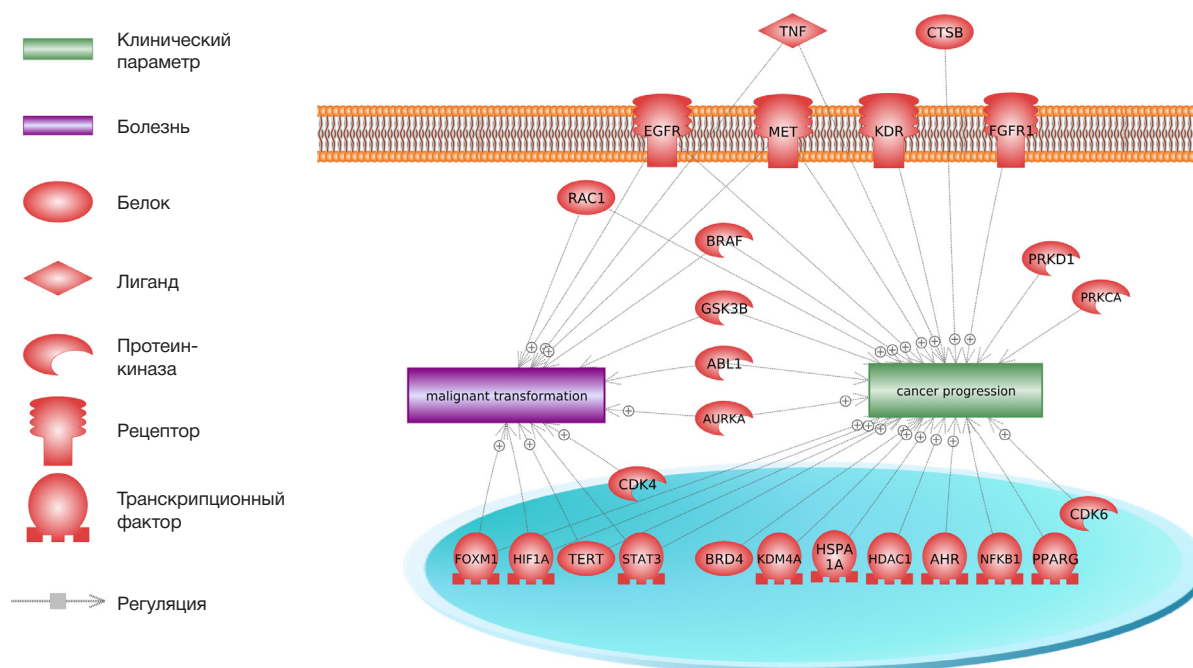


**Рис. 5.** Диаграмма цитирований публикаций, вышедших в 2019 г. и посвященных дизайну и разработке прототипов противоопухолевых лекарств. На диаграмме приведены оригинальные названия соединений

индола, хинолона, сесквитерпена, пиразола, пиридина (пиридина), стероидов и куркумина и британина (britanin). Интересно отметить, что достаточное количество публикаций было посвящено совершенствованию дизайна ингибиторов полимеризации тубулина [16], и число новых работ в данной области, согласно статистике ресурса PubMed за 10-летний период, оставалось на плато, с началом их некоторого снижения в 2019–2020 гг., что может свидетельствовать о снижении научного интереса к этому направлению. На рис. 1 и 2 также показано, что культуры иммортализованных эмбриональных клеток почки человека HEK293, клеток колоректального рака HCT116, клеток карциномы легких A549 и аденокарциномы протоков молочной железы MCF-7 получили преимущественное распространение в качестве модельных *in vitro* систем. Их использовали для фенотипического скрининга с целью выявления спектра биологической активности новых прототипов лекарств, которые были получены как в процессе органического синтеза, так и были выделены из растений, морских водорослей и грибов. Часть лекарственных растений используется в этно-фармакологической медицине (например, в КНР), что обусловило определенный вклад ученых из этой страны в публикационную активность по данной тематике.

На рис. 3 показано, что наибольшая представленность имела место для соединений из класса гетероциклов, гликозидов, хинонов и терпенов, которые в общей сложности составили 71% в общей структуре распределения. Важно обратить внимание на последнюю группу (терпены и терпеноиды), которая имеет высокий научный приоритет и которую в настоящее время рассматривают в качестве активного «донора» новых базовых структур для разработки прототипов противоопухолевых лекарств [17]. Кроме того, анализ частоты встречаемости названий химических соединений в синопсисах целевой выборки публикаций показал, что можно выделить не менее 29 наиболее популярных химических структур (акридин, антрахинон, дибензил, стильбен, фенантридин, пиранокарбазол, бензопиран, имидазола-пиридин, индол, индолизин, нафтиридин, фталазин, хиназолинон, хиноксалин, хинолин и циннолин), используемых в органическом синтезе новых производных с противоопухолевой активностью и иным спектром [18, 19]. Так, на долю производных на основе индола, хинолина, акридина и пиридина в общей сложности приходится до 35% от всех производных.

Визуализация результатов анализа трендов публикационной активности за пятилетний период (2016–2020 гг.) для 150 соединений (в числе которых были названия химических структур синтетического



**Рис. 6.** Анализ связей белковых мишеней прототипов противоопухолевых лекарств со злокачественной трансформацией («malignant transformation») и опухолевой прогрессией («cancer progression») при помощи ресурса Pathway Studio

(46%) и соединений природного происхождения (54%)) приведена на рис. 4. Логично выделить дискретную группу соединений (например, производные 1,6-нафтипиридона, сульфонил-аза-спироидиенона, N-ацил-о-фенилендиамина и скабиозида С), для которых противоопухолевая активность была выявлена впервые. Также на рис. 4 виден рост научного интереса к разработкам прошлых лет (например, к производным диоскина, циннолина, индолизина, наргеницина А1 и кверцетину), что следует из роста числа публикаций, вышедших в 2020 г., в которых описаны новые спектры противоопухолевых эффектов этой группы соединений. С другой стороны, публикационная активность с упоминанием производных тиазолидиндиона (троглитазон), нутлина, силибина, сквамочиона, производных бензодиоксола, олеаноловой и гидроксамовых кислот в 2018–2020 гг. плавно снижалась по сравнению с периодом 2016–2017 гг.

Помимо исследования динамики числа публикаций, был выполнен анализ цитирования работ, опубликованных в 2019 г., которые были посвящены идентификации и дизайну прототипов противоопухолевых лекарств. Согласно числу цитирований этих работ за период 2019–2021 гг. (минимальный порог — 1000 цитирований), научный интерес был сфокусирован на производных хиноксалина, нафтохинона, берберина, вальпроовой и докозагексаеновой кислот, а также лапахоне (lapachone), лютеолине (luteolin) и кверцетине (quercetin), причем последний является лидером по числу цитирований (4200) (см. рис. 5). Однако по среднему числу цитирований одной публикации, вышедшей в 2019 г. (минимальный порог 15 цитирований), лидировали публикации с упоминанием кризоспленоло D, 2-бензоил-окси-циннамальдегида, монастрола и лапахона в контексте дизайна новых прототипов противоопухолевых лекарств.

Область разработки эффективных прототипов противоопухолевых лекарств неразрывно связана со смежной и не менее наукоемкой областью идентификации молекулярных мишеней организма человека, на которые воздействуют фармакологически активные соединения.

Работы в этом комплементарном направлении сопряжены с выявлением механизмов действия малых молекул, что критически важно для дифференциации их основного эффекта и побочного действия, а также для дизайна высокоселективных соединений, действующих на заданный достоверно известный спектр молекулярных мишеней. Подавляющее большинство клинически значимых мишеней организма являются мономерными белками или олигомерными белковыми комплексами [20]. Так, поиск белковых мишеней для ряда приоритетных прототипов противоопухолевых лекарств (рис. 5) в базе данных Reaxys позволил далее установить, что за исключением кризоспленоло D для трех остальных соединений были картированы молекулярные мишени. Близкий по структуре гомолог 2-бензоил-окси-циннамальдегида, ((E)-2-(3-оксопроп-1-ен-1-ил) фенилбензоат, как оказалось, ингибирует ферментативную активность циклин-зависимой киназы 4, CDK4 (Target ID: 820056979), глутатион-редуктазы (Target ID: 820106479) и фарнезил-трансферазы (Target ID: 470858527). Вместе с тем, производные на основе монастрола и лапахона имеют более оптимальные лекарствовподобные свойства (соответствие параметрам «rule of five» [21]), чем 2-бензоил-окси-циннамальдегид, и более широкий научный задел по идентификации спектра их молекулярных мишеней в организме. В базе данных Reaxys занесены 31 и 117 записей (по состоянию на 29 мая 2021 г.) о мишенях монастрола и лапахона соответственно. Среди них можно выделить такие белки, как протеинкиназа Aurora A (Reaxys Target ID: 818366617), фосфатаза 2 M-фазы (Target ID: 820046846), ДНК-топоизомераза I (Target ID: 818289566), ДНК-топоизомераза II (Target ID: 824645880), глутатион-S-трансфераза P (Target ID: 820104166), варианты ГТФазы K-Ras (Target ID: 819104337) с заменами G12C и Q61R, NAD(P)H кинон дегидрогеназа 1 (Target ID: 820009294).

Из целевой выборки публикаций были отобраны те, в которых описаны результаты экспериментов по картированию молекулярных мишеней и исследованию механизмов действия для новых соединений

Таблица. Взаимосвязь биологической активности новых прототипов противоопухолевых лекарств с их молекулярными мишенями

| Название биологически активного соединения                                         | Описание                                                                          | Источник |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>Молекулярные мишени и механизм действия</b>                                     |                                                                                   |          |
| LQFM126                                                                            | Ингибитор ББВ MDM2 и p53                                                          | [22]     |
| E7386                                                                              | Ингибитор ББВ $\beta$ -катенина и CREB                                            | [23]     |
| Британин                                                                           | Ингибитор ББВ HIF-1 $\alpha$ и Myc                                                | [24]     |
| Миконазол*                                                                         | Ингибитор ББВ DDIAS и STAT3                                                       | [25]     |
| 5F-203                                                                             | Активатор арил-гидрокарбонового рецептора (AHR)                                   | [26]     |
| Эмодин                                                                             | Активатор AHR                                                                     | [27]     |
| Производные 3,4-(пиримидин-2-ил-амино) бензоил-гидразин-1-карбоксамид/карботиамида | Антагонист рецептора ретинойдной кислоты $\alpha$ (RXR $\alpha$ )                 | [28]     |
| Конъюгат на основе эпигаллокатехина-3-галат-4 $\beta$ -триазолоподофиллоксина      | Ингибитор ДНК-топоизомеразы II (TOP2)                                             | [29]     |
| Производные трициклического хиназолинона                                           | Ингибитор ДНК-топоизомеразы I (TOP1)                                              | [30]     |
| Производные 5 (или 6)-нитро-2-бензоксазол, 2-оксазоло [4,5-b] пиридина             | Ингибитор TOP1 и TOP2                                                             | [31]     |
| Ламелларин D                                                                       | Ингибитор TOP1                                                                    | [32]     |
| Хёхст 33342                                                                        | Ингибитор TOP1                                                                    | [33]     |
| Производные 3-(1H-индол-3-ил)-2,3,3a,4-тетрагидротиохромено [4,3-c] пиразола       | Ингибитор TOP2                                                                    | [34]     |
| Производные 2,3-дигидропиразино [1,2-a] индол-1,4-диона                            | Ингибитор тирозинкиназы EGFR и мутантного варианта серин/треонинкиназы BRAF V600E | [35]     |
| Производные 4-гидроксихиназолина                                                   | Ингибитор тирозинкиназы VEGFR2                                                    | [36]     |
| DW14383                                                                            | Ингибитор тирозинкиназы FGFR                                                      | [37]     |
| Конъюгаты на основе пиперазина и халкона                                           | Ингибитор тирозинкиназы VEGFR                                                     | [38]     |
| Производные 1,6-нафтиридоны                                                        | Ингибитор тирозинкиназы c-MET                                                     | [39]     |
| Производные N-сульфонамида                                                         | Ингибитор тирозинкиназы c-MET                                                     | [40]     |
| Dp44mT                                                                             | Ингибитор протеинкиназы AMPK                                                      | [41]     |
| Тигиланол тиглат                                                                   | Активатор протеинкиназы C (PKC)                                                   | [42]     |
| Производные эпокситиглиана                                                         | Активаторы протеинкиназы C (PKC)                                                  | [42]     |
| Производные изоксазоло [4,5e] [1,2,4] триазепина                                   | Ингибитор протеинкиназы C (PKC)                                                   | [43]     |
| Производные пиразоло [3,4-d] пиримидина                                            | Ингибитор протеинкиназы D (PKD)                                                   | [44]     |
| TAS-119                                                                            | Ингибитор протеинкиназы AURKA                                                     | [45]     |
| Производные спиробензопирана                                                       | Возможный механизм — ингибирование протеинкиназы CDK4                             | [46]     |
| Производные пиразоло [3,4-d] пиримидина (Si306 и Si113)                            | Потенциальный ингибитор протеинкиназ CDK 1/2                                      | [47]     |
| Производные 7 H-[1,2,4] триазоло [3,4-b][1,3,4] тиадиазина                         | Ингибитор протеинкиназы GSK-3 $\beta$                                             | [48]     |
| Винпоцетин                                                                         | Активатор протеинкиназы GSK-3 $\beta$                                             | [49]     |
| Производные тиазолилгидразона                                                      | Ингибитор протеинкиназы ABL1                                                      | [50]     |
| Производные 5-(3-хлорофениламино) бензо [c][2,6] нафтиридина                       | Ингибитор киназы 2 (CK2)                                                          | [51]     |
| WZ4003                                                                             | Ингибитор AMPK-связанной протеинкиназы 5                                          | [52]     |
| N2817                                                                              | Ингибитор белка везикулярного траффика BET1                                       | [53]     |
| Тетразанбиген                                                                      | Регулятор экспрессии PPAR $\gamma$                                                | [54]     |
| Каликозин                                                                          | Регулятор апоптоза и экспрессии miR-375                                           | [55]     |
| Производные 3-бромопирувата                                                        | Регуляция активности протеазы CTSB                                                | [56]     |
| Декурсин                                                                           | Регуляция экспрессии и деградации фактора транскрипции HIF-1 $\alpha$             | [57]     |
| Троглитазон                                                                        | Ингибирование активности фактора транскрипции FOXM1                               | [58]     |
| Напабуказин                                                                        | Ингибитор фактора транскрипции STAT3                                              | [59]     |
| Производные N-замещенного сульфамойлбензамида                                      | Ингибитор активности IL-6/STAT3                                                   | [60]     |
| Андрографолид                                                                      | Регулятор активности фактора транскрипции ATF4                                    | [61]     |
| Производные хинолина                                                               | Ингибитор фосфодиэстеразы (PDE5)                                                  | [62]     |
| Остол                                                                              | Ингибитор деацетилазы гистонов (HDAC)                                             | [63]     |
| Эмпаглифлозин                                                                      | Ингибитор ионного транспортера SGLT2 (SLC5A2)                                     | [64]     |

Окончание таблицы

|                                                                 |                                                |      |
|-----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|------|
| Amb4269951                                                      | Ингибитор холинотропного транспортера CTL1     | [65] |
| Эводиамин                                                       | Ингибитор шаперона HSP70                       | [66] |
| Производные 6-(7-нитро-2,1,3-бензоксадиазол-4-ил-тио) гексанола | Ингибиторы глутатионтрансферазы GSTP1          | [67] |
| BIBR1532                                                        | Регуляция активности теломеразы TERT           | [68] |
| Ацетилшиконин                                                   | Ингибитор дигидрофолатредуктазы DHFR           | [69] |
| Производные докозагексаеновой кислоты                           | Ингибитор бромодоменсодержащего белка BRD4     | [70] |
| Ликохалкон А                                                    | Регулятор экспрессии PD-L1                     | [71] |
| Производные 2-аминопирролкарбоксамиды                           | Ингибитор полимеризации тубулина               | [72] |
| Производные 2,3-диарил-2Н-азирина                               | Ингибитор полимеризации тубулина               | [73] |
| Производные индолизина                                          | Потенциальный ингибитор полимеризации тубулина | [74] |
| Производные реина                                               | Ингибитор малой ГТФазы Rac1                    | [75] |
| Дексаметазон                                                    | Регулятор активности p65                       | [76] |
| Сигнальные каскады в качестве мишеней                           |                                                |      |
| Производные олеанолевой кислоты                                 | PI3K/AKT/mTOR                                  | [77] |
| Производные гипенозида                                          | PI3K/AKT/mTOR                                  | [78] |
| Производные цианидин-3-О-глюкозида                              | PI3K/AKT/mTOR                                  | [79] |
| IPM712                                                          | PI3K/AKT                                       | [80] |
| Тиено[3,2-с]пиримидин                                           | PI3K/mTOR                                      | [81] |
| Артемизин                                                       | Wnt/ $\beta$ -катенин                          | [82] |
| PRI-724                                                         | Wnt/ $\beta$ -катенин                          | [83] |
| Производные целастрола                                          | HIF-1 $\alpha$                                 | [84] |
| Декурсин                                                        | HIF-1 $\alpha$                                 | [85] |
| Урсоловая кислота                                               | JAK2/STAT3/EGFR                                | [86] |
| Скулкапфлавон I                                                 | JAK/STAT/MAPK                                  | [87] |
| Галлотанин                                                      | JAK/STAT                                       | [88] |
| Ликохалкон А                                                    | MAPK                                           | [89] |
| Производные кризинхроменспирооксинадола                         | p53                                            | [90] |
| Пикроподофилотоксин                                             | JNK/p38                                        | [91] |
| Лютеолин                                                        | ERK/FOXO3a                                     | [92] |

**Примечание:** ББВ — белок-белковое взаимодействие; \* — разрешенные к клиническому применению лекарственные средства выделены курсивом.

синтетического и природного происхождения, обладающих противоопухолевой активностью, а также статьи [22–92], описывающие эффекты уже известных противоопухолевых лекарств и иных репозиционируемых лекарств (табл.). Научный интерес к подобным соединениям следует из повышенного уровня цитирования публикаций с упоминанием этих соединений и наличием патентного потенциала. Кроме того, впервые обнаруженные химические структуры с широким спектром противоопухолевой активности могут позже стать базисом для дизайна производных и для работ по идентификации их белковых мишеней в организме человека. Стоит отметить, что подобные работы по картированию мишеней для лекарств в настоящее время представляют собой крайне востребованное научное направление экспериментальной фармакологии и имеют высокий уровень цитируемости.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ данных, представленных в таблице, показал, что идентифицированные белковые мишени для новых противоопухолевых соединений распределялись в количественном отношении следующим образом: протеин-киназы (38%), ДНК-топоизомеразы I и II (10%), факторы транскрипции (9%), клинически значимые белок-белковые комплексы (7%), белки цитоскелета (тубулин)

(5%), и, наконец, остальная группа разнородных мишеней составила 40%. Примечательно, что в последнюю группу вошли ферменты фосфодиэстераза 5A (PDE5A), Na<sup>+</sup>-зависимый транспортер глюкозы SGLT2, а также ферменты, связанные с метаболизмом химиотерапевтических препаратов — глутатион-S-трансфераза GSTP1 и дигидрофолатредуктаза DHFR, действующие в формировании лекарственно-устойчивого фенотипа опухоли [93]. Следовательно, блокада таких ферментов может быть комплементарным фармакологическим воздействием для ограничения химиорезистентности. Анализ текстов синопсисов публикаций позволил определить, что механизм действия противоопухолевых прототипов лекарств, приведенных в таблице, главным образом заключался в конкурентном или неконкурентном обратимом ингибировании каталитической активности ферментов.

Из таблицы видно, что существует научный интерес к биологически активным низкомолекулярным соединениям, способным модулировать функцию факторов транскрипции (например, HIF-1 $\alpha$ , FOXM1, ATF4). Это группа внутриклеточных белков, которые долгое время считали крайне сложными молекулярными объектами для дизайна прототипов лекарств [94]. Поиск новых соединений, нарушающих трансдукцию сигналов в классических про-опухолевых сигнальных путях, пока по-прежнему

остается традиционным способом воздействия на молекулярные механизмы канцерогенеза. По результатам библиометрического анализа за 2020–2021 гг. следует отметить, что упоминания каскадов, регулируемых PI3K, mTOR, AKT1, STAT3, HIF-1a и p53, наиболее часто встречались среди фармакологически таргетируемых сигнальных путей.

В таблице также можно заметить группу соединений (LQFM126, E7386, британин) и антимикотического лекарства миконазола, которые обладают потенциалом для селективной модуляции аффинности белковых комплексов. Это инновационный подход в дизайне прототипов лекарств, поскольку он основан на фармакологическом таргетировании эволюционно консервативных слабо-мутируемых интерфейсов белок-белковых взаимодействий [95, 96]. Однако существует ряд полемических работ [97, 98], где, напротив, отмечено преимущественное накопление мутаций, ассоциированных с канцерогенезом, в интерфейсах клинически значимых белковых комплексов, что указывает на необходимость более углубленного изучения роли мутационных факторов для конкретного белкового комплекса.

Далее с использованием ресурса Pathway Studio был проведен поиск информации о вовлеченности белковых мишеней из таблицы в процессы канцерогенеза, который оценивали по наличию связей белков с процессом «malignant transformation» и клиническим параметром «cancer progression». Отбор результатов выполняли по наличию не менее чем пяти публикаций, описывающих ассоциации каждой белковой мишени с данными параметрами в отдельности. Так, при визуализации результатов поиска было выявлено что, по крайней мере, для большей части белковых мишеней из таблицы имеются многочисленные литературные свидетельства их вовлеченности в молекулярные события при канцерогенезе (рис. 6).

Из таблицы также следует, что, с одной стороны, STAT3 был идентифицирован в качестве новой белковой мишени известного противоопухолевого лекарства набуфакина. С другой стороны, изучение эффектов репозиционирования миконазола троглитазона, дексаметазона, винпоцетина и эмпаглифлозина позволило установить еще один вид биологической активности — противоопухолевую. Можно предположить, что она обусловлена действием этих лекарств на белковые мишени, участвующие в нарушении функции сигнальных путей, которое имеет место при канцерогенезе.

При помощи базы межмолекулярных взаимодействий ресурса Pathway Studio было также установлено, что основной тип взаимодействия между белковыми мишенями представляет собой посттрансляционные модификации по типу фосфорилирования. Ниже перечислены выявленные охарактеризованные бинарные белок-белковые взаимодействия, в которых первый

белок в паре фосфорилирует второй белок: EGFR/STAT3, MET/STAT3, GSK3B/HIF1A, ABL1/STAT3, EGFR/GSK3B, ABL1/TERT, EGFR/MET, PRKCA/GSK3B, ABL1/STAT3, AURKA/GSK3B, PRKD1/EGFR, GSK3B/HSPA1A, GSK3B/NFKB1. Перечисленные выше взаимодействия относятся к белкам, которые регулируют ключевые процессы канцерогенеза и являются мишенями для зарегистрированных противоопухолевых лекарств, а также мишенями для дизайна новых более действенных и безопасных лекарственных прототипов [99, 100].

Таким образом, библиометрический анализ публикаций, посвященных идентификации и разработкам новых противоопухолевых прототипов лекарств непептидной природы (или соединений) за период 2020–2021 гг. выявил: значительную представленность соединений из классов гетероциклов, гликозидов, хинонов и терпенов (суммарно 71% в структуре распределения исследуемых прототипов соединений); тот факт, что наиболее используемыми базовыми химическими структурами (до 35%) для органического синтеза производных были индол, хиназолин, акридин и пиридин; представленность соединений природного происхождения и синтетических производных на их основе. Анализ трендов публикационной активности позволил выявить направленность научного интереса на исследование отдельных групп соединений и прогресс в картировании их молекулярных мишеней, спектр которых существенно дифференцировался и расширился за последний год. Такие классы ассоциированных с канцерогенезом белковых мишеней, как сериновые/треониновые протеинкиназы, рецепторные тирозинкиназы, ДНК-топоизомеразы и тубулины пока остаются наиболее изучаемыми. Однако также наметился рост публикаций и возрос научный интерес в сфере дизайна новых ингибиторов клинически значимых белок-белковых комплексов, факторов транскрипции и метаболических ферментов, участвующих в формировании лекарственно-устойчивого фенотипа опухолевых клеток.

## ВЫВОДЫ

Системный библиометрический подход с использованием панели аналитических ресурсов Scopus, Reaxys, Pathway Studio и Cortellis, а также программного обеспечения VOS viewer позволяет проводить оперативный мониторинг тенденций в области дизайна и разработки (R&D) противоопухолевых лекарств и выявлять приоритеты научного интереса, дополняя моно- и политематические обзорные работы в периодических изданиях. Вместе с тем, можно констатировать, что в настоящее время растет научный интерес к новым молекулярным модальностям, ассоциированным с процессами канцерогенеза, что стимулирует работы по поиску новых эффективных фармакотерапевтических агентов.

## Литература

1. Kiriiri GK, Njogu PM, Mwangi AN. Exploring different approaches to improve the success of drug discovery and development projects: a review. *Futur J Pharm Sci.* 2020; 6: 27. DOI: 10.1186/s43094-020-00047-9.
2. Gibbs JB. Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research. *Science.* 2000; 287 (5460): 1969–73. DOI: 10.1126/science.287.5460.1969.
3. Druker BJ. Perspectives on the development of a molecularly targeted agent. *Cancer Cell.* 2002 Feb; 1 (1): 31–6. DOI: 10.1016/s1535-6108(02)00025-9.
4. Nam NH, Parang K. Current targets for anticancer drug discovery. *Curr Drug Targets.* 2003; 4 (2): 159–79. DOI: 10.2174/1389450033346966.
5. Haider T, Pandey V, Banjare N, Gupta PN, Soni V. Drug resistance

- in cancer: mechanisms and tackling strategies. *Pharmacol Rep.* 2020; 72 (5): 1125–51. DOI:10.1007/s43440-020-00138-7.
6. Devlin EJ, Denson LA, Whitford HS. Cancer treatment side effects: A meta-analysis of the relationship between response expectancies and experience. *J Pain Symptom Manage.* 2017; 54 (2): 245–58.e2. DOI:10.1016/j.jpainsymman.2017.03.017.
  7. Kumar B, Singh S, Skvortsova I, Kumar V. Promising targets in anti-cancer drug development: recent updates. *Curr Med Chem.* 2017; 24 (42): 4729–52. DOI: 10.2174/0929867324666170331123648.
  8. Magalhaes LG, Ferreira LLG, Andricopulo AD. Recent advances and perspectives in cancer drug design. *An Acad Bras Cienc.* 2018; 90 (1 Suppl 2): 1233–50. DOI: 10.1590/0001-3765201820170823.
  9. Cui W, Aoudate A, Wang S, Yu Q, Li Y, Yuan S. Discovering anti-cancer drugs via computational methods. *Front Pharmacol.* 2020; 11: 733. DOI: 10.3389/fphar.2020.00733.
  10. Özen Çınar İ. Bibliometric analysis of breast cancer research in the period 2009–2018. *Int J Nurs Pract.* 2020; 26 (3): e12845. DOI:10.1111/ijn.12845.
  11. Didion CA, Henne WA. A bibliometric analysis of folate receptor research. *BMC Cancer.* 2020; 20 (1): 1109. DOI:10.1186/s12885-020-07607-5.
  12. Jin B, Wu XA, Du SD. Top 100 most frequently cited papers in liver cancer: a bibliometric analysis. *ANZ J Surg.* 2020; 90 (1–2): 21–6. DOI:10.1111/ans.15414.
  13. Liu W, Wu L, Zhang Y, Shi L, Yang X. Bibliometric analysis of research trends and characteristics of oral potentially malignant disorders. *Clin Oral Investig.* 2020; 24 (1): 447–54. DOI: 10.1007/s00784-019-02959-0.
  14. Van Eck NJ, Waltman L. Text mining and visualization using VOSviewer. *ISSI Newsletter.* 2011; 7 (3): 50–4.
  15. Tauno M, Jaak V. Clustvis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Research.* 2015; 43 (W1): W566–W570, 2015. DOI: 10.1093/nar/gkv468.
  16. Arnst KE, Banerjee S, Chen H, Deng S, Hwang DJ, Li W, et al. Current advances of tubulin inhibitors as dual acting small molecules for cancer therapy. *Med Res Rev.* 2019; 39 (4): 1398–426. DOI:10.1002/med.21568.
  17. Chopra B, Dhingra AK, Dhar KL, Nepali K. Emerging role of terpenoids for the treatment of cancer: a review. *Mini Rev Med Chem.* 2021. Available from: <https://www.eurekaselect.com/190215/article>. DOI: 10.2174/1389557521666210112143024.
  18. Kirsch P, Hartman AM, Hirsch AKH, Empting M. Concepts and core principles of fragment-based drug design. *Molecules.* 2019; 24 (23): 4309. DOI: 10.3390/molecules24234309.
  19. Giacomini E, Rupiani S, Guidotti L, Recanatini M, Roberti M. The use of stilbene scaffold in medicinal chemistry and multi-target drug design. *Curr Med Chem.* 2016; 23 (23): 2439–89. DOI: 10.2174/0929867323666160517121629.
  20. Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL. Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol.* 2011; 162 (6): 1239–49. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x.
  21. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997; 23 (1–3): 3–25. DOI: 10.1016/S0169-409X(96)00423-1.
  22. Garcia da Silva AC, Rodrigues BDS, Andrade WM, Marques Dos Santos TR, de Carvalho FS, Sanz G, et al. Antiangiogenic and antitumoral activity of LQFM126 prototype against B16F10 melanoma cells. *Chem Biol Interact.* 2020; 325: 109127. DOI: 10.1016/j.cbi.2020.109127.
  23. Yamada K, Hori Y, Inoue S, Yamamoto Y, Iso K, Kamiyama H, et al. E7386, a selective inhibitor of the interaction between  $\beta$ -catenin and CBP, exerts antitumor activity in tumor models with activated canonical Wnt signaling. *Cancer Res.* 2021; 81 (4): 1052–62. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-20-0782.
  24. Zhang YF, Zhang ZH, Li MY, Wang JY, Xing Y, Ri M, et al. Britannin stabilizes T cell activity and inhibits proliferation and angiogenesis by targeting PD-L1 via abrogation of the crosstalk between Myc and HIF-1 $\alpha$  in cancer. *Phytomedicine.* 2021; 81: 153425. DOI: 10.1016/j.phymed.2020.153425
  25. Yoon SH, Kim BK, Kang MJ, Im JY, Won M. Miconazole inhibits signal transducer and activator of transcription 3 signaling by preventing its interaction with DNA damage-induced apoptosis suppressor. *Cancer Sci.* 2020 Jul; 111 (7): 2499–507. DOI: 10.1111/cas.14432. Epub 2020 May 31. PMID: 32476221; PMCID: PMC7385363.
  26. Osmaniye D, Korkut Çelikeleş B, Sağlık BN, Levent S, Acar Çevik U, Kaya Çavuşoğlu B, et al. Synthesis of some new benzoxazole derivatives and investigation of their anticancer activities. *Eur J Med Chem.* 2021; 210: 112979. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112979.
  27. Zhang N, Wang J, Sheng A, Huang S, Tang Y, Ma S, et al. Emodin inhibits the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells through activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR). *Front Pharmacol.* 2021; 11: 622046. DOI: 10.3389/fphar.2020.622046.
  28. Qin J, Liu J, Wu C, Xu J, Tang B, Guo K, et al. Synthesis and biological evaluation of (3/4-(pyrimidin-2-ylamino) benzoyl)-based hydrazine-1 carboxamide/carbothioamide derivatives as novel RXR $\alpha$  antagonists. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2020; 35 (1): 880–96. DOI: 10.1080/14756366.2020.1740692.
  29. Zi CT, Yang L, Hu Y, Zhang P, Tang H, Zhang BL, et al. Synthesis, antitumor activity, and molecular docking of (-)-epigallocatechin-3-gallate-4 $\beta$ -triazolopodophyllotoxin conjugates. *J Asian Nat Prod Res.* 2020; 1–9. DOI: 10.1080/10286020.2020.1786066.
  30. Huang WY, Zhang XR, Lyu L, Wang SQ, Zhang XT. Pyridazino[1,6-b]quinazolinones as new anticancer scaffold: synthesis, DNA intercalation, topoisomerase I inhibition and antitumor evaluation in vitro and in vivo. *Bioorg Chem.* 2020; 99: 103814. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.103814.
  31. Karatas E, Foto E, Ertan-Bolelli T, Yalcin-Ozkat G, Yilmaz S, Ataei S, et al. Discovery of 5-(or 6)-benzoxazoles and oxazolo[4,5-b]pyridines as novel candidate antitumor agents targeting hTopo II $\alpha$ . *Bioorg Chem.* 2021; 112: 104913. DOI: 10.1016/j.bioorg.2021.104913.
  32. Fukuda T, Nanjo Y, Fujimoto M, Yoshida K, Natsui Y, Ishibashi F, et al. Lamellarin-inspired potent topoisomerase I inhibitors with the unprecedented benzo[g][1]benzopyrano[4,3-b]indol-6(13H)-one scaffold. *Bioorg Med Chem.* 2019; 27 (2): 265–77. DOI: 10.1016/j.bmc.2018.11.037.
  33. Acar Çevik U, Sağlık BN, Osmaniye D, Levent S, Kaya Çavuşoğlu B, Karaduman AB, et al. Synthesis, anticancer evaluation and molecular docking studies of new benzimidazole-1,3,4-oxadiazole derivatives as human topoisomerase types I poison. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2020; 35 (1): 1657–73. DOI: 10.1080/14756366.2020.1806831.
  34. Song Y, Feng S, Feng J, Dong J, Yang K, Liu Z, et al. Synthesis and biological evaluation of novel pyrazoline derivatives containing indole skeleton as anti-cancer agents targeting topoisomerase II. *Eur J Med Chem.* 2020; 200: 112459. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112459.
  35. Al-Wahaibi LH, Gouda AM, Abou-Ghadi OF, Salem OIA, Ali AT, Farghaly HS, et al. Design and synthesis of novel 2,3-dihydropyrazino[1,2-a]indole-1,4-dione derivatives as antiproliferative EGFR and BRAFV600E dual inhibitors. *Bioorg Chem.* 2020; 104: 104260. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104260.
  36. Eissa IH, Ibrahim MK, Metwaly AM, Belal A, Mehany ABM, Abdelhady AA, et al. Design, molecular docking, in vitro, and in vivo studies of new quinazolin-4(3H)-ones as VEGFR-2 inhibitors with potential activity against hepatocellular carcinoma. *Bioorg Chem.* 2021; 107: 104532. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104532.
  37. Dai MD, Wang YL, Fan J, Dai Y, Ji YC, Sun YM, et al. DW14383 is an irreversible pan-FGFR inhibitor that suppresses FGFR-dependent tumor growth in vitro and in vivo. *Acta Pharmacol Sin.* 2020. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41401-020-00567-3>. DOI: 10.1038/s41401-020-00567-3.
  38. Ahmed MF, Santali EY, El-Haggag R. Novel piperazine-chalcone hybrids and related pyrazoline analogues targeting VEGFR-2 kinase; design, synthesis, molecular docking studies, and anticancer evaluation. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2021; 36 (1): 307–18. DOI: 10.1080/14756366.2020.1861606.
  39. Zhuo LS, Wu FX, Wang MS, Xu HC, Yang FP, Tian YG, et al. Structure-activity relationship study of novel quinazoline-based 1,6-naphthyridinones as MET inhibitors with potent antitumor efficacy. *Eur J Med Chem.* 2020; 208: 112785. DOI: 10.1016/j.

- ejmech.2020.112785.
40. Nan X, Zhang J, Li HJ, Wu R, Fang SB, Zhang ZZ, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel N-sulfonylamidine-based derivatives as c-Met inhibitors via Cu-catalyzed three-component reaction. *Eur J Med Chem.* 2020; 200: 112470. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112470.
  41. Krishan S, Sahni S, Richardson DR. The anti-tumor agent, Dp44mT, promotes nuclear translocation of TFEB via inhibition of the AMPK-mTORC1 axis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020; 1866 (12): 165970. DOI: 10.1016/j.bbdis.2020.165970.
  42. Cullen JK, Boyle GM, Yap PY, Elminger S, Simmons JL, Broit N, et al. Activation of PKC supports the anticancer activity of tigilanol tiglate and related epoxytiglianes. *Sci Rep.* 2021; 11 (1): 207. DOI: 10.1038/s41598-020-80397-9.
  43. Wagner E, Wietrzyk J, Psurski M, Becan L, Turlej E. Synthesis and anticancer evaluation of novel derivatives of isoxazolo[4,5-e] [1,2,4]triazepine derivatives and potential inhibitors of protein kinase C. *ACS Omega.* 2020; 6 (1): 119–34. DOI:10.1021/acsomega.0c03801.
  44. Gilles P, Kashyap RS, Freitas MJ, Ceusters S, Van Asch K, Janssens A, et al. Design, synthesis and biological evaluation of pyrazolo[3,4-d]pyrimidine-based protein kinase D inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2020; 205: 112638. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112638.
  45. Sootome H, Miura A, Masuko N, Suzuki T, Uto Y, Hirai H, et al. Inhibitor TAS-119 enhances antitumor efficacy of taxanes in vitro and in vivo: preclinical studies as guidance for clinical development and trial design. *Mol Cancer Ther.* 2020; 19 (10): 1981–91. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-20-0036.
  46. Kar S, Ramamoorthy G, Mitra K, Shivalingegowda N, Mahesha, Mavileti SK, et al. Synthesis of novel spirobenzopyrans as potent anticancer leads inducing apoptosis in HeLa cells. *Bioorg Med Chem Lett.* 2020; 30 (12): 127199. DOI: 10.1016/j.bmcl.2020.127199.
  47. Massaro M, Barone G, Barra V, Cancemi P, Di Leonardo A, Grossi G, et al. Pyrazole[3,4-d]pyrimidine derivatives loaded into halloysite as potential CDK inhibitors. *Int J Pharm.* 2021; 599: 120281. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120281.
  48. Ismail MI, Mohamady S, Samir N, Abouzid KAM. Design, synthesis, and biological evaluation of novel 7H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazine inhibitors as antitumor agents. *ACS Omega.* 2020; 5 (32): 20170–86. DOI: 10.1021/acsomega.0c01829.
  49. Zhang ZY, Dong SM, Liu YH, Zhang MM, Zhang JK, Zhu HJ, et al. Enhanced anticancer activity by the combination of vinpocetine and sorafenib via PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$  signaling axis in hepatocellular carcinoma cells. *Anticancer Drugs.* 2021. Available from: [https://journals.lww.com/anti-cancerdrugs/Abstract/2021/09000/Enhanced\\_antitumor\\_activity\\_by\\_the\\_combination\\_of.7.aspx](https://journals.lww.com/anti-cancerdrugs/Abstract/2021/09000/Enhanced_antitumor_activity_by_the_combination_of.7.aspx). DOI: 10.1097/CAD.0000000000001056.
  50. Zeytün E, Altıntop MD, Sever B, Özdemir A, Ellakwa DE, Ocak Z, et al. A new series of antileukemic agents: design, synthesis, in vitro and in silico evaluation of thiazole-based abl1 kinase inhibitors. *Anticancer Agents Med Chem.* 2021; 21 (9): 1099–109. DOI: 10.2174/1871520620666200824100408.
  51. Wang Y, Lv Z, Chen F, Wang X, Gou S. Discovery of 5-(3-chlorophenylamino) benzo[c][2,6] naphthyridine derivatives as highly selective ck2 inhibitors with potent cancer cell stemness inhibition. *J Med Chem.* 2021; 64 (8): 5082–98. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c00131.
  52. Yang H, Wang X, Wang C, Yin F, Qu L, Shi C et al. Optimization of WZ4003 as NUAk inhibitors against human colorectal cancer. *Eur J Med Chem.* 2021; 210: 113080. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.113080.
  53. Wu Q, Chen DQ, Sun L, Huan XJ, Bao XB, Tian CQ et al. Novel bivalent BET inhibitor N2817 exhibits potent anticancer activity and inhibits TAF1. *Biochem Pharmacol.* 2021; 185: 114435. DOI: 10.1016/j.bcp.2021.114435.
  54. Gan L, Gan Z, Dan Y, Li Y, Zhang P, Chen S, et al. Tetrazanbigen derivatives as peroxisome proliferator-activated receptor gamma (ppary) partial agonists: design, synthesis, structure-activity relationship, and anticancer activities. *J Med Chem.* 2021; 64 (2): 1018–36. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c01512.
  55. Zhang D, Sun G, Peng L, Tian J, Zhang H. Calycosin inhibits viability, induces apoptosis, and suppresses invasion of cervical cancer cells by upregulating tumor suppressor miR-375. *Arch Biochem Biophys.* 2020; 691: 108478. DOI: 10.1016/j.abb.2020.108478.
  56. Szczuka I, Wiśniewski J, Kustrzeba-Wójcicka I, Terlecki G. The effect of 3-bromopyruvate on the properties of cathepsin B in the aspect of metastatic potential of colon cancer cells. *Adv Clin Exp Med.* 2020; 29 (8): 949–57. DOI: 10.17219/acem/123622. PMID: 32820873.
  57. Ge Y, Yoon SH, Jang H, Jeong JH, Lee YM. Decursin promotes HIF-1 $\alpha$  proteasomal degradation and immune responses in hypoxic tumour microenvironment. *Phytomedicine.* 2020; 78: 153318. DOI: 10.1016/j.phymed.2020.153318.
  58. Tabatabaei Dakhili SA, Pérez DJ, Gopal K, Haque M, Ussher JR, Kashfi K, et al. SP1-independent inhibition of FOXM1 by modified thiazolidinediones. *Eur J Med Chem.* 2021; 209: 112902. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112902.
  59. Liu Y, Peng X, Li H, Jiao W, Peng X, Shao J, et al. STAT3 inhibitor napabucasin inhibits tumor growth and cooperates with proteasome inhibition in human ovarian cancer cells. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2021. DOI: 10.2174/1574892816666210224155403.
  60. Wang X, Wu K, Fang L, Yang X, Zheng N, Du Z, et al. Discovery of N-substituted sulfamoylbenzamide derivatives as novel inhibitors of STAT3 signaling pathway based on Niclosamide. *Eur J Med Chem.* 2021; 218:113362. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113362.
  61. Zhang J, Li C, Zhang L, Heng Y, Xu T, Zhang Y, et al. Andrographolide induces noxa-dependent apoptosis by transactivating atf4 in human lung adenocarcinoma cells. *Front Pharmacol.* 2021; 12: 680589. DOI:10.3389/fphar.2021.680589.
  62. Ibrahim TS, Hawwas MM, Taher ES, Alhakamy NA, Alfaleh MA, Elagawany M, et al. Design and synthesis of novel pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-one bearing quinoline scaffold as potent dual PDE5 inhibitors and apoptotic inducers for cancer therapy. *Bioorg Chem.* 2020; 105: 104352. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104352.
  63. Abosharaf HA, Diab T, Atlam FM, Mohamed TM. Osthole extracted from a citrus fruit that affects apoptosis on A549 cell line by histone deacetylase inhibition (HDACs). *Biotechnol Rep (Amst).* 2020; 28: e00531. DOI: 10.1016/j.btre.2020.e00531.
  64. Xie Z, Wang F, Lin L, Duan S, Liu X, Li X, et al. An SGLT2 inhibitor modulates SHH expression by activating AMPK to inhibit the migration and induce the apoptosis of cervical carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2020; 495: 200–10. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.09.005.
  65. Watanabe S, Nishijima N, Hirai K, Shibata K, Hase A, Yamanaka T, et al. Anticancer activity of amb4269951, a choline transporter-like protein 1 inhibitor, in human glioma cells. *Pharmaceuticals (Basel).* 2020; 13 (5): 104. DOI: 10.3390/ph13050104.
  66. Hyun SY, Le HT, Min HY, Pei H, Lim Y, Song I, et al. Evodiamine inhibits both stem cell and non-stem-cell populations in human cancer cells by targeting heat shock protein 70. *Theranostics.* 2021; 11 (6): 2932–52. DOI: 10.7150/tno.49876.
  67. Tentori L, Dorio AS, Mazzon E, Muzi A, Sau A, Cuzzocrea S, et al. The glutathione transferase inhibitor 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol (NBDHEX) increases temozolomide efficacy against malignant melanoma. *Eur J Cancer.* 2011; 47(8): 1219–30. DOI: 10.1016/j.ejca.2010.12.008.
  68. Altamura G, Degli Uberti B, Galiero G, De Luca G, Power K, Licenziato L, et al. The small molecule BIBR1532 exerts potential anti-cancer activities in preclinical models of feline oral squamous cell carcinoma through inhibition of telomerase activity and down-regulation of TERT. *Front Vet Sci.* 2021; 7: 620776. DOI: 10.3389/fvets.2020.620776.
  69. Wang J, Iannarelli R, Pucciarelli S, Laudadio E, Galeazzi R, Giangrossi M, et al. Acetylshikonin isolated from *Lithospermum erythrorhizon* roots inhibits dihydrofolate reductase and hampers autochthonous mammary carcinogenesis in  $\Delta$ 16HER2 transgenic mice. *Pharmacol Res.* 2020; 161: 105123. DOI: 10.1016/j.phrs.2020.105123.
  70. Ding W, Zhang H, Mei G. Synergistic antitumor activity of DHA and JQ1 in colorectal carcinoma. *Eur J Pharmacol.* 2020; 885: 173500. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173500.
  71. Yuan LW, Jiang XM, Xu YL, Huang MY, Chen YC, Yu WB, et al.

- Licochalcone A inhibits interferon-gamma-induced programmed death-ligand 1 in lung cancer cells. *Phytomedicine*. 2021; 80: 153394. DOI:10.1016/j.phymed.2020.153394.
72. Boichuk S, Galebikova A, Bikinieva F, Dunaev P, Aukhadieva A, Syuzov K, et al. 2-APCAs, the novel microtubule targeting agents active against distinct cancer cell lines. *Molecules*. 2021; 26 (3): 616. DOI: 10.3390/molecules26030616.
  73. Lin S, Liang Y, Cheng J, Pan F, Wang Y. Novel diaryl-2H-azirines: Antitumor hybrids for dual-targeting tubulin and DNA. *Eur J Med Chem*. 2021; 214: 113256. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113256.
  74. Sardaru MC, Craciun AM, Al Matarneh CM, Sandu IA, Amarandi RM, Popovici L, et al. Cytotoxic substituted indolizines as new colchicine site tubulin polymerisation inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2020; 35 (1): 1581–95. DOI: 10.1080/14756366.2020.1801671.
  75. Li X, Liu Y, Zhao Y, Tian W, Zhai L, Pang H, et al. Rhein derivative 4f inhibits the malignant phenotype of breast cancer by downregulating Rac1 protein. *Front Pharmacol*. 2020; 11: 754. DOI: 10.3389/fphar.2020.00754.
  76. Yao Y, Yao QY, Xue JS, Tian XY, An QM, Cui LX, et al. Dexamethasone inhibits pancreatic tumor growth in preclinical models: Involvement of activating glucocorticoid receptor. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2020; 401: 115118. DOI: 10.1016/j.taap.2020.115118.
  77. Wang SS, Zhang QL, Chu P, Kong LQ, Li GZ, Li YQ, et al. Synthesis and antitumor activity of  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl moiety-containing oleanolic acid derivatives targeting PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Bioorg Chem*. 2020; 101: 104036. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104036.
  78. Liu H, Li X, Duan Y, Xie JB, Piao XL. Mechanism of gypenosides of *Gynostemma pentaphyllum* inducing apoptosis of renal cell carcinoma by PI3K/AKT/mTOR pathway. *J Ethnopharmacol*. 2021; 271: 113907. DOI: 10.1016/j.jep.2021.113907.
  79. Li X, Zhao J, Yan T, Mu J, Lin Y, Chen J, et al. Cyanidin-3-O-glucoside and cisplatin inhibit proliferation and downregulate the PI3K/AKT/mTOR pathway in cervical cancer cells. *J Food Sci*. 2021. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1750-3841.15740>. DOI: 10.1111/1750-3841.15740.
  80. Ma W, Zhang Q, Li X, Ma Y, Liu Y, Hu S, et al. IPM712, a vanillin derivative as potential antitumor agents, displays better antitumor activity in colorectal cancers cell lines. *Eur J Pharm Sci*. 2020; 152: 105464. DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105464.
  81. Han Y, Tian Y, Wang R, Fu S, Jiang J, Dong J, et al. Design, synthesis and biological evaluation of thieno[3,2-d]pyrimidine derivatives containing aroyl hydrazone or aryl hydrazide moieties for PI3K and mTOR dual inhibition. *Bioorg Chem*. 2020; 104: 104197. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104197.
  82. Wang T, Wang J, Ren W, Liu ZL, Cheng YF, Zhang XM. Combination treatment with artemisinin and oxaliplatin inhibits tumorigenesis in esophageal cancer EC109 cell through Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Thorac Cancer*. 2020; 11 (8): 2316–24. DOI: 10.1111/1759-7714.13570.
  83. Gabata R, Harada K, Mizutani Y, Ouchi H, Yoshimura K, Sato Y, et al. Anti-tumor activity of the small molecule inhibitor PRI-724 against  $\beta$ -catenin-activated hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res*. 2020; 40 (9): 5211–19. DOI: 10.21873/anticancerres.14524.
  84. Shang FF, Wang JY, Xu Q, Deng H, Guo HY, Jin X, et al. Design, synthesis of novel celastrol derivatives and study on their antitumor growth through HIF-1 $\alpha$  pathway. *Eur J Med Chem*. 2021; 220: 113474. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0223523421003238?via%3Dihub>. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113474.
  85. Ge Y, Yoon SH, Jang H, Jeong JH, Lee YM. Decursin promotes HIF-1 $\alpha$  proteasomal degradation and immune responses in hypoxic tumour microenvironment. *Phytomedicine*. 2020; 78: 153318. DOI:10.1016/j.phymed.2020.153318.
  86. Kang DY, Sp N, Lee JM, Jang KJ. Antitumor effects of ursolic acid through mediating the inhibition of STAT3/PD-L1 signaling in non-small cell lung cancer cells. *Biomedicine*. 2021; 9 (3): 297. DOI:10.3390/biomedicine9030297.
  87. Cui J, Li H, Wang Y, Tian T, Liu C, Wang Y, et al. Skullcapflavone I has a potent anti-pancreatic cancer activity by targeting miR-23a. *Biofactors*. 2020; 46 (5): 821–30. DOI: 10.1002/biof.1621.
  88. Houssein M, Abi Saab W, Khalil M, Khalife H, Fatfat M. Cell death by galotannin is associated with inhibition of the JAK/STAT pathway in human colon cancer cells. *Curr Ther Res Clin Exp*. 2020; 92: 100589. DOI: 10.1016/j.curtheres.2020.100589.
  89. Luo W, Sun R, Chen X, Li J, Jiang J, He Y, et al. ERK activation-mediated autophagy induction resists licochalcone a-induced anticancer activities in lung cancer cells in vitro. *Onco Targets Ther*. 2021; 13: 13437–50. DOI: 10.2147/OTT.S278268.
  90. Zhang WH, Chen S, Liu XL, Bing-Lin, Liu XW, Zhou Y. Study on antitumor activities of the chrysin-chromene-spirooxindole on Lewis lung carcinoma C57BL/6 mice in vivo. *Bioorg Med Chem Lett*. 2020; 30 (17): 127410. DOI: 10.1016/j.bmcl.2020.127410.
  91. Kwak AW, Yoon G, Lee MH, Cho SS, Shim JH, Chae JI. Picropodophyllotoxin, an epimer of podophyllotoxin, causes apoptosis of human esophageal squamous cell carcinoma cells through ROS-mediated JNK/P38 MAPK pathways. *Int J Mol Sci*. 2020; 21 (13): 4640. DOI: 10.3390/ijms21134640.
  92. Potočnjak I, Šimić L, Gobin I, Vukelić I, Domitrović R. Antitumor activity of luteolin in human colon cancer SW620 cells is mediated by the ERK/FOXO3a signaling pathway. *Toxicol In Vitro*. 2020; 66: 104852. DOI:10.1016/j.tiv.2020.104852.
  93. Brooks JD, Teraoka SN, Bernstein L, Mellemkjær L, Malone KE, Lynch CF, et al. Common variants in genes coding for chemotherapy metabolizing enzymes, transporters, and targets: a case-control study of contralateral breast cancer risk in the WECARE Study. *Cancer Causes Control*. 2013; 24 (8): 1605–14. DOI: 10.1007/s10552-013-0237-6.
  94. Bushweller JH. Targeting transcription factors in cancer — from undruggable to reality. *Nat Rev Cancer*. 2019; 19 (11): 611–24. DOI: 10.1038/s41568-019-0196-7.
  95. Lu H, Zhou Q, He J, Jiang Z, Peng C, Tong R, et al. Recent advances in the development of protein-protein interactions modulators: mechanisms and clinical trials. *Signal Transduct Target Ther*. 2020; 5 (1): 213. DOI: 10.1038/s41392-020-00315-3.
  96. Ivanov AA, Khuri FR, Fu H. Targeting protein-protein interactions as an anticancer strategy. *Trends Pharmacol Sci*. 2013; 34 (7): 393–400. DOI: 10.1016/j.tips.2013.04.007.
  97. Engin HB, Kreisberg JF, Carter H. Structure-based analysis reveals cancer missense mutations target protein interaction interfaces. *PLoS One*. 2016; 11 (4): e0152929. DOI: 10.1371/journal.pone.0152929.
  98. Porta-Pardo E, Garcia-Alonso L, Hrabe T, Dopazo J, Godzik A. A pan-cancer catalogue of cancer driver protein interaction interfaces. *PLoS Comput Biol*. 2015; 11 (10): e1004518. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004518.
  99. Duffy MJ, Crown J. Drugging "undruggable" genes for cancer treatment: Are we making progress? *Int J Cancer*. 2021; 148 (1): 8–17. DOI: 10.1002/ijc.33197.
  100. Santos R, Ursu O, Gaulton A, Bento AP, Donadi RS, Bologa CG, et al. A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2017; 16 (1): 19–34. DOI: 10.1038/nrd.2016.230.

## References

1. Kiriiri GK, Njogu PM, Mwangi AN. Exploring different approaches to improve the success of drug discovery and development projects: a review. *Futur J Pharm Sci*. 2020; 6: 27. DOI: 10.1186/s43094-020-00047-9.
2. Gibbs JB. Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research. *Science*. 2000; 287 (5460): 1969–73. DOI: 10.1126/science.287.5460.1969.
3. Druker BJ. Perspectives on the development of a molecularly targeted agent. *Cancer Cell*. 2002 Feb; 1 (1): 31–6. DOI: 10.1016/s1535-6108(02)00025-9.
4. Nam NH, Parang K. Current targets for anticancer drug discovery. *Curr Drug Targets*. 2003; 4 (2): 159–79. DOI: 10.2174/1389450033346966.
5. Haider T, Pandey V, Banjare N, Gupta PN, Soni V. Drug resistance

- in cancer: mechanisms and tackling strategies. *Pharmacol Rep.* 2020; 72 (5): 1125–51. DOI:10.1007/s43440-020-00138-7.
6. Devlin EJ, Denson LA, Whitford HS. Cancer treatment side effects: A meta-analysis of the relationship between response expectancies and experience. *J Pain Symptom Manage.* 2017; 54 (2): 245–58.e2. DOI:10.1016/j.jpainsymman.2017.03.017.
  7. Kumar B, Singh S, Skvortsova I, Kumar V. Promising targets in anti-cancer drug development: recent updates. *Curr Med Chem.* 2017; 24 (42): 4729–52. DOI: 10.2174/0929867324666170331123648.
  8. Magalhaes LG, Ferreira LLG, Andricopulo AD. Recent advances and perspectives in cancer drug design. *An Acad Bras Cienc.* 2018; 90 (1 Suppl 2): 1233–50. DOI: 10.1590/0001-3765201820170823.
  9. Cui W, Aouidate A, Wang S, Yu Q, Li Y, Yuan S. Discovering anti-cancer drugs via computational methods. *Front Pharmacol.* 2020; 11: 733. DOI: 10.3389/fphar.2020.00733.
  10. Özen Çınar İ. Bibliometric analysis of breast cancer research in the period 2009–2018. *Int J Nurs Pract.* 2020; 26 (3): e12845. DOI:10.1111/ijn.12845.
  11. Didion CA, Henne WA. A bibliometric analysis of folate receptor research. *BMC Cancer.* 2020; 20 (1): 1109. DOI:10.1186/s12885-020-07607-5.
  12. Jin B, Wu XA, Du SD. Top 100 most frequently cited papers in liver cancer: a bibliometric analysis. *ANZ J Surg.* 2020; 90 (1–2): 21–6. DOI:10.1111/ans.15414.
  13. Liu W, Wu L, Zhang Y, Shi L, Yang X. Bibliometric analysis of research trends and characteristics of oral potentially malignant disorders. *Clin Oral Investig.* 2020; 24 (1): 447–54. DOI: 10.1007/s00784-019-02959-0.
  14. Van Eck NJ, Waltman L. Text mining and visualization using VOSviewer. *ISSI Newsletter.* 2011; 7 (3): 50–4.
  15. Tauno M, Jaak V. Clustvis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Research.* 2015; 43 (W1): W566–W570. DOI: 10.1093/nar/gkv468.
  16. Arnst KE, Banerjee S, Chen H, Deng S, Hwang DJ, Li W, et al. Current advances of tubulin inhibitors as dual acting small molecules for cancer therapy. *Med Res Rev.* 2019; 39 (4): 1398–426. DOI:10.1002/med.21568.
  17. Chopra B, Dhingra AK, Dhar KL, Nepali K. Emerging role of terpenoids for the treatment of cancer: a review. *Mini Rev Med Chem.* 2021. Available from: <https://www.eurekaselect.com/190215/article>. DOI: 10.2174/1389557521666210112143024.
  18. Kirsch P, Hartman AM, Hirsch AKH, Empting M. Concepts and core principles of fragment-based drug design. *Molecules.* 2019; 24 (23): 4309. DOI: 10.3390/molecules24234309.
  19. Giacomini E, Rupiani S, Guidotti L, Recanatini M, Roberti M. The use of stilbene scaffold in medicinal chemistry and multi-target drug design. *Curr Med Chem.* 2016; 23 (23): 2439–89. DOI: 10.2174/0929867323666160517121629.
  20. Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL. Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol.* 2011; 162 (6): 1239–49. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x.
  21. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997; 23 (1–3): 3–25. DOI: 10.1016/S0169-409X(96)00423-1.
  22. Garcia da Silva AC, Rodrigues BDS, Andrade WM, Marques Dos Santos TR, de Carvalho FS, Sanz G, et al. Antiangiogenic and antitumoral activity of LQFM126 prototype against B16F10 melanoma cells. *Chem Biol Interact.* 2020; 325: 109127. DOI: 10.1016/j.cbi.2020.109127.
  23. Yamada K, Hori Y, Inoue S, Yamamoto Y, Iso K, Kamiyama H, et al. E7386, a selective inhibitor of the interaction between  $\beta$ -catenin and CBP, exerts antitumor activity in tumor models with activated canonical Wnt signaling. *Cancer Res.* 2021; 81 (4): 1052–62. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-20-0782.
  24. Zhang YF, Zhang ZH, Li MY, Wang JY, Xing Y, Ri M, et al. Britannin stabilizes T cell activity and inhibits proliferation and angiogenesis by targeting PD-L1 via abrogation of the crosstalk between Myc and HIF-1 $\alpha$  in cancer. *Phytomedicine.* 2021; 81: 153425. DOI: 10.1016/j.phymed.2020.153425
  25. Yoon SH, Kim BK, Kang MJ, Im JY, Won M. Miconazole inhibits signal transducer and activator of transcription 3 signaling by preventing its interaction with DNA damage-induced apoptosis suppressor. *Cancer Sci.* 2020 Jul; 111 (7): 2499–507. DOI: 10.1111/cas.14432. Epub 2020 May 31. PMID: 32476221; PMCID: PMC7385363.
  26. Osmaniye D, Korkut Çelikaş B, Sağlık BN, Levent S, Acar Çevik U, Kaya Çavuşoğlu B, et al. Synthesis of some new benzoxazole derivatives and investigation of their anticancer activities. *Eur J Med Chem.* 2021; 210: 112979. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112979.
  27. Zhang N, Wang J, Sheng A, Huang S, Tang Y, Ma S, et al. Emodin inhibits the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells through activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR). *Front Pharmacol.* 2021; 11: 622046. DOI: 10.3389/fphar.2020.622046.
  28. Qin J, Liu J, Wu C, Xu J, Tang B, Guo K, et al. Synthesis and biological evaluation of (3/4-(pyrimidin-2-ylamino) benzoyl)-based hydrazine-1 carboxamide/carbothioamide derivatives as novel RXR $\alpha$  antagonists. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2020; 35 (1): 880–96. DOI: 10.1080/14756366.2020.1740692.
  29. Zi CT, Yang L, Hu Y, Zhang P, Tang H, Zhang BL, et al. Synthesis, antitumor activity, and molecular docking of (-)-epigallocatechin-3-gallate-4 $\beta$ -triazolopodophyllotoxin conjugates. *J Asian Nat Prod Res.* 2020; 1–9. DOI: 10.1080/10286020.2020.1786066.
  30. Huang WY, Zhang XR, Lyu L, Wang SQ, Zhang XT. Pyridazino[1,6-b]quinazolinones as new anticancer scaffold: synthesis, DNA intercalation, topoisomerase I inhibition and antitumor evaluation in vitro and in vivo. *Bioorg Chem.* 2020; 99: 103814. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.103814.
  31. Karatas E, Foto E, Ertan-Bolelli T, Yalcin-Ozkut G, Yilmaz S, Ataei S, et al. Discovery of 5-(or 6)-benzoxazoles and oxazolo[4,5-b]pyridines as novel candidate antitumor agents targeting hTopo II $\alpha$ . *Bioorg Chem.* 2021; 112: 104913. DOI: 10.1016/j.bioorg.2021.104913.
  32. Fukuda T, Nanjo Y, Fujimoto M, Yoshida K, Natsui Y, Ishibashi F, et al. Lamellarin-inspired potent topoisomerase I inhibitors with the unprecedented benzo[g][1]benzopyrano[4,3-b]indol-6(13H)-one scaffold. *Bioorg Med Chem.* 2019; 27 (2): 265–77. DOI: 10.1016/j.bmc.2018.11.037.
  33. Acar Çevik U, Sağlık BN, Osmaniye D, Levent S, Kaya Çavuşoğlu B, Karaduman AB, et al. Synthesis, anticancer evaluation and molecular docking studies of new benzimidazole-1,3,4-oxadiazole derivatives as human topoisomerase types I poison. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2020; 35 (1): 1657–73. DOI: 10.1080/14756366.2020.1806831.
  34. Song Y, Feng S, Feng J, Dong J, Yang K, Liu Z, et al. Synthesis and biological evaluation of novel pyrazoline derivatives containing indole skeleton as anti-cancer agents targeting topoisomerase II. *Eur J Med Chem.* 2020; 200: 112459. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112459.
  35. Al-Wahaibi LH, Gouda AM, Abou-Ghadi OF, Salem OIA, Ali AT, Farhaly HS, et al. Design and synthesis of novel 2,3-dihydropyrazino[1,2-a]indole-1,4-dione derivatives as antiproliferative EGFR and BRAFV600E dual inhibitors. *Bioorg Chem.* 2020; 104: 104260. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104260.
  36. Eissa IH, Ibrahim MK, Metwaly AM, Belal A, Mehany ABM, Abdelhady AA, et al. Design, molecular docking, in vitro, and in vivo studies of new quinazolin-4(3H)-ones as VEGFR-2 inhibitors with potential activity against hepatocellular carcinoma. *Bioorg Chem.* 2021; 107: 104532. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104532.
  37. Dai MD, Wang YL, Fan J, Dai Y, Ji YC, Sun YM, et al. DW14383 is an irreversible pan-FGFR inhibitor that suppresses FGFR-dependent tumor growth in vitro and in vivo. *Acta Pharmacol Sin.* 2020. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41401-020-00567-3>. DOI: 10.1038/s41401-020-00567-3.
  38. Ahmed MF, Santali EY, El-Haggag R. Novel piperazine-chalcone hybrids and related pyrazoline analogues targeting VEGFR-2 kinase; design, synthesis, molecular docking studies, and anticancer evaluation. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2021; 36 (1): 307–18. DOI: 10.1080/14756366.2020.1861606.
  39. Zhuo LS, Wu FX, Wang MS, Xu HC, Yang FP, Tian YG, et al. Structure-activity relationship study of novel quinazoline-based 1,6-naphthyridinones as MET inhibitors with potent antitumor efficacy. *Eur J Med Chem.* 2020; 208: 112785. DOI: 10.1016/j.

- ejmech.2020.112785.
40. Nan X, Zhang J, Li HJ, Wu R, Fang SB, Zhang ZZ, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel N-sulfonylamidine-based derivatives as c-Met inhibitors via Cu-catalyzed three-component reaction. *Eur J Med Chem.* 2020; 200: 112470. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112470.
  41. Krishan S, Sahni S, Richardson DR. The anti-tumor agent, Dp44mT, promotes nuclear translocation of TFEB via inhibition of the AMPK-mTORC1 axis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020; 1866 (12): 165970. DOI: 10.1016/j.bbdis.2020.165970.
  42. Cullen JK, Boyle GM, Yap PY, Elmlinger S, Simmons JL, Broit N, et al. Activation of PKC supports the anticancer activity of tigilanol tiglate and related epoxytiglanes. *Sci Rep.* 2021; 11 (1): 207. DOI: 10.1038/s41598-020-80397-9.
  43. Wagner E, Wietrzyk J, Psurski M, Becan L, Turlej E. Synthesis and anticancer evaluation of novel derivatives of isoxazolo[4,5-e] [1,2,4]triazepine derivatives and potential inhibitors of protein kinase C. *ACS Omega.* 2020; 6 (1): 119–34. DOI:10.1021/acsomega.0c03801.
  44. Gilles P, Kashyap RS, Freitas MJ, Ceusters S, Van Asch K, Janssens A, et al. Design, synthesis and biological evaluation of pyrazolo[3,4-d]pyrimidine-based protein kinase D inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2020; 205: 112638. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112638.
  45. Sootome H, Miura A, Masuko N, Suzuki T, Uto Y, Hirai H, et al. Inhibitor TAS-119 enhances antitumor efficacy of taxanes in vitro and in vivo: preclinical studies as guidance for clinical development and trial design. *Mol Cancer Ther.* 2020; 19 (10): 1981–91. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-20-0036.
  46. Kar S, Ramamoorthy G, Mitra K, Shivalingegowda N, Mahesha, Mavileti SK, et al. Synthesis of novel spirobibenzopyrans as potent anticancer leads inducing apoptosis in HeLa cells. *Bioorg Med Chem Lett.* 2020; 30 (12): 127199. DOI: 10.1016/j.bmcl.2020.127199.
  47. Massaro M, Barone G, Barra V, Cancemi P, Di Leonardo A, Grossi G, et al. Pyrazole[3,4-d]pyrimidine derivatives loaded into halloysite as potential CDK inhibitors. *Int J Pharm.* 2021; 599: 120281. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120281.
  48. Ismail MI, Mohamady S, Samir N, Abouzid KAM. Design, synthesis, and biological evaluation of novel 7H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazine inhibitors as antitumor agents. *ACS Omega.* 2020; 5 (32): 20170–86. DOI: 10.1021/acsomega.0c01829.
  49. Zhang ZY, Dong SM, Liu YH, Zhang MM, Zhang JK, Zhu HJ, et al. Enhanced anticancer activity by the combination of vinpocetine and sorafenib via PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$  signaling axis in hepatocellular carcinoma cells. *Anticancer Drugs.* 2021. Available from: [https://journals.lww.com/anti-cancerdrugs/Abstract/2021/09000/Enhanced\\_antitumor\\_activity\\_by\\_the\\_combination\\_of.7.aspx](https://journals.lww.com/anti-cancerdrugs/Abstract/2021/09000/Enhanced_antitumor_activity_by_the_combination_of.7.aspx). DOI: 10.1097/CAD.0000000000001056.
  50. Zeytin E, Altintop MD, Sever B, Özdemir A, Ellakwa DE, Ocak Z, et al. A new series of antileukemic agents: design, synthesis, in vitro and in silico evaluation of thiazole-based abl kinase inhibitors. *Anticancer Agents Med Chem.* 2021; 21 (9): 1099–109. DOI: 10.2174/1871520620666200824100408.
  51. Wang Y, Lv Z, Chen F, Wang X, Gou S. Discovery of 5-(3-chlorophenylamino) benzo[c][2,6] naphthyridine derivatives as highly selective ck2 inhibitors with potent cancer cell stemness inhibition. *J Med Chem.* 2021; 64 (8): 5082–98. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c00131.
  52. Yang H, Wang X, Wang C, Yin F, Qu L, Shi C et al. Optimization of WZ4003 as NIAK inhibitors against human colorectal cancer. *Eur J Med Chem.* 2021; 210: 113080. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.113080.
  53. Wu Q, Chen DQ, Sun L, Huan XJ, Bao XB, Tian CQ et al. Novel bivalent BET inhibitor N2817 exhibits potent anticancer activity and inhibits TAF1. *Biochem Pharmacol.* 2021; 185: 114435. DOI: 10.1016/j.bcp.2021.114435.
  54. Gan L, Gan Z, Dan Y, Li Y, Zhang P, Chen S, et al. Tetrazanbigen derivatives as peroxisome proliferator-activated receptor gamma (ppary) partial agonists: design, synthesis, structure-activity relationship, and anticancer activities. *J Med Chem.* 2021; 64 (2): 1018–36. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c01512.
  55. Zhang D, Sun G, Peng L, Tian J, Zhang H. Calycosin inhibits viability, induces apoptosis, and suppresses invasion of cervical cancer cells by upregulating tumor suppressor miR-375. *Arch Biochem Biophys.* 2020; 691: 108478. DOI: 10.1016/j.abb.2020.108478.
  56. Szczuka I, Wiśniewski J, Kustrzeba-Wójcicka I, Terlecki G. The effect of 3-bromopyruvate on the properties of cathepsin B in the aspect of metastatic potential of colon cancer cells. *Adv Clin Exp Med.* 2020; 29 (8): 949–57. DOI: 10.17219/acem/123622. PMID: 32820873.
  57. Ge Y, Yoon SH, Jang H, Jeong JH, Lee YM. Decursin promotes HIF-1 $\alpha$  proteasomal degradation and immune responses in hypoxic tumour microenvironment. *Phytomedicine.* 2020; 78: 153318. DOI: 10.1016/j.phymed.2020.153318.
  58. Tabatabaei Dakhili SA, Pérez DJ, Gopal K, Haque M, Ussher JR, Kashfi K, et al. SP1-independent inhibition of FOXM1 by modified thiazolidinediones. *Eur J Med Chem.* 2021; 209: 112902. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112902.
  59. Liu Y, Peng X, Li H, Jiao W, Peng X, Shao J, et al. STAT3 inhibitor napabucasin inhibits tumor growth and cooperates with proteasome inhibition in human ovarian cancer cells. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2021. DOI: 10.2174/1574892816666210224155403.
  60. Wang X, Wu K, Fang L, Yang X, Zheng N, Du Z, et al. Discovery of N-substituted sulfamoylbenzamide derivatives as novel inhibitors of STAT3 signaling pathway based on Niclosamide. *Eur J Med Chem.* 2021; 218:113362. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113362.
  61. Zhang J, Li C, Zhang L, Heng Y, Xu T, Zhang Y, et al. Andrographolide induces noxa-dependent apoptosis by transactivating atf4 in human lung adenocarcinoma cells. *Front Pharmacol.* 2021; 12: 680589. DOI:10.3389/fphar.2021.680589.
  62. Ibrahim TS, Hawwas MM, Taher ES, Alhakamy NA, Alfaleh MA, Elagawany M, et al. Design and synthesis of novel pyrazolo[3,4-d] pyrimidin-4-one bearing quinoline scaffold as potent dual PDE5 inhibitors and apoptotic inducers for cancer therapy. *Bioorg Chem.* 2020; 105: 104352. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104352.
  63. Abosharaf HA, Diab T, Atlam FM, Mohamed TM. Osthole extracted from a citrus fruit that affects apoptosis on A549 cell line by histone deacetylase inhibition (HDACs). *Biotechnol Rep (Amst).* 2020; 28: e00531. DOI: 10.1016/j.btre.2020.e00531.
  64. Xie Z, Wang F, Lin L, Duan S, Liu X, Li X, et al. An SGLT2 inhibitor modulates SHH expression by activating AMPK to inhibit the migration and induce the apoptosis of cervical carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2020; 495: 200–10. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.09.005.
  65. Watanabe S, Nishijima N, Hirai K, Shibata K, Hase A, Yamanaka T, et al. Anticancer activity of amb4269951, a choline transporter-like protein 1 inhibitor, in human glioma cells. *Pharmaceuticals (Basel).* 2020; 13 (5): 104. DOI: 10.3390/ph13050104.
  66. Hyun SY, Le HT, Min HY, Pei H, Lim Y, Song I, et al. Evodiamine inhibits both stem cell and non-stem-cell populations in human cancer cells by targeting heat shock protein 70. *Theranostics.* 2021; 11 (6): 2932–52. DOI: 10.7150/thno.49876.
  67. Tentori L, Dorio AS, Mazzon E, Muzi A, Sau A, Cuzzocrea S, et al. The glutathione transferase inhibitor 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol (NBDHEX) increases temozolomide efficacy against malignant melanoma. *Eur J Cancer.* 2011; 47(8): 1219–30. DOI: 10.1016/j.ejca.2010.12.008.
  68. Altamura G, Degli Uberti B, Galiero G, De Luca G, Power K, Licenziato L, et al. The small molecule BIBR1532 exerts potential anti-cancer activities in preclinical models of feline oral squamous cell carcinoma through inhibition of telomerase activity and down-regulation of TERT. *Front Vet Sci.* 2021; 7: 620776. DOI: 10.3389/fvets.2020.620776.
  69. Wang J, Iannarelli R, Pucciarelli S, Laudadio E, Galeazzi R, Giangrossi M, et al. Acetylshikonin isolated from *Lithospermum erythrorhizon* roots inhibits dihydrofolate reductase and hampers autotrophic mammary carcinogenesis in  $\Delta$ 16HER2 transgenic mice. *Pharmacol Res.* 2020; 161: 105123. DOI: 10.1016/j.phrs.2020.105123.
  70. Ding W, Zhang H, Mei G. Synergistic antitumor activity of DHA and JQ1 in colorectal carcinoma. *Eur J Pharmacol.* 2020; 885: 173500. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173500.
  71. Yuan LW, Jiang XM, Xu YL, Huang MY, Chen YC, Yu WB, et al.

- Licochalcone A inhibits interferon-gamma-induced programmed death-ligand 1 in lung cancer cells. *Phytomedicine*. 2021; 80: 153394. DOI:10.1016/j.phymed.2020.153394.
72. Boichuk S, Galebmbikova A, Bikinieva F, Dunaev P, Aukhadieva A, Syuzov K, et al. 2-APCAs, the novel microtubule targeting agents active against distinct cancer cell lines. *Molecules*. 2021; 26 (3): 616. DOI: 10.3390/molecules26030616.
  73. Lin S, Liang Y, Cheng J, Pan F, Wang Y. Novel diaryl-2H-azirines: Antitumor hybrids for dual-targeting tubulin and DNA. *Eur J Med Chem*. 2021; 214: 113256. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113256.
  74. Sardaru MC, Craciun AM, Al Matarnah CM, Sandu IA, Amarandi RM, Popovici L, et al. Cytotoxic substituted indolizines as new colchicine site tubulin polymerisation inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2020; 35 (1): 1581–95. DOI: 10.1080/14756366.2020.1801671.
  75. Li X, Liu Y, Zhao Y, Tian W, Zhai L, Pang H, et al. Rhein derivative 4f inhibits the malignant phenotype of breast cancer by downregulating Rac1 protein. *Front Pharmacol*. 2020; 11: 754. DOI: 10.3389/fphar.2020.00754.
  76. Yao Y, Yao QY, Xue JS, Tian XY, An QM, Cui LX, et al. Dexamethasone inhibits pancreatic tumor growth in preclinical models: Involvement of activating glucocorticoid receptor. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2020; 401: 115118. DOI: 10.1016/j.taap.2020.115118.
  77. Wang SS, Zhang QL, Chu P, Kong LQ, Li GZ, Li YQ, et al. Synthesis and antitumor activity of  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl moiety-containing oleanolic acid derivatives targeting PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Bioorg Chem*. 2020; 101: 104036. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104036.
  78. Liu H, Li X, Duan Y, Xie JB, Piao XL. Mechanism of gypenosides of *Gynostemma pentaphyllum* inducing apoptosis of renal cell carcinoma by PI3K/AKT/mTOR pathway. *J Ethnopharmacol*. 2021; 271: 113907. DOI: 10.1016/j.jep.2021.113907.
  79. Li X, Zhao J, Yan T, Mu J, Lin Y, Chen J, et al. Cyanidin-3-O-glucoside and cisplatin inhibit proliferation and downregulate the PI3K/AKT/mTOR pathway in cervical cancer cells. *J Food Sci*. 2021. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1750-3841.15740>. DOI: 10.1111/1750-3841.15740.
  80. Ma W, Zhang Q, Li X, Ma Y, Liu Y, Hu S, et al. IPM712, a vanillin derivative as potential antitumor agents, displays better antitumor activity in colorectal cancers cell lines. *Eur J Pharm Sci*. 2020; 152: 105464. DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105464.
  81. Han Y, Tian Y, Wang R, Fu S, Jiang J, Dong J, et al. Design, synthesis and biological evaluation of thieno[3,2-d]pyrimidine derivatives containing aroyl hydrazone or aryl hydrazide moieties for PI3K and mTOR dual inhibition. *Bioorg Chem*. 2020; 104: 104197. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104197.
  82. Wang T, Wang J, Ren W, Liu ZL, Cheng YF, Zhang XM. Combination treatment with artemisinin and oxaliplatin inhibits tumorigenesis in esophageal cancer EC109 cell through Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Thorac Cancer*. 2020; 11 (8): 2316–24. DOI: 10.1111/1759-7714.13570.
  83. Gabata R, Harada K, Mizutani Y, Ouchi H, Yoshimura K, Sato Y, et al. Anti-tumor activity of the small molecule inhibitor PRI-724 against  $\beta$ -catenin-activated hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res*. 2020; 40 (9): 5211–19. DOI: 10.21873/anticancer.14524.
  84. Shang FF, Wang JY, Xu Q, Deng H, Guo HY, Jin X, et al. Design, synthesis of novel celastrol derivatives and study on their antitumor growth through HIF-1 $\alpha$  pathway. *Eur J Med Chem*. 2021; 220: 113474. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0223523421003238?via%3Dihub>. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113474.
  85. Ge Y, Yoon SH, Jang H, Jeong JH, Lee YM. Decursin promotes HIF-1 $\alpha$  proteasomal degradation and immune responses in hypoxic tumour microenvironment. *Phytomedicine*. 2020; 78: 153318. DOI:10.1016/j.phymed.2020.153318.
  86. Kang DY, Sp N, Lee JM, Jang KJ. Antitumor effects of ursolic acid through mediating the inhibition of STAT3/PD-L1 signaling in non-small cell lung cancer cells. *Biomedicines*. 2021; 9 (3): 297. DOI:10.3390/biomedicines9030297.
  87. Cui J, Li H, Wang Y, Tian T, Liu C, Wang Y, et al. Skullcapflavone I has a potent anti-pancreatic cancer activity by targeting miR-23a. *Biofactors*. 2020; 46 (5): 821–30. DOI: 10.1002/biof.1621.
  88. Houssein M, Abi Saab W, Khalil M, Khalife H, Fatfat M. Cell death by gallotannin is associated with inhibition of the JAK/STAT pathway in human colon cancer cells. *Curr Ther Res Clin Exp*. 2020; 92: 100589. DOI: 10.1016/j.curtheres.2020.100589.
  89. Luo W, Sun R, Chen X, Li J, Jiang J, He Y, et al. ERK activation-mediated autophagy induction resists licochalcone a-induced anticancer activities in lung cancer cells in vitro. *Onco Targets Ther*. 2021; 13: 13437–50. DOI: 10.2147/OTT.S278268.
  90. Zhang WH, Chen S, Liu XL, Bing-Lin, Liu XW, Zhou Y. Study on antitumor activities of the chrysin-chromene-spirooxindole on Lewis lung carcinoma C57BL/6 mice in vivo. *Bioorg Med Chem Lett*. 2020; 30 (17): 127410. DOI: 10.1016/j.bmcl.2020.127410.
  91. Kwak AW, Yoon G, Lee MH, Cho SS, Shim JH, Chae JI. Picropodophyllotoxin, an epimer of podophyllotoxin, causes apoptosis of human esophageal squamous cell carcinoma cells through ROS-mediated JNK/P38 MAPK pathways. *Int J Mol Sci*. 2020; 21 (13): 4640. DOI: 10.3390/ijms21134640.
  92. Potočnjak I, Šimić L, Gobin I, Vukelić I, Domitrović R. Antitumor activity of luteolin in human colon cancer SW620 cells is mediated by the ERK/FOXO3a signaling pathway. *Toxicol In Vitro*. 2020; 66: 104852. DOI:10.1016/j.tiv.2020.104852.
  93. Brooks JD, Teraoka SN, Bernstein L, Mellemkjær L, Malone KE, Lynch CF, et al. Common variants in genes coding for chemotherapy metabolizing enzymes, transporters, and targets: a case-control study of contralateral breast cancer risk in the WECARE Study. *Cancer Causes Control*. 2013; 24 (8): 1605–14. DOI: 10.1007/s10552-013-0237-6.
  94. Bushweller JH. Targeting transcription factors in cancer — from undruggable to reality. *Nat Rev Cancer*. 2019; 19 (11): 611–24. DOI: 10.1038/s41568-019-0196-7.
  95. Lu H, Zhou Q, He J, Jiang Z, Peng C, Tong R, et al. Recent advances in the development of protein-protein interactions modulators: mechanisms and clinical trials. *Signal Transduct Target Ther*. 2020; 5 (1): 213. DOI: 10.1038/s41392-020-00315-3.
  96. Ivanov AA, Khuri FR, Fu H. Targeting protein-protein interactions as an anticancer strategy. *Trends Pharmacol Sci*. 2013; 34 (7): 393–400. DOI: 10.1016/j.tips.2013.04.007.
  97. Engin HB, Kreisberg JF, Carter H. Structure-based analysis reveals cancer missense mutations target protein interaction interfaces. *PLoS One*. 2016; 11 (4): e0152929. DOI: 10.1371/journal.pone.0152929.
  98. Porta-Pardo E, Garcia-Alonso L, Hrabe T, Dopazo J, Godzik A. A pan-cancer catalogue of cancer driver protein interaction interfaces. *PLoS Comput Biol*. 2015; 11 (10): e1004518. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004518.
  99. Duffy MJ, Crown J. Drugging "undruggable" genes for cancer treatment: Are we making progress? *Int J Cancer*. 2021; 148 (1): 8–17. DOI: 10.1002/ijc.33197.
  100. Santos R, Ursu O, Gaulton A, Bento AP, Donadi RS, Bologa CG, et al. A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2017; 16 (1): 19–34. DOI: 10.1038/nrd.2016.230.

## ОЦЕНКА МЕТОДОВ ИНАКТИВИРОВАНИЯ АДЕНОВИРУСА ПТИЦ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН

Н. Н. Савина<sup>1</sup>✉, А. А. Екимов<sup>1</sup>, В. П. Трухин<sup>1</sup>, А. Э. Евтушенко<sup>1</sup>, Е. Н. Жиренкина<sup>1</sup>, Е. О. Синегубова<sup>2</sup>, А. В. Слита<sup>2</sup><sup>1</sup> Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия<sup>2</sup> Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

При производстве инактивированных гриппозных вакцин на стадии инактивации должен быть инактивирован как вирус гриппа, так и возможные вирусные загрязнители (например, аденовирус птиц), которые могут попасть в вакцину из сырья (куриных эмбрионов). Инактиваторы должны обеспечивать гарантированное снижение вирусной нагрузки загрязнителя не менее чем на 4 lg (БОЕ)/мл, что обеспечит его отсутствие в готовой вакцине. Целью работы было выбрать клеточную линию для наработки аденовируса и оценить снижение титра аденовируса в полупродуктах гриппозных вакцин при воздействии инактиваторов. Были подобраны оптимальные условия наработки аденовируса птиц штаммов CELO и Fontes в культуре клеток, в качестве оптимальной выбрана культура клеток Vero; рассмотрены основные используемые инактиваторы:  $\beta$ -пропиолактон и УФ-излучение. Титры аденовируса определяли методом бляшкообразования. Спустя 10 ч инактивации  $\beta$ -пропиолактоном аденовирус штамма CELO показал снижение вирусной нагрузки на  $4,12 \pm 0,06$  lg, а аденовирус штамма Fontes — на  $4,20 \pm 0,19$  lg, что указывает на эффективное действие  $\beta$ -пропиолактона при инактивации. Проведение инактивации УФ-излучением позволяет снизить вирусную нагрузку штамма CELO на  $4,69 \pm 0,89$  lg, а штамма Fontes — на  $4,44 \pm 1,06$  lg за 5 мин. Отмечено, что добавление детергента на стадии расщепления также снижает вирусную нагрузку на  $0,93 \pm 0,15$  lg и  $1,04 \pm 0,12$  lg для штаммов CELO и Fontes соответственно при использовании н-октил- $\beta$ -D-глюкопиранозид и на  $1,18 \pm 0,17$  lg и  $1,12 \pm 0,38$  lg при использовании тетрадецилтриметиламмоний бромида.

**Ключевые слова:** гриппозные вакцины, инактивация, аденовирус птиц, пропиолактон, УФ-излучение**Вклад авторов:** все авторы внесли равнозначный вклад в разработку методики исследования, получение, анализ и интерпретацию данных, в написание и редактирование статьи.**Соблюдение этических стандартов:** исследование проведено с соблюдением этических принципов Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации 1964 г. и последующих ее пересмотров.✉ **Для корреспонденции:** Наталья Николаевна Савина  
ул. Свободы, д. 52, г. Красное Село, г. Санкт-Петербург, 198320; n.n.savina@spbnivs.ru**Статья получена:** 18.08.2021 **Статья принята к печати:** 12.09.2021 **Опубликована онлайн:** 26.09.2021**DOI:** 10.47183/mes.2021.032

## EVALUATION OF AVIAN ADENOVIRUS INACTIVATION METHODS USED IN THE PRODUCTION OF INFLUENZA VACCINES

Savina NN<sup>1</sup>✉, Ekimov AA<sup>1</sup>, Trukhin VP<sup>1</sup>, Evtushenko AE<sup>1</sup>, Zhirenkina EN<sup>1</sup>, Sinigubova EO<sup>2</sup>, Slita AV<sup>2</sup><sup>1</sup> Saint Petersburg Research Institute of Vaccines and Serums, FMBA, Russia<sup>2</sup> Saint Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint Petersburg, Russia

Inactivation of influenza virus and other potential contaminants like avian adenoviruses coming from embryonated chicken eggs is a critical step in the production of inactivated influenza vaccines. Inactivation must lead to a guaranteed reduction in contaminant titers by at least 4 lg (PFU)/ml. The aim of this study was to identify an optimum cell line for adenovirus propagation and to estimate a reduction in adenovirus titers in vaccine intermediates after inactivation. In a series of experiments, we identified the optimum conditions and the optimum cell line for the propagation of avian adenovirus (strains CELO and Fontes). The most commonly used inactivation methods were analyzed, including inactivation by  $\beta$ -propiolactone and UV light. Viral titers were measured by plaque assays. After 10 h of inactivation with  $\beta$ -propiolactone, CELO titers fell by  $4.12 \pm 0.06$  lg, whereas Fontes titers, by  $4.20 \pm 0.19$  lg, suggesting that  $\beta$ -propiolactone is an effective inactivating agent. Exposure to UV light led to a reduction in CELO titers by  $4.69 \pm 0.89$  lg and a reduction in Fontes titers by  $4.44 \pm 1.06$  lg after 5 min. N-octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside added at the splitting step reduced CELO titers by  $0.93 \pm 0.15$  lg and Fontes titers by  $1.04 \pm 0.12$  lg, whereas tetradecyltrimethylammonium bromide led to a reduction in CELO and Fontes titers by  $1.18 \pm 0.17$  lg and  $1.12 \pm 0.38$  lg, respectively.

**Keywords:** influenza vaccine, inactivation, avian adenovirus, propiolactone, UV radiation**Author contribution:** all authors have equally contributed to the methodology of the study, analysis and interpretation of the results and manuscript preparation.**Compliance with ethical standards:** the study complied with the principles of the Declaration of Helsinki (1964) and its revisions.✉ **Correspondence should be addressed:** Natalya N. Savina  
Svobody, 52, Krasnoye Selo, Saint Petersburg, 198320; n.n.savina@spbnivs.ru**Received:** 18.08.2021 **Accepted:** 12.09.2021 **Published online:** 26.09.2021**DOI:** 10.47183/mes.2021.032

Процесс производства гриппозных инактивированных вакцин включает стадию инактивации вируса гриппа для обеспечения безопасности готового препарата. Согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения и Европейского медицинского агентства [1, 2], стадия инактивации должна обеспечивать полную инактивацию вируса гриппа, однако, кроме вируса гриппа полупродукты могут содержать и загрязнители, наиболее значимые из которых — вирус лейкоза птиц, аденовирус птиц,

микоплазма. Согласно регламентирующей документации, процесс инактивации должен быть эффективен и в отношении перечисленных загрязнителей.

Инактивация в технологическом процессе производства может быть проведена как физическими методами, так и химическими. В качестве физического метода чаще всего используют облучение УФ-излучением, а химического — воздействием алкилирующих реагентов, таких как  $\beta$ -пропиолактон [3].

Аденовирусная инфекция птиц протекает хронически у птиц и летальна у куриных эмбрионов (КЭ). Аденовирусы птиц объединены в род *Aviadenovirus*. В настоящее время насчитывают 12 различных серотипов аденовирусов птиц, относящихся к группам CELO (Chicken Embrio Lethal Orphan), GAL (Gallus Adeno-Like virus), и один тип — возбудитель синдрома снижения яйценоскости EDS-76 [4].

Аденовирусная инфекция у кур проявляется как гепатит с тельцами включения, синдром гепатита-гидроперикарда и эрозия желудка, а также респираторными заболеваниями, отставанием в росте, воспалением суставов [5].

Аденовирусная инфекция птиц часто выступает в роли вторичного фактора при иных инфекционных болезнях, особенно при инфекционном бронхите кур, микоплазмозе и других заболеваниях дыхательных путей птицы.

Важно также отметить, что в птицеводствах Российской Федерации периодически возникают вспышки болезней, причиной которых являются и аденовирусы птиц [6, 7].

В литературе описаны методы инактивации аденовируса при помощи формальдегида [8], однако данные исследования затрагивают культивирование вируса гриппа и аденовируса с использованием культур клеток MDCK, что не может быть экстраполировано на эмбриональную технологию получения гриппозных вакцин. Известно также, что использование формальдегида в большей степени, чем  $\beta$ -пропиолактон, снижает иммуногенность вакцины из-за инактивации,  $\beta$ -пропиолактон обладает большей эффективностью в отношении инактивации вируса гриппа [9].

Приоритетное использование  $\beta$ -пропиолактона в отличие от формальдегида в качестве инактивирующего агента обусловлено тем, что  $\beta$ -пропиолактон гидролизует до 3-гидроксипропионовой кислоты, которая является промежуточным метаболитом липидного обмена человека [10], что непосредственно влияет на безопасность вакцины.

Целью настоящего исследования было выбрать оптимальный агент для инактивирования контаминанта гриппозных вакцин — аденовируса птиц, в частности наиболее распространенных групп CELO и GAL (штамм Fontes), а также выбрать минимальную длительность стадии инактивации для гарантированного снижения вирусной нагрузки не менее чем на 4 lg (БОЕ)/мл [11].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Материалы

Аденовирус птиц *Adenoviridae*, *Aviadenovirus*, Fowl adenovirus A, Fowl adenovirus 1, штамм Phelps (CELO), ATCC VR-432 (коллекция ATCC; США).

Аденовирус птиц *Adenoviridae*, *Aviadenovirus*, Fowl adenovirus D, Fowl adenovirus 2, штамм Fontes, ATCC VR-280 (коллекция ATCC; США).

Клетки HEp-2 (коллекция клеточных линий НИИЭМ им. Пастера; Россия).

Клетки MA-104 (коллекция клеточных линий НИИЭМ им. Пастера; Россия).

Клетки Vero (коллекция клеточных линий НИИЭМ им. Пастера; Россия).

### Культивирование аденовирусов птиц штаммов CELO и Fontes и определение их инфекционной активности

Эксперименты по определению оптимальной культуры клеток для накопления вирусов проводили на линиях

клеток Vero B, MA-104 и HEp-2. Клетки культивировали в ростовой среде альфа-MEM с добавлением 10% инактивированной нагреванием фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Gibco), 2 mM L-глутамин, 100 мкг/мл гентамицина. Для эксперимента использовали поддерживающую питательную среду (ППС), которая отличалась от ростовой тем, что в ее состав входило не 10, а 2% фетальной сыворотки крупного рогатого скота. Для исследования клетки выращивали во флаконах (площадь дна 25 см<sup>2</sup>) для культуральных работ при 37 °C в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>; посевная доза составила 500 тыс. клеток/мл. Клетки культивировали в течение ночи до формирования монослоя.

Клетки инфицировали изучаемыми вирусными агентами и культивировали при 37 °C в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub> до деструкции 80–90% монослоя. Флаконы замораживали при –20 °C и после оттаивания определяли инфекционный титр вирусов, как описано ниже.

Клетки изучаемых линий рассевали на 24-луночные планшеты (посевная доза — 500 тыс. клеток/мл) и культивировали при 37 °C в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub> в течение ночи до формирования монослоя. Из вирусосодержащего материала готовили серию 10-кратных разведений от 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-7</sup>. Полученными разведениями инфицировали клетки в лунках планшета и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. По истечении указанного времени клетки промывали средой и вносили среду MEM с жидким ацицеллом (SigmaAldrich; США) в соотношении 1 : 1. После этого планшеты инкубировали 96 ч при 37 °C в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. По истечении этого времени в лунки вносили по 1 мл 0,1%-го спиртового раствора кристалвиолета и окрашивали в течение 15 мин, после чего лунки промывали дистиллированной водой, подсушивали при комнатной температуре и подсчитывали число вирусных бляшек в каждой лунке. На основании полученных данных рассчитывали титр вируса по методу Рида и Менча [12], который выражали в БОЕ/мл.

### Получение вирусосодержащей аллантоисной жидкости

Для культивирования вируса гриппа использовали 9–11-дневные куриные эмбрионы. Заражение куриных эмбрионов проводили дозой 0,2 мл с инфекционной активностью 102,0–104,5 и эффективной инфекционной дозой, равной 50 (ЭИД<sub>50</sub>). Инкубацию куриных эмбрионов осуществляли при 35 °C в течение 48 ч для вируса гриппа типа А и в течение 72 ч — для вируса гриппа типа В. После инкубации эмбрионы охлаждали и собирали вирусосодержащую аллантоисную жидкость (ВАЖ).

### Получение вирусных концентратов (ВК)

ВАЖ подвергали фильтрации через каскад фильтров с диаметром пор 10, 6 и 1 мкм с последующим концентрированием с использованием ультрафильтрационной установки с пределом отсеивания 300 кДа. Сконцентрированную вирусосодержащую аллантоисную жидкость подвергали ультрацентрифугированию в градиенте плотности сахарозы (60–20%). Собирали фракции сахарозного градиента в диапазоне 40–25% сахарозы.

Таблица 1. Инфекционная активность аденовирусов птиц CELO и Fontes в клеточных линиях различного генеза

| Вирус  | Титр вируса в клеточной линии, БОЕ/мл |                           |                           |
|--------|---------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
|        | Vero                                  | HEp-2                     | MA-104                    |
| CELO   | $4,3 \pm 2,3 \times 10^5$             | $6,5 \pm 3,0 \times 10^3$ | $1,1 \pm 0,2 \times 10^3$ |
| Fontes | $3,3 \pm 1,5 \times 10^6$             | $9,7 \pm 3,8 \times 10^3$ | $2,0 \pm 0,7 \times 10^3$ |

### Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов осуществляли при помощи программного пакета Microsoft Excel 365 (Microsoft corp.; США), а также Minitab 19 (Minitab Inc.; США). Доверительные интервалы рассчитаны для доверительной вероятности 95%.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### Выбор оптимальной клеточной линии для культивирования аденовирусов птиц

Для оптимизации процесса культивирования аденовирусов птиц были использованы три клеточные линии: Vero, MA-104 и HEp-2 как наиболее часто применяемые для культивирования аденовирусов. Результаты изучения инфекционной активности вирусов в этих линиях представлены в табл. 1.

Оба аденовируса птиц репродуцировались в клетках Vero более чем на два порядка более эффективно, чем в линиях MA-104 и HEp-2. Полученные данные свидетельствуют, что линия Vero является наиболее перmissive для обоих аденовирусов птиц.

#### Изучение динамики инактивации аденовируса птиц в вирусосодержащей аллантоисной жидкости β-пропиолактоном

Для моделирования инфицирования вирусосодержащей аллантоисной жидкости (ВАЖ) аденовирусами птиц и их инактивации к образцам ВАЖ добавляли 10% по объему предварительно оттитрованный инфекционный материал, содержащий аденовирус птиц, так, чтобы конечное его содержание составляло не менее  $10^5$  БОЕ/мл. Полученную смесь подвергали инактивации β-пропиолактоном (0,09% в

конечной смеси) и определяли значение титра аденовируса птиц в образцах. Динамика инактивации представлена на рис. 1.

Снижение вирусной нагрузки не менее чем на 4 lg БОЕ/мл происходило не менее чем через 10 ч после добавления β-пропиолактона, что обуславливает необходимость проведения инактивации вирусосодержащей аллантоисной жидкости в технологическом процессе получения гриппозных препаратов не менее 10 ч.

#### Изучение динамики инактивации аденовируса птиц в вирусных концентратах с помощью ультрафиолетового облучения

Для моделирования инфицирования ВК аденовирусами птиц и их инактивации к образцам ВК добавляли 10% по объему предварительно оттитрованный инфекционный материал, содержащий аденовирус птиц, так чтобы конечное его содержание составляло не менее  $10^5$  БОЕ/мл. Контаминированный ВК помещали в чашки Петри с диаметром 90 мм. Чашки с образцами устанавливали под установкой из четырех ультрафиолетовых ламп (общей мощностью 60 Вт) на расстоянии 20 см. Проводили облучение по схеме:

- 1-я чашка — 0 с;
- 2-я чашка — 30 с;
- 3-я чашка — 1 мин;
- 4-я чашка — 2 мин;
- 5-я чашка — 5 мин.

Через указанные промежутки времени из чашек отбирали пробы ВК объемом 1 мл, в которых определяли инфекционный титр вируса при помощи бляшкообразования. Динамика инактивации представлена на рис. 2.

Снижение вирусной нагрузки не менее чем на 4 lg БОЕ/мл происходит не менее чем через 5 мин действия УФ-

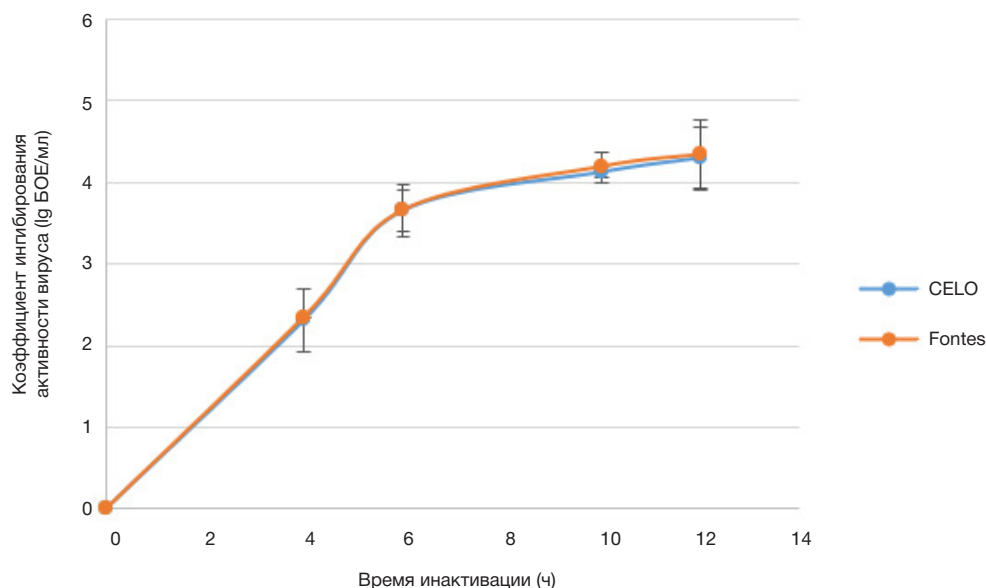


Рис. 1. Динамика инактивации аденовируса птиц штаммов CELO и Fontes при действии β-пропиолактона

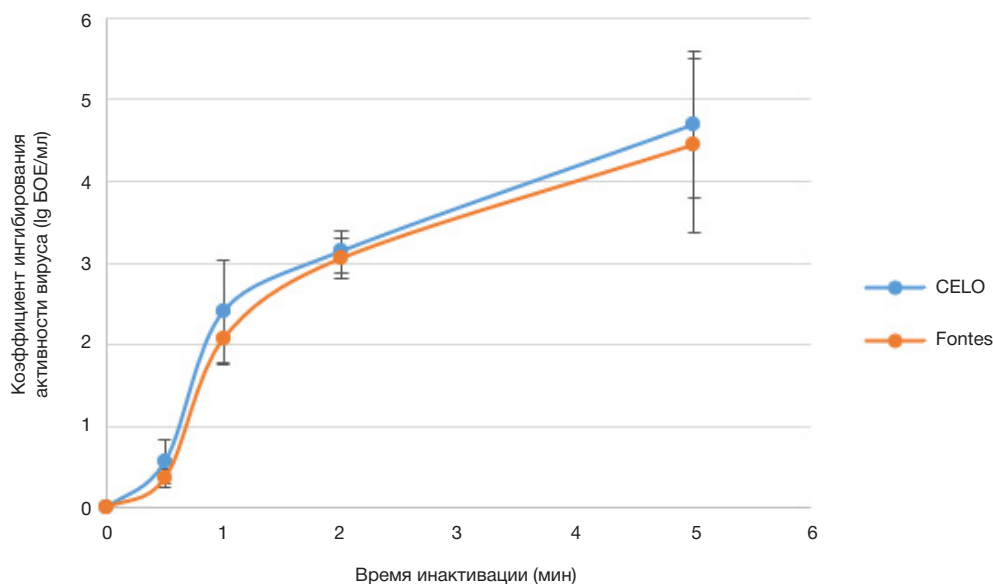


Рис. 2. Динамика инактивации аденовируса птиц штаммов CELO и Fontes при действии УФ-излучения

излучения, что обуславливает необходимость проведения инактивации вирусосодержащей аллантоисной жидкости в технологическом процессе получения гриппозных препаратов не менее 5 мин действия УФ-излучения.

#### Изучение динамики инактивации аденовируса птиц в вирусных концентратах с использованием детергентов

Для моделирования инфицирования ВК аденовирусами птиц и их инактивации к образцам ВК добавляли 10% по объему предварительно оттитрованный инфекционный материал, содержащий аденовирус птиц, так, чтобы конечное его содержание составляло не менее  $10^5$  БОЕ/мл. К контаминированным ВК добавляли предварительно растворенные в фосфатно-солевом буфере детергенты н-октил- $\beta$ -D-глюкопиранозид (соотношение общего белка к детергенту — 1/8) и тетрадецилтриметиламмоний бромид (ТДТАБ) (соотношение общего белка к детергенту — 1/0,5) и определяли значение титра аденовируса птиц в образцах. Динамика инактивации представлена на рис. 3 и 4.

Снижение титра аденовируса при действии детергентов на 1 lg БОЕ/мл происходило спустя 1 ч расщепления вируса гриппа детергентами, а именно на  $0,93 \pm 0,15$  lg и  $1,04 \pm 0,12$  lg для штаммов CELO и Fontes соответственно при использовании н-октил- $\beta$ -D-глюкопиранозид и  $1,18 \pm 0,17$  lg и  $1,12 \pm 0,38$  lg при использовании тетрадецилтриметиламмония бромид.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По результатам исследования, инактивация как  $\beta$ -пропиолактоном, так и УФ-излучением эффективна в отношении контаминанта — аденовируса штаммов Fontes и CELO, однако вариабельность результатов при действии УФ-излучения выше (табл. 2).

Полученные данные могут свидетельствовать о меньшей стабильности процесса инактивации и как следствие — повышении риска выпуска некачественной гриппозной вакцины. Большинство фармацевтических производителей, как отечественных, так и зарубежных, инактивируют вирус гриппа химическим способом.

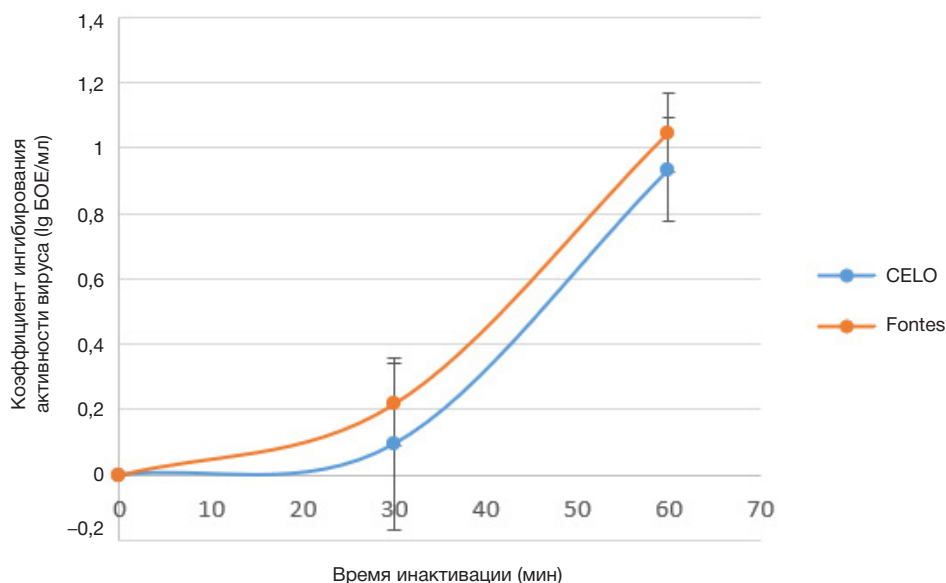


Рис. 3. Динамика инактивации аденовируса птиц штаммов CELO и Fontes при действии н-октил- $\beta$ -D-глюкопиранозидом

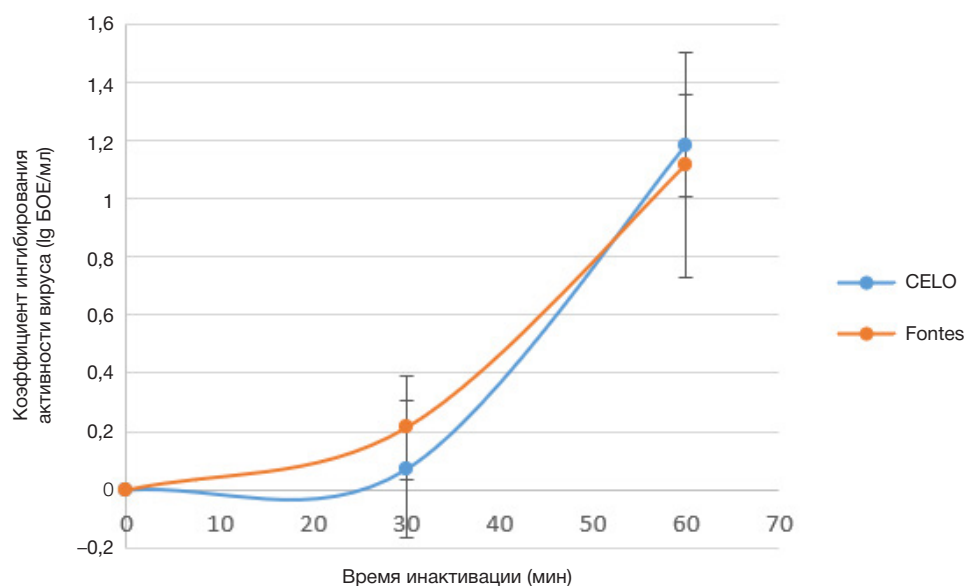


Рис. 4. Динамика инактивации аденовируса птиц штаммов CELO и Fontes при действии ТДТАБ

В частности, компании Novartis, ID Biomedical Corp of Quebec и ФГУП СГБНИИВС ФМБА России для производства гриппозной вакцины используют инактивацию  $\beta$ -пропиолактоном [13–15]. Таким образом, используемый способ инактивации может гарантированно инактивировать не только вирус гриппа, но и возможный контаминант — аденовирус птиц.

## ВЫВОДЫ

В результате проведенного исследования была выбрана оптимальная клеточная линия для культивирования аденовирусов птиц Fontes и CELO. Показано, что линия Vero обеспечивает репродукцию вирусов примерно на два порядка выше по сравнению с линиями клеток Нер-2 и МА-104. Выявлено, что минимальное время инактивирования аденовируса содержащей аллантоисной жидкости с использованием  $\beta$ -пропиолактона при получении

гриппозных вакцин, составляет 10 ч, что гарантированно снижает нагрузку аденовируса птиц на 4 lg БОЕ/мл. В случае использования УФ-излучения для инактивации вирусных концентратов время инактивации должно составлять не менее 5 мин экспозиции, что гарантированно снижает нагрузку аденовируса птиц на 4 lg БОЕ/мл. Дополнительное снижение нагрузки аденовируса птиц на 1 lg БОЕ/мл происходит после добавления детергентов при получении гриппозных расщепленных вакцин. Таким образом, технология получения гриппозных вакцин, включающая стадии инактивирования аллантоисной жидкости  $\beta$ -пропиолактоном в течение 10 ч с последующим добавлением детергента через 1 ч, гарантированно обеспечивает полное инактивирование аденовирусов птиц. Однако аденовирус является не единственным возможным контаминантом и на следующем этапе представляется необходимым изучение кинетики инактивации  $\beta$ -пропиолактоном вируса лейкоза птиц и микоплазмы.

Таблица 2. Снижение вирусной нагрузки аденовируса при действии различными инактиваторами

| Инактиватор                                       | Наименование штамма |                    |
|---------------------------------------------------|---------------------|--------------------|
|                                                   | CELO                | Fontes             |
| $\beta$ -Пропиолактон<br>(время инактивации 10 ч) | 4,12 $\pm$ 0,06 lg  | 4,20 $\pm$ 0,19 lg |
| УФ-излучение<br>(время инактивации 5 м)           | 4,69 $\pm$ 0,89 lg  | 4,44 $\pm$ 1,06    |

## Литература

- Guideline on Influenza vaccines — Quality module. EMA/CHMP/BWP/310834/2012 Rev.1 Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP), 2017. Available from: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-influenza-vaccines-quality-module-revision-1\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-influenza-vaccines-quality-module-revision-1_en.pdf).
- Серия технических докладов ВОЗ, № 927, 2005 год. Приложение 3. Рекомендации по производству и контролю вакцин против гриппа (инактивированных).
- Sabbaghi A, Miri SM, Keshavarz M, Zargar M, Ghaemi A. Inactivation methods for whole influenza vaccine production. Rev Med Virol. 2019 Nov; 29 (6): e2074.
- King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Leftkowitz EJ, editors. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, 2012; 1327 p.
- Qing Pan, Jing Wang, Yulong Gao, Qi Wang, Hongyu Cui, Changjun Liu, et al. Identification of chicken CAR homology as a cellular receptor for the emerging highly pathogenic fowl adenovirus 4 via unique binding mechanism, Emerging Microbes & Infections. 2020; 9 (1): 586–96.
- Бакулин В. А., Мурый В. А. Аденовирусный гепатит с включениями-гидроперикардит кур: эпизоотология, диагностика и специфическая профилактика. Био. 2011; 12: 28–30.
- Борисов В. В. Разработка средств и методов диагностики и специфической профилактики аденовирусных болезней кур [диссертация]. Иваново, 2007.

8. Kap M, Arron GI, Loibner M, Hausleitner A, Siaulyte G, Zatloukal K, Riegman P. Inactivation of Influenza A virus, Adenovirus, and Cytomegalovirus with PAXgene Tissue Fixative and Formalin. *Biopreservation and Biobanking*. 2013; 11 (4): 229–34.
9. Herrera-Rodriguez J, Signorazzi A, Holtrop M, de Vries-Idema J, Huckriede A. Inactivated or damaged? Comparing the effect of inactivation methods on influenza virions to optimize vaccine production. *Vaccine*. 2019; 37 (12): 1630–7.
10. Shuo Lei, Xun Gao, Yang Sun, Xiangyong Yu, Longshan Zhao. Gas chromatography-mass spectrometry method for determination of  $\beta$ -propiolactone in human inactivated rabies vaccine and its hydrolysis analysis, *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2018; 8 (6): 373–7.
11. Руководство по исследованию валидации вирусной очистки: проектирование, вклад и интерпретация исследований, использующих инактивацию и удаление вирусов. EMA CPMP/BWP/268/95; 1996.
12. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene*. 1938; 27: 493–7.
13. Haussmann C, Hauschild F, Jobst B, Novartis AG, assignee. Improvements in preparation of influenza virus vaccine antigens. United States patent US № US6986808P. 18.03.2008.
14. Burt DS, Jones DH, Lowell GH, White GL, Torossian K, Fries LF, assignee. ID Biomedical Corp of Quebec. Proteosome influenza vaccine. United States patent US № US18247600P. 15.02.2000.
15. Трухин В. П., Евтушенко А. Э., Красильников И. В., Савина Н. Н., Быков Д. Г., Уйба С. В., Васильев А. Н., Рыськова Е. В., Начарова Е. П., Аракелов С. А., авторы; Федеральное государственное унитарное предприятие «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» Федерального медико-биологического агентства (ФГУП СПбНИИВС ФМБА России), патентообладатель. Способ получения антигена или антигенов для производства противогриппозной вакцины и вакцина на его основе. Патент РФ № RU2019118695A. 14.06.2019.

## References

1. Guideline on Influenza vaccines — Quality module. EMA/CHMP/BWP/310834/2012 Rev.1 Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP), 2017. Available from: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-influenza-vaccines-quality-module-revision-1\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-influenza-vaccines-quality-module-revision-1_en.pdf).
2. Serija tehničkih dokladow VOZ, # 927, 2005 god. Prilozhenie 3. Rekomendacii po proizvodstvu i kontrolju vakcin protiv grippa (inaktivirovannyh). Russian.
3. Sabbaghi A, Miri SM, Keshavarz M, Zargar M, Ghaemi A. Inactivation methods for whole influenza vaccine production. *Rev Med Virol*. 2019 Nov; 29 (6): e2074.
4. King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Leftkowitz EJ, editors. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, 2012; 1327 p.
5. Qing Pan, Jing Wang, Yulong Gao, Qi Wang, Hongyu Cui, Changjun Liu, et al. Identification of chicken CAR homology as a cellular receptor for the emerging highly pathogenic fowl adenovirus 4 via unique binding mechanism, *Emerging Microbes & Infections*. 2020; 9 (1): 586–96.
6. Bakulin V. A., Murj V. A. Adenovirusnyj gepatit s vkluchenijami gidroperekardit kur: jepizootologija, diagnostika i specificheskaja profilaktika. *Bio*. 2011; 12: 28–30. Russian.
7. Borisov VV. Razrabotka sredstv i metodov diagnostiki i specificheskoi profilaktiki adenovirusnyh boleznej kur [dissertacija]. Ivanovo, 2007.
8. Kap M, Arron GI, Loibner M, Hausleitner A, Siaulyte G, Zatloukal K, Riegman P. Inactivation of Influenza A virus, Adenovirus, and Cytomegalovirus with PAXgene Tissue Fixative and Formalin. *Biopreservation and Biobanking*. 2013; 11 (4): 229–34.
9. Herrera-Rodriguez J, Signorazzi A, Holtrop M, de Vries-Idema J, Huckriede A. Inactivated or damaged? Comparing the effect of inactivation methods on influenza virions to optimize vaccine production. *Vaccine*. 2019; 37 (12): 1630–7.
10. Shuo Lei, Xun Gao, Yang Sun, Xiangyong Yu, Longshan Zhao. Gas chromatography-mass spectrometry method for determination of  $\beta$ -propiolactone in human inactivated rabies vaccine and its hydrolysis analysis, *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2018; 8 (6): 373–7.
11. Rukovodstvo po issledovaniju validacii virusnoj ochistki: proektirovanie, vklad i interpretacija issledovanij, ispol'zujushhih inaktivaciju i udalenie virusov. EMA CPMP/BWP/268/95; 1996. Russian.
12. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene*. 1938; 27: 493–7.
13. Haussmann C, Hauschild F, Jobst B, Novartis AG, assignee. Improvements in preparation of influenza virus vaccine antigens. United States patent US № US6986808P. 18.03.2008.
14. Burt DS, Jones DH, Lowell GH, White GL, Torossian K, Fries LF, assignee. ID Biomedical Corp of Quebec. Proteosome influenza vaccine. United States patent US № US18247600P. 15.02.2000.
15. Truhin VP, Evtushenko AY, Krasilnikov IV, Savina NN, Bykov DG, Ujba SV, Vasilev AN, Ryskova EV, Nacharova EP, Arakelov SA, avtory; Federal'noe gosudarstvennoe unitarnoe predpriyatie «Sankt-Peterburgskij nauchno-issledovatel'skij institut vakcin i syvorotok i predpriyatie po proizvodstvu bakterijnyh preparatov» Federal'nogo mediko-biologicheskogo agentstva (FGUP SPbNIIVS FMBA Rossii), patentoobladatel'. Sposob polucheniya antigena ili antigenov dlja proizvodstva protivogrippoiznoj vakciny i vakcina na ego osnove. Patent RF # RU2019118695A. 14.06.2019. Russian.

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТРЕХ НОВЫХ БАКТЕРИОФАГОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ФАГОВОЙ ТЕРАПИИ

Р. Б. Городничев , М. А. Корниенко, Н. С. Купцов, М. В. Малахова, Д. А. Беспятых, В. А. Веселовский, Е. А. Шитиков, Е. Н. Ильина  
Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Бактерия *Klebsiella pneumoniae* способна вызывать широкий спектр внутрибольничных инфекций человека, ассоциированных с антибиотикорезистентностью и высокой смертностью. Одна из перспективных альтернатив применению антибиотиков для лечения таких инфекций — терапия вирулентными бактериофагами. Целью работы было выделить из внешней среды вирулентные бактериофаги, эффективные против актуальных клинических штаммов *K. pneumoniae*, и дать их молекулярно-генетическую характеристику. Бактериофаги выделяли из проб речной воды методом накопительных культур. Полногеномное секвенирование бактериофагов выполняли на платформе MiSeq (Illumina). Выделено и описано три новых бактериофага *K. pneumoniae*, принадлежащих к семействам *Autographiviridae* (vB\_KpnP\_NER40, GenBank MZ602146) и *Myoviridae* (vB\_KpnM\_VIK251, GenBank MZ602147; vB\_KpnM\_FRZ284, GenBank MZ602148). На коллекции из 105 клинических штаммов *K. pneumoniae* установлено, что бактериофаги vB\_KpnP\_NER40 и vB\_KpnM\_VIK251 обладают узким спектром литической активности (22% и 11%), ограниченными штаммами с капсульным типом K2 и K20 соответственно. Бактериофаг vB\_KpnM\_FRZ284, напротив, имел широкий спектр литической активности (37%), вызывая лизис штаммов с различным типом капсульного полисахарида. Фаги обладают строго вирулентной природой и не несут в составе генома гены интеграз, токсинов или факторов патогенности. В составе геномов капсулоспецифичных бактериофагов vB\_KpnP\_NER40 и vB\_KpnM\_VIK251 обнаружены гены деполимераз, кодирующие потенциальные рецепторсвязывающие белки. Коктейль из трех бактериофагов лизировал около 65% штаммов исследуемой коллекции *K. pneumoniae* и потенциально применим в терапевтических целях.

**Ключевые слова:** вирулентные бактериофаги, *Klebsiella pneumoniae*, антибиотикорезистентность, фаготерапия, деполимеразы

**Финансирование:** исследование выполнено за счет средств, предоставленных для выполнения государственного задания «Разработка персонализированного подхода терапии инфекционных процессов с применением вирулентных бактериофагов» (ШИФР: Бактериофаг).

**Благодарности:** авторы благодарят Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России за секвенирование геномов бактериофагов.

**Вклад авторов:** Р. Б. Городничев, М. А. Корниенко, Е. А. Шитиков — план исследований, обработка данных, написание статьи; Н. С. Купцов — набор и обработка данных, написание статьи; М. В. Малахова, В. А. Веселовский — набор данных; Д. А. Беспятых — обработка данных, Е. Н. Ильина — план исследований, написание статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** вся экспериментальная работа выполнена с соблюдением норм Санитарно-эпидемиологических правил «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» СП 1.3.2322-08; Санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2518-09 — «Дополнения и изменения № 1 к санитарно-эпидемиологическим правилам «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» СП 1.3.2322-08; Санитарно-эпидемиологических правил «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» СанПиН 2.1.7.2790-10, а также Федеральных клинических рекомендаций «Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противозидемической практике».

 **Для корреспонденции:** Роман Борисович Городничев  
ул. Малая Пироговская, д. 1а, г. Москва, 119435; gorodnichev.r.b@gmail.com

**Статья получена:** 21.07.2021 **Статья принята к печати:** 26.08.2021 **Опубликована онлайн:** 29.09.2021

**DOI:** 10.47183/mes.2021.035

## MOLECULAR GENETIC CHARACTERIZATION OF THREE NEW *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* BACTERIOPHAGES SUITABLE FOR PHAGE THERAPY

Gorodnichev RB , Kornienko MA, Kuptsov NS, Malakhova MV, Bespiatykh DA, Veselovsky VA, Shitikov EA, Ilna EN  
Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

The *Klebsiella pneumoniae* bacterium is capable of causing the broad range of human nosocomial infections associated with antibiotic resistance and high mortality. Virulent bacteriophage therapy is one of the promising alternatives to antibiotic treatment of such infections. The study was aimed to isolate virulent bacteriophages effective against the relevant clinical *K. pneumoniae* strains, and to perform the molecular genetic characterization of these phages. Bacteriophages were isolated from the river water samples using the enrichment method. The whole-genome sequencing was performed on the MiSeq platform (Illumina). Three novel *K. pneumoniae* bacteriophages belonging to families *Autographiviridae* (vB\_KpnP\_NER40, GenBank MZ602146) and *Myoviridae* (vB\_KpnM\_VIK251, GenBank MZ602147; vB\_KpnM\_FRZ284, GenBank MZ602148) have been isolated and characterized. On the collection of 105 *K. pneumoniae* clinical strains, it has been found that bacteriophages vB\_KpnP\_NER40 and vB\_KpnM\_VIK251 have a narrow lytic spectrum (22% and 11%), which is limited to strains of the capsular types K2 and K20 respectively. In contrast, bacteriophage vB\_KpnM\_FRZ284 has a broad lytic spectrum (37%), causing the lysis of strains with different types of capsular polysaccharide. The phages are strictly virulent and have no genes encoding integrases, toxins or pathogenicity factors in their genomes. Genes of depolymerases, encoding the potential receptor binding proteins, have been found in the genomes of the capsular-specific bacteriophages vB\_KpnP\_NER40 and vB\_KpnM\_VIK251. The cocktail of three bacteriophages has lysed about 65% of the studied collection of *K. pneumoniae* strain and is potentially applicable for therapeutic purposes.

**Keywords:** virulent bacteriophages, *Klebsiella pneumoniae*, antibiotic resistance, phage therapy, depolymerases

**Funding:** the study was carried out within the framework of the State Assignment "Development of a Personalized Approach to the Therapy of Infections Using Virulent Bacteriophages" (CODE: Бактериофаг).

**Acknowledgements:** the authors thank the Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, the Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of the Russian Federal Medical Biological Agency, for their help with bacteriophage genome sequencing.

**Author contribution:** Gorodnichev RB, Kornienko MA, Shitikov EA — study plan, data processing, manuscript writing; Kuptsov NS — data acquisition and processing, manuscript writing; Malakhova MV, Veselovsky VA — data acquisition; Bespiatykh DA — data processing, Ilna EN — study plan, manuscript writing.

**Compliance with ethical standards:** experimental work was carried out in strict compliance with the guidelines SP 1.3.2322-08 "Safety of Working With Microorganisms of III–IV Groups of Pathogenicity (Danger) and Causative Agents of Parasitic Diseases"; guidelines SP 1.3.2518-09 "Additions and Amendments № 1 to the guidelines SP 1.3.2322-08 "Safety of Working With Microorganisms of III–IV Groups of Pathogenicity (Danger) and Causative Agents of Parasitic Diseases"; guidelines "Sanitary and Epidemiologic Requirements for the Handling of Medical Waste" (SanPIN 2.1.7.2790-10), and Federal Clinical Guidelines "Rational Use of Bacteriophages in Clinical and Epidemiological Practice".

 **Correspondence should be addressed:** Roman B. Gorodnichev  
Malaya Pirogovskaya, 1a, Moscow, 119435; gorodnichev.r.b@gmail.com

**Received:** 21.07.2021 **Accepted:** 26.08.2021 **Published online:** 29.09.2021

**DOI:** 10.47183/mes.2021.035

*Klebsiella pneumoniae* — широко распространенная в окружающей среде грамотрицательная неподвижная факультативно анаэробная бактерия. Микроорганизмы этого вида традиционно считают комменсалами, их можно обнаружить на коже человека, в желудочно-кишечном и дыхательном трактах [1]. Это второй по распространенности внутрибольничный патоген в мире, способный вызывать широкий спектр инфекций, таких как абсцессы, гнойные раны, септицемия, пневмония, инфекции мочевыводящих путей и желудочно-кишечного тракта [2].

Нерациональное использование антибиотиков в мире привело к возникновению и распространению бактерий с лекарственной устойчивостью. Среди представителей рода *Klebsiella* наибольшую опасность представляют изоляты, несущие гены бета-лактамаз расширенного спектра действия, или гены карбапенемаз [3]. По данным карты антибиотикорезистентности России, 30–60% нозокомиальных изолятов могут иметь устойчивость к карбапенемам и 60–80% к цефалоспорином третьего поколения [4].

Вследствие кризиса, вызванного распространением устойчивых форм бактерий, особую актуальность приобретает поиск новых подходов к антимикробной терапии. Одной из перспективных альтернатив является терапия вирулентными бактериофагами (фагами) [5]. Фаги — это естественные антагонисты бактерий в природных популяциях, способные быстро и избирательно лизировать патогены, включая изоляты *K. pneumoniae*, ассоциированные с устойчивостью к антибиотикам. Бактериофаговую терапию применяют в клинической практике с начала XX в., и за всю историю ее использования не было выявлено ни одного значимого побочного эффекта [6]. В настоящее время эффективность и безопасность фаготерапии подтверждены на моделях млекопитающих и *Galleria mellonella*, а также клинически [7, 8]. Естественным ограничением этого подхода является узкий спектр хозяев отдельных бактериофагов. В этой связи для борьбы с неизвестным патогеном приходится использовать фаговые коктейли, содержащие активные бактериофаги против разных видов бактерий [9].

Диапазон хозяев фагов *K. pneumoniae* хорошо коррелирует с типом капсульного полисахарида (КПС) [10]. На сегодняшний день описано не менее 130 типов КПС, который является ключевым фактором вирулентности, защищающим бактерии от иммунной системы человека и действия некоторых антибиотиков [11]. Штаммы, характеризующиеся повышенным уровнем экспрессии КПС, часто более вирулентны и относятся к группе гипервирулентных *K. pneumoniae* [12].

Большинство фагов *K. pneumoniae* кодируют деполимеразы — ферменты, способные разлагать экзополисахаридную капсулу путем расщепления гликозидных связей [10, 13]. Разнообразие фаговых деполимераз представляет особый интерес, поскольку исследование ферментов может привести к разработке нового класса противомикробных агентов. Показано, что фаговые деполимеразы могут увеличить скорость инактивации бактерий сывороткой *in vitro* и значительно повысить выживаемость в моделях мышей и личинок *Galleria mellonella* [14, 15]. Кроме того, фаговые деполимеразы могут быть использованы для быстрого определения типов микробных капсул или разрушения бактериальных биопленок [16].

Целью исследования было провести выделение из внешней среды вирулентных бактериофагов, эффективных

против актуальных клинических штаммов *K. pneumoniae*, дать их описание и оценку перспективности использования в качестве агентов фаговой терапии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Штаммы бактерий и их характеристика

Коллекция, включающая 105 штаммов *K. pneumoniae*, была собрана в 2018–2019 гг. на базе Клинической больницы № 123 Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины ФМБА России. Все бактерии выращивали в лизогенном бульоне (LB) (Himedia; Индия) при 37 °С. Идентификацию бактерий проводили методом MALDI-TOF масс-спектрометрии, как описано ранее [17]. Чувствительность к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом в соответствии с руководством Института клинических и лабораторных стандартов [18].

### Молекулярно-генетическая характеристика бактериальных штаммов

Выделение геномной ДНК выполняли с помощью набора «ДНК-экспресс» («Литех»; Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Мультилокусное секвенирование-типирование (MLST) штаммов *K. pneumoniae* проводили путем определения нуклеотидных последовательностей семи генов домашнего хозяйства по стандартной схеме, как описано ранее [19]. Капсульный тип определяли методом секвенирования по Сенгеру гена *wzi* [20]. Реакцию амплификации генов, входящих в схемы молекулярно-генетического типирования, проводили на TETRAD DNA ENGINE (MJ Research; США). Для секвенирования по Сенгеру использовали прибор 3730 DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific; Великобритания).

### Выделение и очистка бактериофагов

Три штамма *K. pneumoniae* Kp40, Kp25-1 и Kp284 были использованы в качестве хозяев для выделения бактериофагов. Фаги vB\_KpnP\_NER40, vB\_KpnM\_VIK251 и vB\_KpnM\_FRZ284 были выделены из проб воды реки Чермянка по ранее описанному методу [21]. Образец речной воды объемом 15 мл центрифугировали при 10 000 g в течение 15 мин, а супернатант фильтровали с помощью стерильного мембранного шприцевого фильтра 0,22 мкм (Millipore; США). Отфильтрованный супернатант и 0,2 мл культуры штамма-хозяина в фазе логарифмического роста (OD 600 нм = 0,3) добавляли к 15 мл LB-бульона двойной концентрации и инкубировали в течение ночи при перемешивании (200 об./мин) при 37 °С для обогащения фаговой фракции. Далее культуру центрифугировали при 10 000 g в течение 15 мин и затем фильтровали через 0,22 мкм фильтры. Полученные лизаты серийно разводили в LB и определяли титр фага методом агаровых слоев по Грациа для обнаружения и выделения монофагов [22]. Моноизоляты получали последовательным (трехкратным) выделением из отдельных негативных колоний.

### Определение спектра литической активности

Спектр литической активности фагов устанавливали методом спот-тестирования с использованием 105 штаммов *K. pneumoniae*. Аликвоту 100 мкл культуры каждого штамма в фазе логарифмического роста

(OD 600 нм = 0,3) добавляли к 5 мл полужидкого агара (0,6%), который затем вносили поверх нижнего агарового слоя. Фаговый лизат объемом 5 мл с титром  $10^6$  БОЕ/мл наносили каплями на свежевысеянные газоны штаммов и оставляли высыхать до полного впитывания. Результат оценивали после инкубации в течение ночи при 37 °С по наличию зон лизиса на месте нанесенных капель бактериофага. В случае образования сплошной зоны лизиса или единичных негативных колоний штамм бактерии считали чувствительным к действию бактериофага.

### Полногеномное секвенирование бактериофагов и биоинформатический анализ данных

Для выделения тотальной ДНК фагов использовали стандартный протокол фенол-хлороформной экстракции, как описано ранее [23]. Процедуру секвенирования осуществляли с помощью инструмента MiSeq с использованием набора реагентов для секвенирования MiSeq Reagent Nano Kit v2 (500cycle) (Illumina; США) согласно рекомендациям производителя.

Сборку геномов проводили с помощью программы SPAdes (v.3.14.0). Открытые рамки считывания (ORF) предсказывали с помощью GeneMarkS (версия 4.32), Phast и VGAS. Программные пакеты tRNAScan-SE (University of California Santa Cruz, USA) и ARAGORN (Murdoch University, Australia) использовали для предсказания наличия в геноме транспортной РНК (тРНК). Предполагаемые функции белков, кодируемых отдельными ORF, были предсказаны вручную с помощью BLASTp, HHPred, Phast и InterPro. Поиск генов токсинов и других факторов вирулентности в геномах бактериофагов осуществляли с использованием баз данных факторов вирулентности патогенных бактерий [24]. Для выявления детерминант устойчивости к антибиотикам проводили сравнение с базой генов устойчивости к антибиотикам [25]. Филогенетический анализ осуществляли с использованием аминокислотных последовательностей РНК-полимеразы для фагов семейства *Autographiviridae* и большой субъединицы терминазы для фагов семейства *Myoviridae* в соответствии с рекомендациями Международного комитета по таксономии вирусов (МКТВ) (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy>). Филогенетическое древо было построено с помощью метода дистанционной филогении Genome-BLAST, реализованного в веб-сервере VICTOR.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### Выделение и фенотипическая характеристика трех новых фагов *Klebsiella pneumoniae*

В качестве штамма-хозяина для фага vB\_KpnP\_NER40 был использован штамм *K. pneumoniae* Kp40, относящийся к

сиквенс-типу (ST) 395 и капсульному типу K2. Штамм *K. pneumoniae* Kp25-1, принадлежащий к ST268 и капсульному типу K20, использовали в качестве хозяина для выделения бактериофага vB\_KpnM\_VIK251. Третий штамм *K. pneumoniae* Kp284, относящийся к редкому сиквенс-типу ST1655 и обладающий неопределенным типом капсулы, был выбран как штамм-хозяин для фага vB\_KpnM\_FRZ284. Штаммы *K. pneumoniae*, использованные в качестве хозяев, обладали устойчивостью к трем и более классам антибиотиков, в том числе к меропенему.

Бактериофаг vB\_KpnP\_NER40 формировал крупные (3–5 мм) негативные колонии, окруженные широким (2–4 мм) ореолом. Негативные колонии фага vB\_KpnM\_VIK251 характеризовались меньшим размером (2–3 мм) и были окружены небольшим (1–2 мм) ореолом. Фаг vB\_KpnM\_FRZ284 формировал мелкие (1–2 мм) негативные колонии без ореола (рис. 1). По литературным данным, наличие полупрозрачного ореола вокруг негативной колонии связано с предполагаемой активностью фаговых деполимераз [26].

#### Спектр литической активности бактериофагов

Для определения спектра литической активности исследуемых фагов использовали коллекцию из 105 штаммов *K. pneumoniae*. По результатам типирования последовательности гена *wzi*, штаммы *K. pneumoniae* имели 20 уникальных капсульных типов. Наиболее распространенными капсульными типами были K2 ( $n = 25$ ; 23,8%), K20 ( $n = 17$ ; 16,2%), KL39 ( $n = 14$ ; 13,3%) и KL64 ( $n = 9$ ; 8,6%).

Бактериофаги vB\_KpnP\_NER40 и vB\_KpnM\_VIK251 обладали узким спектром литической активности, ограниченным штаммами с одним капсульным типом (табл. 1). Фаг vB\_KpnP\_NER40 лизировал 23 из 25 штаммов с капсульным типом K2, а фаг vB\_KpnM\_VIK251 — 12 из 17 штаммов с капсульным типом K20. Напротив, фаг vB\_KpnM\_FRZ284 показывал литическую активность, не ограниченную каким-то одним типом капсулы, и лизировал 39 штаммов коллекции 14 различных капсульных типов (табл. 1).

#### Анализ результатов полногеномного секвенирования бактериофагов

Для бактериофагов vB\_KpnP\_NER40, vB\_KpnM\_VIK251 и vB\_KpnM\_FRZ284 было проведено полногеномное секвенирование с последующим анализом данных. Аннотированные геномные последовательности бактериофагов были депонированы в базе данных NCBI GenBank под номерами MZ602146 (vB\_KpnP\_NER40), MZ602147 (vB\_KpnM\_VIK251) и MZ602148 (vB\_KpnM\_FRZ284).

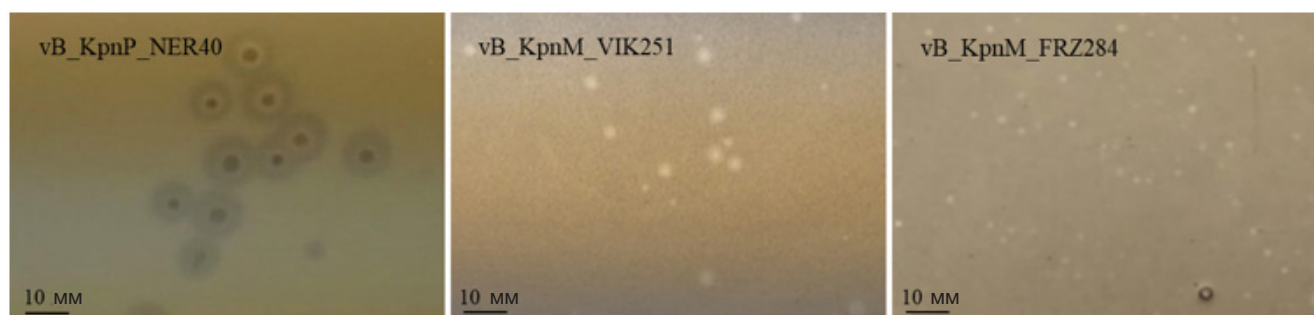


Рис. 1. Морфология негативных колоний бактериофагов vB\_KpnP\_NER40, vB\_KpnM\_VIK251 и vB\_KpnM\_FRZ284

Таблица 1. Спектр литической активности фагов vB\_KpnP\_NER40, vB\_KpnM\_VIK251 и vB\_KpnM\_FRZ284

| Капсульный тип | Общее число штаммов | Число штаммов, лизируемых vB_KpnP_NER40 (% от общего) | Число штаммов, лизируемых vB_KpnM_VIK251 (% от общего) | Число штаммов, лизируемых vB_KpnM_FRZ284 (% от общего) |
|----------------|---------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| K1             | 3                   | 0                                                     | 0                                                      | 1 (33,3%)                                              |
| K2             | 25                  | 23 (92%)                                              | 0                                                      | 4 (16%)                                                |
| K7             | 1                   | 0                                                     | 0                                                      | 1 (100%)                                               |
| K19            | 4                   | 0                                                     | 0                                                      | 2 (50%)                                                |
| K20            | 17                  | 0                                                     | 12 (70,6 %)                                            | 2 (11,8%)                                              |
| K23            | 6                   | 0                                                     | 0                                                      | 3 (50%)                                                |
| KL24           | 3                   | 0                                                     | 0                                                      | 3 (100%)                                               |
| KL25           | 2                   | 0                                                     | 0                                                      | 0                                                      |
| KL38           | 1                   | 0                                                     | 0                                                      | 0                                                      |
| KL39           | 14                  | 0                                                     | 0                                                      | 8 (57,1%)                                              |
| KL45           | 5                   | 0                                                     | 0                                                      | 4 (80%)                                                |
| K47            | 2                   | 0                                                     | 0                                                      | 0                                                      |
| K57            | 6                   | 0                                                     | 0                                                      | 3 (50%)                                                |
| K60            | 1                   | 0                                                     | 0                                                      | 0                                                      |
| KL62           | 1                   | 0                                                     | 0                                                      | 1 (100%)                                               |
| KL63           | 2                   | 0                                                     | 0                                                      | 0                                                      |
| KL64           | 9                   | 0                                                     | 0                                                      | 5 (55,6%)                                              |
| KL107          | 1                   | 0                                                     | 0                                                      | 1 (100%)                                               |
| KL108          | 1                   | 0                                                     | 0                                                      | 0                                                      |
| wzi475         | 1                   | 0                                                     | 0                                                      | 1 (100%)                                               |

Геном фага vB\_KpnP\_NER40 был представлен двухцепочечной ДНК и имел длину 42 674 п.н. Содержание пар Г + Ц составило 54,3%. Биоинформационный анализ выявил 53 ОПС общей протяженностью 39 659 п.н. (табл. 2). Анализ нуклеотидной последовательности генома с помощью алгоритма BLASTn показал, что фаг vB\_KpnP\_NER40 принадлежит к семейству *Autographiviridae*. Для верификации филогенетического положения фага было построено филогенетическое древо на основании аминокислотных последовательностей РНК-полимеразы фагов, рекомендованных МКТВ и принадлежащих к семейству *Autographiviridae*. Согласно филогенетическому анализу, фаг vB\_KpnP\_NER40 принадлежит к роду *Drulisvirus* семейства *Autographiviridae* и наиболее близок к фагу phiBO1E (GenBank KM576124.1; 87% покрытия и 92,05% идентичности согласно BLASTn) (рис. 2).

Геном vB\_KpnM\_VIK251 представлял собой линейную молекулу дцДНК размером 141 994 п.н. с содержанием пар Г + Ц 44,6%. Всего было выявлено 242 открытые рамки считывания и 23 последовательности, кодирующие тРНК. Согласно BLASTn, фаг соответствовал семейству *Myoviridae* и был близок к представителям рода *Mydovirus*.

Геном фага vB\_KpnM\_FRZ284 также был представлен дцДНК и по данным BLASTn относился к семейству *Myoviridae*, однако был более близок к фагам, принадлежащим к роду *Jiaodavirus*. Фаг имел длину 166 376 п.н. с содержанием пар Г + Ц 39,6% и кодировал 274 открытых рамки считывания и 16 тРНК (см. табл. 2).

Для уточнения филогенетической позиции фагов *Myoviridae* было построено древо на основании аминокислотных последовательностей большой субъединицы терминазы фагов vB\_KpnM\_VIK251 и vB\_KpnM\_FRZ284 и фагов, рекомендованных МКТВ (рис. 3). По результатам филогенетического анализа фаг vB\_KpnM\_VIK251 относился к роду *Mydovirus* и наиболее близко располагался к фагу vB\_KpnM\_KB57 (GenBank KT934943.1; 87% покрытия и 96,71% идентичности согласно BLASTn).

Фаг vB\_KpnM\_FRZ284 соответствовал фагам семейства *Myoviridae*, рода *Jiaodavirus* и был близок к KPN5 (GenBank MN101229.1, 93% покрытия и 97,23% идентичности согласно BLASTn) (см. рис. 3).

#### Функциональная аннотация фагов *K. pneumoniae*

В процессе аннотации фага vB\_KpnP\_NER40 удалось предсказать функцию для 25 белков, кодируемых геномом. vB\_KpnP\_NER40 имел типичную для Т7-подобных фагов организацию и характеризовался присутствием фаговых ДНК- и РНК-полимераз, а также кассеты лизиса, состоящей из расположенных друг за другом генов, кодирующих спанин, холин и эндолизин [27]. В геноме не было обнаружено ни одного гена тРНК, известных детерминант устойчивости к антибиотикам, интеграз или токсинов.

В геноме фага vB\_KpnP\_NER40 было закодировано два белка, определяющих хозяйскую специфичность: NER40\_00045 и NER40\_00053. Первый белок NER40\_00045 имеет длину 318 аминокислот и представляет собой высококонсервативный белок для фагов рода *Drulisvirus*. Второй белок NER40\_00053 имеет высокую степень гомологии с хвостовыми фибриллами шести фагов *K. pneumoniae* (QE50388.1, CAD5239035.1, QJI52632.1, YP\_009789295.1, YP\_009792408.1, YP\_009006074.1; 96%-е покрытие и 98,42–97,52% идентичности согласно BLASTp). Более того, данный белок кодирует потенциальный домен пектатлиазы с бета-спиральной структурой, характерной для фаговых деполимераз.

Для фага vB\_KpnM\_VIK251 предполагаемая функция (структурные белки, ферменты, участвующие в репликации, регуляции, транскрипции и трансляции ДНК, лизис хозяина) может быть присвоена продуктам 145 открытых рамок считывания. Не было обнаружено ни одного гена, функция которого была бы связана с лизогенным жизненным циклом фагов. В составе генома данного фага

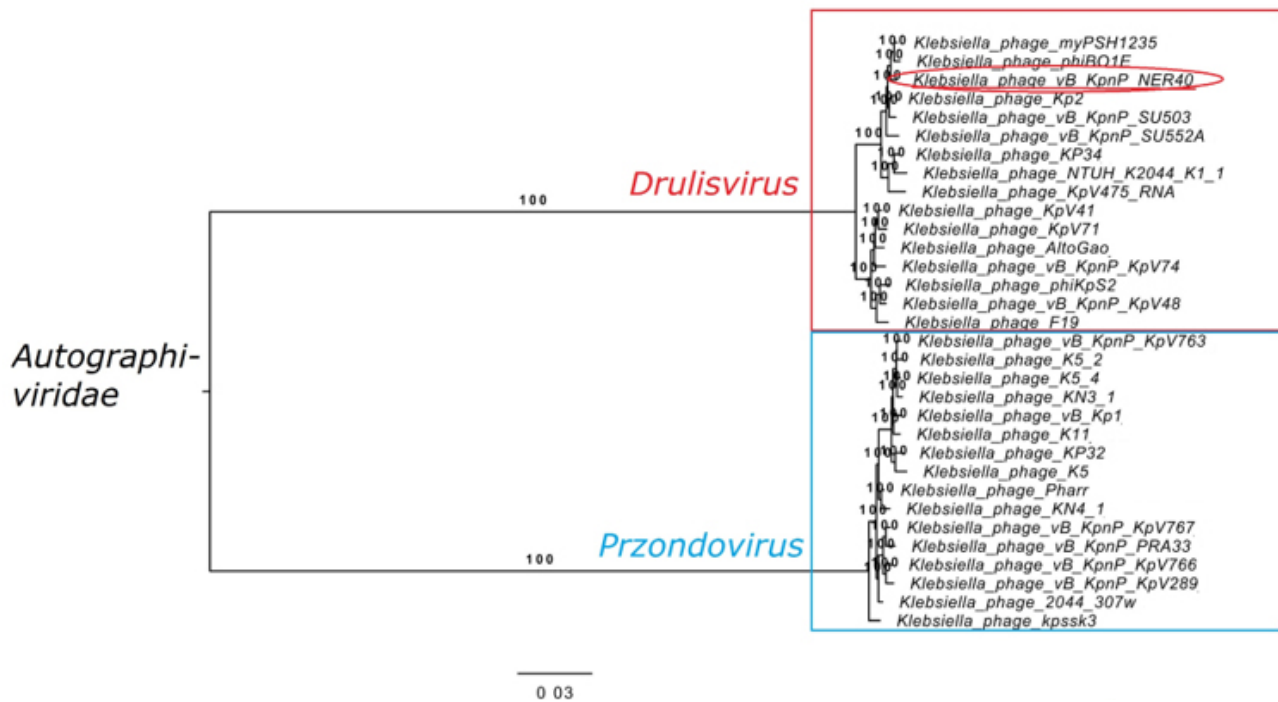


Рис. 2. Филогенетическое древо аминокислотных последовательностей РНК-полимеразы фагов *Autographiviridae*

было обнаружено как минимум два гена (VIK251\_00041 и VIK251\_00046), кодирующих гомологичные фаговым фибриллам белки.

Бактериофаг vB\_KpnM\_FRZ284 кодирует 126 белков, которым может быть приписана предполагаемая функция. В составе генома не было обнаружено генов интеграз, токсинов или иных факторов патогенности, исключающих его применение для терапии. Аппарат рецепторсвязывающих белков данного фага представлен четырьмя белками (FRZ284\_00009, FRZ284\_00012, FRZ284\_00098 и FRZ284\_00101), имеющими гомологию с известными белками фибрилл фагов рода *Jiaodavirus*.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мультирезистентные штаммы *K. pneumoniae*, принадлежащие к сиквенс-типам 395 и 268 и капсульным типам K2 и K20, были использованы в качестве штаммов-хозяев для выделения бактериофагов. Такие изоляты широко распространены и часто связаны с нозокомиальными вспышками, вызванными карбапенемрезистентными и гипервирулентными штаммами в Азии и Европе [28, 29].

В рамках поиска возможных альтернативных антимикробных терапевтических агентов были выделены три новых литических фага *K. pneumoniae*. Фаги vB\_KpnM\_VIK251 и vB\_KpnM\_FRZ284 принадлежат разным родам семейства *Myoviridae*. Фаг vB\_KpnP\_NER40 относится к семейству *Autographiviridae*. Фаги vB\_KpnP\_NER40 и vB\_KpnM\_VIK251 обладают выраженной капсулоспецифичностью (K2- и K20-специфичностью соответственно) и лизировали 70–90% штаммов, обладающих соответствующим капсульным типом. В свою очередь vB\_KpnM\_FRZ284 лизировал 36% штаммов коллекции независимо от капсульного типа штаммов.

Бактериофаг vB\_KpnP\_NER40 кодировал деполимеразу в составе рецепторсвязывающего белка, определяющую хозяйскую специфичность. Деполимераза фага vB\_KpnP\_NER40 гомологична нескольким рецепторсвязывающим белкам фагов, в том числе уже описанной деполимеразе

фага KpV74 (NC\_047811.1, 96%-е покрытие и 98,2% идентичности согласно BLASTp) с K2-специфичностью [14].

При более детальном рассмотрении генома бактериофага vB\_KpnM\_VIK251 можно заметить, что ген VIK251\_00052 кодирует белок с неизвестной функцией, однако N-концевая часть данного белка обладает высокой гомологией с хвостовой фибриллой, несущей рецепторсвязывающий деполимеразный домен у фага vB\_KpnM\_Seu621 (QOI68629.1). Остальная часть данного белка кодирует пектатлиазный домен с бета-спиральной структурой, что может говорить о принадлежности данного гипотетического белка к аппарату фаговых фибрилл, ответственных за распознавание хозяйских рецепторов и деполимеразную активность данного фага. Предполагаемая деполимераза фага vB\_KpnM\_VIK251 не имеет гомологичных белков, содержащихся в базе данных NCBI, что представляет большой интерес в связи с перспективностью деполимераз как возможного терапевтического агента для борьбы с клебсиеллезными инфекциями [15].

Механизм адсорбции третьего фага vB\_KpnM\_FRZ284 на сегодняшний день не известен, однако широкий спектр литической активности делает его перспективным для дальнейшего исследования в целях возможного биоинженерного расширения спектра литической активности других бактериофагов.

С точки зрения возможностей для терапии инфекционных заболеваний, вызванных *K. pneumoniae*, следует отметить, что коктейль, составленный из исследуемых фагов, лизует 65% штаммов коллекции, и это сравнимо с эффективностью коммерческих препаратов бактериофагов, включающих в свой состав несколько десятков бактериофагов [30].

## ВЫВОДЫ

Выделенные из природных источников бактериофаги vB\_KpnP\_NER40, vB\_KpnM\_VIK251 и vB\_KpnM\_FRZ284 демонстрируют высокий потенциал в качестве

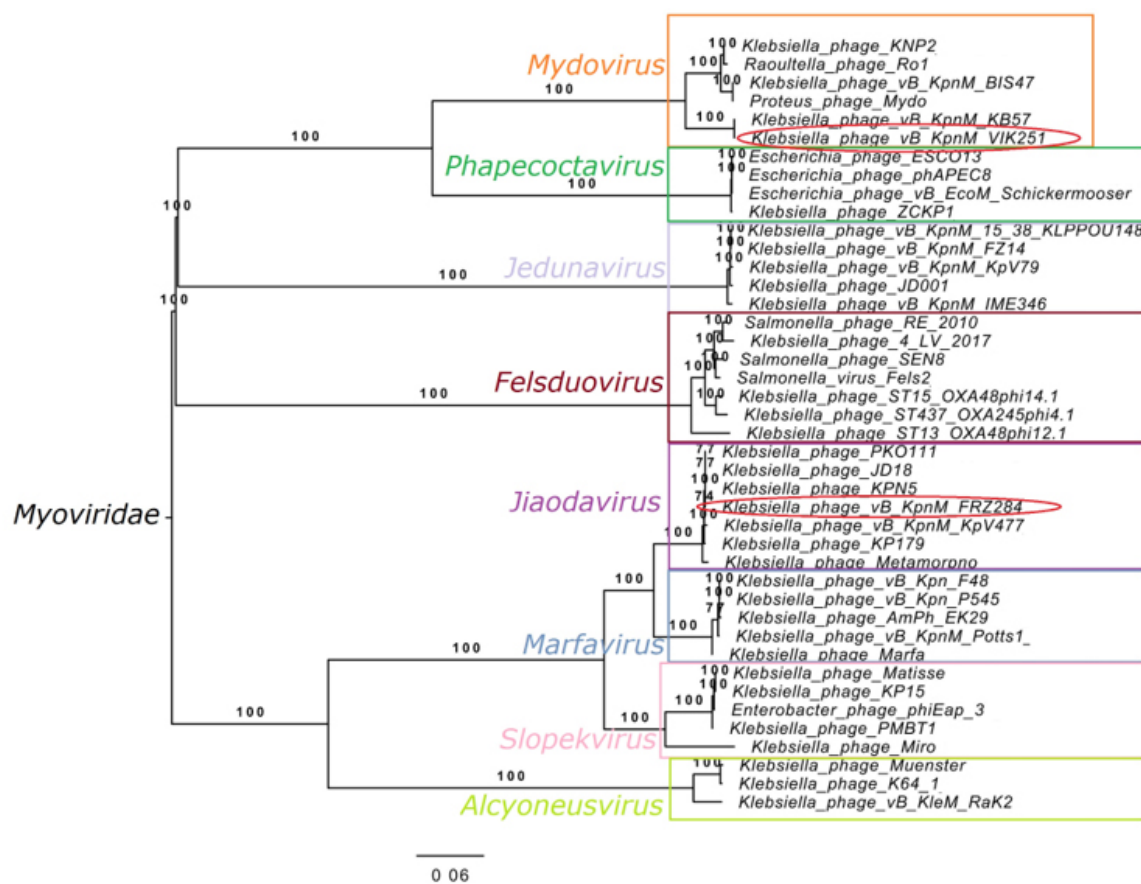


Рис. 3. Филогенетическое древо аминокислотных последовательностей большой субъединицы терминазы бактериофагов семейства Myoviridae

альтернативных антибактериальных агентов против *K. pneumoniae*, устойчивых к антибиотикам. Строгая хозяйская специфичность фагов vB\_KpnM\_VIK251 и vB\_KpnP\_NER40 и потенциальная способность разрушать

капсульные полисахариды, а также широкий спектр литической активности для фага vB\_KpnM\_FRZ284 делают исследуемые фаги перспективными кандидатами для получения высокоэффективных коктейлей бактериофагов.

Таблица 2. Общая характеристика геномов фагов vB\_KpnP\_NER40, vB\_KpnM\_VIK251 и vB\_KpnM\_FRZ284

| Бактериофаг    | Геном, п.н. | Г + Ц, % | ОПС | Семейство         | Род         |
|----------------|-------------|----------|-----|-------------------|-------------|
| vB_KpnP_NER40  | 42 674      | 54,3     | 53  | Autographiviridae | Drulisvirus |
| vB_KpnM_VIK251 | 14 1994     | 44,6     | 242 | Myoviridae        | Mydovirus   |
| vB_KpnM_FRZ284 | 16 6376     | 39,6     | 274 | Myoviridae        | Jiaodavirus |

## Литература

- Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2016; 80 (3): 629–61.
- Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11 (4): 589–603.
- Lee CR, et al. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Frontiers in microbiology*. 2016; 7: 895.
- Kuzmenkov AY, et al. AMRmap: an interactive web platform for analysis of antimicrobial resistance surveillance data in Russia. *Front Microbiol*. 2021; 12: 377.
- Górski A, et al. Phage therapy: current status and perspectives. *Med Res Rev*. 2020; 40 (1): 459–63.
- Payne RJH, Jansen VAA. Phage therapy: the peculiar kinetics of self-replicating pharmaceuticals. *Clin Pharmacol Ther*. 2000; 68 (3): 225–230.
- Schooley RT, et al. Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61 (10): e00954–17.
- Dedrick RM, et al. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat Med*. 2019; 25 (5): 730–3.
- Clark JR, March JB. Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. *Trends Biotechnol*. 2006; 24 (5): 212–8.
- Pires DP, et al. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016; 100 (5): 2141–51.
- Wyres KL, et al. Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data. *Microb genomics*. 2016; 2 (12): 1–12.
- Sobir SK, Struve C, Jacobsson SG. Primary *Klebsiella pneumoniae* liver abscess with metastatic spread to lung and eye, a North-European Case Report of an emerging syndrome. *Open Microbiol*. 2010; 4 (1): 5–7.
- Knecht LE, Veljkovic M, Fieseler L. Diversity and function of phage

- encoded depolymerases. *Front Microbiol.* 2020; 10: 2949.
14. Solovieva EV, et al. Comparative genome analysis of novel Podoviruses lytic for hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* of K1, K2, and K57 capsular types. *Virus Res.* 2018; 243: 10–18.
15. Volozhantsev N, et al. Characterization and therapeutic potential of Bacteriophage-encoded polysaccharide depolymerases with — galactosidase activity against *Klebsiella pneumoniae* K57 capsular type. *Antibiot.* 2020; 9 (11): 1–16.
16. Scorpio A, et al. Treatment of experimental anthrax with recombinant capsule depolymerase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52 (3): 1014.
17. Kornienko M, et al. Analysis of nosocomial *Staphylococcus haemolyticus* by MLST and MALDI-TOF mass spectrometry. *Infect Genet Evol.* 2016; 39: 99–105.
18. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing An informational supplement for global application developed through the Clinical and Laboratory Standards Institute consensus process. 29th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, 2019. Available from: [https://clsi.org/media/2663/m100ed29\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/2663/m100ed29_sample.pdf).
19. Diancourt L, et al. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol.* 2005; 43 (8): 4178–82.
20. Brisse S, et al. Wzi gene sequencing, a rapid method for determination of capsular type for *Klebsiella* strains. *J Clin Microbiol.* 2013; 51 (12): 4073–8.
21. Van Twest R, Kropinski AM. Bacteriophage enrichment from water and soil. *Methods Mol Biol.* 2009; 501: 15–21.
22. Mazzocco A, et al. Enumeration of bacteriophages using the small drop plaque assay system. *Methods Mol Biol.* 2009; 501: 81–85.
23. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 1989; 2.
24. Liu B, et al. VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47 (D1): D687–D692.
25. Liu B, Pop M. ARDB — Antibiotic Resistance Genes Database. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37.
26. Wang C, et al. Protective and therapeutic application of the depolymerase derived from a novel KN1 genotype of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage in mice. *Res Microbiol.* 2019; 170 (3): 156–64.
27. D'Andrea MM, et al.  $\phi$ bO1E, a newly discovered lytic bacteriophage targeting carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* of the pandemic Clonal Group 258 clade II lineage. *Sci Rep.* 2017; 7 (1): 1–8.
28. Yang J, et al. A nosocomial outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: dissemination of ST11 and emergence of ST37, ST392 and ST395. *Clin Microbiol Infect.* 2013; 19 (11): E509–E515.
29. Muggeo A, et al. Spread of *Klebsiella pneumoniae* ST395 non-susceptible to carbapenems and resistant to fluoroquinolones in North-Eastern France. *J Glob.* 2018; 13: 98–103.
30. Купцов Н. С., Корниенко М. А., Городничев Р. Б., Данилов Д. И., Малахова М. В., Парфенова Т. В. и др. Эффективность препаратов бактериофагов против патогенов группы ESKAPE. *Вестник РГМУ.* 2020; (3): 19–26.

## References

1. Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2016; 80 (3): 629–61.
2. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11 (4): 589–603.
3. Lee CR, et al. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Frontiers in microbiology.* 2016; 7: 895.
4. Kuzmenkov AY, et al. AMRmap: an interactive web platform for analysis of antimicrobial resistance surveillance data in Russia. *Front Microbiol.* 2021; 12: 377.
5. Górski A, et al. Phage therapy: current status and perspectives. *Med Res Rev.* 2020; 40 (1): 459–63.
6. Payne RJH, Jansen VAA. Phage therapy: the peculiar kinetics of self-replicating pharmaceuticals. *Clin Pharmacol Ther.* 2000; 68 (3): 225–230.
7. Schooley RT, et al. Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61 (10): e00954–17.
8. Dedrick RM, et al. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat Med.* 2019; 25 (5): 730–3.
9. Clark JR, March JB. Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. *Trends Biotechnol.* 2006; 24 (5): 212–8.
10. Pires DP, et al. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016; 100 (5): 2141–51.
11. Wyres KL, et al. Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data. *Microb genomics.* 2016; 2 (12).
12. Sobirk SK, Struve C, Jacobsson SG. Primary *Klebsiella pneumoniae* liver abscess with metastatic spread to lung and eye, a North-European Case Report of an emerging syndrome. *Open Microbiol.* 2010; 4 (1): 5–7.
13. Knecht LE, Veljkovic M, Fieseler L. Diversity and function of phage encoded depolymerases. *Front Microbiol.* 2020; 10: 2949.
14. Solovieva EV, et al. Comparative genome analysis of novel Podoviruses lytic for hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* of K1, K2, and K57 capsular types. *Virus Res.* 2018; 243: 10–18.
15. Volozhantsev N, et al. Characterization and therapeutic potential of Bacteriophage-encoded polysaccharide depolymerases with — galactosidase activity against *Klebsiella pneumoniae* K57 capsular type. *Antibiot.* 2020; 9 (11): 1–16.
16. Scorpio A, et al. Treatment of experimental anthrax with recombinant capsule depolymerase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52 (3): 1014.
17. Kornienko M, et al. Analysis of nosocomial *Staphylococcus haemolyticus* by MLST and MALDI-TOF mass spectrometry. *Infect Genet Evol.* 2016; 39: 99–105.
18. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing An informational supplement for global application developed through the Clinical and Laboratory Standards Institute consensus process. 29th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, 2019. Available from: [https://clsi.org/media/2663/m100ed29\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/2663/m100ed29_sample.pdf).
19. Diancourt L, et al. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol.* 2005; 43 (8): 4178–82.
20. Brisse S, et al. Wzi gene sequencing, a rapid method for determination of capsular type for *Klebsiella* strains. *J Clin Microbiol.* 2013; 51 (12): 4073–8.
21. Van Twest R, Kropinski AM. Bacteriophage enrichment from water and soil. *Methods Mol Biol.* 2009; 501: 15–21.
22. Mazzocco A, et al. Enumeration of bacteriophages using the small drop plaque assay system. *Methods Mol Biol.* 2009; 501: 81–85.
23. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 1989; 2.
24. Liu B, et al. VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47 (D1): D687–D692.
25. Liu B, Pop M. ARDB — Antibiotic Resistance Genes Database. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37.
26. Wang C, et al. Protective and therapeutic application of the depolymerase derived from a novel KN1 genotype of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage in mice. *Res Microbiol.* 2019; 170 (3): 156–64.
27. D'Andrea MM, et al.  $\phi$ bO1E, a newly discovered lytic

- bacteriophage targeting carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* of the pandemic Clonal Group 258 clade II lineage. *Sci Rep.* 2017; 7 (1): 1–8.
28. Yang J, et al. A nosocomial outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: dissemination of ST11 and emergence of ST37, ST392 and ST395. *Clin Microbiol Infect.* 2013; 19 (11): E509–E515.
  29. Muggeo A, et al. Spread of *Klebsiella pneumoniae* ST395 non-susceptible to carbapenems and resistant to fluoroquinolones in North-Eastern France. *J Glob.* 2018; 13: 98–103.
  30. Kuptsov NS, Kornienko MA, Gorodnichev RB, Danilov DI, Malakhova MV, Parfenova TV, et al. Efficacy of commercial bacteriophage products against ESKAPE pathogens. *Bulletin of RSMU.* 2020; (3): 18–24.

## АНТЕНАТАЛЬНАЯ И РАННЯЯ ПОСТНАТАЛЬНАЯ ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ АКТУАЛЬНЫХ ВРОЖДЕННЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

В. В. Васильев<sup>1,4</sup>, А. А. Гринева<sup>1</sup>✉, Н. В. Рогозина<sup>1,3</sup>, Р. А. Иванова<sup>1,2</sup>, Г. М. Ушакова<sup>1</sup><sup>1</sup> Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия<sup>2</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия<sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия<sup>4</sup> Северо-западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

Неспецифичность клинико-лабораторных и инструментальных проявлений врожденных инфекционных заболеваний, в том числе вирусной природы, многообразие методов этиологической верификации возбудителей определяют как необходимость выбора оптимальных подходов к диагностике этой патологии, так и целесообразность обследования на широкий спектр этиологических агентов при подозрении на врожденные вирусные инфекции. На основании анализа действующих рекомендаций профессиональных сообществ, международных консенсусов специалистов, результатов отдельных опубликованных исследований показано, что ключевым способом этиологической верификации широко распространенных вирусных инфекций в антенатальном периоде является выявление генетического материала возбудителей при амнио-, кордоцентезе (для цитомегаловирусной и парвовирусной инфекций), в родовых путях (для герпетической инфекции). В постнатальном периоде наряду с молекулярно-генетическим исследованием проводят серологическую диагностику с определением специфических иммуноглобулинов классов М и G и индекса их avidности.

**Ключевые слова:** инфекции, дети, беременность, цитомегаловирус, парвовирус, герпесвирусы

**Вклад авторов:** В. В. Васильев — концепция, окончательное редактирование; А. А. Гринева, В. В. Васильев, Р. А. Иванова, Г. М. Ушакова — анализ исходных материалов, написание текста; А. А. Гринева — редактирование статьи.

✉ **Для корреспонденции:** Александра Александровна Гринева  
ул. Профессора Попова, д. 9. г. Санкт-Петербург, 197022; a.a.grineva@gmail.com

**Статья получена:** 26.08.2021 **Статья принята к печати:** 12.09.2021 **Опубликована онлайн:** 25.09.2021

**DOI:** 10.47183/mes.2021.031

## ANTENATAL AND EARLY POSTNATAL ETIOLOGICAL VERIFICATION OF RELEVANT CONGENITAL VIRAL INFECTIOUS DISEASES

Vasilyev VV<sup>1,4</sup>, Grineva AA<sup>1</sup>✉, Rogozina NV<sup>1,3</sup>, Ivanova RA<sup>1,2</sup>, Ushakova GM<sup>1</sup><sup>1</sup> Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Saint-Petersburg, Russia<sup>2</sup> Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint-Petersburg, Russia<sup>3</sup> St. Petersburg State Pediatric Medical University, Saint-Petersburg, Russia<sup>4</sup> Mechnikov North-Western State Medical University, Saint-Petersburg, Russia

Nonspecificity of clinical, laboratory and instrumental manifestations of congenital infectious diseases, including viral infections, and the diversity of methods for etiological verification of pathogens define both the need to choose the optimal approaches to the diagnosis of this pathology, and the feasibility of testing for a broad range of etiologic agents in case of suspected congenital viral infection. The analysis of current guidelines, international consensus documents issued by specialists, and published results of some studies has shown that identification of the genetic material of the pathogen with the use of amniocentesis/cordocentesis (for cytomegalovirus and parvovirus infections) or in the birth canal (for herpes simplex infection) is the key method for antenatal etiological verification of the widespread viral infections. During the postnatal period, molecular genetic testing is combined with serological diagnosis involving determining specific immunoglobulins M and G, as well as their avidity index.

**Keywords:** infections, children, pregnancy, cytomegalovirus, parvovirus, herpes viruses

**Author contribution:** Vasilyev VV — concept, final editing; Grineva AA, Vasilyev VV, Rogozina NV, Ivanova RA, Ushakova GM — raw data analysis, manuscript writing; Grineva AA — manuscript editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexandra A. Grineva  
Professora Popova, 9, St. Petersburg, 197022; a.a.grineva@gmail.com

**Received:** 26.08.2021 **Accepted:** 12.09.2021 **Published online:** 25.09.2021

**DOI:** 10.47183/mes.2021.031

Врожденные вирусные инфекции (ВВИ) — патологии, сопровождающиеся высокой летальностью, нередко инвалидизацией, наносящие огромный социально-экономический ущерб обществу [1–4]. По МКБ-10 ВВИ классифицируют в классе XVI «Отдельные состояния, возникающие в перинатальном периоде», P35 [5].

Исторически среди ВВИ наиболее известна краснуха, классические проявления которой у новорожденных описал австралийский офтальмолог Н. Грегг [6]. Создание эффективной вакцины и обеспечение ее доступности привели в настоящее время к тому, что диагноз «врожденная краснуха» (синдром врожденной краснухи)

ставят крайне редко, а в развитых странах он практически не встречается. В Российской Федерации (РФ) за период с 2008 по 2020 г. зарегистрировано 7 случаев синдрома врожденной краснухи [7].

В последние десятилетия растет доля ВВИ, вызываемых другими вирусами, прежде всего — вирусами семейства герпеса. Известно, что представители практически всех типов могут передаваться от матери плоду, однако частота такой передачи и последствия для плода не одинаковы, и в отношении части типов изучены недостаточно. В настоящее время считается, что самой распространенной ВВИ является цитомегаловирусная инфекция [8]. В

отношении частоты поражений плода другими вирусами этого семейства имеющиеся данные нередко существенно различаются, что, вероятно, обусловлено применением различных методов исследований и разнородными группами обследуемых лиц [9–15].

Внедрение современных методов диагностики инфекций (иммуноферментный, иммунохемилюминесцентный анализы, иммуноцито- и гистохимические, молекулярно-генетические методы) закономерно привело к пониманию того, что, помимо вирусных инфекций, входящих в классический TORCH-комплекс (краснуха, цитомегаловирус, вирус простого герпеса человека 1-го и 2-го типов), поражение плода могут вызывать и другие вирусы, в частности, парвовирус B19V, энтеровирусы и ряд других [16].

Следует отметить, что в доступных официальных данных по заболеваемости инфекционными заболеваниями в масштабах РФ [7] отсутствуют сведения о регистрации неонатальной ветряной оспы, врожденной энтеровирусной, парвовирусной инфекций.

В отношении врожденных инфекций своевременная этиологическая диагностика имеет решающее значение, так как она определяет как тактику ведения беременности, так и возможности этиотропной терапии. При этом именно диагностика в антенатальном периоде наиболее актуальна в связи с тем, что ее проведение в неонатальном периоде приводит к бесконтрольному развитию инфекционного процесса у плода и ухудшает исходы врожденного заболевания [15–18].

Законодательно [19] в РФ определено, что с 1 января 2022 г. клинические рекомендации, разрабатываемые и принимаемые в соответствии с нормативным документом Минздрава [20], становятся документами, во многом определяющими спектр и порядок выполнения лечебно-диагностических мероприятий в России. В свете того, что в настоящее время ведется активная работа по подготовке и утверждению рекомендаций по значительному количеству нозологических форм заболеваний, включая и некоторые врожденные инфекции, авторы сочли необходимым представить в обзоре современные подходы к антенатальной и неонатальной этиологической верификации некоторых актуальных ВВИ (герпетическая инфекция 1-го и 2-го типов, цитомегаловирусная инфекция, парвовирусная B19V-инфекция).

В обзор включены действующие зарубежные клинические рекомендации и международные консенсусы профессиональных сообществ, а также основные, по мнению авторов, публикации обзорного характера, систематические обзоры и метаанализы. Поиск информации проведен в англо- и русскоязычных базах данных (MEDLINE, PubMed, Scopus, Web of science, Cochrane Library, eLIBRARY и др.), глубина поиска 15 лет (приведены ссылки на более ранние исследования, имеющие фундаментальное значение).

В обзор не включены клинические рекомендации и консенсусы, касающиеся перинатальных аспектов ВИЧ-инфекции, вирусных гепатитов и других вирусных инфекций, диагностические подходы к которым изложены в Санитарных правилах и нормах [20]; публикации, касающиеся перинатальных аспектов тех ВВИ, в отношении которых рекомендации носят временный или ненормативный характер (COVID-19-инфекция и инфекция, вызванная вирусом Зика), а также обосновывающие выбор методов и средств, включенных в рекомендации (это сделано разработчиками самих клинических рекомендаций и консенсусов).

## Общие подходы к антенатальной этиологической диагностике ВВИ

Антенатальная этиологическая диагностика условно может быть разделена на два этапа. Первый этап, или «скрининг», основан на выявлении признаков вероятной врожденной инфекции неинвазивными методами (в данном контексте — методами, не нарушающими целостность амниотической оболочки). На этом этапе используют лабораторные исследования биологических жидкостей беременной (главным образом — кровь, мочу, слюну) для выявления в них либо генетического материала микроорганизмов и их антигенов, либо маркеров иммунного ответа (специфичные антитела, определение avidности антител), а также методы визуализации (чаще всего — УЗИ плода в разных модификациях). Вирусологический метод (культивирование вирусов на культурах клеток с последующей идентификацией) на практике применяют редко из-за трудоемкости и длительности [21]. На данном этапе можно высказать обоснованное мнение о наличии того или иного инфекционного заболевания у матери и оценить состояние плода, но невозможно ответить на вопрос о наличии врожденного инфекционного заболевания у плода.

Второй этап антенатальной диагностики («экспертный») имеет целью доказать или опровергнуть наличие у плода определенного инфекционного заболевания, т. е. необходимо сформулировать нозологический диагноз с указанием этиологии, что является решающим в тактике дальнейшего ведения беременности и родов. На этом этапе выполняют инвазивные процедуры с целью получения биологических образцов плода (амнио-, кордоцентез) и их исследование на наличие генетического материала микроорганизмов, выделение культуры возбудителя и т. д. (в данной публикации не рассмотрен вопрос ценности биопсии ворсин хориона для диагностики ВВИ).

Амнио- и кордоцентез имеют ограничения не только по срокам беременности для их проведения, но и по ориентировочной давности инфекционного процесса у беременной, что сужает их диагностическую ценность с точки зрения длительности развития заболевания плода (если произошла передача возбудителя). Поэтому в современной антенатальной диагностике чрезвычайно большое значение придается именно этапу скрининга, его постоянному совершенствованию.

## Диагностика врожденной инфекции, вызванной вирусом простого герпеса 1-го и 2-го типов

Генитальный герпес является одной из наиболее распространенных инфекций, передающихся половым путем и чаще всего обусловлен вирусом простого герпеса 2-го типа (до 85%) [9, 11, 22]. Заражение плода происходит, в основном, при контакте новорожденного с вирусом при прохождении по родовым путям [23–30].

Вирус простого герпеса 2-го типа (ВПГ-2) распространяется в основном половым путем, заражение чаще всего происходит в возрасте 20–30 лет. По оценкам ВОЗ, в мире 13% населения в возрасте 15–49 лет имеют эту инфекцию [9]. Распространенность ВПГ-2 среди беременных варьирует; в работах обзорного характера оценивается как 20–30%, при этом примерно 10% серонегативных женщин по ВПГ-2 живут с серопозитивным партнером и, следовательно, подвержены риску заражения генитальным герпесом во время беременности [23, 24, 30, 31]. Среди дискордантных пар женщины, серонегативные

(не имеющие антител) к антигенам вируса простого герпеса 1-го типа (ВПГ-1), имеют вероятность сероконверсии 3,7%, в то время как для женщин, серопозитивных по антителам к антигенам ВПГ-1, риск сероконверсии в отношении ВПГ-2 оценивается в 1,7% [23, 24, 30, 31].

Риск врожденной инфекции определяют время первичного заражения по отношению к зачатию и наличие или отсутствие реактивации инфекции во время беременности. Принято считать, что риск передачи инфекции при первичном заражении матери во время беременности достигает 50%, при реактивации он около 4% [9].

Передача ВПГ происходит как внутриутробно, так и в интра- и постнатальном периодах. Считается, что в 75–85% плод инфицируется непосредственно перед родами после разрыва околоплодных оболочек или во время родов при прохождении через инфицированные родовые пути; доля внутриутробного инфицирования составляет 5–8% случаев неонатального герпеса [24–28, 30, 31]. Риск неонатальной инфекции колеблется от 30 до 50% для инфекций ВПГ, которые начинаются на поздних сроках беременности (последний триместр), тогда как инфицирование на ранних сроках беременности сопряжено с риском около 1% [11, 24, 25, 29].

#### **Аntenатальная диагностика врожденной инфекции, вызванной ВПГ-1 и ВПГ-2**

Скрининговое обследование беременных на определение антител к вирусу простого герпеса в крови во время беременности проводить не рекомендуется вне зависимости от наличия или отсутствия симптомов ВПГ-инфекции в анамнезе [25–28, 30].

Обследование беременных рекомендовано при первичной ВПГ-2-инфекции в первых двух триместрах беременности. В этом случае следует определить IgM, IgG к ВПГ-2 в динамике с интервалом 2–4 недели для выявления сероконверсии, а также проводить последовательные молекулярно-генетические тесты (полимеразную цепную реакцию, или ПЦР) для определения ДНК ВПГ-2 из генитальных выделений беременной, начиная с 32-й недели беременности для определения тактики родоразрешения и решения вопроса о назначении противовирусной терапии. Если первичная ВПГ-2 развивается в течение последних 4–6 недель гестации, риск вертикальной передачи и инфицирования новорожденного высок (41%). В таком случае рекомендуется рассмотреть возможность родов путем кесарева сечения и назначения этиотропной терапии матери и новорожденному [26, 28, 29].

По мнению авторов данной статьи, облигатная этиотропная терапия препаратами прямого противовирусного действия (ацикловир) при герпетической инфекции на поздних сроках беременности позволяет избежать трансабдоминальных инвазивных процедур с целью диагностики или исключения поражения плода, что рекомендовано при некоторых других инфекционных заболеваниях (см. далее).

#### **Диагностика врожденной инфекции, вызванной ВПГ-1 и ВПГ-2 в неонатальном периоде**

Клиническая картина неонатального герпеса весьма разнообразна и не патогномонична, что в ряде случаев затрудняет диагностику. Основными проявлениями, позволяющими предполагать наличие герпетической

инфекции у детей в возрасте до 6 недель жизни, являются наличие высыпаний в виде пузырьков на коже и слизистой, сепсис-подобное заболевание, плеоцитоз ликвора, судороги, очаговая неврологическая симптоматика, респираторный дистресс-синдром, эпизоды апноэ, прогрессирующий пневмонит, тромбоцитопения, конъюнктивит, картина гепатита или печеночной недостаточности, повышение трансаминаз, лучевые признаки поражения головного мозга [28, 29].

В этих ситуациях основной метод этиологической верификации в современных условиях — выявление генетического материала вируса с помощью ПЦР. Для исследования следует взять мазки со слизистых полости рта, носоглотки, конъюнктивы и прямой кишки (так называемые «поверхностные культуры»), при наличии поражения ЦНС — ликвор, при генерализованных формах заболевания — дополнительно кровь, а при наличии элементов сыпи — мазки-отпечатки содержимого везикул. Хотя цитопатическое действие ВПГ проявляется в течение первых 5 суток культивирования, и вирусологический метод позволяет типировать штамм вируса, это исследование является трудоемким, дорогостоящим и в рутинной практике малоприменимым [29–32].

#### **Диагностика врожденной цитомегаловирусной инфекции**

Наибольший риск инфицирования плода цитомегаловирусом (ЦМВ) и развитие тяжелых форм заболевания отмечены в тех случаях, когда беременная переносит первичную ЦМВ-инфекцию (ЦМВИ) (до 30% беременных серонегативны). Частота первичной ЦМВИ у женщин во время беременности достигает 1% [33, 34].

#### **Аntenатальная диагностика ЦМВИ**

Острую ЦМВИ у беременной сложно заподозрить из-за редкости манифестных форм и неспецифичности симптомов (острое респираторное заболевание с минимальными катаральными явлениями, полилимфаденит, гепато- и спленомегалия). Ультразвуковые признаки вероятного поражения плода тоже не специфичны (табл.).

В настоящее время рутинное определение специфических IgM и IgG, avidности последних (в сыворотке крови количественными методами) и вирусной нагрузки (ПЦР) не рекомендуется [35–38]. Применение этих методов оправдано только для женщин групп риска: возраст до 25 лет, имеющих признаки острого респираторного заболевания до 20-й недели гестации, повторнородящих и имеющих организованных детей, работающих в детских образовательных учреждениях (т. е. имеющих высокий риск заражения) [35–38].

При наличии лабораторных и клиничко-инструментальных признаков первичной (реактивации латентной, суперинфекции) ЦМВИ показано исследование амниотической жидкости, полученной при амниоцентезе (выполняется не ранее 6-й недели от предполагаемого времени начала заболевания и не ранее 20-й недели гестации), методом ПЦР. Кордоцентез не рекомендован, так как, по мнению ряда авторов, не имеет преимуществ перед амниоцентезом для диагностики врожденной ЦМВИ [36–38, 41].

При отсутствии возможности выполнения амниоцентеза (или информированном отказе от его проведения) беременной, а также в случае отсутствия при первичном ультразвуковом исследовании (УЗИ) плода признаков

**Таблица.** Ультразвуковые признаки врожденной ЦМВИ в антенатальном периоде [39, 40]

| Признаки                                         | Частота, % |
|--------------------------------------------------|------------|
| Мозговые кальцификаты                            | 0,6–17,4   |
| Микроцефалия                                     | 14,5       |
| Гиперэхогенный кишечник                          | 4,5–13     |
| Внутриутробная задержка роста                    | 1,9–13     |
| Субэпандимальные кисты                           | 11,6       |
| Вентрикуломегалия                                | 4,5–1,5    |
| Асцит                                            | 8,7        |
| Выпот в перикард                                 | 7,2        |
| Гиперэхогенные почки                             | 4,3        |
| Увеличение печени                                | 4,3        |
| Утолщение плаценты или плацентарные кальцификаты | 4,3        |
| Печеночные кальцификаты                          | 1,4        |
| Водянка плода                                    | 0,6        |

врожденной ЦМВИ выполняют повторные УЗИ плода в режиме скрининга каждые 2–3 недели [36–38, 41].

Выявление в ходе УЗ-мониторинга плода признаков прогрессирования врожденной ЦМВИ может быть показанием для искусственного прерывания беременности по медицинским показаниям [35, 36, 38].

#### Постнатальная диагностика цитомегаловирусной инфекции

Показания к лабораторно-инструментальному обследованию для исключения/верификации врожденной ЦМВИ у новорожденных следующие: наличие у ребенка клинических признаков врожденной инфекции безотносительно к возможной этиологии (в том числе лейкопения, тромбоцитопения, повышение печеночных трансаминаз, прямого билирубина); отрицательный аудиотест; документированная первичная ЦМВИ у матери во время беременности независимо от наличия или отсутствия клинических проявлений заболевания у ребенка; субфебрилитет, гриппоподобное заболевание у матери в первые 20 недель гестации; угрозы преждевременных родов; недоношенность, задержка внутриутробного развития; выявление в последе генетического материала возбудителя методом ПЦР; признаки внутриутробной инфекции, выявленные при лучевых исследованиях [36, 38, 39].

Метод выбора для этиологической верификации заболевания при подозрении на врожденную ЦМВИ у новорожденных — определение ДНК цитомегаловируса с помощью ПЦР в слюне, моче, крови в первые 3 недели жизни. Оптимальным является исследование слюны (может быть выполнен буккальный соскоб) и мочи, в меньшей степени — крови [36, 38, 41–44]. Ликвор исследуют только при поражении ЦНС и выполнении люмбальной пункции молекулярно-генетическим методом с определением ДНК ЦМВ. Исследование сыворотки крови новорожденного одновременно количественно на IgM и IgG к антигенам ЦМВ более доступно, но менее информативно: специфичные IgM в первые дни жизни должны свидетельствовать о первичной инфекции, но они не всегда выявляются при врожденной ЦМВИ, и встречаются ложноположительные результаты [45]. Специфичные IgG у новорожденного нередко присутствуют в высоком титре, однако концентрация трансплацентарно переданных антител уменьшается уже в течение первых трех недель жизни [36, 38, 45, 46].

#### Диагностика врожденной парвовирусной В19V-инфекции

Парвовирусная В19V-инфекция (ПВИ) во время беременности увеличивает риск потери плода, самопроизвольного аборта и мертворождения. Риск развития неблагоприятных исходов беременности достигает 10%. При инфицировании женщины во время беременности заражение плода происходит в 24–51% случаев [49, 50].

В большинстве случаев инфицирования парвовирусом во время беременности плод не страдает, однако инфекция может привести к развитию неиммунной водянки плода вследствие формирования тяжелой анемии, застойной сердечной недостаточности и миокардита, что при несвоевременной диагностике и терапии приводит к перинатальным потерям. Наиболее критичным для воздействия парвовируса В19V (ПВВ19) на плод является период между 11-й и 23-й неделями внутриутробного развития. Частота внутриутробной гибели плода при инфицировании до 20-й недели гестации составляет около 17%, а в более поздние сроки — около 6%. Однако инфекция в третьем триместре в 7,5% случаев может приводить к внутриутробной гибели плода без признаков неиммунной водянки и анемии [51–54].

#### Антенатальная диагностика ПВИ

Около 40% женщин детородного возраста остаются серонегативными в отношении парвовируса, а следовательно, восприимчивы к инфекции. Примерно 50% беременных переносят инфекцию бессимптомно, у них нет классической сыпи по типу инфекционной эритемы, наблюдаемой у детей. У взрослых чаще, чем у детей, проявляются атипичные симптомы, такие как суставные артралгии.

Обследование на ПВИ не регламентировано ни в одной стране мира и носит только рекомендательный характер. Стоит отметить, что обследование на ПВИ, так же, как и обследование на ЦМВИ, не рекомендовано профессиональными сообществами в качестве исследований для всех без исключения беременных. Показанием к обследованию беременной на ПВВ19 являются только выявление неиммунного отека плода или его гибель [49, 51].

В качестве лабораторного скрининга используют метод иммуноферментного анализа с определением

специфичных иммуноглобулинов IgM, IgG в сыворотке крови беременной. Хотя наличие IgG подтверждает факт перенесенной ранее инфекции, любой не отрицательный ответ на IgM (положительный или сомнительный IgM) потребует в последующем обязательного проведения молекулярно-генетического тестирования с определением ДНК ПБВ19 в крови женщины и консультации инфекциониста [51–54].

В случае подтверждения острой ПВИ у матери, по данным лабораторного обследования (IgM к ПБВ19 положительные, наличие ДНК ПБВ19 в крови), в дальнейшем показано постоянное наблюдение за состоянием плода каждые 1–2 недели в течение 12 недель посредством УЗ-мониторинга с обязательным определением максимальной систолической скорости в средней мозговой артерии (доплерометрия) для своевременного выявления анемии и водянки плода [55]. В случае выявления УЗ-признаков неиммунной водянки беременная должна быть госпитализирована в специализированное учреждение родовспоможения для проведения амнио- или кордоцентеза (после 18–20 недели). В случае подозрения на тяжелую анемию плода по данным доплерометрии предпочтение отдается кордоцентезу [51, 56].

#### Постнатальная диагностика парвовирусной B19V-инфекции

Показания к лабораторно-инструментальному обследованию для исключения или верификации врожденной ПВИ у новорожденных практически идентичны показаниям к обследованию на другие ВВИ,

например ЦМВИ. Диагностические подходы также схожи: основной метод этиологической верификации — молекулярно-генетический (ПЦР), в качестве субстрата используют цельную кровь или ее дериваты [51, 56, 57]. Другие лабораторные и инструментальные исследования выполняют по клиническим показаниям.

#### Заключение

Перечень врожденных инфекций далеко не ограничен составными частями TORCH-комплекса, сегодня известно более 50 микроорганизмов, способных вызывать поражение плода.

Аntenальная (в сочетании с неонатальной) верификация этиологии инфекций — наиболее важный инструмент для определения тактики ведения беременности и родов, прогноза перспектив развития плода и новорожденного. В настоящее время точная верификация возбудителя у плода подразумевает инвазивные вмешательства, что в определенной степени ограничивает их применение.

Развитие научных исследований в области врожденных инфекций идет, в том числе, и по пути изучения возможностей применения не только качественных методов определения наличия тех или иных маркеров инфекционного процесса, но и количественных методик, что находит свое отражение, например, в предложениях по оптимизации обследования ВИЧ-позитивных беременных на ЦМВИ [58, 59]. Возможно, в недалеком будущем подобные подходы получат более широкое распространение, особенно для ситуаций, связанных с микст-инфекциями.

#### Литература

- Grosse SD, Leung J, Lanzieri TM. Identification of congenital CMV cases in administrative databases and implications for monitoring prevalence, healthcare utilization, and costs. *Curr Med Res Opin.* 2021 May; 37 (5): 769–79. PubMed PMID: 33591223.
- Grosse SD, Dollard SC, Ortega-Sanchez IR. Economic assessments of the burden of congenital cytomegalovirus infection and the cost-effectiveness of prevention strategies. *Semin Perinatol.* 2021; 45 (3): 151393. PubMed PMID: 33551180.
- Lieu JEC, Kenna M, Anne S, Davidson L. Hearing Loss in Children: a review. *JAMA.* 2020; 324 (21): 2195–205. PubMed PMID: 33258894.
- Velasco-Velázquez S, Celis-Giraldo D, Botero Hincapié A, Alejandro Hincapié Erika D, Sofia Cordero López S, Marulanda Orozco N, et al. Clinical, Socio-economic and Environmental Factors Related with Recurrences in Ocular Toxoplasmosis in Quindío, Colombia. *Ophthalmic Epidemiol.* 2021; 28 (3): 258–64. PubMed PMID: 33115293.
- МКБ 10 — Международная классификация болезней 10-го пересмотра версия: 2019. Доступно по ссылке: <https://mkb-10.com/index.php?pid=15190> (08.09.2021).
- Gregg, NM. Congenital Cataract Following German Measles in the Mother. *Epidemiol Infect.* 1991; 107 (1): iii–xiv.
- Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Раздел «Документы». Доступно по ссылке: <https://www.rosпотребнадзор.ru/documents/documents.php> (08.09.2021).
- Moodley A, Payton KSE. The Term Newborn: Congenital Infections. *Clin Perinatol.* 2021; 48 (3): 485–511. PubMed PMID: 34353577.
- World Health Organization. 2017. [2019-05-07]. Herpes simplex virus. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>.
- Van Der Pol B. Type-specific detection of herpes simplex virus type 1 and type 2 using the cobas® HSV 1 and 2 test on the cobas® 4800 platform. *Expert Rev Mol Diagn.* 2016; 16 (11): 1145–54. PubMed PMID: 27687862.
- James SH, Kimberlin DW. Neonatal herpes simplex virus infection: epidemiology and treatment. *Clin Perinatol.* 2015; 42 (1): 47–59. PubMed PMID: 25677996.
- Tan MP, Koren G. Chickenpox in pregnancy: revisited. *Reprod Toxicol.* 2006; 21 (4): 410–20. PubMed PMID: 15979274.
- Smith CK, Arvin AM. Varicella in the fetus and newborn. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2009; 14 (4): 209–17. PubMed PMID: 19097954.
- Sauerbrei A, Wutzler P. Neonatal varicella. *J Perinatol.* 2001 Dec; 21 (8): 545–9. PubMed PMID: 11774017.
- Trotta M, Borchi B, Nicolai A, Venturini E, Giaché S, Sterrantino G, et al. Epidemiology, management and outcome of varicella in pregnancy: a 20-year experience at the Tuscany Reference Centre for Infectious Diseases in Pregnancy. *Infection.* 2018 Oct; 46 (5): 693–9. PubMed PMID: 29766472.
- Auriti C, De Rose DU, Santisi A, Martini L, Piersigilli F, Bersani I, et al. Pregnancy and viral infections: Mechanisms of fetal damage, diagnosis and prevention of neonatal adverse outcomes from cytomegalovirus to SARS-CoV-2 and Zika virus. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2021 Oct 1; 1867 (10): 166198. PubMed PMID: 34118406.
- Peyron F, McLeod R, Ajzenberg D, Contopoulos-Ioannidis D, Kieffer F, Mandelbrot L, et al. Congenital Toxoplasmosis in France and the United States: One Parasite, Two Diverging Approaches. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017 Feb 16; 11 (2): e0005222. PubMed PMID: 28207736.

18. Albright CM, Werner EF, Hughes BL. Cytomegalovirus Screening in Pregnancy: A Cost-Effectiveness and Threshold Analysis. *Am J Perinatol*. 2019 Jun; 36 (7): 678–87. PubMed PMID: 30567003.
19. Федеральный закон от 21 ноября 2011 г. N 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» с изменениями и дополнениями. <https://base.garant.ru/12191967/> (Доступ 26.03.2021 г.).
20. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 28.02.2019 № 104н «Об утверждении порядка и сроков одобрения и утверждения клинических рекомендаций, критериев принятия научно-практическим советом решения об одобрении, отклонении или направлении на доработку клинических рекомендаций либо решения об их пересмотре». Доступно по ссылке: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/72599420/>. (Дата обращения: 12.03.2020).
21. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28 января 2021 года № 4 «Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»». Доступно по ссылке: <https://docs.cntd.ru/document/573660140> (07.09.2021).
22. LeGoff J, Péré H, Bélec L. Diagnosis of genital herpes simplex virus infection in the clinical laboratory. *Virol J*. 2014; 11: 83. PubMed PMID: 24885431.
23. Pinninti SG, Kimberlin DW. Preventing herpes simplex virus in the newborn. *ClinPerinatol*. 2014; 41 (4): 945–55. PubMed PMID: 25459782.
24. Brown ZA, Selke S, Zeh J, et al. The acquisition of herpes simplex virus during pregnancy. *N Engl J Med*. 1997; 337 (8): 509–15.
25. Management of Genital Herpes in Pregnancy: ACOG Practice Bulletin/ACOG Practice Bulletin, Number 220. *Obstet Gynecol*. 2020 May; 135 (5): e193–e202. PubMed PMID: 32332414.
26. Samies NL, James SH. Prevention and treatment of neonatal herpes simplex virus infection. *Antiviral Res*. 2020 Apr; 176: 104721. PubMed PMID: 32044154.
27. Grupo de Trabajo de Infección Neonatal por virus herpes simplex de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica. Guía de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre prevención, diagnóstico y tratamiento de la infección neonatal por virus herpes simplex [The Spanish Society of Paediatric Infectious Diseases guidelines on the prevention, diagnosis and treatment of neonatal herpes simplex infections]. *An Pediatr*. 2018 Jul; 89 (1): 64.e1–64.e10. PubMed PMID: 29453157.
28. Sénat MV, Anselem O, Picone O, Renesme L, Sananès N, Vauloup-Fellous C, et al. Prevention and management of genital herpes simplex infection during pregnancy and delivery: Guidelines from the French College of Gynaecologists and Obstetricians (CNGOF). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2018 May; 224: 93–101. PubMed PMID: 29571124.
29. Ramgopal S, Wilson PM, Florin TA. Diagnosis and Management of Neonatal Herpes Simplex Infection in the Emergency Department. *Pediatr Emerg Care*. 2020 Apr; 36 (4): 196–202. PubMed PMID: 32265379.
30. Fernandes ND, Arya K, Ward R. Congenital Herpes Simplex. In: *StatPearls Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing*, 2021 Jan. PubMed PMID: 29939674.
31. Shangase N, Kharsany ABM, Ntombela NP, Pettifor A, McKinnon LR. A Systematic Review of Randomized Controlled Trials of School Based Interventions on Sexual Risk Behaviors and Sexually Transmitted Infections Among Young Adolescents in Sub-Saharan Africa. *AIDS Behav*. 2021 Mar 27. PubMed PMID: 33772695.
32. Otto WR, Myers AL, LaRussa B, Kimberlin DW, Jackson MA. Clinical Markers and Outcomes of Neonates With Herpes Simplex Virus Deoxyribonucleic Acid Persistence in Cerebrospinal Fluid in Disseminated and Central Nervous System Infection. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2018 May 15; 7 (2): e30–e33. PubMed PMID: 28510722.
33. Davis NL, King CC, Kourtis AP. Cytomegalovirus infection in pregnancy. *Birth Defects Res*. 2017; 109 (5): 336–464.
34. Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY, Aragon DC, et al. Seroconversion for Cytomegalovirus Infection During Pregnancy and Fetal Infection in a Highly Seropositive Population: "The BraCHS Study". *J Infect Dis*. 2018; 218: 1200.
35. Hughes BL, Gyamfi-Bannerman C. Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM). Diagnosis and antenatal management of congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol*. 2016; 214 (6): B5–B11.
36. Rawlinson WD, Boppana SB, Fowler KB, Kimberlin DW, et al. Congenital cytomegalovirus infection in pregnancy and the neonate: consensus recommendations for prevention, diagnosis, and therapy. *Lancet Infect Dis*. 2017; 17 (6): e177–e188.
37. Britt WJ. Congenital human cytomegalovirus infection and the enigma of maternal immunity. *J Virol*. 2017; 91 (15).
38. Luck SE, Wieringa JW, Blázquez-Gamero D, Henneke P, Schuster K, Butler K, et al. Congenital Cytomegalovirus: A European Expert Consensus Statement on Diagnosis and Management. *Pediatr Infect Dis J*. 2017; 36 (12): 1205–13. PubMed PMID: 29140947.
39. Capretti MG, Lanari M, Tani G, Ancora G, Sciutti R, Marsico C, et al. Role of cerebral ultrasound and magnetic resonance imaging in newborns with congenital cytomegalovirus infection. *Brain Dev*. 2014; 36 (3): 203–11. PubMed PMID: 23647916.
40. de Vries LS, Gunardi H, Barth PG, Bok LA, Verboon-Macielek MA, Groenendaal F. The spectrum of cranial ultrasound and magnetic resonance imaging abnormalities in congenital cytomegalovirus infection. *Neuropediatrics*. 2004 Apr; 35 (2): 113–9. PubMed PMID: 15127310.
41. Desveaux C, Klein J, Leruez-Ville M, et al. Identification of symptomatic fetuses infected with cytomegalovirus using amniotic fluid peptide biomarkers. *PLoS Pathog*. 2016; 12: e1005395.
42. Boppana SB, Ross SA, Shimamura M, Palmer AL, Ahmed A, Michaels MG, et al. Saliva polymerase-chain-reaction assay for cytomegalovirus screening in newborns. *N Engl J Med*. 2011; 364 (22): 2111–8. PubMed PMID: 21631323.
43. Ross SA, Ahmed A, Palmer AL, Michaels MG, Sánchez PJ, Bernstein DI, et al. Detection of congenital cytomegalovirus infection by real-time polymerase chain reaction analysis of saliva or urine specimens. *J Infect Dis*. 2014; 210 (9): 1415–8. PubMed PMID: 24799600.
44. Eventov-Friedman S, Manor H, Bar-Oz B, Averbuch D, Caplan O, Lifshitz A, et al. Saliva Real-Time Polymerase Chain Reaction for Targeted Screening of Congenital Cytomegalovirus Infection. *J Infect Dis*. 2019; 220 (11): 1790–6. PubMed PMID: 31310307.
45. Bilavsky E, Watad S, Levy I, Linder N, Pardo J, Ben-Zvi H, et al. Positive IgM in Congenital CMV Infection. *Clin Pediatr (Phila)*. 2017; 56 (4): 371–75. PubMed PMID: 28006975.
46. Рогозина Н. В., Васильев В. В., Гринева А. А., Михайлов А. В., Каштанова Т. А., Романовский А. Н. и др. Ante- и постнатальная диагностика и комплексное лечение врожденной цитомегаловирусной инфекции. *Рос вестн перинатол и педиатр*. 2019; 64 (6): 89–93. DOI: 10.21508/1027–4065–2019–64–6–89–93.
47. Marsico C, Kimberlin D. W. Congenital Cytomegalovirus infection: advances and challenges in diagnosis, prevention and treatment. *Ital J Pediatr*. 2017; 43: 38. Published online 2017 Apr 17. DOI: 10.1186/s13052-017-0358-8.
48. Ross SA, Ahmed A, Palmer AL, Michaels MG, Sánchez PJ, Bernstein DI, et al. Detection of Congenital Cytomegalovirus Infection by Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis of Saliva or Urine Specimens. *The Journal of Infectious Diseases* 2014; 210: 1415–8. DOI: 10.1093/infdis/jiu263.
49. Xiong YQ, Tan J, Liu YM, He Q, Li L, Zou K, et al. The risk of maternal parvovirus B19 infection during pregnancy on fetal loss and fetal hydrops: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Virol*. 2019; 114: 12–20. PubMed PMID: 30897374.
50. Шишко Г. А., Ермолович М. А., Самойлович Е. О., Артюшевская М. В., Леонова Е. Ю., Устинович Ю. А. Роль парвовирусной инфекции в перинатальной патологии. *Репродуктивное здоровье. Восточная Европа*. 2015; 5: 95–102.
51. Attwood LO, Holmes NE, Hui L. Identification and management of congenital parvovirus B19 infection. *Prenat Diagn*. 2020 Dec; 40 (13): 1722–31. PubMed PMID: 32860469.
52. Salbetti MB, Pedranti MS, Barbero P, Molisani P, Lazzari M, Olivera N, et al. Molecular screening of the human parvoviruses B19 and bocavirus 1 in the study of congenital diseases as applied to symptomatic pregnant women and children. *Access Microbiol*.

- 2019; 1 (5): e000037. PubMed PMID: 32974527.
53. Hunter LA, Ayala NK. Parvovirus B19 in Pregnancy: A Case Review. *J Midwifery Womens Health*. 2021; 66 (3): 385–90. PubMed PMID: 34101977.
54. Gallinella G. The clinical use of parvovirus B19 assays: recent advances. *Expert Rev Mol Diagn*. 2018; 18 (9): 821–32. PubMed PMID: 30028234.
55. Prefumo F, Fichera A, Fratelli N, Sartori E. Fetal anemia: Diagnosis and management. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2019; 58: 2–14. PubMed PMID: 30718211.
56. Voordouw B, Rockx B, Jaenisch T, Fraaij P, Mayaud P, Vossen A, et al. Performance of Zika Assays in the Context of Toxoplasma gondii, Parvovirus B19, Rubella Virus, and Cytomegalovirus (TORCH) Diagnostic Assays. *Clin Microbiol Rev*. 2019; 33 (1): e00130-18. PubMed PMID: 31826871.
57. Bascietto F, Liberati M, Murgano D, Buca D, Iacovelli A, Flacco ME, et al. Outcome of fetuses with congenital parvovirus B19 infection: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2018; 52 (5): 569–76. PubMed PMID: 29785793.
58. Шахгильдян В. И., Александрова Е. П., Козырина Н. В., Шипулина О. Ю., Додонова Э. А., Шахгильдян Н. В. Цитомегаловирусная инфекция у беременных и новорожденных: эпидемиологический анализ, новые подходы к диагностике и лечению. *Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение*. 2020; 8 (2): 80–94. DOI: 10.24411/2303-9698-2020-12008.
59. Шахгильдян В. И. Врожденная цитомегаловирусная инфекция: актуальные вопросы, возможные ответы. *Неонатология: новости, мнения, обучение*. 2020; 8 (4): 61–72. DOI: <https://doi.org/10.33029/2308-2402-2020-8-4-61-72>.

## References

1. Grosse SD, Leung J, Lanzieri TM. Identification of congenital CMV cases in administrative databases and implications for monitoring prevalence, healthcare utilization, and costs. *Curr Med Res Opin*. 2021 May; 37 (5): 769–79. PubMed PMID: 33591223.
2. Grosse SD, Dollard SC, Ortega-Sanchez IR. Economic assessments of the burden of congenital cytomegalovirus infection and the cost-effectiveness of prevention strategies. *Semin Perinatol*. 2021; 45 (3): 151393. PubMed PMID: 33551180.
3. Lieu JEC, Kenna M, Anne S, Davidson L. Hearing Loss in Children: a review. *JAMA*. 2020; 324 (21): 2195–205. PubMed PMID: 33258894.
4. Velasco-Velázquez S, Celis-Giraldo D, Botero Hincapié A, Alejandro Hincapié Erika D, Sofia Cordero López S, Marulanda Orozco N, et al. Clinical, Socio-economic and Environmental Factors Related with Recurrences in Ocular Toxoplasmosis in Quindío, Colombia. *Ophthalmic Epidemiol*. 2021; 28 (3): 258–64. PubMed PMID: 33115293.
5. MKB 10 — Mezhdunarodnaja klassifikacija boleznej 10-go peresmotra versija: 2019. Dostupno po ssylke: <https://mkb-10.com/index.php?pid=15190> (08.09.2021). Russian.
6. Gregg, NM. Congenital Cataract Following German Measles in the Mother. *Epidemiol Infect*. 1991; 107 (1): iii–xiv.
7. Federal'naja sluzhba po nadzoru v sfere zashhity prav potrebitel'ej i blagopoluchija cheloveka. Razdel «Dokumenty». Dostupno po ssylke: <https://www.rosпотребнадзор.ru/documents/documents.php> (08.09.2021). Russian.
8. Moodley A, Payton KSE. The Term Newborn: Congenital Infections. *Clin Perinatol*. 2021; 48 (3): 485–511. PubMed PMID: 34353577.
9. World Health Organization. 2017. [2019-05-07]. Herpes simplex virus. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>.
10. Van Der Pol B. Type-specific detection of herpes simplex virus type 1 and type 2 using the cobas® HSV 1 and 2 test on the cobas® 4800 platform. *Expert Rev Mol Diagn*. 2016; 16 (11): 1145–54. PubMed PMID: 27687862.
11. James SH, Kimberlin DW. Neonatal herpes simplex virus infection: epidemiology and treatment. *Clin Perinatol*. 2015; 42 (1): 47–59. PubMed PMID: 25677996.
12. Tan MP, Koren G. Chickenpox in pregnancy: revisited. *Reprod Toxicol*. 2006; 21 (4): 410–20. PubMed PMID: 15979274.
13. Smith CK, Arvin AM. Varicella in the fetus and newborn. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2009; 14 (4): 209–17. PubMed PMID: 19097954.
14. Sauerbrei A, Wutzler P. Neonatal varicella. *J Perinatol*. 2001 Dec; 21 (8): 545–9. PubMed PMID: 11774017.
15. Trotta M, Borchì B, Niccolai A, Venturini E, Giachè S, Sterrantino G, et al. Epidemiology, management and outcome of varicella in pregnancy: a 20-year experience at the Tuscany Reference Centre for Infectious Diseases in Pregnancy. *Infection*. 2018 Oct; 46 (5): 693–9. PubMed PMID: 29766472.
16. Auriti C, De Rose DU, Santisi A, Martini L, Piersigilli F, Bersani I, et al. Pregnancy and viral infections: Mechanisms of fetal damage, diagnosis and prevention of neonatal adverse outcomes from cytomegalovirus to SARS-CoV-2 and Zika virus. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2021 Oct 1; 1867 (10): 166198. PubMed PMID: 34118406.
17. Peyron F, McLeod R, Aizenberg D, Contopoulos-Ioannidis D, Kieffer F, Mandelbrot L, et al. Congenital Toxoplasmosis in France and the United States: One Parasite, Two Diverging Approaches. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Feb 16; 11 (2): e0005222. PubMed PMID: 28207736.
18. Albright CM, Werner EF, Hughes BL. Cytomegalovirus Screening in Pregnancy: A Cost-Effectiveness and Threshold Analysis. *Am J Perinatol*. 2019 Jun; 36 (7): 678–87. PubMed PMID: 30567003.
19. Federal'nyj zakon ot 21 nojabrja 2011 g. N 323-FZ «Ob osnovah ohrany zdorov'ja grazhdan v Rossijskoj Federacii» s izmenenijami i dopolnenijami. <https://base.garant.ru/12191967/> (Dostup 26.03.2021 g.). Russian.
20. Prikaz Ministerstva zdoravoohraneniya Rossijskoj Federacii ot 28.02.2019 # 104n «Ob utverzhdenii porjadka i srokov odobrenija i utverzhdenija klinicheskikh rekomendacij, kriteriev prinjatija nauchno-prakticheskimi sovetami reshenija ob odobrenii, otklonenii ili napravlenii na dorabotku klinicheskikh rekomendacij libo reshenija ob ih peresmotre». Dostupno po ssylke: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/72599420/>. (Data obrashhenija: 12.03.2020). Russian.
21. Postanovlenie Glavnogo gosudarstvennogo sanitarnogo vracha Rossijskoj Federacii ot 28 janvarja 2021 goda # 4 ««Ob utverzhdenii sanitarnykh pravil i norm SanPiN 3.3686-21 «Sanitarno-jepidemiologicheskie trebovanija po profilaktike infekcionnykh boleznej»». Dostupno po ssylke: <https://docs.cntd.ru/document/573660140> (07.09.2021). Russian.
22. LeGoff J, Péré H, Bélec L. Diagnosis of genital herpes simplex virus infection in the clinical laboratory. *Virol J*. 2014; 11: 83. PubMed PMID: 24885431.
23. Pinninti SG, Kimberlin DW. Preventing herpes simplex virus in the newborn. *Clin Perinatol*. 2014. 41 (4): 945–55. PubMed PMID: 25459782.
24. Brown ZA, Selke S, Zeh J, et al. The acquisition of herpes simplex virus during pregnancy. *N Engl J Med*. 1997; 337 (8): 509–15.
25. Management of Genital Herpes in Pregnancy: ACOG Practice Bulletin. *ACOG Practice Bulletin*, Number 220. *Obstet Gynecol*. 2020 May; 135 (5): e193–e202. PubMed PMID: 32332414.
26. Samies NL, James SH. Prevention and treatment of neonatal herpes simplex virus infection. *Antiviral Res*. 2020 Apr; 176: 104721. PubMed PMID: 32044154.
27. Grupo de Trabajo de Infección Neonatal por virus herpes simplex de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica. Guía de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre prevención, diagnóstico y tratamiento de la infección neonatal por virus herpes simplex [The Spanish Society of Paediatric Infectious Diseases guidelines on the prevention, diagnosis and treatment of neonatal herpes simplex infections]. *An Pediatr*. 2018 Jul; 89 (1): 64.e1–64.e10. PubMed PMID: 29453157.
28. Sénat MV, Anselem O, Picone O, Renesme L, Sananès N, Vauloup-Fellous C, et al. Prevention and management of

- genital herpes simplex infection during pregnancy and delivery: Guidelines from the French College of Gynaecologists and Obstetricians (CNGOF). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2018 May; 224: 93–101. PubMed PMID: 29571124.
29. Ramgopal S, Wilson PM, Florin TA. Diagnosis and Management of Neonatal Herpes Simplex Infection in the Emergency Department. *Pediatr Emerg Care.* 2020 Apr; 36 (4): 196–202. PubMed PMID: 32265379.
  30. Fernandes ND, Arya K, Ward R. Congenital Herpes Simplex. In: *StatPearls Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing*, 2021 Jan. PubMed PMID: 29939674.
  31. Shangase N, Kharsany ABM, Ntombela NP, Pettifor A, McKinnon LR. A Systematic Review of Randomized Controlled Trials of School Based Interventions on Sexual Risk Behaviors and Sexually Transmitted Infections Among Young Adolescents in Sub-Saharan Africa. *AIDS Behav.* 2021 Mar 27. PubMed PMID: 33772695.
  32. Otto WR, Myers AL, LaRussa B, Kimberlin DW, Jackson MA. Clinical Markers and Outcomes of Neonates With Herpes Simplex Virus Deoxyribonucleic Acid Persistence in Cerebrospinal Fluid in Disseminated and Central Nervous System Infection. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2018 May 15; 7 (2): e30–e33. PubMed PMID: 28510722.
  33. Davis NL, King CC, Kourtis AP. Cytomegalovirus infection in pregnancy. *Birth Defects Res.* 2017; 109 (5): 336–464.
  34. Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY, Aragon DC, et al. Seroconversion for Cytomegalovirus Infection During Pregnancy and Fetal Infection in a Highly Seropositive Population: "The BraCHS Study". *J Infect Dis.* 2018; 218: 1200.
  35. Hughes BL, Gyamfi-Bannerman C. Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM). Diagnosis and antenatal management of congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol.* 2016; 214 (6): B5–B11.
  36. Rawlinson WD, Boppana SB, Fowler KB, Kimberlin DW, et al. Congenital cytomegalovirus infection in pregnancy and the neonate: consensus recommendations for prevention, diagnosis, and therapy. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17 (6): e177–e188.
  37. Britt WJ. Congenital human cytomegalovirus infection and the enigma of maternal immunity. *J Virol.* 2017; 91 (15).
  38. Luck SE, Wieringa JW, Blázquez-Gamero D, Henneke P, Schuster K, Butler K, et al. Congenital Cytomegalovirus: A European Expert Consensus Statement on Diagnosis and Management. *Pediatr Infect Dis J.* 2017; 36 (12): 1205–13. PubMed PMID: 29140947.
  39. Capretti MG, Lanari M, Tani G, Ancora G, Sciutti R, Marsico C, et al. Role of cerebral ultrasound and magnetic resonance imaging in newborns with congenital cytomegalovirus infection. *Brain Dev.* 2014; 36 (3): 203–11. PubMed PMID: 23647916.
  40. de Vries LS, Gunardi H, Barth PG, Bok LA, Verboon-Macielek MA, Groenendaal F. The spectrum of cranial ultrasound and magnetic resonance imaging abnormalities in congenital cytomegalovirus infection. *Neuropediatrics.* 2004 Apr; 35 (2): 113–9. PubMed PMID: 15127310.
  41. Desveaux C, Klein J, Leruez-Ville M, et al. Identification of symptomatic fetuses infected with cytomegalovirus using amniotic fluid peptide biomarkers. *PLoS Pathog.* 2016; 12: e1005395.
  42. Boppana SB, Ross SA, Shimamura M, Palmer AL, Ahmed A, Michaels MG, et al. Saliva polymerase-chain-reaction assay for cytomegalovirus screening in newborns. *N Engl J Med.* 2011; 364 (22): 2111–8. PubMed PMID: 21631323.
  43. Ross SA, Ahmed A, Palmer AL, Michaels MG, Sánchez PJ, Bernstein DI, et al. Detection of congenital cytomegalovirus infection by real-time polymerase chain reaction analysis of saliva or urine specimens. *J Infect Dis.* 2014; 210 (9): 1415–8. PubMed PMID: 24799600.
  44. Eventov-Friedman S, Manor H, Bar-Oz B, Averbuch D, Caplan O, Lifshitz A, et al. Saliva Real-Time Polymerase Chain Reaction for Targeted Screening of Congenital Cytomegalovirus Infection. *J Infect Dis.* 2019; 220 (11): 1790–6. PubMed PMID: 31310307.
  45. Bilavsky E, Watad S, Levy I, Linder N, Pardo J, Ben-Zvi H, et al. Positive IgM in Congenital CMV Infection. *Clin Pediatr (Phila).* 2017; 56 (4): 371–75. PubMed PMID: 28006975.
  46. Rogozina NV, Vasilev VV, Grineva AA, Mihajlov AV, Kashtanova TA, Romanovskij AN, i dr. Ante- i postnatal'naja diagnostika i kompleksnoe lechenie vrozhdennoj citomegalovirusnoj infekcii. *Ros vestn perinatol i pediater.* 2019; 64 (6): 89–93. DOI: 10.21508/1027-4065-2019-64-6-89-93. Russian.
  47. Marsico C, Kimberlin D. W. Congenital Cytomegalovirus infection: advances and challenges in diagnosis, prevention and treatment. *Ital J Pediatr.* 2017; 43: 38. Published online 2017 Apr 17. DOI: 10.1186/s13052-017-0358-8.
  48. Ross SA, Ahmed A, Palmer AL, Michaels MG, Sánchez PJ, Bernstein DI, et al. Detection of Congenital Cytomegalovirus Infection by Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis of Saliva or Urine Specimens. *The Journal of Infectious Diseases* 2014; 210: 1415–8. DOI: 10.1093/infdis/jiu263.
  49. Xiong YQ, Tan J, Liu YM, He Q, Li L, Zou K, et al. The risk of maternal parvovirus B19 infection during pregnancy on fetal loss and fetal hydrops: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Virol.* 2019; 114: 12–20. PubMed PMID: 30897374.
  50. Shishko GA, Ermolovich MA, Samojlovich EO, Artyushevskaja MV, Leonova EYu, Ustinovich YuA. Rol' parvovirusnoj infekcii v perinatal'noj patologii. *Reproduktivnoe zdorov'e. Vostochnaja Evropa.* 2015; 5: 95–102. Russian.
  51. Attwood LO, Holmes NE, Hui L. Identification and management of congenital parvovirus B19 infection. *Prenat Diagn.* 2020 Dec; 40 (13): 1722–31. PubMed PMID: 32860469.
  52. Salbetti MB, Pedranti MS, Barbero P, Molisani P, Lazzari M, Olivera N, et al. Molecular screening of the human parvoviruses B19 and bocavirus 1 in the study of congenital diseases as applied to symptomatic pregnant women and children. *Access Microbiol.* 2019; 1 (5): e000037. PubMed PMID: 32974527.
  53. Hunter LA, Ayala NK. Parvovirus B19 in Pregnancy: A Case Review. *J Midwifery Womens Health.* 2021; 66 (3): 385–90. PubMed PMID: 34101977.
  54. Gallinella G. The clinical use of parvovirus B19 assays: recent advances. *Expert Rev Mol Diagn.* 2018; 18 (9): 821–32. PubMed PMID: 30028234.
  55. Prefumo F, Fichera A, Fratelli N, Sartori E. Fetal anemia: Diagnosis and management. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2019; 58: 2–14. PubMed PMID: 30718211.
  56. Voordouw B, Rockx B, Jaenisch T, Fraaij P, Mayaud P, Vossen A, et al. Performance of Zika Assays in the Context of Toxoplasma gondii, Parvovirus B19, Rubella Virus, and Cytomegalovirus (TORCH) Diagnostic Assays. *Clin Microbiol Rev.* 2019; 33 (1): e00130-18. PubMed PMID: 31826871.
  57. Bascietto F, Liberati M, Murgano D, Buca D, Iacovelli A, Flacco ME, et al. Outcome of fetuses with congenital parvovirus B19 infection: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2018; 52 (5): 569–76. PubMed PMID: 29785793.
  58. Shahgildjan VI, Aleksandrova EP, Kozyrina NV, Shipulina OYu, Dodonova YeA, Shahgildjan NV. Citomegalovirusnaja infekcija u beremennyh i novorozhdennyh: jepidemiologicheskij analiz, novye podhody k diagnostike i lecheniju. *Akusherstvo i ginekologija: novosti, mnenija, obuchenie.* 2020; 8 (2): 80–94. DOI: 10.24411/2303-9698-2020-12008. Russian.
  59. Shahgildjan VI. Vrozhdennaja citomegalovirusnaja infekcija: aktual'nye voprosy, vozmozhnye otvety. *Neonatologija: novosti, mnenija, obuchenie.* 2020; 8 (4): 61–72. DOI: <https://doi.org/10.33029/2308-2402-2020-8-4-61-72>. Russian.

## МЕХАНИЗМЫ УЧАСТИЯ В-ЛИМФОЦИТОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

М. В. Мельников<sup>1,2,3</sup> ✉, В. С. Роговский<sup>1,2</sup>, А. В. Лопатина<sup>1,2</sup>, А. А. Свиридова<sup>1,2</sup>, А. И. Волков<sup>1</sup>, А. Н. Бойко<sup>1,2</sup><sup>1</sup> Федеральный центр мозга и нейротехнологий Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия<sup>2</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия<sup>3</sup> Институт иммунологии Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Рассеянный склероз (РС) — хроническое демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы с аутоиммунным механизмом развития. Долгое время РС рассматривали как заболевание, опосредованное преимущественно Т-клетками. Однако исследования последних лет указывают на критическое патогенетическое значение В-лимфоцитов при РС. При РС В-клетки способны оказывать как про-, так и противовоспалительное действие. В статье рассмотрены основные механизмы участия В-клеток в патогенезе РС. Обсуждены диагностическая значимость оценки характеристик гуморального звена иммунной системы при демиелинизирующих заболеваниях, а также современные возможности модуляции функций В-клеток.

**Ключевые слова:** В-клетки, нейродегенерация, нейровоспаление, рассеянный склероз.

**Вклад авторов:** М. В. Мельников — написание и редактирование рукописи; В. С. Роговский, А. В. Лопатина, А. И. Волков — написание рукописи; А. А. Свиридова — написание и форматирование рукописи; А. Н. Бойко — концепция и дизайн исследования, редактирование рукописи

✉ **Для корреспонденции:** Михаил Валерьевич Мельников  
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; medikms@yandex.ru

**Статья получена:** 17.07.2021 **Статья принята к печати:** 06.08.2021 **Опубликована онлайн:** 16.08.2021

**DOI:** 10.47183/mes.2021.020

## MECHANISMS OF B LYMPHOCYTE INVOLVEMENT IN THE PATHOGENESIS OF MULTIPLE SCLEROSIS

Melnikov MV<sup>1,2,3</sup> ✉, Rogovskii VS<sup>1,2</sup>, Lopatina AV<sup>1,2</sup>, Sviridova AA<sup>1,2</sup>, Volkov AI<sup>1</sup>, Boyko AN<sup>1,2</sup><sup>1</sup> Federal Center for Brain and Neurotechnology of Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russia<sup>2</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia<sup>3</sup> Institute of Immunology of Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russia

Multiple sclerosis (MS) is a chronic demyelinating disease of the central nervous system involving autoimmune mechanisms. MS has been treated as a disorder mediated mainly by T cells for a long time. However, recent findings demonstrate that B lymphocytes are of crucial pathogenetic significance in MS. In patients with MS, B cells can possess both pro-inflammatory and anti-inflammatory effects. The paper reports the main mechanisms of B lymphocyte involvement in the pathogenesis of MS. Diagnostic value of assessing humoral immune parameters in individuals with demyelinating diseases and modern possibility of B cell function modulation are discussed.

**Keywords:** B cells, neurodegeneration, neuroinflammation, multiple sclerosis

**Author contribution:** Melnikov MV — manuscript writing and editing; Rogovskii VS, Lopatina AV, Volkov AI — manuscript writing; Sviridova AA — manuscript writing and formatting; Boyko AN — study concept and design, manuscript editing

✉ **Correspondence should be addressed:** Mikhail V. Melnikov  
Ostrovitianova, 1, Moscow, 117997; medikms@yandex.ru

**Received:** 17.07.2021 **Accepted:** 06.08.2021 **Published online:** 16.08.2021

**DOI:** 10.47183/mes.2021.020

Рассеянный склероз (РС) — хроническое демиелинизирующее и нейродегенеративное заболевание центральной нервной системы (ЦНС) с аутоиммунным механизмом развития. РС является одной из наиболее сложных и социально значимых проблем клинической неврологии, что подтверждают широкая распространенность заболевания, постоянно растущее число заболевших, а также тяжелая инвалидизация больных РС, представляющих собой преимущественно молодых людей в возрасте 18–45 лет [1].

Длительное время РС рассматривали как заболевание, преимущественно опосредованное Т-клеточным иммунным ответом. Наибольшее патогенетическое значение отводили Th1- и Th17-клеткам (субпопуляции CD4<sup>+</sup> Т-клеток), продуцирующим провоспалительные цитокины интерферон-γ (IFNγ) интерлейкин-17 (IL17) соответственно [2].

Однако исследования последних лет показали, что наряду с Т-лимфоцитами существенную роль в патогенезе РС играют и В-клетки. Известно, что В-клетки не только способны дифференцироваться в плазматические клетки и продуцировать антитела, но и вырабатывают цитокины и презентруют антигены. В пользу участия В-лимфоцитов в патогенезе РС указывает высокая диагностическая ценность определения олигоклональных

иммуноглобулинов и свободных легких κ- и λ-цепей иммуноглобулинов в спинномозговой жидкости, а также клиническая эффективность анти-В-клеточной терапии при РС [3, 4].

В обзоре представлены основные механизмы про- и противовоспалительного эффекта В-лимфоцитов в патогенезе демиелинизирующих заболеваний. Обсуждены диагностическое и прогностическое значение оценки показателей гуморального звена иммунной системы при демиелинизирующих заболеваниях, а также новые подходы в модуляции функций В-клеток при РС.

### В-лимфоциты: развитие, дифференцировка и субпопуляции

#### Дифференцировка В-лимфоцитов

Дифференцировка В-лимфоцитов (В-клеток) происходит из полипотентных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) костного мозга. Данные клетки являются самоподдерживающейся популяцией и дают начало лимфоидному и миелоидному росту. Клетки лимфоидного роста дают начало предшественникам Т- и В-лимфоцитов.

Для дифференцировки В-клеток важным значением обладает IL7 [5].

Новообразованные В-клетки с интактным В-клеточным рецептором мигрируют из костного мозга в периферическую кровь и вторичные лимфоидные органы [6]. Стоит отметить, что данные по дифференцировке В-клеток зачастую противоречивы, так как большой массив информации получен при исследованиях на грызунах, и часто сложно определить соответствие популяций человеческих и мышиных В-клеток.

У людей самыми ранними В-клетками, восстанавливающимися на периферии после В-клеточной терапии, являются  $CD10^+CD38^{high}CD24^{high}$ . Эти В-клетки далее разделяются на тип 1 и тип 2, а также на  $CD10^{neg}$  тип 3 клетки на основании постепенно снижающейся экспрессии CD24 и CD38. *In vitro* они способны к ступенчатой дифференцировке в В-клетки зрелого наивного фенотипа. Зрелые наивные В-клетки обладают фенотипом  $CD10^{neg}CD38^{low/neg}$  [7].

Дальнейшая дифференцировка В-клеток осуществляется после антигенной стимуляции. Стимуляция В-клеток осуществляется посредством взаимодействия антигена с В-клеточным рецептором (В-cell receptor, BCR). В отличие от Т-клеточного рецептора, BCR распознает антиген без связи с белком главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, MHC). CD19 — корецептор комплекса BCR, является одним из самых ранних и наиболее специфичных маркеров В-клеток [8]. CD20 также является общим маркером В-клеток, экспрессируемым большинством В-клеток, однако он не экспрессируется в терминально дифференцированных плазмобластах и плазматических клетках. В отличие от CD19, функциональная роль CD20 изучена в существенно меньшей степени [9].

После антигенной стимуляции происходит сложный процесс дифференцировки, зависящий в том числе от степени аффинности антигена к BCR. В ходе дифференцировки образуются, в частности, короткоживущие и долгоживущие плазматические клетки, продуцирующие антитела, а также В-клетки памяти. Интересно, что по современным представлениям В-клетки памяти развиваются из В-клеток с более низкой аффинностью к антигену, что в дальнейшем обеспечивает возможность быстрой адаптации В-клеточного рецептора к изменившемуся антигену (например, вследствие мутации вируса) [10].

#### Субпопуляции В-лимфоцитов

##### 1. В-клетки памяти

В-клетки памяти — это долгоживущие покоящиеся клетки, которые способны быстро реагировать на повторное появление антигена. В тех случаях, когда уровень циркулирующих антител недостаточен для немедленной нейтрализации и устранения патогенов, происходит экспансия В-клеток памяти. Стоит отметить, что В-клетки памяти локализуются в тех областях, где вероятность встречи с антигенами максимальна, при этом в этих локациях так же широко представлены макрофаги ( $CD169^+$ ), способные презентировать антигены В-клеткам. При этом презентация антигена происходит как наивным В-клеткам, так и В-клеткам памяти [10].

Таким образом, можно выделить два вида В-клеточной памяти. Первый вид реализуется при участии антител, продуцируемых долгоживущими плазматическими клетками.

Плазматические клетки человека характеризуются совместной экспрессией CD138 и CD38, что позволяет идентифицировать плазматические клетки в костном мозге или в клеточных суспензиях из тканей методом многоцветной проточной цитометрии. Эти окончательно дифференцированные В-клетки теряют способность экспрессировать CD19 и CD20 (маркеры В-клеток) на клеточной поверхности, сохраняя при этом экспрессию CD27 [8].

Второй вид В-клеточной памяти опосредован В-клетками памяти, которые являются покоящимися и рекрутируются при недостаточности иммунного ответа, сформированного В-клеточной памятью первого типа. В связи с этим стоит отметить, что отсутствие специфичных антител в плазме крови не следует рассматривать как отсутствие потенциала к повторному иммунному ответу В-клеток памяти.

Существует несколько видов В-клеток памяти, которые классифицируют на основе их происхождения, дифференциальной экспрессии CD27 и изотипа экспрессируемых иммуноглобулинов. Существуют три основных характерных области происхождения В-клеток памяти: селезенка, зародышевые (герминальные) центры (структуры внутри вторичных лимфоидных органов, в особенности в лимфатических узлах, где происходят пролиферация и дифференцировка зрелых В-клеток) и собственная пластинка слизистой оболочки кишечника. Для клеток памяти селезеночного происхождения характерно производство маркеров  $CD27^+IgG^+$ . В-клетки памяти герминальных центров экспрессируют  $CD27^+IgM^+IgD^-$ , при этом для них характерна смена экспрессии IgM на  $CD27^+IgG/IgA^+$ . Кишечные В-клетки памяти экспрессируют  $CD27^+IgA^+$  [11].

Согласно существующим представлениям, в крови и костном мозге человеческие В-клетки памяти могут быть разделены на три основные популяции:  $CD19^+CD27^+IgM^+IgD^+$  (аналогично В-клеткам маргинальной зоны),  $CD19^+CD27^+IgM^+IgD^-$  (т. е. только IgM-позитивные) и способные к переключению классов иммуноглобулинов  $CD19^+CD27^+IgM^-(IgG^+$  или  $IgA^+)$  [10].

После активации и дифференцировки В-клеток в герминальных центрах происходит их переход в высокоаффинные В-клетки, которые мигрируют в костный мозг, где они могут персистировать в отсутствии антигенной стимуляции в течение длительного времени, составляя основу долговременного гуморального иммунитета [10].

В-клетки памяти могут также локализоваться в областях организма, являющихся входными воротами и преимущественными областями распространения для различных инфекций, где они представляют собой тканерезидентные В-клетки памяти [12]. После репрезентации антигена В-клетки памяти начинают быстро пролиферировать и дифференцироваться в плазматические клетки. При этом они могут вновь входить в герминальные центры для очередного «переобучения» — повышения аффинности и переключения классов продуцируемых иммуноглобулинов [10].

Стоит отметить, что в герминальных центрах важную роль играют фолликулярные  $CD4^+$ -Т-клетки (фолликулярные Т-хелперы, или  $T_H$ -клетки), которые, продуцируя IL21, стимулируют дифференцировку В-клеток памяти в плазматические клетки. При этом известно, что IL21 является важным цитокином в патогенезе РС, обеспечивая дифференцировку Th17-клеток. Согласно последним данным,  $T_H$ -клетки играют существенную роль в Th17-индуцированном нейровоспалении, в связи с чем

являются потенциальной терапевтической мишенью при РС [10, 13].

## 2. В-регуляторные клетки

Большой интерес представляет недавно идентифицированная субпопуляция регуляторных В-клеток ( $B_{reg}$ ), продуцирующих IL10 и способных подавлять иммунный ответ на чужеродные и аутоантигены [13, 14]. К наиболее часто встречаемым в литературе типам  $B_{reg}$  относятся В-клетки  $CD24^{high}CD38^{high}$ , а также  $CD27^{int}CD38^{high}$ .  $B_{reg}$  способны стимулировать дифференцировку  $CD4^{+}$ -Т-клеток в регуляторные клетки ( $T_{reg}$ ), ингибировать Th1-иммунный ответ и дифференцировку Th17-клеток.  $B_{reg}$  могут также подавлять продукцию IFN $\alpha$  дендритными клетками. Супрессивная активность  $B_{reg}$  снижается при аутоиммунных заболеваниях [14].

### Механизмы участия В-клеток в иммунопатогенезе РС (антитела, цитокины, антигенпрезентация)

В-клетки вовлечены в патогенез РС путем различных механизмов, таких как презентация антигенов Т-клеткам, секреция про- и противовоспалительных цитокинов, а также продукции аутоантител [15].

В-клетки являются профессиональными антигенпрезентирующими клетками — они специфично распознают даже низкие концентрации антигенов и конститутивно экспрессируют молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса II и молекулы костимуляции, что позволяет В-клеткам осуществлять прайминг Т-клеток и, в свою очередь, индуцировать собственную дифференцировку в клетки памяти и плазматические клетки, продуцирующие антитела [16, 17]. В ЦНС, вероятно, благодаря этим процессам происходит усиленная активация инфильтрирующих Т-клеток, которые затем реализуют повреждающие эффекты в головном и спинном мозге [17].

Цитокиновая секреция В-клетками оказывает поддерживающую роль для нейровоспаления. В-клетки больных РС характеризуются провоспалительным цитокиновым профилем. Они продуцируют повышенное количество IL6, лимфотоксина- $\alpha$  и фактора некроза опухоли  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), тогда как продукция ими противовоспалительного IL10, напротив, снижена [17]. Установлено, что анти-В-клеточная терапия подавляет аутоиммунные реакции путем деплеции IL6-продуцирующих В-лимфоцитов [18].

РС характеризуется также усиленным интратекальным синтезом IgG. Повышение уровня IgG в спинномозговой жидкости, вероятно, связано с повышением уровня циркулирующих антител, в частности, с избирательным повышением подклассов IgG1 и IgG3. Продукция антител циркулирующими В-клетками вносит существенный вклад в патогенез РС [19].

Важно, что участие В-лимфоцитов в патогенезе РС связано с их функционированием как на периферии, так и в ЦНС. Показано, что при вторично-прогрессирующем РС в оболочках головного мозга формируются эктопические лимфоидные фолликулы, которые, главным образом, представлены В-лимфоцитами. Полагают, что такие В-клеточные структуры в наибольшей степени способны обуславливать кортикальную демиелинизацию и прогрессирование заболевания. Более того, недавно установлено, что менингеальные В-клеточные фолликулы формируются уже на ранних стадиях демиелинизирующего процесса, что может объяснять нейродегенеративные изменения в дебюте заболевания [20, 21].

### Диагностическое и прогностическое значения оценки гуморального звена иммунной системы при демиелинизирующих заболеваниях

Несмотря на существующие достижения в понимании патогенеза РС, биомаркеры с высокой специфичностью и чувствительностью, позволяющие диагностировать РС на ранней стадии, не выявлены. На сегодняшний день среди

**Таблица.** Влияние препаратов, изменяющих течение РС, на функции В-лимфоцитов при ЭАЭ и РС

| Терапия            | Заболевание | Эффект на В-лимфоциты                                                                                                                  | Авторы       |
|--------------------|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Глатирамера ацетат | ЭАЭ         | Повышение продукции IL4, IL10 и IL13 и снижение продукции IL6, IL12 и TNF $\alpha$ В-клетками                                          | [44, 45]     |
|                    | РС          | Снижение уровня экспрессии CXCR5 и ICAM-3 на В-лимфоцитах. Снижение продукции IL6 и TNF $\alpha$ , повышение продукции IL10 В-клетками | [44, 46]     |
| IFN $\beta$        | ЭАЭ         | Повышение количества $B_{reg}$ -клеток, продуцирующих IL10                                                                             | [47]         |
|                    | РС          | Подавление экспрессии генов IL1 $\beta$ , IL23. Повышение количества $B_{reg}$ -клеток, продуцирующих IL10                             | [47, 48]     |
| Диметилфумарат     | ЭАЭ         | Подавление экспрессии МНС II на В-клетках, уменьшение продукции В-клетками ГМ-КСФ, TNF $\alpha$ и IL6                                  | [49, 50]     |
|                    | РС          | Снижение количества $CD19^{+}CD27^{+}$ -В-клеток памяти. Снижение продукции ГМ-КСФ, IL6 и TNF $\alpha$ В-клетками                      | [49, 51]     |
| Терифлуноид        | ЭАЭ         | Уменьшение количества мигрирующих в ЦНС В-клеток                                                                                       | [52]         |
|                    | РС          | Снижение общего количества В-клеток                                                                                                    | [53, 54]     |
| Финголимод         | ЭАЭ         | Предупреждение образования В-клеточных фолликул в мозговых оболочках                                                                   | [50]         |
|                    | РС          | Снижение количества циркулирующих В-клеток. Снижение продукции TNF $\alpha$ и повышение продукции IL10 В-клетками                      | [49, 50, 54] |
| Натализумаб        | РС          | Повышение количества циркулирующих в периферической крови $B_{reg}$ -клеток. Снижение количества В-клеток в цереброспинальной жидкости | [50, 55]     |
| Окрелизумаб        | ЭАЭ         | Снижение количества В-клеток в костном мозге, лимфатических узлах и селезенке                                                          | [56]         |
|                    | РС          | Снижение количества $CD20^{+}$ -В-клеток                                                                                               | [53, 57]     |
| Кладрибин          | РС          | Снижение количества циркулирующих В-клеток памяти. Повышение продукции IL10 В-клетками                                                 | [53]         |
| Алемтузумаб        | РС          | Снижение количества циркулирующих В-клеток                                                                                             | [49, 50]     |

множества иммунологических параметров, оцениваемых при РС, наибольшей диагностической и прогностической ценностью обладают показатели гуморального иммунного ответа, в частности, олигоклональные полосы иммуноглобулинов и IgG в спинномозговой жидкости [22–24].

Олигоклональные полосы иммуноглобулинов определяют в парной пробе в сыворотке крови и спинномозговой жидкости. Они образованы IgG и IgM, которые продуцируют плазматические клетки ЦНС. Одновременное наличие этих полос в спинномозговой жидкости и их отсутствие в сыворотке крови указывают на усиленный интратекальный синтез антител и связаны с РС (у более 95% больных РС олигоклональные полосы иммуноглобулинов обнаруживаются в спинномозговой жидкости при отсутствии в сыворотке крови). Однако стоит отметить, что олигоклональные полосы иммуноглобулинов не специфичны для РС и могут быть обнаружены при других воспалительных заболеваниях ЦНС [23]. Таким образом, данный показатель является дополнительным в диагностике РС и носит скорее подтверждающий характер при исключении других воспалительных заболеваний ЦНС.

Высокочувствительной и специфичной в отношении РС является оценка свободных легких к-цепей иммуноглобулинов в спинномозговой жидкости [25].

Обсуждается также прогностическое значение определения олигоклональных полос иммуноглобулинов и свободных легких к-цепей иммуноглобулинов в спинномозговой жидкости с целью оценки риска конверсии клинически изолированного синдрома (КИС) и радиологически изолированного синдрома (РИС) (ранние формы демиелинизирующего процесса). Так, в нескольких крупных исследованиях было показано, что наличие олигоклональных полос иммуноглобулинов у больных КИС и РИС повышает риск конверсии в РС [25–27].

Показатели гуморального звена иммунной системы исследуют и при других демиелинизирующих заболеваниях ЦНС. Высокой диагностической ценностью, например, обладают антитела к аквапорино-4, а также к миелолигандоцитарному гликопротеину (МОГ) для диагностики заболеваний спектра оптиконейромиелита (ЗОНМ) и МОГ-ассоциированных синдромов соответственно [28].

### **Влияние анти-В-клеточной терапии на течение РС**

Обнаружение клинической эффективности анти-В-клеточной терапии при РС стало одним из важнейших событий в лечении этого заболевания в последние годы, особенно на основе моноклональных антител к CD20-рецептору. Более того, в настоящий момент анти-В-клеточная терапия препаратом окрелизумаб является единственным доказанным эффективным методом лечения первично-прогрессирующей формы РС [29]. При активном ремиттирующем РС и вторично-прогрессирующем РС с обострениями активно используют окрелизумаб и офтамумаб (последний пока не разрешен в Российской Федерации). Одним из основных вопросов, связанных с назначением анти-В-клеточной терапии, является необходимость определения критериев персонализированного назначения таких препаратов, а именно выявление прогностических маркеров оптимального/субоптимального ответа на терапию. Другим вопросом являются дозировка и частота лекарственного средства.

С этой точки зрения наибольшее внимание привлекает определение процентного отношения В-клеток иммунологической памяти (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) [30, 31]. В настоящее время данный метод применяют (off-label) в странах Евросоюза и США для персонализированного подхода в лечении пациентов, получающих ритуксимаб и окрелизумаб для лечения РС и оптиконейромиелита [30]. Контроль уровня В-клеток памяти для оптимизации терапии препаратом ритуксимаб при ЗОНМ рекомендован Французским обществом изучения данных заболеваний (NOMADMUS) [32]. В нескольких клинических исследованиях проводили анализ В-клеток памяти во фракции мононуклеарных клеток периферической крови для оптимизации терапии оптиконейромиелита препаратом ритуксимаб [23–35]. В одном из них 100 больных оптиконейромиелитом проходили терапию ритуксимабом в среднем в течение 67 месяцев (при достижении В-клеток памяти уровня > 0,05% от количества мононуклеарных клеток периферической крови в течение двух лет и > 0,1% в последующие годы) [34]. На фоне лечения среднегодовая частота обострений сократилась с 2,4 до 0,1 и уровень инвалидизации снизился или стабилизировался у 96% пациентов.

В то же время не известны исследования, в которых учет индивидуальных клинических, нейровизуализационных и иммунологических показателей послужил поводом для изменения протокола терапии препаратами алемтузумаб, кладрибин, окрелизумаб при РС, за исключением нежелательных реакций, включая лимфопению.

При изучении механизма действия вышеуказанных препаратов было выявлено, что ключевым аспектом их эффективности при РС и ЗОНМ является селективная гибель пула В-клеток иммунологической памяти. Так, алемтузумаб, один из высокоэффективных препаратов в лечении РС, вызывает гибель Т- и В-клеток и последующее быстрое восстановление популяции незрелых, а затем зрелых В-клеток, но при этом продолжительное снижение уровня CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>-В-клеток памяти [36]. Анализ субпопуляций лимфоцитов в исследованиях кладрибина в таблетках показал, что снижение уровня CD4<sup>+</sup>-Т-клеток составляет 40–45%, CD8<sup>+</sup>-клеток — 15–20% в течение года после применения препарата, тогда как снижение уровня CD19<sup>+</sup>-В-клеток было более существенным [37, 38]. Стоит отметить, что снижение только CD4<sup>+</sup>-Т-клеток не может объяснять высокую клиническую эффективность кладрибина, так как опыт исследований анти-CD4-моноклональных антител показал, что снижение уровня CD4<sup>+</sup>-Т-клеток на 60–70% лишь незначительно снижало частоту обострений РС [39]. В исследовании кладрибина в таблетках был отмечен дозозависимый эффект (между дозами 5,25 мг/кг и 3,5 мг/кг) на CD4<sup>+</sup> и CD8-клеточные популяции, но не на В-клетки [37]. С учетом одинаковых клинических результатов применения обеих доз кладрибина, эффект этого препарата связывают с воздействием преимущественно на В-клетки [38]. Напротив, восстановление популяции В-клеток памяти на фоне терапии алемтузумабом и кладрибином сочеталось с возобновлением активности РС и необходимостью проведения повторных курсов лечения [38, 40–42].

Было показано, что при РС высокоэффективна анти-В-клеточная терапия с использованием анти-CD20-моноклональных антител. Использование окрелизумаба вызывает существенное снижение CD19<sup>+</sup>-В-клеток, поэтому введение препарата каждые 6 месяцев может

оказаться слишком частым для некоторых пациентов. Так, в продолжении клинических исследований II фазы препарата окрелизумаб при ремитирующем РС, когда группы сравнения, получавшие плацебо и IFN $\beta$ , были переведены на окрелизумаб через 24 недели, а затем получали препарат через 24, 48, 72 недели и были под наблюдением до 144 недели, частота обострений и прогрессирование инвалидизации оставались низкими в течение 18 месяцев после последнего введения препарата [43].

Важно отметить, что на функции В-клеток влияет не только собственно анти-В-клеточная терапия, но и другие препараты, изменяющие течение РС, с чем может быть связана их клиническая эффективность. Влияние других препаратов, изменяющих течение РС, на функции В-клеток

при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите (ЭАЭ) и РС представлено в таблице.

## Заключение

Важное значение гуморального звена иммунной системы в патогенезе, диагностике и лечении демиелинизирующих заболеваний ЦНС не вызывает сомнений. В то же время механизмы, опосредующие роль В-клеток при этих заболеваниях, недостаточно изучены. Миграция В-клеток из периферии в ЦНС через гематоэнцефалический барьер, значение В-клеток на ранних стадиях демиелинизирующего процесса, влияние анти-В-клеточной терапии на В-клетки ЦНС — лишь часть вопросов, которые предстоит уточнить.

## Литература

- Boyko A, Melnikov M. Prevalence and incidence of multiple sclerosis in Russian Federation: 30 years of studies. *Brain Sci.* 2020 May 18; 10 (5): 305. DOI: 10.3390/brainsci10050305.
- Kamali AN, Noorbakhsh SM, Hamedifar H, Jadidi-Niaragh F, Yazdani R, Bautista JM, et al. A role for Th1-like Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune disorders. *Mol Immunol.* 2019 Jan; 105: 107–15. DOI: 10.1016/j.molimm.2018.11.015.
- Ziemssen T, Akgün K, Brück W. Molecular biomarkers in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation.* 2019 Dec 23; 16 (1): 272. DOI: 10.1186/s12974-019-1674-2.
- Milo R. Therapies for multiple sclerosis targeting B cells. *Croat Med J.* 2019 Apr 30; 60 (2): 87–98. DOI: 10.3325/cmj.2019.60.87.
- Corfe SA, Paige CJ. The many roles of IL7 in B cell development; mediator of survival, proliferation and differentiation. *Semin Immunol.* 2012; 24 (3), 198–208. DOI: 10.1016/j.smim.2012.02.001.
- Bemark M. Translating transitions — how to decipher peripheral human B cell development. *J Biomed Res.* 2015; 29 (4): 264–84. DOI: 10.7555/JBR.29.20150035.
- Kaminski DA, Wei C, Qian Y, Rosenberg AF, Sanz I. Advances in human B cell phenotypic profiling. *Front Immunol.* 2012; 3: 302. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00302.
- Khodadadi L, Cheng Q, Radbruch A, Hiepe F. The maintenance of memory plasma cells. *Front Immunol.* 2019; 10: 1787. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01787.
- Pavlasova G, Mraz M. The regulation and function of CD20: an "enigma" of B-cell biology and targeted therapy. *Haematologica.* 2020; 105 (6): 1494–506. DOI: 10.3324/haematol.2019.243543.
- Palm AE, Henry C. Remembrance of things past: long-term B cell memory after infection and vaccination. *Front Immunol.* 2019; 10: 1787. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01787.
- Luz EC, Damaris EL. "Introduction to T and B lymphocytes," in autoimmunity: from bench to bedside. El Rosario University Press, 2013.
- Adachi Y, Onodera T, Yamada Y, Daio R, Tsuiji M, Inoue T, et al. Distinct germinal center selection at local sites shapes memory B cell response to viral escape. *J Exp Med.* 2015; 212 (10), 1709–23. DOI: 10.1084/jem.20142284.
- Quinn JL, Kumar G, Agasing A, Ko RM, Axtell RC. Role of TFH cells in promoting T helper 17-induced neuroinflammation. *Front Immunol.* 2018; 9: 382. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00382.
- Atisha-Fregoso Y, Zou YR, Diamond B. "B cells and generation of antibodies". In: Dubois' Lupus Erythematosus and Related Syndromes. Elsevier, 2019; 101–15.
- Sospedra M. B cells in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 2018; 31 (3): 256–262. DOI: 10.1097/WCO.0000000000000563.
- Adler LN, Jiang W, Bhamidipati K, Millican M, Macaubas C, et al. The other function: class II-restricted antigen presentation by B cells. *Front Immunol.* 2017; 8: 319. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00319.
- Hausser-Kinzel S, Weber MS. The role of B cells and antibodies in multiple sclerosis, neuromyelitis optica, and related disorders. *Front Immunol.* 2019; 10: 201. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00201.
- Barr TA, Shen P, Brown S, Lampropoulou V, Roch T, Lawrie S, et al. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL6-producing B cells. *J Exp Med.* 2012; 209 (5): 1001–10. DOI: 10.1084/jem.20111675.
- Yu X, Graner M, Kennedy PGE, Liu Y. The role of antibodies in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Front Neurol.* 2020; 11: 533388. DOI: 10.3389/fneur.2020.533388.
- Negron A, Stüve O, Forsthuber TG. Ectopic lymphoid follicles in multiple sclerosis: Centers for Disease Control. *Front Neurol.* 2020 Dec 8; 11: 607766. DOI: 10.3389/fneur.2020.607766.
- Bell L, Lenhart A, Rosenwald A, Monoranu CM, Berberich-Siebelt F. Lymphoid aggregates in the CNS of progressive multiple sclerosis patients lack regulatory T cells. *Front Immunol.* 2020 Jan 15; 10: 3090. DOI: 10.3389/fimmu.2019.03090.
- Ziemssen T, Akgün K, Brück W. Molecular biomarkers in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation.* 2019 Dec 23; 16 (1): 272. DOI: 10.1186/s12974-019-1674-2.
- Schwenkenbecher P, Konen FF, Wurster U, Jendretzky KF, Gingele S, Sühs KW, et al. The persisting significance of oligoclonal bands in the dawning era of kappa free light chains for the diagnosis of multiple sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2018 Nov 29; 19 (12): 3796. DOI: 10.3390/ijms19123796.
- Lefvert A, Link H. IgG production within the central nervous system: a critical review of proposed formulae. *Ann Neurol.* 1985; 17: 13–20. DOI: 10.1002/ana.410170105.
- Tintore M, Rovira À, Río J, Otero-Romero S, Arrambide G, Tur C, et al. Defining high, medium and low impact prognostic factors for developing multiple sclerosis. *Brain.* 2015 Jul; 138 (Pt 7): 1863–74. DOI: 10.1093/brain/awv105.
- Kuhle J, Disanto G, Dobson R, et al. Conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis: A large multicentre study. *Mult Scler.* 2015; 21 (8): 1013–24.
- Lebrun-Frenay C, Kantarci O, Siva A, Sormani MP, Pelletier D, Okuda DT. 10-year RISC study group on behalf of SFSEP, OFSEP. Radiologically isolated syndrome: 10-year risk estimate of a clinical event. *Ann Neurol.* 2020 Aug; 88 (2): 407–17. DOI: 10.1002/ana.25799.
- Hor JY, Asgari N, Nakashima I, Broadley SA, Leite MI, Kissani N, et al. Epidemiology of neuromyelitis optica spectrum disorder and its prevalence and incidence worldwide. *Front Neurol.* 2020 Jun 26; 11: 501. DOI: 10.3389/fneur.2020.00501.
- Greenfield AL, Hauser SL. B-cell therapy for multiple sclerosis: entering an era. *Ann Neurol.* 2018 Jan; 83 (1): 13–26. DOI: 10.1002/ana.25119.
- Baker D, Marta M, Pryce G, Giovannoni G, Schmierer K. Memory B cells are major targets for effective immunotherapy in relapsing multiple sclerosis. *E Bio Medicine.* 2017; 16: 41–50.

31. Bose T. Role of immunological memory cells as a therapeutic target in multiple sclerosis. *Brain Sci.* 2017; 7 (11): E148.
32. Ciron J, Audoin B, Bourre B, Brassat D, Durand-Dubief F, Laplaud D, et al. NOMADMUS group, under the aegis of OFSEP, SFSEP. Recommendations for the use of Rituximab in neuromyelitis optica spectrum disorders *Rev Neurol (Paris)*. 2018; 174 (4): 255–64.
33. Kim SH, Kim W, Li XF, Jung IJ, Kim HJ. Repeated treatment with rituximab based on the assessment of peripheral circulating memory B cells in patients with relapsing neuromyelitis optica over 2 years. *Arch Neurol.* 2011; 68, 1412–20.
34. Kim SH, Jeong IH, Hyun JW, Joung A, Jo HJ, Hwang SH, et al. Treatment outcomes with rituximab in 100 patients with neuromyelitis optica: influence of FCGR3A polymorphisms on the therapeutic response to rituximab. *JAMA Neurol.* 72: 989–95.
35. Kim SH, Huh SY, Lee SJ, Joung A, Kim HJ. A5-year follow-up of rituximab treatment in patients with neuromyelitis optica spectrum disorder. *JAMA Neurol.* 2013; 70: 1110–7.
36. Thompson SA, Jones JL, Cox AL, et al. B-cell reconstitution and BAFF after alemtuzumab (CAMPATH-1H) treatment of multiple sclerosis. *J Clin Immunol.* 2010; 30: 99–105.
37. Duddy M, Niino M, Adatia F, et al. Distinct effector cytokine profile of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol.* 2007; 178: 6092–9.
38. Giovannoni G, Cohen JA, Coles AJ, Hartung HP, Havrdova E, Selmaj KW, et al. CARE-MS II Investigators. Alemtuzumab improves preexisting disability in active relapsing-remitting MS patients. *Neurology.* 2016 Nov 8; 87 (19): 1985–92.
39. Van Oosten BW, Lai M, Hodgkinson S, et al. Treatment of multiple sclerosis with the monoclonal anti-CD4 antibody cM-T412: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, MR-monitored phase II trial. *Neurology.* 1997; 49: 351–7.
40. Ceronie B, Jacobs BM, Baker D, Dubuisson N, Mao Z, Ammoscato F, et al. Cladribine treatment of multiple sclerosis is associated with depletion of memory B cells. *J Neurol.* 2018 May; 265 (5): 1199–209.
41. Giovannoni G, Cohen JA, Coles AJ, Hartung HP, Havrdova E, Selmaj KW, et al. CARE-MS II Investigators. Alemtuzumab improves preexisting disability in active relapsing-remitting MS patients. *Neurology.* 2016 Nov 8; 87 (19): 1985–92.
42. Havrdova E, Arnold DL, Cohen JA, Hartung HP, Fox EJ, Giovannoni G, et al. CARE-MS I and CAMMS03409 Investigators. Alemtuzumab CARE-MS I 5-year follow-up: Durable efficacy in the absence of continuous MS therapy. *Neurology.* 2017 Sep 12; 89 (11): 1107–16. *Neurology.* 2018 Apr 17; 90 (16): 755.
43. Genovese MC, Kaine JL, Lowenstein MB, et al. Ocrelizumab, a humanized antiCD20 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: a phase I/II randomized, blinded, placebo-controlled, dose-ranging study. *Arthritis Rheum.* 2008; 58: 2652–61.
44. Kuerten S, Jackson LJ, Kaye J, Vollmer TL. Impact of glatiramer acetate on B cell-mediated pathogenesis of multiple sclerosis. *CNS Drugs.* 2018; 32 (11): 1039–51.
45. Begum-Haque S, Christy M, Ochoa-Reparaz J, Nowak EC, Mielcarz D, Haque A, et al. Augmentation of regulatory B cell activity in experimental allergic encephalomyelitis by glatiramer acetate. *J Neuroimmunol.* 2011 Mar; 232 (0): 136–44.
46. Ireland SJ, Guzman AA, O'Brien DE, Hughes S, Greenberg B, Flores A, et al. The effect of glatiramer acetate therapy on functional properties of B cells from patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *JAMA Neurol.* 2014 Nov; 71 (11): 1421–8.
47. Schubert RD, Hu Y, Kumar G, Szeto S, Abraham P, Winderl J, et al. Interferon- $\beta$  treatment requires B cells for efficacy in neuro-autoimmunity. *J Immunol.* 2015 Mar 1; 194 (5): 2110–6.
48. Ramgolam VS, Sha Y, Marcus KL, Choudhary N, Troiani L, Chopra M, et al. B cells as a therapeutic target for IFN- $\beta$  in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Immunol.* 2011; 186 (7): 4518–26.
49. Sabatino JJ, Zamvil SS, Hauser SL. B-cell therapies in multiple sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2019 Feb; 9 (2): a032037.
50. Lehmann-Horn K, Kinzel S, Weber MS. Deciphering the role of B cells in multiple sclerosis-towards specific targeting of pathogenic function. *Int J Mol Sci.* 2017 Oct; 18 (10): 2048.
51. Gregson A, Thompson K, Tsirka SE, Selwood DL. Emerging small-molecule treatments for multiple sclerosis: focus on B cells. *F1000Res.* 2019; 8: F1000 Faculty Rev-245.
52. Braley TJ, Segal BM. B-cell targeting agents in the treatment of multiple sclerosis. *Curr Treat Options Neurol.* 2013 Jun; 15 (3): 259–69.
53. Traub JW, Häusser-Kinzel S, Weber MS. Differential effects of MS therapeutics on B cells-implications for their use and failure in AQP4-positive NMOSD patients. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul; 21 (14): 5021.
54. Claes N, Fraussen J, Stinissen P, Hupperts R, Somers V. B cells are multifunctional players in multiple sclerosis pathogenesis: insights from therapeutic interventions. *Front Immunol.* 2015; 6: 642.
55. Traub JW, Pellkofer HL, Gröndey K, Seeger I, Rowold C, Brück W, et al. Natalizumab promotes activation and pro-inflammatory differentiation of peripheral B cells in multiple sclerosis patients. *J Neuroinflammation.* 2019; 16: 228.
56. Häusler D, Häusser-Kinzel S, Feldmann L, Torke S, Lepenietier G, Bernard CCA, et al. Functional characterization of reappearing B cells after anti-CD20 treatment of CNS autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018 Sep 25; 115 (39): 9773–8.
57. Fernández-Velasco JL, Kuhle J, Monreal E, et al. Effect of ocrelizumab in blood leukocytes of patients with primary progressive MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2021 Mar; 8 (2): e940.

## References

1. Boyko A, Melnikov M. Prevalence and incidence of multiple sclerosis in Russian Federation: 30 years of studies. *Brain Sci.* 2020 May 18; 10 (5): 305. DOI: 10.3390/brainsci10050305.
2. Kamali AN, Noorbakhsh SM, Hamedifar H, Jadidi-Niaragh F, Yazdani R, Bautista JM, et al. A role for Th1-like Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune disorders. *Mol Immunol.* 2019 Jan; 105: 107–15. DOI: 10.1016/j.molimm.2018.11.015.
3. Ziemssen T, Akgün K, Brück W. Molecular biomarkers in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation.* 2019 Dec 23; 16 (1): 272. DOI: 10.1186/s12974-019-1674-2.
4. Milo R. Therapies for multiple sclerosis targeting B cells. *Croat Med J.* 2019 Apr 30; 60 (2): 87–98. DOI: 10.3325/cmj.2019.60.87.
5. Corfe SA, Paige CJ. The many roles of IL7 in B cell development; mediator of survival, proliferation and differentiation. *Semin Immunol.* 2012; 24 (3): 198–208. DOI: 10.1016/j.smim.2012.02.001.
6. Bemak M. Translating transitions — how to decipher peripheral human B cell development. *J Biomed Res.* 2015; 29 (4): 264–84. DOI: 10.7555/JBR.29.20150035.
7. Kaminski DA, Wei C, Qian Y, Rosenberg AF, Sanz I. Advances in human B cell phenotypic profiling. *Front Immunol.* 2012; 3: 302. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00302.
8. Khodadadi L, Cheng Q, Radbruch A, Hiepe F. The maintenance of memory plasma cells. *Front Immunol.* 2019; 10: 721. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00721.
9. Pavlasova G, Mraz M. The regulation and function of CD20: an "enigma" of B-cell biology and targeted therapy. *Haematologica.* 2020; 105 (6): 1494–506. DOI: 10.3324/haematol.2019.243543.
10. Palm AE, Henry C. Remembrance of things past: long-term B cell memory after infection and vaccination. *Front Immunol.* 2019; 10: 1787. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01787.
11. Luz EC, Damaris EL. "Introduction to T and B lymphocytes," in autoimmunity: from bench to bedside. El Rosario University Press, 2013.
12. Adachi Y, Onodera T, Yamada Y, Daio R, Tsuiji M, Inoue T, et al. Distinct germinal center selection at local sites shapes memory B cell response to viral escape. *J Exp Med.* 2015; 212 (10): 1709–23. DOI: 10.1084/jem.20142284.
13. Quinn JL, Kumar G, Agasing A, Ko RM, Axtell RC. Role of TFH

- cells in promoting T helper 17-induced neuroinflammation. *Front Immunol.* 2018; 9: 382. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00382.
14. Atisha-Fregoso Y, Zou YR, Diamond B. "B cells and generation of antibodies". In: Dubois' Lupus Erythematosus and Related Syndromes. Elsevier, 2019; 101–15.
  15. Sospedra M. B cells in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 2018; 31 (3): 256–262. DOI: 10.1097/WCO.0000000000000563.
  16. Adler LN, Jiang W, Bhamidipati K, Millican M, Macaubas C, et al. The other function: class II-restricted antigen presentation by B cells. *Front Immunol.* 2017; 8: 319. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00319.
  17. Hauser-Kinzel S, Weber MS. The role of B cells and antibodies in multiple sclerosis, neuromyelitis optica, and related disorders. *Front Immunol.* 2019; 10: 201. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00201.
  18. Barr TA, Shen P, Brown S, Lampropoulou V, Roch T, Lawrie S, et al. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL6-producing B cells. *J Exp Med.* 2012; 209 (5): 1001–10. DOI: 10.1084/jem.20111675.
  19. Yu X, Graner M, Kennedy PGE, Liu Y. The role of antibodies in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Front Neurol.* 2020; 11: 533388. DOI: 10.3389/fneur.2020.533388.
  20. Negron A, Stüve O, Forsthuber TG. Ectopic lymphoid follicles in multiple sclerosis: Centers for Disease Control. *Front Neurol.* 2020 Dec 8; 11: 607766. DOI: 10.3389/fneur.2020.607766.
  21. Bell L, Lenhart A, Rosenwald A, Monoranu CM, Berberich-Siebelt F. Lymphoid aggregates in the CNS of progressive multiple sclerosis patients lack regulatory T cells. *Front Immunol.* 2020 Jan 15; 10: 3090. DOI: 10.3389/fimmu.2019.03090.
  22. Ziemssen T, Akgün K, Brück W. Molecular biomarkers in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation.* 2019 Dec 23; 16 (1): 272. DOI: 10.1186/s12974-019-1674-2.
  23. Schwenkenbecher P, Konen FF, Wurster U, Jendretzky KF, Gingele S, Sühs KW, et al. The persisting significance of oligoclonal bands in the dawning era of kappa free light chains for the diagnosis of multiple sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2018 Nov 29; 19 (12): 3796. DOI: 10.3390/ijms19123796.
  24. Lefvert A, Link H. IgG production within the central nervous system: a critical review of proposed formulae. *Ann Neurol.* 1985; 17: 13–20. DOI: 10.1002/ana.410170105.
  25. Tintore M, Rovira À, Río J, Otero-Romero S, Arrambide G, Tur C, et al. Defining high, medium and low impact prognostic factors for developing multiple sclerosis. *Brain.* 2015 Jul; 138 (Pt 7): 1863–74. DOI: 10.1093/brain/awv105.
  26. Kuhle J, Disanto G, Dobson R, et al. Conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis: A large multicentre study. *Mult Scler.* 2015; 21 (8): 1013–24.
  27. Lebrun-Frenay C, Kantarci O, Siva A, Sormani MP, Pelletier D, Okuda DT. 10-year RISC study group on behalf of SFSEP, OFSEP. Radiologically isolated syndrome: 10-year risk estimate of a clinical event. *Ann Neurol.* 2020 Aug; 88 (2): 407–17. DOI: 10.1002/ana.25799.
  28. Hor JY, Asgari N, Nakashima I, Broadley SA, Leite MI, Kissani N, et al. Epidemiology of neuromyelitis optica spectrum disorder and its prevalence and incidence worldwide. *Front Neurol.* 2020 Jun 26; 11: 501. DOI: 10.3389/fneur.2020.00501.
  29. Greenfield AL, Hauser SL. B-cell therapy for multiple sclerosis: entering an era. *Ann Neurol.* 2018 Jan; 83 (1): 13–26. DOI: 10.1002/ana.25119.
  30. Baker D, Marta M, Pryce G, Giovannoni G, Schmierer K. Memory B cells are major targets for effective immunotherapy in relapsing multiple sclerosis. *E Bio Medicine.* 2017; 16: 41–50.
  31. Bose T. Role of immunological memory cells as a therapeutic target in multiple sclerosis. *Brain Sci.* 2017; 7 (11): E148.
  32. Ciron J, Audoin B, Bourre B, Brassat D, Durand-Dubief F, Laplaud D, et al. NOMADMUS group, under the aegis of OFSEP, SFSEP. Recommendations for the use of Rituximab in neuromyelitis optica spectrum disorders *Rev Neurol (Paris).* 2018; 174 (4): 255–64.
  33. Kim SH, Kim W, Li XF, Jung IJ, Kim HJ. Repeated treatment with rituximab based on the assessment of peripheral circulating memory B cells in patients with relapsing neuromyelitis optica over 2 years. *Arch Neurol.* 2011; 68, 1412–20.
  34. Kim SH, Jeong IH, Hyun JW, Joung A, Jo HJ, Hwang SH, et al. Treatment outcomes with rituximab in 100 patients with neuromyelitis optica: influence of FCGR3A polymorphisms on the therapeutic response to rituximab. *JAMA Neurol.* 72: 989–95.
  35. Kim SH, Huh SY, Lee SJ, Joung A, Kim HJ. A5-year-follow-up of rituximab treatment in patients with neuromyelitis optica spectrum disorder. *JAMA Neurol.* 2013; 70: 1110–7.
  36. Thompson SA, Jones JL, Cox AL, et al. B-cell reconstitution and BAFF after alemtuzumab (CAMPATH-1H) treatment of multiple sclerosis. *J Clin Immunol.* 2010; 30: 99–105.
  37. Duddy M, Niino M, Adatia F, et al. Distinct effector cytokine profile of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol.* 2007; 178: 6092–9.
  38. Giovannoni G, Cohen JA, Coles AJ, Hartung HP, Havrdova E, Selmaj KW, et al. CARE-MS II Investigators. Alemtuzumab improves preexisting disability in active relapsing-remitting MS patients. *Neurology.* 2016 Nov 8; 87 (19): 1985–92.
  39. Van Oosten BW, Lai M, Hodgkinson S, et al. Treatment of multiple sclerosis with the monoclonal anti-CD4 antibody cM-T412: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, MR-monitored phase II trial. *Neurology.* 1997; 49: 351–7.
  40. Ceronie B, Jacobs BM, Baker D, Dubuisson N, Mao Z, Ammoscato F, et al. Cladribine treatment of multiple sclerosis is associated with depletion of memory B cells. *J Neurol.* 2018 May; 265 (5): 1199–209.
  41. Giovannoni G, Cohen JA, Coles AJ, Hartung HP, Havrdova E, Selmaj KW, et al. CARE-MS II Investigators. Alemtuzumab improves preexisting disability in active relapsing-remitting MS patients. *Neurology.* 2016 Nov 8; 87 (19): 1985–92.
  42. Havrdova E, Arnold DL, Cohen JA, Hartung HP, Fox EJ, Giovannoni G, et al. CARE-MS I and CAMMS03409 Investigators. Alemtuzumab CARE-MS I 5-year follow-up: Durable efficacy in the absence of continuous MS therapy. *Neurology.* 2017 Sep 12; 89 (11): 1107–16. *Neurology.* 2018 Apr 17; 90 (16): 755.
  43. Genovese MC, Kaine JL, Lowenstein MB, et al. Ocrelizumab, a humanized antiCD20 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: a phase I/II randomized, blinded, placebo-controlled, dose-ranging study. *Arthritis Rheum.* 2008; 58: 2652–61.
  44. Kuerten S, Jackson LJ, Kaye J, Vollmer TL. Impact of glatiramer acetate on B cell-mediated pathogenesis of multiple sclerosis. *CNS Drugs.* 2018; 32 (11): 1039–51.
  45. Begum-Haque S, Christy M, Ochoa-Reparaz J, Nowak EC, Mielcarz D, Haque A, et al. Augmentation of regulatory B cell activity in experimental allergic encephalomyelitis by glatiramer acetate. *J Neuroimmunol.* 2011 Mar; 232 (0): 136–44.
  46. Ireland SJ, Guzman AA, O'Brien DE, Hughes S, Greenberg B, Flores A, et al. The effect of glatiramer acetate therapy on functional properties of B cells from patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *JAMA Neurol.* 2014 Nov; 71 (11): 1421–8.
  47. Schubert RD, Hu Y, Kumar G, Szeto S, Abraham P, Winderl J, et al. Interferon- $\beta$  treatment requires B cells for efficacy in neuro-autoimmunity. *J Immunol.* 2015 Mar 1; 194 (5): 2110–6.
  48. Ramgolan VS, Sha Y, Marcus KL, Choudhary N, Troiani L, Chopra M, et al. B cells as a therapeutic target for IFN- $\beta$  in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Immunol.* 2011; 186 (7): 4518–26.
  49. Sabatino JJ, Zamvil SS, Hauser SL. B-cell therapies in multiple sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2019 Feb; 9 (2): a032037.
  50. Lehmann-Horn K, Kinzel S, Weber MS. Deciphering the role of B cells in multiple sclerosis-towards specific targeting of pathogenic function. *Int J Mol Sci.* 2017 Oct; 18 (10): 2048.
  51. Gregson A, Thompson K, Tsirka SE, Selwood DL. Emerging small-molecule treatments for multiple sclerosis: focus on B cells. *F1000Res.* 2019; 8: F1000 Faculty Rev-245.
  52. Braley TJ, Segal BM. B-cell targeting agents in the treatment of multiple sclerosis. *Curr Treat Options Neurol.* 2013 Jun; 15 (3): 259–69.
  53. Traub JW, Häusser-Kinzel S, Weber MS. Differential effects of MS therapeutics on B cells-implications for their use and failure in AQP4-positive NMOSD patients. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul; 21 (14): 5021.
  54. Claes N, Fraussen J, Stinissen P, Hupperts R, Somers V. B cells are multifunctional players in multiple sclerosis pathogenesis: insights from therapeutic interventions. *Front Immunol.* 2015; 6: 642.
  55. Traub JW, Pellkofer HL, Grondy K, Seeger I, Rowold C, Brück W, et al. Natalizumab promotes activation and pro-inflammatory

- differentiation of peripheral B cells in multiple sclerosis patients. *J Neuroinflammation*. 2019; 16: 228.
56. Häusler D, Häusser-Kinzel S, Feldmann L, Torke S, Lepennetier G, Bernard CCA, et al. Functional characterization of reappearing B cells after anti-CD20 treatment of CNS autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018 Sep 25; 115 (39): 9773–8.
  57. Fernández-Velasco JI, Kuhle J, Monreal E, et al. Effect of ocrelizumab in blood leukocytes of patients with primary progressive MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2021 Mar; 8 (2): e940.

## СТРАТЕГИИ УПРАВЛЕНИЯ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ У СПОРТСМЕНОВ

Л. И. Дергачева<sup>1</sup>, А. А. Деревоедов<sup>1</sup>, И. Т. Выходец<sup>2</sup>, А. А. Павлова<sup>1</sup>✉, С. А. Парастаев<sup>1,3</sup><sup>1</sup> Федеральный научно-клинический центр спортивной медицины и реабилитации Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия<sup>2</sup> Управление спортивной медицины и цифровизации Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия<sup>3</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Контроль гликемии — самая сложная проблема для получающих инсулин спортсменов с сахарным диабетом (СД). При хорошем управлении гликемией обмен гликогена может быть нормальным, а работоспособность повышена коррекцией доз инсулина в соответствии с физической нагрузкой и питанием. Интенсивность физической нагрузки, упражнения с сопротивлением, интервальные тренировки при СД 1-го и 2-го типов обеспечивают оптимальную физиологическую адаптацию в период тренировок и демонстрируют хорошие гликемические преимущества при однократных нагрузочных сетах. Но для получающих инсулинотерапию спортсменов с СД важно не только поддержание оптимального уровня глюкозы во время тренировок и соревнований. Нужно учитывать и потенциальные нарушения терморегуляции, увеличивающие риск теплового стресса во время тренировок/соревнований, знать возможное влияние применяемых спортсменами лекарств на гликемию, электролитный баланс и дегидратацию, знать порядок оформления направляемых в антидопинговую организацию документов для запроса на терапевтическое использование инсулина. Целью обзора было попытаться привлечь внимание спортивных врачей и тренеров к вышеописанным проблемам и к необходимости более широкого использования новых технологий по контролю СД; помочь применяющим инсулин спортсменам с СД сохранять высокую работоспособность и спортивное долголетие.

**Ключевые слова:** спортсмены, сахарный диабет, разрешение на терапевтическое использование, инсулин, физиологическая адаптация, физические нагрузки/упражнения, спортивная результативность

**Финансирование:** исследование выполнено при финансовой поддержке Государственного задания Федерального медико-биологического агентства России № 67.003.20.800.

**Вклад авторов:** Л. И. Дергачева — существенный вклад в концепцию работы, сбор данных, анализ содержания, написание текста; А. А. Деревоедов, С. А. Парастаев — критический пересмотр содержания, утверждение окончательного варианта статьи; И. Т. Выходец — утверждение окончательного варианта статьи; А. А. Павлова — написание текста, оформление рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Анна Александровна Павлова  
ул. Большая Дорогомилловская, д. 5, г. Москва, 121059; dr\_pavlova@hotmail.com

**Статья получена:** 20.07.2021 **Статья принята к печати:** 27.08.2021 **Опубликована онлайн:** 28.09.2021

**DOI:** 10.47183/mes.2021.034

## DIABETES MELLITUS MANAGEMENT STRATEGIES IN ATHLETES

Dergacheva LI<sup>1</sup>, Derevoyedov AA<sup>1</sup>, Vykhodets IT<sup>2</sup>, Pavlova AA<sup>1</sup>✉, Parastayev SA<sup>1,3</sup><sup>1</sup> Federal Research and Clinical Center for Sports Medicine and Rehabilitation of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia<sup>2</sup> Office of the Sports Medicine Organization and digitalization of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russia<sup>3</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Glycemic control is the biggest challenge for athletes with diabetes mellitus (DM) on insulin therapy. Done well, it can keep glycogen metabolism normal and allow performance improvement through adjustment of the insulin doses to the specifics of nutrition and exercising. In DM Type 1 and Type 2 patients, intense physical activity and resistance exercising, as well as interval training, enable optimal physiological adaptation during the training period and prove to be beneficial when the athlete does one-time exercise sets. But for athletes with DM on insulin therapy, keeping blood glucose at the optimal level is not the only important issue. It is also necessary to factor in the potential body temperature regulation disturbances that increase the risk of heat stress during training/competition, learn the effects the drugs used by athletes may have on the glycemic status, control electrolyte balance and dehydration, know how to execute the application for permission to use insulin for therapeutic purposes submitted to the anti-doping organization. The purpose of this review was to draw attention of sports medicine physicians and coaches to the above problems and to the need for wider use of the new DM control technology; help athletes with DM on insulin therapy continuously perform well and ensure their athletic longevity.

**Keywords:** athletes; diabetes mellitus; therapeutic use exemption; insulin; physiological adaptation, sports performance, physical loads/exercises

**Funding:** the study relied on the financial support released under the State Assignment No. 67.003.20.800 issued by the Federal Medical Biological Agency of Russia.

**Author contribution:** Dergacheva LI — significant contribution to the study conceptualization, data collection, content analysis, text authoring; Derevoyedov AA, Parastayev SA — critical review of the content, approval of the final version of the article; Vykhodets IT — approval of the final version of the article; Pavlova AA — text authoring, manuscript formalization.

✉ **Correspondence should be addressed:** Anna A. Pavlova  
Bolshaya Dorogomilovskaya, 5, Moscow, 121059; dr\_pavlova@hotmail.com

**Received:** 20.07.2021 **Accepted:** 27.08.2021 **Published online:** 28.09.2021

**DOI:** 10.47183/mes.2021.034

Одна из проблем, с которой сталкиваются страдающие сахарным диабетом 1-го или 2-го типа (СД1, СД2) спортсмены, — сложность достижения максимальной производительности при минимальных отклонениях от оптимального уровня глюкозы в крови. Для использующих инсулин тренировки часто более сложны из-за

способности сокращающейся мышцы инсулиннезависимо стимулировать поглощение глюкозы из крови, что приводит к гипогликемии. Тем не менее и лицам с СД2, которым не требуется ежедневное введение инсулина, необходим баланс многих факторов, чтобы обеспечить приемлемую переносимость физических нагрузок. Для поддержания

гликемического баланса и оптимальных показателей для занятий спортом нужно учитывать и контролировать целый ряд условий (рис. 1).

Так, модифицируемые факторы нагрузок могут вызывать значительные колебания уровня глюкозы в крови. Кроме того, дозы инсулина и пищевой рацион должны быть скорректированы для предотвращения гипо- или гипергликемии как во время тренировки, так и после нее. Водно-электролитный баланс, на который могут влиять гипергликемия и обычно назначаемые лицам с диабетом лекарства, также может менять спортивную эффективность.

### Контроль уровня глюкозы в крови

Поддержание безопасных показателей гликемии необходимо для достижения высоких спортивных результатов. Важно понимать, какие факторы могут влиять на уровень глюкозы в крови, и как отклонение от целевого диапазона значений может изменить текущую работоспособность спортсмена.

### Гипогликемия

Снижение уровня глюкозы в крови в процессе тренировки ниже 4,0 ммоль/л может создавать риск для здоровья спортсмена, а ниже 3,6 ммоль/л — снижать эффективность тренировки примерно на 20% [2]. Гипогликемия обычно связана с использованием экзогенного инсулина, и часто приводит к тому, что человек выполняет физическую нагрузку в состоянии периферической гиперинсулинемии. Помимо стойкой гипогликемии, возникающей обычно в течение 15 ч после тренировки [3], возможно длительное снижение уровня калия, способное сохраняться несколько часов и после возвращения глюкозы к норме [4]. Со степенью тяжести гипокалиемии связаны такие осложнения, как нарушения сердечного ритма и сократимости скелетных мышц, что отрицательно сказывается на спортивных результатах. Большой проблемой являются и спровоцированные тренировками ночные гипогликемии.

### Гипергликемия

Использующим инсулин спортсменам с диабетом (а иногда и спортивным врачам) для предотвращения гипогликемии часто кажется целесообразным поддерживать более высокий уровень глюкозы в крови. Однако такая тактика может снизить качество спортивной подготовки. В диапазоне значений концентрации глюкозы в крови от 8,9 до 10 ммоль/л у почек пропадает способность полностью реабсорбировать ее из первичной мочи. Достижение вышеуказанного «почечного порога» (величина которого является индивидуальным показателем) приводит к накоплению глюкозы в моче и в результате к значительной потере жидкости вследствие осмотического диуреза. Кроме того, гипергликемия может вызывать снижение в плазме концентрации натрия, хлоридов и кальция и повышение концентрации калия [4], что ведет к ослаблению мышечной функции. Помимо вышеперечисленного, имеющим необъяснимые гипергликемии ( $\geq 13,0$  ммоль/л) спортсменам с СД1 необходима обязательная проверка кетонов крови. Если их уровень повышен ( $\geq 1,5$  ммоль/л), то тренировки следует прервать, потому что уровень и глюкозы, и кетонов может продолжать расти даже при умеренной физической активности [5].

### Тип выполняемых упражнений и время проведения тренировок

В последнее время большое внимание уделяется исследованиям силовых нагрузок и высокоинтенсивных интервальных тренировок (ВИТ) как альтернативе продолжительным аэробным упражнениям. Интенсивные нагрузки, даже выполняемые в коротких подходах, по сравнению с длительными сессиями аэробных упражнений умеренной интенсивности могут быть более полезными в отношении повышения тренированности и снижения факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний, уровня липопротеинов сыворотки крови и эндотелиальной дисфункции [6]. Даже у ведущих малоподвижный образ жизни лиц и у пожилых людей с



Рис. 1. Факторы, способные влиять на изменения уровня глюкозы в крови при физической нагрузке у лиц с СД1 [1]

СД2 ВИТ улучшают чувствительность клеток печени и мышц к инсулину и их оксидативную способность в большей степени, чем длительные упражнения умеренной интенсивности [6]. А исследование физически активных взрослых людей с СД2 показало, что после одной высокоинтенсивной интервальной тренировки улучшается ночной и утренний уровень гликемии натощак в течение 24 ч после ее проведения [7]. У людей с СД1 добавление в аэробные тренировки коротких серий нагрузок высокой интенсивности помогает снизить риск гипогликемий во время упражнений. Однако вопрос, приводит ли такой тип проводимых во второй половине дня тренировок к большему риску ночной гипогликемии (по сравнению с только аэробными упражнениями), все еще остается предметом для обсуждения [8].

Следует отметить, что из-за влияния на высвобождение катехоламинов (адреналин/норадреналин) высокоинтенсивные тренировки и соревнования могут существенно увеличить выход глюкозы из печени, что способно привести к гипергликемии во время физической активности. Гипергликемия может возникать даже до момента этих нагрузок, потому как ожидание события само по себе способно вызвать повышение уровня катехоламинов, следовательно, и глюкозы крови [9].

Много преимуществ дают и силовые упражнения, которые целесообразно включать в тренировочный режим спортсмена с диабетом. В дополнение к повышению производительности мышц за счет увеличения силы и скорости их сокращения, тренировка с сопротивлением связана с иными позитивными эффектами, включая более высокий расход энергии в покое (повышение основного обмена), увеличение минеральной плотности костей и улучшение композиционного состава тела [10]. Упражнения у взрослых с СД1 связаны с меньшим снижением уровня глюкозы крови, чем аэробная активность (рис. 2) [11], и могут обеспечить защитный эффект от его падения, если выполняются перед аэробными упражнениями [12].

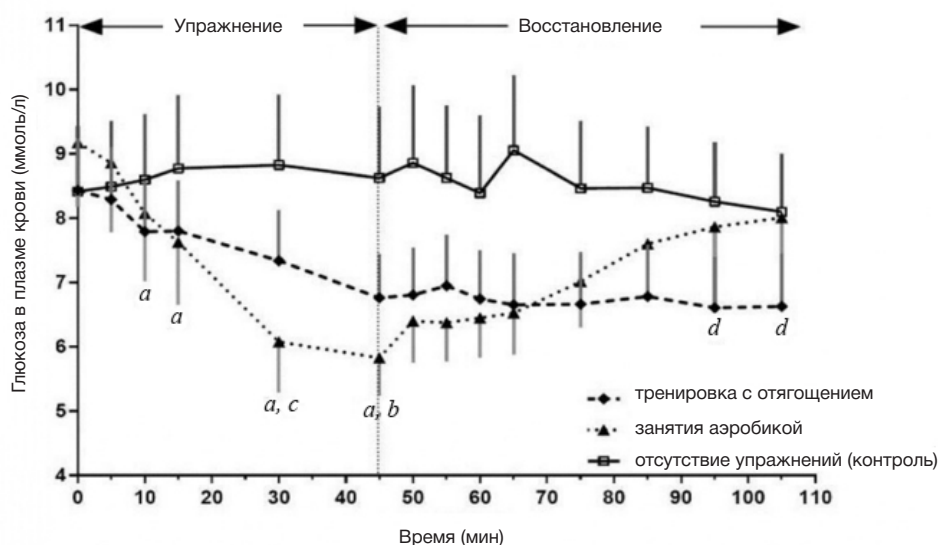
В недавно проведенном исследовании тренировка натощак у людей с СД2 приводила к более значимому улучшению постпрандиальных гликемических профилей в

течение последующих 24 ч, чем упражнения, выполняемые после завтрака [7].

В одной из работ у 35 использовавших инсулиновые помпы лиц с СД1 в дни, когда они выполняли упражнения перед завтраком, было отмечено меньшее число эпизодов гипогликемии и показания непрерывного мониторинга глюкозы (НМГ/CGM) чаще сохранялись в близком к эугликемическому диапазоне, по сравнению с днями, когда упражнения выполняли в дневное время [3]. В других исследованиях у людей с СД1 упражнения с сопротивлением, выполненные перед завтраком, были связаны с повышением уровня глюкозы в крови [8], а при выполнении тренировок днем, напротив, было обнаружено снижение уровня гликемии [11]. При использовании соответствующей повышению уровня глюкозы дозы инсулина быстрого действия через 2 ч после тренировки для купирования гипергликемии после утренних упражнений с отягощениями гипогликемия не возникает [13]. Хотя применимость результатов этих небольших исследований может быть ограничена, для спортсменов с СД1, имеющих частые проблемы с гипогликемией, возможно, стоит предпочесть утренние тренировки, а тем, кто борется с гипергликемией, — периодически выбирать тренировку днем. В рекомендациях необходимо учитывать тип и время соревнований, в которых примут участие спортсмены: краткосрочные спортивные результаты при анаэробных упражнениях днем лучше, чем утром, а сниженную производительность можно улучшить с помощью регулярных тренировок с утра [14].

#### Потребление углеводов и корректировка дозы инсулина как основа оптимизации спортивной подготовки

Конкуренция в спортивных соревнованиях требует предотвращения как гипо-, так и гипергликемий. В частности, невозможность предотвратить гипогликемию во время тренировок и соревнований наверняка снизит физическую работоспособность [15], но баланс гликемии может быть достигнут с помощью стратегии правильного



**Рис. 2.** Влияние типа упражнений на стабильность глюкозы в крови у лиц с СД1 (HbA1c  $7,1 \pm 1,0\%$ ) [9]. Среднее ( $\pm$  SE) содержание глюкозы в плазме во время упражнений и в течение 60 мин восстановления ( $n = 12$ ).  $\square$  — отсутствие упражнений (контроль);  $\blacklozenge$  — тренировка с отягощением (три подхода из семи упражнений с максимумом восьми повторений за 45 мин);  $\blacktriangle$  — занятия аэробикой (бег при 60% максимальной расчетной ЧСС в течение 45 мин); *a* — статистически значимое изменение от базового уровня в аэробных упражнениях; *b* — статистически значимое изменение от базовой линии в упражнениях с отягощением; *c* — статистически значимая разница между контролем и аэробным сеансом; *d* — статистически значимые изменения во время восстановления после аэробных упражнений; различия считали статистически значимыми, только если они оставались значимыми после поправок Bonferroni для множественных сравнений

**Таблица.** Рекомендации по снижению болюсного введения инсулина перед едой при начале тренировки в течение 90 мин после введения болюса\*

| Вид активности                                           | Продолжительность активности<br>около 30 мин | Продолжительность активности<br>около 60 мин |
|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Легкие аэробные упражнения (30–39% РЧП**)                | –25%                                         | –50%                                         |
| Аэробные упражнения умеренной интенсивности (40–59% РЧП) | –50%                                         | –75%                                         |
| Интенсивная аэробика (60–89% РЧП)                        | –75%                                         | Не оценивали                                 |

**Примечание:** \* — составлено по источникам [29, 30, 31, 32]; \*\* РЧП — резерв частоты пульса.

приема углеводов, коррекции доз инсулина и времени их введения. Для предотвращения гипогликемии в течение аэробной тренировки длительностью около 30 мин дополнительные углеводы или снижение доз вводимого инсулина обычно не требуются. Для аэробных нагрузок длительностью 30–60 мин при низком/нормальном уровне инсулина гипогликемией может предотвратить прием 10–15 г углеводов [16]; для действий, выполняемых с относительной гиперинсулинемией (после введения болюсного инсулина, т. е. введения инсулина короткого (ультракороткого) действия для поддержания целевой гликемии после еды и для коррекции гипергликемии), может потребоваться 30–60 г углеводов на час упражнений [17]. В течение длительных тренировок или соревнований (например, марафон) такой дополнительный прием углеводов полезен независимо от типа диабета [18].

После физической активности мышечный гликоген восстанавливается достаточно медленно, со скоростью 5–7% в час. Скорость восстановления увеличивается, когда «депо» гликогена истощено, и замедляется по мере его наполнения. Параллельно, по мере восстановления запасов гликогена в мышцах, начинает ослабевать действие инсулина [19]. Положительный момент — чем раньше обновляется гликоген, тем меньше у спортсмена с СД1 вероятность развития гипогликемии с поздним началом, возникающей на день или два позже тренировки. Недостаточное потребление углеводов после упражнений или употребление углеводов при низком уровне инсулина в крови также может снизить или задержать восстановление гликогена в организме. Поэтому тренирующимся рекомендовано принимать достаточное количество углеводов до, во время и после продолжительных физических нагрузок (умеренных или высокоинтенсивных) в соответствии с адекватными дозами инсулина, особенно в период «окна возможностей» (в пределах от 30 мин до 2 ч после нагрузки) для поддержания и восстановления гликогена в мышцах и печени и уровня глюкозы в крови.

### Корректировка доз инсулина для предотвращения гипогликемии

В качестве замены приема углеводов или в дополнение к нему для снижения риска гипогликемии, вызванной физической нагрузкой, можно уменьшить и базальную, и/или болюсную дозу инсулина. Для использующих несколько ежедневных инъекций инсулина (интенсифицированная базис-болюсная инсулинотерапия) лиц можно снизить базальный инсулин на 20% для доз как до, так и после тренировки. Чтобы оптимизировать уровень глюкозы в крови во время тренировки, спортсмены также могут корректировать время введения и размер болюса [20] инсулина быстрого действия, принимаемого во время еды и перекусов перед тренировкой. Эти корректировки без значительного увеличения кетонов в крови можно делать при непрерывных упражнениях до 45 мин [21]. При использовании непрерывной подкожной инфузии

инсулина с помощью индивидуального носимого дозатора (инсулиновой помпы) спортсмены могут снизить или приостановить базальную инфузию инсулина в начале тренировки или даже за 30–60 мин перед ней, чтобы смягчить снижение уровня глюкозы в крови [22]. Если упражнения выполняются в течение 2–3 ч после болюсного введения инсулина (с помощью шприц-ручки или помпы), то снижение инсулина на 25–75% (перед едой) может ограничить вероятность гипогликемии [23] (табл.). Независимо от того, были ли внесены изменения в дозировку инсулина, для обеспечения безопасности во время тренировки могут потребоваться частые проверки уровня глюкозы в крови и, возможно, дополнительное употребление углеводов.

Для тех, кто получает инсулин в инъекциях (шприц-ручки), риск ночной гипогликемии можно свести к минимуму за счет снижения суточной дозы базального инсулина приблизительно на 20% и снижения прандиального болюсного введения инсулина и углеводного питания с низким гликемическим индексом после вечерней тренировки [24]. Для тех, кто использует инсулиновую помпу, избежать ночных гипогликемий поможет снижение базальной скорости введения на 20% во время сна и в течение 6 ч после дневных упражнений [25]. Включение дополнительного перекуса перед сном на 2 хлебные единицы (20–24 г углеводов), проверка уровня глюкозы на ночь и/или использование НМГ с сигнализацией также оправдано при СД1 и СД2 на инсулинотерапии [26].

Важно также отметить, что скорость всасывания инсулина и начало его действия могут быть усилены как при нагревании места инъекции (использование грелки), так и при массаже в месте введения или рядом с ним [27].

Кроме изменений в дозировке инсулина и потреблении углеводов, от начала гипогликемии могут защитить, по крайней мере, в краткосрочной перспективе дополнительные упражнения, например, выполнение короткого спринта максимальной интенсивности до или после сеанса упражнений умеренной интенсивности [28].

### Разрешение на терапевтическое использование инсулина

Спортсмен, принимающий инсулин, и назначающий препарат врач должны соблюдать требования Общероссийских антидопинговых правил и международных антидопинговых организаций, поскольку инсулин входит в класс S4 «Гормоны и модуляторы метаболизма» Запрещенного списка. Спортсмены, нуждающиеся в применении инсулина, должны обратиться с запросом в антидопинговую организацию и получить разрешение на его использование. Медицинские документы, которые спортсмен прилагает к запросу, должен оформить назначивший инсулин врач. В этих документах, в соответствии с требованиями Международного стандарта ВАДА по терапевтическому использованию [33], необходимо указать следующее.

1. Запрещенная субстанция или запрещенный метод необходимы для лечения диагностированного заболевания, что подтверждается соответствующими клиническими данными.

2. Терапевтическое использование запрещенной субстанции или запрещенного метода не приведет к дополнительному улучшению спортивного результата, кроме ожидаемого вследствие лечения возвращения спортсмена к его обычному здоровому состоянию.

3. Запрещенная субстанция или запрещенный метод показаны при лечении данного заболевания и не имеют разумной разрешенной терапевтической альтернативы.

Требования к оформлению медицинских документов для запроса на терапевтическое использование инсулина изложены в документе «Руководство для врачей по терапевтическому использованию: сахарный диабет», размещенном в разделе «Терапевтическое использование» на сайте Всемирного антидопингового агентства, а также на русском языке на сайте Российского антидопингового агентства «РУСАДА» [34].

Пероральные гипогликемические средства не запрещены, и их применение возможно без подачи запроса на терапевтическое использование (ТИ).

### Использование новых технологий

Прорыв в контроле СД произошел в 1998 г., когда в рутинную практику вошли системы непрерывного мониторинга гликемии (НМГ), которые измеряют глюкозу в интерстициальной жидкости непрерывно с интервалом 5–15 мин с помощью устанавливаемых подкожно датчиков (сенсоров) и могут передавать данные на смартфон/компьютер спортсмена, тренера, спортивного врача. Однако между отображаемым значением интерстициальной глюкозы и ее реальным уровнем в капиллярной крови есть разница (в среднем датчики запаздывают на 8–10 мин, максимально до 20 мин). Таким образом, если уровень глюкозы в крови стабилен, то полученные данные будут близки к уровню капиллярной глюкозы, но во время быстрого повышения или понижения гликемии отображаемое значение будет соответственно ниже или выше.

Вопрос применения НМГ в спорте пока остается дискуссионным. Результаты одного исследования показали, что НМГ был полезен для выявления бессимптомных гипогликемий и гипергликемий после тренировок (в ходе других исследований было выявлено, что точность измерений в современных системах ограничена и зависит от продолжительности использования датчика, раздражения кожи и проблем контакта датчика с кожей) [35]. Несмотря на то что несколько исследований подтвердили, что точность НМГ во время тренировок приемлема [36], другие сообщили о недостаточной точности и таких проблемах, как обрыв сенсорных нитей, невозможность калибровки и временные интервалы между изменениями глюкозы в капиллярной крови и ее отображением с помощью сенсора [37]. Хотя непрерывный мониторинг — весьма полезный инструмент для отслеживания тенденций уровня глюкозы в крови во время тренировочных нагрузок и профилактики гипогликемии после них, НМГ пока не может полностью заменять тестирование капиллярной крови с помощью индивидуальных глюкометров.

Инсулиновые помпы — устройства для постоянной подкожной инфузии инсулина, с непрерывным

мониторингом глюкозы (НМГ) в режиме реального времени. Одно из их преимуществ перед ежедневными инъекциями, используемыми для создания базис-болюсного режима — помпы позволяют изменять базальный инсулин, поступающий подкожно во время тренировки, что дает более физиологичную реакцию на нагрузку. Лица, пользующиеся шприц-ручкой один или два раза в день для введения базального инсулина, хуже способны быстро реагировать на изменения потребности в нем во время и после тренировки [38]. Однако спортсмены должны уметь управлять помпой, если она не отключена во время физических нагрузок, а это может быть затруднено в контактных видах спорта, во время командных игр и др. Кроме того, факторы окружающей среды (например, тепло) могут отрицательно повлиять на качество инсулина в помпе.

Автоматизированные системы доставки инсулина (тип «замкнутого контура»), называемые «искусственная поджелудочная железа», являются высочайшим технологическим решением в лечении инсулинозависимого сахарного диабета. Они включают в себя: НМГ, инсулиновую помпу и систему алгоритмов управления (некоторые из которых могут базироваться на смартфоне). Это система с обратной связью, которая, в отличие от одного датчика НМГ, не требует ввода пользователем своих данных в ответ на показания монитора; система монитора и инсулиновой помпы автоматически подает правильное количество инсулина, рассчитанное на основе переданных показаний. Корректировка инфузии инсулина таким образом может быть настолько точной, насколько точны измерительные устройства, на которые она полагается [39]. Исследования лиц с СД1 показывают, что добавление в замкнутую систему «тревожного» сигнала, включающегося при падении уровня глюкозы ниже заданного критического (4–4,5 ммоль/л), еще больше снижает риск гипогликемии во время и сразу после тренировки [40].

### Другие факторы, влияющие на работоспособность спортсмена с сахарным диабетом

Исследования показали, что у лиц с СД1 и СД2 часто встречаются нарушения терморегуляции [41]. В частности, при СД1 нарушается выделение пота, особенно при достижении повышенного уровня физических нагрузок. Там, где обезвоживание может привести к дальнейшему ухудшению потоотделения, очень важно внимательно следить за уровнем глюкозы в крови во время соревнований в жаркую погоду, чтобы избежать дальнейшего обострения существующих нарушений в механизмах охлаждения тела [42].

Исследования лиц с риском развития СД2 показали, что увеличение продолжительности сидения связано с плохим гликемическим контролем и метаболическими рисками и не зависит от периодического участия в интенсивной деятельности умеренного или высокого уровня [43]. В другом исследовании было выявлено, что всего 3 мин легкой ходьбы в сочетании с простой тренировкой с отягощением через каждые 30 мин длительного сидения были полезны для адекватного управления гликемией в течение суток [44].

Нельзя забывать и о влиянии лекарственных средств. Помимо инсулина, все спортсмены с диабетом могут принимать разнообразные рецептурные или безрецептурные препараты для лечения различных заболеваний (состояний). Их потенциальное влияние

на спортивные результаты по большей части будет опосредовано изменением в крови уровня глюкозы и водно-электролитного баланса, что может ухудшить гидратационный статус и мышечную сократимость. К таковым относятся некоторые антигипертензивные, мочегонные, стероидные и нестероидные противовоспалительные препараты, симптоматические лекарства от простуды и некоторые другие вещества.

Кортикостероиды, которые могут быть назначены при некоторых распространенных заболеваниях (например, астме, артрите и аллергическом рините), могут привести к гипергликемии у лиц с диабетом [45]; назначение данных препаратов также требует оформления ТИ. Антипсихотические препараты могут снизить уровень чувствительности к инсулину и таким образом увеличивать риск гипергликемии и обезвоживания у спортсменов с СД [46]. Лекарства, содержащие фенилэфрин или псевдоэфедрин в качестве активных ингредиентов (например, лекарства от простуды/гриппа и аллергии) имеют тенденцию увеличивать гликогенолиз в печени, аналогично катехоламинам, что часто приводит к гипергликемии у людей с диабетом [47]. Конечно, вряд ли спортсмены во время соревнований будут использовать подобные средства: стимуляторы псевдоэфедрин, адrenalalin входят в Запрещенный список ВАДА, а фенилэфрин — в Программу мониторинга, но возможно, что более молодые и/или менее опытные спортсмены могут применить их во внесоревновательный период, не зная о влиянии этих веществ на спортивную результативность и на уровень глюкозы в крови.

Спортсмены с СД2 могут получать комбинированную терапию, сочетающую введение инсулина (базальный инсулин/смешанный инсулин/базис-болюсный режим) и прием пероральных сахароснижающих препаратов. При этом следует обращать особое внимание на возможные побочные реакции последних, способные нарушить баланс электролитов и потенциально повлиять на спортивные результаты.

Метформин, один из самых известных пероральных антидиабетических препаратов из группы бигуанидов, может вызвать диспепсию и диарею. Аналогичный эффект существует и у другого гипогликемического средства, акарбозы (ингибитора альфа-глюкозидазы), тормозящей переваривание и всасывание углеводов в тонкой кишке. Следствием диареи может стать снижение уровня калия в крови, поэтому у спортсменов, принимающих вышеуказанные лекарства, следует чаще контролировать уровень электролитов, особенно в период соревнований.

Такие современные сахароснижающие препараты, как агонисты рецепторов глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1 receptor agonists, или инкретиномиметики), ингибиторы дипептидилпептидазы 4 (DPP-4 inhibitors, или глиптины), активируют инкретиновый ответ, снижают уровень постпрандиальной гликемии путем стимуляции глюкозозависимой секреции инсулина и ингибирования высвобождения глюкагона. Среди побочных реакций часто встречаются диарея и рвота, нечасто — дегидратация, что требует повышенного внимания к уровню электролитов крови у спортсменов. Применение агонистов рецепторов GLP-1 ассоциировалось с риском развития острого панкреатита, в комбинации с инсулином — с повышенным риском развития гипогликемии. Ингибиторы натрийзависимого котранспортера глюкозы 2-го типа (SGLT2 inhibitors, или глифлозины), а также 2-го

и 1-го типов (SGLT1 и SGLT2) уменьшают реабсорбцию глюкозы в почках и таким образом снижают уровень глюкозы в крови и гликированный гемоглобин (HbA1c). Их дополнительные положительные эффекты — снижение массы тела, систолического артериального давления и содержания в крови мочевой кислоты. Так как при приеме этих препаратов объем выделяемой мочи увеличивается (особенно при исходной гипергликемии), может возникнуть дегидратация, и связанные с уменьшением объема межклеточной жидкости побочные реакции: гипотензия, постуральное головокружение, ортостатическая гипотензия. При приеме некоторых препаратов данного класса (канаглифлозин) отмечено небольшое, но достоверное снижение общей минеральной плотности костной ткани (МПК) тазобедренного сустава, повышение биомаркеров костеобразования и резорбции и повышенный риск перелома костей, возникающий уже через 12 недель после начала лечения [48]. Представитель данного класса сотаглифлозин (SGLT1 и SGLT2 inhibitor) в настоящее время уже одобрен и для лечения СД1.

Поскольку гипертония является частым осложнением диабета, не исключено, что спортсменам с сахарным диабетом, в зависимости от их возраста и анамнеза, могут назначаться ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (АПФ), антагонисты рецептора ангиотензина II (АРА) или какие-либо мочегонные препараты. АПФ и АРА способны вызвать гиперкалиемию [49], а высокий уровень калия в крови может ухудшить спортивные результаты из-за мышечной слабости или вызвать сердечную аритмию, которая может оказаться смертельной для спортсмена. Диуретики, назначенные для контроля артериального давления, приводят к полиурии и увеличивают риск обезвоживания и электролитного дисбаланса. В частности, тиазидные диуретики связаны с большим риском гипонатриемии, который увеличивается с возрастом, выше среди женщин и, как правило, влияет на людей с меньшим весом больше, чем с на людей с высоким. Тиазиды также могут увеличивать потерю калия с мочой, иногда повышая возможность развития гипокалиемии [50]. Кроме того, применение диуретиков регламентировано стандартами ВАДА.

## Заключение

Хотя управление гликемией у спортсменов с диабетом может быть весьма затруднено из-за интенсивности физических нагрузок и напряженного графика тренировок и соревнований, такие спортсмены потенциально могут быть такими же успешными, как и спортсмены без диабета. Интенсивность, тип и время нагрузок, а также дозы и время приема инсулина и пищи так или иначе будут влиять на уровень глюкозы в крови и на работоспособность атлета, но их можно эффективно контролировать с помощью соответствующих изменений режима. Спортсмены, спортивные врачи и тренеры должны знать о влиянии уровня глюкозы в крови и лекарств на гидратацию и баланс электролитов, чтобы вносить необходимые коррективы для достижения оптимальных результатов. Последние технологии мониторинга и контроля диабета, хотя в настоящее время и несколько ограничены в точности и использовании, могут помочь спортсменам лучше контролировать гликемию и достигать максимальной спортивной эффективности.

## Литература

- Solberg SR, Land R, Desay E, Ker D. Physical activity and type 1 diabetes: time for a rewire? *J Diabetes Sci Technol*. 2015; 9: 609–18.
- Kelly D, Hamilton JK, Riddell MC. Blood glucose levels and performance in a sports cAMP for adolescents with type 1 diabetes mellitus: a field study. *Int J Pediatr*. 2010.
- Gomez AM, Gomez C, Aschner P, et al. Effects of performing morning versus afternoon exercise on glycemic control and hypoglycemia frequency in type 1 diabetes patients on sensor-augmented insulin pump therapy. *J Diabetes Sci Technol*. 2015; 9: 619–24.
- Caduff A, Lutz HU, Heinemann L, et al. Dynamics of blood electrolytes in repeated hyper- and/or hypoglycaemic events in patients with type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2011; 54: 2678–89.
- Colberg SR, Yardley JE, Riddell MC, et al. Physical activity/exercise and diabetes: a position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2016; 39 (11): 2065–79.
- Gibala MJ, Little JP, Macdonald MJ, Hawley JA. Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. *J Physiol*. 2012; 590: 1077–84.
- Terada T, Wilson BJ, Myette-Co'te'E, et al. Targeting specific interstitial glycemic parameters with high-intensity interval exercise and fasted-state exercise in type 2 diabetes. *Metabolism*. 2016; 65: 599–608.
- Iscoe KE, Riddell MC. Continuous moderate-intensity exercise with or without intermittent high-intensity work: effects on acute and late glycaemia in athletes with Type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med*. 2011; 28: 824–32.
- Yardley JE, Kenny GP, Perkins BA, et al. Resistance versus aerobic exercise: acute effects on glycemia in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2013; 36 (3): 537–42.
- Westcott WL. Resistance training is medicine: effects of strength training on health. *Curr Sports Med Rep*. 2012; 11: 209–16.
- Turner D, Luzio S, Gray BJ, et al. Impact of single and multiple sets of resistance exercise in type 1 diabetes. *Scand. J Med Sci Sports*. 2015; 25: 99–109.
- Yardley JE, Kenny GP, Perkins BA, et al. Effects of performing resistance exercise before versus after aerobic exercise on glycemia in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2012; 35: 669–75.
- Turner D, Luzio S, Gray BJ, et al. Algorithm that delivers an individualized rapid-acting insulin dose after morning resistance exercise counters postexercise hyperglycemia in people with Type 1 diabetes. *Diabet. Med*. 2016; 33: 506–10.
- Chtourou H, Souissi N. The effect of training at a specific time of day: a review. *J Strength Cond Res*. 2012; 26: 1984–2005.
- Murillo S, Brugnara L, Novials A. One year follow-up in a group of halfmarathon runners with type-1 diabetes treated with insulin analogues. *J Sports Med Phys Fitness*. 2010; 50: 506–10.
- Riddell MC, Milliken J. Preventing exercise-induced hypoglycemia in type 1 diabetes using real-time continuous glucose monitoring and a new carbohydrate intake algorithm: an observational field study. *Diabetes Technol Ther*. 2011; 13: 819–25.
- Francescato MP, Stel G, Stenner E, Geat M. Prolonged exercise in type 1 diabetes: performance of a customizable algorithm to estimate the carbohydrate supplements to minimize glycemic imbalances. *PLoS One*. 2015; 10: e0125220.
- Adolfsson P, Mattsson S, Jendle J. Evaluation of glucose control when a new strategy of increased carbohydrate supply is implemented during prolonged physical exercise in type 1 diabetes. *Eur J Appl Physiol*. 2015; 115: 2599–607.
- Jensen TE, Richter EA. Regulation of glucose and glycogen metabolism during and after exercise. *J Physiol*. 2012; 590: 1069–76.
- West DJ, Stephens JW, Bain SC, et al. A combined insulin reduction and carbohydrate feeding strategy 30 min before running best preserves blood glucose concentration after exercise through improved fuel oxidation in type 1 diabetes mellitus. *J Sports Sci*. 2011; 29: 279–89.
- Bracken RM, West DJ, Stephens JW, et al. Impact of pre-exercise rapidacting insulin reductions on ketogenesis following running in type 1 diabetes. *Diabet Med*. 2011; 28: 218–22.
- Franc S, Daoudi A, Pochat A, et al. Insulin-based strategies to prevent hypoglycaemia during and after exercise in adult patients with type 1 diabetes on pump therapy: the DIABRASPORT randomized study. *Diabetes Obes. Metab*. 2015; 17: 1150–57.
- West DJ, Morton RD, Bain SC, et al. Blood glucose responses to reductions in pre-exercise rapid-acting insulin for 24 h after running in individuals with type 1 diabetes. *J Sports Sci*. 2010; 28: 781–88.
- Campbell MD, Walker M, Bracken RM, et al. Insulin therapy and dietary adjustments to normalize glycemia and prevent nocturnal hypoglycemia after evening exercise in type 1 diabetes: a randomized controlled trial. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2015; 3: e000085.
- Taplin CE, Cobry E, Messer L, et al. Preventing post-exercise nocturnal hypoglycemia in children with type 1 diabetes. *J Pediatr*. 2010; 157: 784–88. e781.
- Garg SK, Brazg RL, Bailey TS, et al. Hypoglycemia begets hypoglycemia: the order effect in the ASPIRE in-clinic study. *Diabetes Technol Ther*. 2014; 16: 125–30.
- Freckmann G, Pleus S, Haug C, et al. Increasing local blood flow by warming the application site: beneficial effects on postprandial glycemic excursions. *J Diabetes Sci Technol*. 2012; 6: 780–5.
- Yardley J, Mollard R, Macintosh A, et al. Vigorous intensity exercise for glycemic control in patients with type 1 diabetes. *Can J Diab*. 2013; 37: 427–32.
- Campbell MD, Walker M, Trenell MI, et al. Metabolic implications when employing heavy pre- and post-exercise rapid-acting insulin reductions to prevent hypoglycaemia in type 1 diabetes patients: a randomised clinical trial. *PLoS One*. 2014; 9 (5): e97143.
- Moser O, et al. Effects of high-intensity interval exercise versus moderate continuous exercise on glucose homeostasis and hormone response in patients with type 1 diabetes mellitus using novel ultra-long-acting insulin. *PLoS One*. 2015; 10 (8): e0136489.
- Shetty VB, Fournier PA, Davey RJ, et al. Effect of exercise intensity on glucose requirements to maintain euglycaemia during exercise in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016; 101 (3): 972–80.
- Дедов И. И., Шестакова М. В., Майоров А. Ю. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом: клинические рекомендации. 2019; 22 (1S1): 1–144.
- World Anti-Doping Agency. International standard for therapeutic use exemptions (ISTUE) [cited 2021 Jul 14]. Available from: <https://www.wada-ama.org/en/resources/therapeutic-use-exemption-tue/international-standard-for-therapeutic-use-exemptions-istue>.
- Медицинская информация для поддержки решений Комитетов по ТИ. Сахарный диабет [cited 2021 Jul 14]. Доступно по ссылке: <https://rusada.ru/upload/iblock/688/Диабет%20версия%204.2%20февраль%202020.pdf>.
- Пьянкова Е. Ю., Аншакова Л. А., Пьянков И.А. и др. Современные технологии в управлении сахарным диабетом — непрерывное мониторирование глюкозы и помповая инсулинотерапия. *Здравоохранение Дальнего Востока*. 2021; 1: 50–55.
- Hásková A, Radovnická L, Petruželková L, Parkin CG, Grunberger G, Horová E, et al. Is superior to flash glucose monitoring for glucose control in type 1 diabetes: the CORRIDA randomized controlled trial. *Diabetes Care*. 2020 Nov; 43 (11): 2744–50.
- Древаль А. В., Шестакова Т. П., Манукян А. А., Брежнева О. Г. Индивидуализированный статистический анализ массива данных непрерывного мониторирования глюкозы. *Альманах клинической медицины*. 2021; 48 (7): 459–68.
- Nimri R, Nir J, Phillip M. Insulin pump therapy. *American journal of therapeutics*. 2020; 27 (1): e30–e41.
- The Food and Drug Administration. What is the pancreas? What is an artificial pancreas device system? [fda.gov](https://www.fda.gov/medical-devices/artificial-pancreas-device-system/what-pancreas-what-artificial-pancreas-device-system) [cited 2021 Jul 14]. Available from: <https://www.fda.gov/medical-devices/artificial-pancreas-device-system/what-pancreas-what-artificial-pancreas-device-system>.
- Сорокин Д. Ю., Лаптев Д. Н. Некоммерческие системы

- введения инсулина в замкнутом контуре. *Consilium Medicum*. 2020; 22 (4): 27–30.
41. Kenny GP, Stapleton JM, Yardley JE, et al. Older adults with type 2 diabetes store more heat during exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2013; 45: 1906–14.
  42. Carter MR, McGinn R, Barrera-Ramirez J, et al. Impairments in local heat loss in type 1 diabetes during exercise in the heat. *Med Sci Sports Exerc*. 2014; 46: 2224–33.
  43. Fritschi C, Park H, Richardson A, et al. Association between daily time spent in sedentary behavior and duration of hyperglycemia in type 2 diabetes. *Biol Res Nurs*. 2015.
  44. Dempsey PC, Larsen RN, Sethi P, et al. Benefits for type 2 diabetes of interrupting prolonged sitting with brief bouts of light walking or simple resistance activities. *Diabetes Care*. 2016; 39: 964–72.
  45. Абдирамашева К. С. Глюкокортикоиды и развитие сахарного диабета. *Theoretical Applied Science*. 2019; 4: 15–19.
  46. Бухтин О. В., Рябцев А. С. Оценка влияния психотропных препаратов на развитие эндокринной патологии. Возможности ее профилактики. В сборнике: *Современные вопросы морфологии эндокринной системы. Материалы IV межрегиональной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых*. Под редакцией О.Ю. Патюченко, А.А. Созыкина, М.А. Затолокиной, Г.Н. Суворовой, М.Н. Дмитриева. Казань: Бук, 2020; с. 23–29.
  47. Маклакова А. С., Маслова М. В., Граф А. В., Соколова Н. А. Вегетативная нервная система в норме и при патологии. Медиаторы и котрансмисмиттер. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2020; 147 с.
  48. FDA revises label of diabetes drug canagliflozin (Invokana, Invokamet) to include updates on bone fracture risk and new information on decreased bone mineral density. 2015 [3/1/16]. Data summary. Available from: <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm461449.htm>.
  49. Столов С. В. Инактивация ренин-ангиотензин-альдостероновой системы. Какой класс препаратов предпочесть? *Евразийский кардиологический журнал*. 2020; 4: 64–78.
  50. Недогода С. В. Диуретики при артериальной гипертензии в свете новых клинических рекомендаций и метаанализов. *Российский кардиологический журнал*. 2021; 3: 91–94.

## References

1. Solberg SR, Land R, Desay E, Ker D. Physical activity and type 1 diabetes: time for a rewiring? *J Diabetes Sci Technol*. 2015; 9: 609–18.
2. Kelly D, Hamilton JK, Riddell MC. Blood glucose levels and performance in a sports cAMP for adolescents with type 1 diabetes mellitus: a field study. *Int J Pediatr*. 2010.
3. Gomez AM, Gomez C, Aschner P, et al. Effects of performing morning versus afternoon exercise on glycemic control and hypoglycemia frequency in type 1 diabetes patients on sensor-augmented insulin pump therapy. *J Diabetes Sci Technol*. 2015; 9: 619–24.
4. Caduff A, Lutz HU, Heinemann L, et al. Dynamics of blood electrolytes in repeated hyper- and/or hypoglycaemic events in patients with type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2011; 54: 2678–89.
5. Colberg SR, Yardley JE, Riddell MC, et al. Physical activity/exercise and diabetes: a position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2016; 39 (11): 2065–79.
6. Gibala MJ, Little JP, Macdonald MJ, Hawley JA. Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. *J Physiol*. 2012; 590: 1077–84.
7. Terada T, Wilson BJ, Myette-Co'te'E, et al. Targeting specific interstitial glycemic parameters with high-intensity interval exercise and fasted-state exercise in type 2 diabetes. *Metabolism*. 2016; 65: 599–608.
8. Iscoe KE, Riddell MC. Continuous moderate-intensity exercise with or without intermittent high-intensity work: effects on acute and late glycaemia in athletes with Type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med*. 2011; 28: 824–32.
9. Yardley JE, Kenny GP, Perkins BA, et al. Resistance versus aerobic exercise: acute effects on glycemia in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2013; 36 (3): 537–42.
10. Westcott WL. Resistance training is medicine: effects of strength training on health. *Curr Sports Med Rep*. 2012; 11: 209–16.
11. Turner D, Luzio S, Gray BJ, et al. Impact of single and multiple sets of resistance exercise in type 1 diabetes. *Scand. J Med Sci Sports*. 2015; 25: 99–109.
12. Yardley JE, Kenny GP, Perkins BA, et al. Effects of performing resistance exercise before versus after aerobic exercise on glycemia in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2012; 35: 669–75.
13. Turner D, Luzio S, Gray BJ, et al. Algorithm that delivers an individualized rapid-acting insulin dose after morning resistance exercise counters postexercise hyperglycemia in people with Type 1 diabetes. *Diabet. Med*. 2016; 33: 506–10.
14. Chtourou H, Souissi N. The effect of training at a specific time of day: a review. *J Strength Cond Res*. 2012; 26: 1984–2005.
15. Murillo S, Brugnara L, Novials A. One year follow-up in a group of halfmarathon runners with type-1 diabetes treated with insulin analogues. *J Sports Med Phys Fitness*. 2010; 50: 506–10.
16. Riddell MC, Milliken J. Preventing exercise-induced hypoglycemia in type 1 diabetes using real-time continuous glucose monitoring and a new carbohydrate intake algorithm: an observational field study. *Diabetes Technol Ther*. 2011; 13: 819–25.
17. Francescato MP, Stel G, Stenner E, Geat M. Prolonged exercise in type 1 diabetes: performance of a customizable algorithm to estimate the carbohydrate supplements to minimize glycemic imbalances. *PLoS One*. 2015; 10: e0125220.
18. Adolfsson P, Mattsson S, Jendle J. Evaluation of glucose control when a new strategy of increased carbohydrate supply is implemented during prolonged physical exercise in type 1 diabetes. *Eur J Appl Physiol*. 2015; 115: 2599–607.
19. Jensen TE, Richter EA. Regulation of glucose and glycogen metabolism during and after exercise. *J Physiol*. 2012; 590: 1069–76.
20. West DJ, Stephens JW, Bain SC, et al. A combined insulin reduction and carbohydrate feeding strategy 30 min before running best preserves blood glucose concentration after exercise through improved fuel oxidation in type 1 diabetes mellitus. *J Sports Sci*. 2011; 29: 279–89.
21. Bracken RM, West DJ, Stephens JW, et al. Impact of pre-exercise rapidacting insulin reductions on ketogenesis following running in type 1 diabetes. *Diabet Med*. 2011; 28: 218–22.
22. Franc S, Daoudi A, Pochat A, et al. Insulin-based strategies to prevent hypoglycaemia during and after exercise in adult patients with type 1 diabetes on pump therapy: the DIABRASPORT randomized study. *Diabetes Obes. Metab*. 2015; 17: 1150–57.
23. West DJ, Morton RD, Bain SC, et al. Blood glucose responses to reductions in pre-exercise rapid-acting insulin for 24 h after running in individuals with type 1 diabetes. *J Sports Sci*. 2010; 28: 781–88.
24. Campbell MD, Walker M, Bracken RM, et al. Insulin therapy and dietary adjustments to normalize glycemia and prevent nocturnal hypoglycemia after evening exercise in type 1 diabetes: a randomized controlled trial. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2015; 3: e000085.
25. Taplin CE, Cobry E, Messer L, et al. Preventing post-exercise nocturnal hypoglycemia in children with type 1 diabetes. *J Pediatr*. 2010; 157: 784–88. e781.
26. Garg SK, Brazg RL, Bailey TS, et al. Hypoglycemia begets hypoglycemia: the order effect in the ASPIRE in-clinic study. *Diabetes Technol Ther*. 2014; 16: 125–30.
27. Freckmann G, Pleus S, Haug C, et al. Increasing local blood flow by warming the application site: beneficial effects on postprandial glycemic excursions. *J Diabetes Sci Technol*. 2012; 6: 780–5.
28. Yardley J, Mollard R, Macintosh A, et al. Vigorous intensity exercise for glycemic control in patients with type 1 diabetes. *Can J Diab*. 2013; 37: 427–32.
29. Campbell MD, Walker M, Trenell MI, et al. Metabolic implications when employing heavy pre- and post-exercise rapid-acting insulin

- reductions to prevent hypoglycaemia in type 1 diabetes patients: a randomised clinical trial. *PLoS One*. 2014; 9 (5): e97143.
30. Moser O, et al. Effects of high-intensity interval exercise versus moderate continuous exercise on glucose homeostasis and hormone response in patients with type 1 diabetes mellitus using novel ultra-long-acting insulin. *PLoS One*. 2015; 10 (8): e0136489.
  31. Shetty VB, Fournier PA, Davey RJ, et al. Effect of exercise intensity on glucose requirements to maintain euglycaemia during exercise in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016; 101 (3): 972–80.
  32. Dedov II, Shestakova MV, Majorov AYU. Algoritmy specializirovannoj medicinskoj pomoshhi bol'nym saharnym diabetom: klinicheskie rekomendacii. 2019; 22 (1S1): 1–144.
  33. World Anti-Doping Agency. International standard for therapeutic use exemptions (ISTUE) [cited 2021 Jul 14]. Available from: <https://www.wada-ama.org/en/resources/therapeutic-use-exemption-tue/international-standard-for-therapeutic-use-exemptions-istue>.
  34. Meditsinskaya informatsiya dlya podderzhki resheniy Komitetov po TI. Sakharnyy diabet [cited 2021 Jul 14] Available from: <https://rusada.ru/upload/iblock/688/Диабет%20версия%204.2%20февраль%202020.pdf>.
  35. P'jankova EYu, Anshakova LA, P'jankov IA, i dr. Sovremennye tehnologii v upravlenii saharnym diabetom — nepreryvnoe monitorirovanie glukozy i pompovaja insulinoterapija. *Zdravoohranenie Dal'nego Vostoka*. 2021; 1: 50–55.
  36. Hásková A, Radovnická L, Petruželková L, Parkin CG, Grunberger G, Horová E, et al. Is superior to flash glucose monitoring for glucose control in type 1 diabetes: the CORRIDA randomized controlled trial. *Diabetes Care*. 2020 Nov; 43 (11): 2744–50.
  37. Dreval AV, Shestakova TP, Manukjan AA, Brezhneva OG. Individualizirovannyj statisticheskij analiz massiva dannyh nepreryvnogo monitorirovaniya glukozy. *Al'manah klinicheskoy mediciny*. 2021; 48 (7): 459–68.
  38. Nimri R, Nir J, Phillip M. Insulin pump therapy. *American journal of therapeutics*. 2020; 27 (1): e30–e41.
  39. The Food and Drug Administration. What is the pancreas? What is an artificial pancreas device system? *fda.gov* [cited 2021 Jul 14]. Available from: <https://www.fda.gov/medical-devices/artificial-pancreas-device-system/what-pancreas-what-artificial-pancreas-device-system>.
  40. Sorokin DYU, Laptev DN. Nekommercheskie sistemy vvedeniya insulina v zamknutom konture. *Consilium Medicum*. 2020; 22 (4): 27–30.
  41. Kenny GP, Stapleton JM, Yardley JE, et al. Older adults with type 2 diabetes store more heat during exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2013; 45: 1906–14.
  42. Carter MR, McGinn R, Barrera-Ramirez J, et al. Impairments in local heat loss in type 1 diabetes during exercise in the heat. *Med Sci Sports Exerc*. 2014; 46: 2224–33.
  43. Fritschi C, Park H, Richardson A, et al. Association between daily time spent in sedentary behavior and duration of hyperglycemia in type 2 diabetes. *Biol Res Nurs*. 2015.
  44. Dempsey PC, Larsen RN, Sethi P, et al. Benefits for type 2 diabetes of interrupting prolonged sitting with brief bouts of light walking or simple resistance activities. *Diabetes Care*. 2016; 39: 964–72.
  45. Abdiramasheva KS. Gljukokortikoidy i razvitie saharnogo diabeta. *Theoretical Applied Science*. 2019; 4: 15–19.
  46. Buhtin OV, Rjabcev AS. Ocenka vlijanija psihotropnyh preparatov na razvitie jendokrinnoj patologii. Vozmozhnosti ee profilaktiki. V sbornike: *Sovremennye voprosy morfologii jendokrinnoj sistemy. Materialy IV mezhhregional'noj nauchno-prakticheskoy konferencii studentov, aspirantov i molodyh uchenyh. Pod redakciej O.Ju. Patjuchenko, A.A. Sozykina, M.A. Zatolokinoj, G.N. Suvorovoj, M.N. Dmitrieva. Kazan': Buk, 2020; s. 23–29.*
  47. Maklakova AS, Maslova MV, Graf AV, Sokolova NA. Vegetativnaja nervnaja sistema v norme i pri patologii. *Mediatory i kotransmitter. M.: Tovarišhestvo nauchnyh izdanij KMK, 2020; 147 s.*
  48. FDA revises label of diabetes drug canagliflozin (Invokana, Invokamet) to include updates on bone fracture risk and new information on decreased bone mineral density. 2015 [3/1/16]. Data summary. Available from: <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm461449.htm>.
  49. Stolov SV. Inaktivacija renin-angiotenzin-al'dosteronovoj sistemy. Kakoj klass preparatov predpochest'? *Evrasijskij kardiologicheskij zhurnal*. 2020; 4: 64–78.
  50. Nedogoda SV. Diuretiki pri arterial'noj gipertenzii v svete novyh klinicheskikh rekomendacij i metaanalizov. *Rossijskij kardiologicheskij zhurnal*. 2021; 3: 91–94.

## «БОЛЕВЫЕ ТОЧКИ» СОТРЯСЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА У ЮНЫХ СПОРТСМЕНОВ

С. О. Ключников<sup>1</sup>, В. С. Фещенко<sup>1,2</sup>, А. В. Жолинский<sup>1</sup>, М. С. Тарасова<sup>1</sup>✉, А. В. Сливин<sup>2</sup>, П. В. Ефимов<sup>2</sup><sup>1</sup> Федеральный научно-клинический центр спортивной медицины и реабилитации Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия<sup>2</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Проведенные в последние десятилетия многочисленные исследования позволили получить большой объем научной информации по проблемам, связанным со спорт-ассоциированными сотрясениями головного мозга. В обзоре сделан анализ мировых данных о сотрясении головного мозга при занятиях спортом детей и юных спортсменов. Обсуждены «болевы точки» проблемы, к которым авторы относят сложные и нерешенные вопросы по критериям диагностики, применению современных методов нейровизуализации и перспективных биомаркеров с учетом новых научных данных о патофизиологических механизмах сотрясений головного мозга. Большое внимание уделено описанию физиологических особенностей детей и подростков и предрасполагающих факторов, значимых как для диагностики, так и для тактики ведения при возникновении этого состояния. Сформулированы актуальные задачи, решение которых необходимо для совершенствования практики спортивной медицины при сотрясении головного мозга у спортсменов детского-юношеского возраста.

**Ключевые слова:** спорт высших достижений, сотрясение головного мозга, детско-юношеский спорт

**Финансирование:** статья подготовлена в рамках прикладной научно-исследовательской работы «Клинико-прогностическое значение особенностей нейрометаболического каскада для развития отсроченных осложнений гипоксических и травматических повреждений мозга у спортсменов» (шифр темы: «Нейрокаскад-20», код темы: 76.35.41), выполненной ФГБУ ФНКЦСМ ФМБА России по государственному заданию на 2020–2021 год.

**Вклад авторов:** С. О. Ключников — поиск и анализ источников, написание текста; В. С. Фещенко — написание текста, общее редактирование; А. В. Жолинский — общее редактирование; М. С. Тарасова, А. В. Сливин, П. В. Ефимов — поиск и анализ источников.

✉ **Для корреспонденции:** Мария Сергеевна Тарасова  
ул. Раевского, д. 4, 121151, г. Москва; tarasovams@sportfmba.ru

**Статья получена:** 20.07.2021 **Статья принята к печати:** 12.08.2021 **Опубликована онлайн:** 17.09.2021

**DOI:** 10.47183/mes.2021.026

## BRAIN CONCUSSION IN YOUNG ATHLETES: MAJOR PAIN POINTS

Klyuchnikov SO<sup>1</sup>, Feshchenko VS<sup>1,2</sup>, Zholinsky AV<sup>1</sup>, Tarasova MS<sup>1</sup>✉, Slivin AV<sup>2</sup>, Efimov PV<sup>2</sup><sup>1</sup> Federal Research and Clinical Center of Sports Medicine and Rehabilitation of FMBA, Moscow, Russia<sup>2</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Numerous studies conducted in recent decades have generated vast amounts of knowledge on sport-related concussions. This review analyzes international data on pediatric and adolescent sport-related concussions. Drawing on the most recent research into the pathophysiology of brain concussions, the authors identify and discuss “pain points” associated with SRC, i.e. unsolved problems of diagnostic criteria, the use of modern neuroimaging modalities and promising biomarkers. Special attention is paid to the physiology of children and adolescents and predisposing factors important for developing adequate diagnostic and management strategies. The authors formulate problems that need to be solved in order to improve care for young athletes with brain concussions.

**Keywords:** elite athletes, brain concussion, youth sports

**Funding:** this review is part of the applied research study on the *Clinical and prognostic significance of neurometabolic cascade for the development of delayed complications of hypoxic and traumatic brain injuries in athletes* (Neurocascade-20, ID 76.35.41) conducted by the Federal Research and Clinical Center of Sports Medicine and Rehabilitation of FMBA under the State Assignment for years 2020–2021.

**Author contribution:** Klyuchnikov SO searched and analyzed the literature and contributed to writing the manuscript; Feshchenko VS contributed to writing the manuscript and edited the final version; Zholinsky AV edited the final version of the manuscript; Tarasova MS, Slivin AV, Efimov PV searched and analyzed the literature.

✉ **Correspondence should be addressed:** Maria S. Tarasova  
Raevskogo, 4, 121151, Moscow; tarasovams@sportfmba.ru

**Received:** 20.07.2021 **Accepted:** 12.08.2021 **Published online:** 17.09.2021

**DOI:** 10.47183/mes.2021.026

Многочисленные исследования, проведенные в последние десятилетия, и обсуждения их итогов на страницах ведущих журналов и на международных форумах позволяют утверждать, что накоплен значительный объем информации о проблемах, связанных со спорт-ассоциированными сотрясениями головного мозга (ССГМ). В целой серии систематических обзоров и метаанализов показана специфика данной травмы в зависимости от вида спорта, тренировочного периода, гендерных различий. Разработаны и предложены для практики различные методы диагностики, протоколы и юридические документы [1, 2]. Казалось бы, современные научные знания и высокий уровень медико-биологических технологий должны были позволить уже решить проблему ССГМ. Однако практические реалии свидетельствуют

о сохраняющихся сложных и нерешенных ее аспектах. Как это ни парадоксально, но сегодня у специалистов нет ни однозначных дефиниций, ни четких объективных критериев диагностики, ни вариантов тактики ведения ССГМ, в том числе учитывающих возрастные особенности юных спортсменов.

Минимальная симптоматика, отсутствие специфических жалоб, относительно короткий период клинического выздоровления без применения каких-либо лекарственных препаратов формируют достаточно распространенное, но ошибочное мнение о незначительном влиянии сотрясений головного мозга на здоровье детей и подростков, занимающихся спортом. Современные научные данные убедительно доказывают, что даже однократное ССГМ может оказывать негативное влияние на успеваемость

юниоров, тогда как при повторных травмах резко увеличивается риск снижения не только школьной успеваемости, но и профессиональной успешности [3]. Именно для детского возраста характерен высокий риск развития неблагоприятных отдаленных последствий, особенно при повторных ССГМ, произошедших на этапе восстановления после травмы [4; 5]. Уже только эти обстоятельства свидетельствуют об актуальности проблемы ССГМ у юных спортсменов, вызывающей у практикующих врачей по спортивной медицине многочисленные вопросы.

Один из первых таких вопросов — частота ССГМ. Традиционно цитируемые в специальной литературе статистические данные относятся, в силу масштабности сведений, к американским юным спортсменам, среди которых число случаев ССГМ достигает от 1,1 до 1,9 млн [6]. По другим данным, в США ежегодно число сотрясений достигает 1,6–3,8 млн, являясь после дорожно-транспортных происшествий второй по распространенности причиной травм головы [7]. При этом учитывают всех спортсменов, учащихся в школах и колледжах, а также принимают во внимание и так называемые рекреационные травмы, полученные не во время тренировок и соревнований. Наряду с этим материалы недавно опубликованных эпидемиологических отчетов свидетельствуют о значительном росте количества ССГМ, в частности, если в 2006 г. было зарегистрировано 569,4 ССГМ на 100 000 травм, то в 2012 г. — 807,9 на 100 000 травм [8]. Одной из вероятных, но не единственной причиной может быть повышенное в последние годы внимание к данному виду травм как у врачей, так и у тренеров, и у родителей, занимающихся спортом детей [9]. Существенное значение в увеличении роста регистрации числа ССГМ могут иметь юридические и даже социально-экономические факторы, роль которых обсуждалась в работах [10; 11].

Хотя хорошо известно, что около 70% травм приходится на возраст до 19 лет [12], тем не менее до недавнего времени ССГМ у детей, занимающихся спортом, считались несущественной проблемой. Приводились научные доводы, что подобные травмы хорошо компенсируются физиологическими и адаптивными ресурсами с редкими и/или незначительными долгосрочными негативными последствиями для организма [13]. Основанием для подобных выводов были итоги целого ряда клинических исследований, в которых лишь у небольшой доли детей были описаны явные клинические симптомы или проявления нейропсихологического дисбаланса [14].

Сегодня, благодаря реализации современных диагностических подходов, экспериментальных, клинко-функциональных и нейрофизиологических исследований головного мозга, становится все более очевидным, что используемые традиционные клинические оценки недостаточны для выявления и дифференциации тонких и гетерогенных патологических состояний, обусловленных ССГМ, особенно в детском возрасте. Накапливаются научные данные о том, что спорт-ассоциированные сотрясения головного мозга могут привести к значительным изменениям в организме детей и подростков, которые сохраняются длительно, даже после наступления периода клинического выздоровления. Оценивая ССГМ, большинство клиницистов ориентируются на итоги коммерческих тестов, например, ImPACT и SCAT, хотя и адаптированных для детского возраста. Отмечая несомненные преимущества этих тестов над

базовыми отчетами при оценке симптомов, результаты специальных исследований все же свидетельствуют об их недостаточной надежности и чувствительности не только для выявления ССГМ, но и для прогнозирования нарушений, формирующихся у детей и подростков в период после завершения острой фазы травмы [1; 15; 16].

Многие исследователи убедительно показали, что большая часть ССГМ у атлетов в любых возрастных группах даже не регистрируется. Среди значимых причин приводятся следующие: недостаточное внимание тренерского персонала к выявлению ССГМ, отсутствие соответствующей информации у самих спортсменов, сознательное искажение/занижение сведений спортсменами о своем здоровье из-за боязни быть отстраненными от спортивной деятельности и др. Например, от 40 до 76% юных атлетов пытаются скрыть свою травму [17], а по другим данным, до 80% юных регбистов или не сообщили о самом факте травмы, или вернулись к полноценным спортивным занятиям раньше завершения периода восстановления [18].

Частота возникновения ССГМ зависит от вида спорта. Наиболее травмоопасным является американский футбол. К видам спорта с высоким риском ССГМ относятся также лакросс, хоккей с шайбой, единоборства, сноуборд и некоторые другие, в первую очередь, контактные виды спорта [5].

Обсуждая вопросы патофизиологии сотрясения головного мозга, отметим, что данное состояние характеризуется временным нарушением функции нейронов, аксонов и сосудистой сети головного мозга, обусловленным ликвородинамическим ударом и ротационным механизмом, вызывая изменения нейротрансмиссии и нейрометаболизма. Могут наблюдаться и петехиальные кровоизлияния в окружающей Сильвиеву водопровода [19]. Проведенные в последние годы в разных странах исследования позволили прийти к детальному пониманию основных биокинетических механизмов, индуцирующих ССГМ. В первую очередь, к ним необходимо отнести силы «ускорения и замедления», при травмирующем воздействии, как правило, резко сменяющие друг друга, и вращение головы [20]. Считается, что ССГМ обычно возникают в результате непосредственного воздействия/удара в область головы. Целесообразно учитывать, что ССГМ также могут быть вызваны и ударом в другие участки тела с последующей иррадиацией [1]. Важным и возможно принципиальным условием являются слабые мышцы шеи, что характерно для женского пола, но особенно для детского возраста. По мнению ряда авторов, именно это обстоятельство значительно увеличивает риск ССГМ у детей, так как не гасится воздействующая на голову сила [21].

Именно резкие ускорительно-замедлительные движения головы у детей до 5-летнего возраста достаточно хорошо известны врачам-педиатрам как травматические факторы, нередко драматичного по своим последствиям, синдрома «встряхнутого ребенка» (в англоязычной литературе — *syndrome «Shaken Baby»*). Был введен специальный термин «*whiplash shaken infant syndrome*» — WSIS (синдром резкой встряски младенца), при диагностически важном сочетании симптомов, включающем кровоизлияние в сетчатку, субдуральное и/или субарахноидальное кровоизлияния и при незначительном повреждении черепа или даже без него [22].

Принципиально важно, что, в отличие от детей более старшего возраста, мозг детей раннего возраста

характеризуется целым рядом физиологических особенностей, предопределяющих последующую драматическую клиническую картину. Сочетание большого размера головы и слабых мышц шеи делает ребенка особенно уязвимым к воздействию ускорительно-замедлительных факторов при подобной травме. Имеют значение недостаточная миелинизация и высокая гидрофильность тканей мозга, характерные для этого возрастного периода. Оба эти условия существенно увеличивают риск возникновения такой травмы под воздействием ускорительно-замедлительных сил и ротационных движений головы [23].

Нарушение миелиновой оболочки обуславливает не только ухудшение проведения нервных импульсов, но и предопределяет большую уязвимость головного мозга при повторных воздействиях, что неоднократно доказано при гипоксически-ишемических повреждениях нервной ткани, в том числе при инсультах у взрослых. Это иллюстрируется данными целого ряда работ, в которых показано, что наличие в анамнезе спортсмена сотрясения головного мозга увеличивает риск повторного сотрясения в 2–5,8 раз [24; 25]. На значимость повторных ССГМ в генезе отдаленных негативных последствий и на характер выздоровления обращает внимание и экспертная группа [5].

Сотрясение головного мозга, представляя собой весьма гетерогенную группу патологических состояний, трактуется экспертами как минимальная черепно-мозговая травма. Происходящие при этом патофизиологические процессы и клинические проявления свидетельствуют о том, что каждое ССГМ уникально и характеризуется широкой палитрой симптомов и спектром их тяжести. Именно многоликая палитра проявлений, во многом совпадающая с другими заболеваниями, предопределяет сложности для диагностики этого состояния. Существенным является и тот факт, что применяемые на практике объективные методы нейровизуализации (МРТ и КТ) не фиксируют какие-либо патологические изменения в головном мозге при его сотрясении. Тем не менее эти методы необходимы для проведения дифференциальной диагностики и исключения иных нозологических форм со сходной клинической симптоматикой.

В последние десятилетия были предприняты неоднократные попытки детализировать и классифицировать симптомы ССГМ у спортсменов в разных видах спорта и разных возрастных группах. Все встречающиеся симптомы ССГМ можно отнести к нескольким группам: соматические, поведенческие и когнитивные.

К соматическим симптомам относятся: головная боль, головокружение, тошнота, рвота, нечеткость зрения, мелькание мушек перед глазами, нарушение равновесия, повышенная чувствительность к свету или шуму, звон в ушах.

К поведенческим и эмоциональным симптомам: нарушения сна, сонливость, общая слабость, повышенная утомляемость, раздражительность, тревожность, депрессия.

К когнитивным симптомам: трудности концентрации внимания и запоминания, ощущение «замедленности движений» и др. [26].

В систематическом обзоре экспертов были проанализированы описанные в многочисленных публикациях признаки, характерные для ССГМ [2]. В итоге авторы работы отметили следующие наиболее типичные и постоянные для спортсменов признаки этого состояния:

- наблюдаемая и задокументированная дезориентация/замешательство сразу после события;

- нарушение равновесия в течение суток после травмы;
- замедление времени реакции в течение двух суток после травмы; и/или

- нарушение вербального обучения и памяти в течение двух суток после травмы.

Технологические достижения в нейровизуализации обеспечили доступность к объективной оценке состояния головного мозга при травме, и, согласно современным трактовкам, к сотрясениям головного мозга должны относиться только те состояния, обусловленные биомеханическим воздействием, которые не сопровождаются структурными изменениями мозга. Однако в литературе опубликованы итоги исследований такими методами, как диффузионно-тензорная визуализация, свидетельствующие, что даже при минимальной ЧМТ и предполагаемом ССГМ выявляется микроструктурная патология (например, незначительные изменения целостности длинных трактов белого вещества, диапедезные кровоизлияния). Предполагается, что указанные микротрансформации могут быть признаком минимальной ЧМТ, при этом клиническое значение диагностируемых изменений пока остается неясным.

Тем не менее изучение функциональных связей мозга позволили предположить негативное влияние ССГМ и субконтузионных воздействий на коммуникацию нейронных сетей у юных спортсменов. При использовании метода диффузионно-тензорной визуализации [27] у спортсменов-подростков через шесть месяцев после перенесенного ССГМ обнаружено значительное увеличение фракционной анизотропии всего мозга, что свидетельствует об изменении миелинизации и плотности волокон [28]. В то же время несмотря на наличие у детей острых изменений целостности белого вещества (по уровню фракционной анизотропии) после травмы, через шесть месяцев их значения вернулись к нормальному диапазону [29]. Столь противоречивые данные, безусловно, затрудняют интерпретацию результатов и клиническую трактовку подобных изменений и диктуют необходимость проведения специальных научных изысканий.

Определенный интерес представляют результаты исследований нейрометаболизма при ССГМ. Описываются, правда, у взрослых спортсменов, увеличение количества глутамата [30], холина [31], креатина [32] и снижение уровня N-ацетиласпартата [32]. Указанные вещества выполняют важную роль в метаболизме мозга, а вариации в их экспрессии после ССГМ коррелируют с нейропсихологическими особенностями [33] и результатами при выполнении спортсменами экспериментальных задач [31]. Отметим, что только в нескольких работах изучались процессы нейрометаболизма у детей с ССГМ, и, в частности, было показано изменение метаболических соотношений по мере развития детей [34]. При использовании позитронно-эмиссионной томографии ученые подтвердили значительные функциональные сдвиги в метаболизме мозга у детей после ССГМ. Обнаружено, например, что первоначальное увеличение потребления глюкозы сменяется значительным снижением ее уровня [35].

В последнее время большой интерес к нейрометаболизму вызывают возможности применения биомаркеров для диагностики повреждений головного мозга. Убедительные научные данные и реализованные на практике диагностикумы показаны, например, при инсультах мозга. Получены и перспективные научные сведения о роли нейромаркеров при ЧМТ. В частности, установлено, что передача импульсов между нейронами

осуществляется путем изменения трансмембранного электрического потенциала с участием ионных каналов и глутаматных рецепторов. Последние участвуют в большинстве возбуждающих импульсов головного мозга и играют ключевую роль в обеспечении пластичности нейронов, процессах адаптации, обучения и формировании памяти [36].

В острой фазе ЧМТ или при повреждении аксонов происходит массивный выброс глутамата в синаптическую щель, который активирует возбуждающие AMPA-рецепторы. N-концевой домен AMPA-рецепторов быстро отщепляется внеклеточными протеазами и попадает в системный кровоток через нарушенный гемато-энцефалический барьер. Продукт деградации AMPA-рецепторов может выявляться в крови в виде AMPA-пептида. Изучение возможности определения уровня AMPA-пептида в крови в комплексной диагностике ССГМ, наряду с нейрокогнитивным тестированием и нейровизуализацией, было проведено в США в рамках исследования с участием 84 спортсменов, представляющих американский футбол. Было показано, что у спортсменов с сотрясениями снижались значения параметров визуальной памяти и индекса когнитивной эффективности при повышенных уровнях AMPA-пептида. В течение 1,5-летнего наблюдения за обследованными спортсменами выявлено, что из 33 только у 18 человек показатели AMPA-пептида снизились до значений, близких к нормальным, и это позволило им вернуться к полноценной спортивной деятельности [37].

В качестве возможных биомаркеров для детекции и оценки сотрясений головного мозга, кроме ассоциированных с глутаматом, предлагаются различные соединения: S100, глиальный фибриллярный кислый белок, нейротрофический фактор, креатинкиназы и некоторые другие. Однако целесообразность их применения при ССГМ, в том числе у юниоров, не подтверждена. По-прежнему актуальны работы по поиску объективных критериев как для диагностики сотрясений, так и мониторинга состояния спортсменов в период реабилитации после травмы и возвращения к активной спортивной деятельности.

Изучение нарушений цереброваскулярной реактивности дает возможность рассматривать этот феномен как один из патофизиологических механизмов при ССГМ у спортсменов. Установлено, что у молодых спортсменов с сотрясением головного мозга (возраст 16–22 года) происходит более медленное по сравнению со здоровыми людьми восстановление после состояний гипо- и гипервентиляции [38]. Наряду с этим при ССГМ диагностированы хронические изменения цереброваскулярной функции. Отмечено значительное снижение общего церебрального кровотока у детей в возрасте 11–15 лет более чем через месяц после полученной травмы [39]. У всех обследованных юниоров через две недели после травмы исчезали поведенческие симптомы, однако у 64% из них сохранялось изменение церебрального кровотока. Через 30 дней после травмы нейропсихологические тесты у всех детей соответствовали норме, хотя у 36% все еще регистрировалась цереброваскулярная дисфункция. Получены данные, свидетельствующие о длительном, до 12 месяцев, сохранении выраженной церебральной дисфункции при отсутствии клинических симптомов сотрясения и при нормальных результатах тестирования [40]. Эти данные наглядно иллюстрируют формирование у получившего

ССГМ юниора длительного «физиологически уязвимого периода», в течение которого повторное воздействие, вероятно, и не только биомеханическое, может привести к повышенному риску развития неблагоприятных отдаленных последствий [1].

Весьма перспективными представляются исследования нейроэлектрической функции мозга. Для выявления и характеристики нейрофизиологических изменений, обусловленных ССГМ, наибольшую чувствительность и специфичность демонстрирует метод «событийно-связанных вызванных потенциалов» (*event-related potentials*). Было показано, что у детей с сотрясением мозга наблюдаются изменения в показателях распределения ресурсов внимания, мониторинга действий и осведомленности об ошибках [41]. Даже один эпизод сотрясения мозга может привести к глубоким изменениям нейроэлектрической функции в процессе развития, обуславливая синдром дефицита внимания у детей, особенно при возникновении сложных когнитивных условий [42].

Вышеизложенные факты позволяют сформулировать следующее положение: ССГМ у детей может значительно влиять на их нейрофизиологические характеристики, что регистрируется различными современными диагностическими методами, однако нейроанатомические последствия травмы у них остаются не изученными. Несмотря на морфофункциональные особенности, у детей, как и у взрослых спортсменов, при ССГМ формируется определенная патофизиологическая картина, которая у значительной части обследованных проявляется в виде стойких изменений функциональных связей, церебрального кровотока и нейроэлектрической функции мозга.

Одним из значимых для исхода ССГМ факторов является возраст спортсмена. В серии исследований разных авторов показано, что дети восстанавливаются после травмы медленнее, чем взрослые [43; 44]. В лонгитюдных клинических исследованиях, свидетельствующих о достаточно оптимистичных исходах ССГМ, тем не менее установлено, что при травме у детей в возрасте до 10 лет значительно выше вероятность развития отдаленных осложненных последствий ССГМ [14; 45]. Авторы достаточно объемных клинических исследований пришли к выводу о необходимости выделения детей предпубертатного периода (до 10 лет) как отдельную возрастную группу с высоким риском стойких нейропсихологических и даже нейропсихиатрических нарушений. Однако и на протяжении всего пубертатного периода спортсмены должны быть под длительным и особым наблюдением, так как их темпы восстановления после ССГМ ниже, чем у взрослых [46; 47].

В определенной мере такая повышенная уязвимость юных атлетов обусловлена особенностями процессов миелинизации и формирования функциональных связей при все еще продолжающемся созревании и развитии фронтальных областей мозга [48; 49]. Хотя не все исследователи разделяют подобную точку зрения. В частности, группа из 11 экспертов под руководством F. P. Riva, проанализировав огромный массив публикаций за период с 1980 по 2018 г., пришла к заключению об отсутствии убедительных доказательств большей подверженности юных спортсменов к возникновению ССГМ по сравнению со взрослыми [5]. В то же время авторы данного экспертного соглашения единодушны в том, что качество исследований за прошедший период

времени существенно, если не принципиально, изменилось, обуславливая значительные трудности в сопоставлении и интерпретации итогов научных работ разных лет.

Гендерные особенности и их влияние на исход ССГМ традиционно остаются предметом многочисленных научных изысканий и дискуссий. Преобладание случаев ССГМ у девушек-спортсменок отмечено в целом ряде работ [50; 51], а также и в заключении экспертной группы [5]. Опубликованные данные, как правило, указывают не только на большую частоту и выраженность симптомов ССГМ, но и на более неблагоприятные исходы у спортсменок до 18 лет по сравнению с юношами [52; 53]. Одним из объяснений может быть, как отмечалось нами ранее, хорошо установленный физиологами факт слабой мускулатуры шеи у девушек, что, несомненно, делает их наиболее уязвимыми при биомеханических воздействиях [54]. Но при этом стоит учитывать и более внимательное отношение к себе у девушек и оперативное информирование медицинского и тренерского штата при появлении соответствующей симптоматики [55]. Справедливости ради отметим, что слабость мускулатуры шеи типично для детского возраста, поэтому некоторые специалисты видят необходимость для профилактики травматизма в занятиях и тренировках, специально разработанных для укрепления мышечного каркаса шеи. Однако в доступной нам литературе мы не обнаружили специальных исследований по сравнению с учетом возраста частоты возникновения и тяжести последствий ССГМ у спортсменов и не занимающихся спортом.

## Заключение

Таким образом, сотрясения головного мозга, ассоциированные с занятиями спортом, у детей и

подростков представляют актуальную проблему, как для науки, так и для практики спортивной медицины. Новейшие исследования свидетельствуют о значимых трансформациях, возникающих в организме юных спортсменов в результате ССГМ, что требует совершенствования диагностических подходов и лечебно-профилактических мероприятий. Актуальными и нерешенными в настоящее время вопросами, на наш взгляд, являются:

- разработка методов диагностики ССГМ и оценки динамики функционального состояния головного мозга, учитывающие возрастные особенности юных спортсменов, на основе современных диагностических технологий нейровизуализации, таких как функциональная магнитно-резонансная томография и магнитно-резонансная спектроскопия, диффузионно-тензорная визуализация, функциональная магнитоэнцефалография, транскраниальная магнитная стимуляция и др.;

- поиск и разработка специальных подходов к медикаментозной и метаболической коррекции типичных для ССГМ у юных спортсменов отсроченных осложнений, в том числе нарушенных нейрофункциональных связей, нейрометаболических и циркуляторных изменений, а также различных когнитивных и сенсорных отклонений;

- разработка программ и протоколов реабилитации и восстановления юных спортсменов после ССГМ, в том числе обоснование и медицинский контроль индивидуальных режимов их возвращения к активной спортивной деятельности;

- подготовка информационно-методических материалов для тренерского штата по особенностям работы с юными спортсменами при возникновении ССГМ и профилактическим мероприятиям, направленным на предупреждение травматизма.

## Литература

- McCrory P, Meeuwisse W, Dvorak J, et al. Consensus statement on concussion in sport—the 5th international conference on concussion in sport held in Berlin. *Br J Sports Med*. 2016; 51 (11): 838–47.
- Giza CC, Hovda DA. The new neurometabolic cascade of concussion. *Neurosurgery*. 2014; 75 (suppl 4): S24–S33.
- Neelakantan M, Ryali B, Cabral MD, Harris A, McCarroll J, Patel DR. Academic Performance Following Sport-Related Concussions in Children and Adolescents: A Scoping Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2020; 17: 7602.
- Davis GA, Anderson V, Babl FE, Gioia, GA, Giza CC, Meehan W, et al. What is the difference in concussion management in children as compared with adults? A systematic review. *Br J Sports Med*. 2017; 51: 949–57.
- Rivara FP, Tennyson R, Mills B, Brownd SR, Emery CA, Gioi G, et al. Consensus Statement on Sports-Related Concussions in Youth Sports. *JAMA Pediatr*. 2020; 174 (1): 79–85.
- Bryan MA, Rowhani-Rahbar A, Comstock RD, Rivara F. Sports- and recreation-related concussions in US youth. *Pediatrics*. 2016; 138: e20154635.
- Zuckerman SL, Kerr ZY, Yengo-Kahn A, Wasserman E, Covassin T, Solomon GS. Epidemiology of sports-related concussion in NCAA athletes from 2009–2010 to 2013–2014: incidence, recurrence, and mechanisms. *Am J Sports Med*. 2015; 43: 2654–62.
- Cancelliere C, Coronado VG, Taylor CA, Xu L. Epidemiology of isolated versus nonisolated mild traumatic brain injury treated in emergency departments in the United States, 2006–2012: sociodemographic characteristics. *J Head Trauma Rehabil*. 2017; 32 (4): E37–E46.
- Kerr ZY, Yeargin S, Valovich McLeod TC, Nittoli VC, Mensch J, Dodge T, et al. Comprehensive coach education and practice contact restriction guidelines result in lower injury rates in youth American football. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*. 2015; 3 (7): 2325967115594578. DOI: 10.1177/2325967115594578. PMID: 26674011; PMCID: PMC4622331.
- Bompadre V, Jinguji TM, Yanez ND, Satchell EK, Gilbert K, Burton M, et al. Washington State's Lystedt law in concussion documentation in Seattle public high schools. *Journal of Athletic Training*. 2014; 49 (4): 486–92.
- Yang J, Comstock RD, Yi H, Harvey HH, Xun P. New and recurrent concussions in high-school athletes before and after traumatic brain injury laws, 2005–2016. *American Journal of Public Health*. 2017; e1–e7.
- Coronado VG, Haileyesus T, Cheng TA, Bell JM, Haarbauer-Krupa J, Lionbarger MR, et al. Trends in sports- and recreation-related traumatic brain injuries treated in US emergency departments: the National Electronic Injury Surveillance System–All Injury Program (NEISS-AIP) 2001–2012. *J Head Trauma Rehabil*. 2015; 30 (3): 185–97.
- Carroll LJ, Cassidy JD, Holm L, Kraus J, Coronado VG. Methodological issues and research recommendations for mild traumatic brain injury: the WHO collaborating centre task force on mild traumatic brain injury. *J Rehabil Med*. 2004; S (43): 113–25.
- Babikian T, Satz P, Zaucha K, Light R, Lewis RS, Asarnow RF. The UCLA longitudinal study of neurocognitive outcomes following mild pediatric traumatic brain injury. *J Int Neuropsychol Soc*. 2011; 17 (5): 886–95.
- Resch J, Driscoll A, McCaffrey N, Brown C, Ferrara MS, Macciocchi S,

- et al. ImPact test-retest reliability: reliably unreliable? *J Athl Train*. 2013; 48 (4): 506–11.
16. Bruce J, Echemendia R, Meeuwisse W, Comper P, Sisco A. 1 year test-retest reliability of ImPACT in professional ice hockey players. *Clin Neuropsychol*. 2014; 28 (1): 14–25.
  17. Prasad MR, Swank PR, Ewing-Cobbs L. Long-term school outcomes of children and adolescents with traumatic brain injury. *J Head Trauma Rehabil*. 2017; 32: E24–E32.
  18. Alexander DG, Shuttleworth-Edwards AB, Kidd M, Malcolm CM. Mild traumatic brain injuries in early adolescent rugby players: Long-term neurocognitive and academic outcomes. *Brain Injury*. 2015; 29: 1113–25.
  19. Гусев Е. И., Скворцова В. И. Ишемия головного мозга. М.: Медицина, 2001; 328 с.
  20. Ommaya AK, Gennarelli TA. Cerebral concussion and traumatic unconsciousness. Correlation of experimental and clinical observations of blunt head injuries. *Brain*. 1974; 97 (4): 633–54.
  21. Buzzini SR, Guskiewicz KM. Sport-related concussion in the young athlete. *Curr Opin Pediatr*. 2006; 18 (4): 376–82.
  22. Румянцев А. Г., Древалъ О. Н., Фениксов В. М. Синдром «Shaken Baby»: диагностика, лечение, профилактика. Вопросы практической педиатрии. 2007; 2 (2): 23–29.
  23. Adam JO, Jai S, Kshitij M. Parenchymal brain injuries in abusive head trauma. *Pediatr Radiol*. 2021; Feb 27.
  24. Emery C, Kang J, Shrier I, Goulet C, Hagel B, Benson B, et al. Risk of injury associated with bodychecking experience among youth hockey players. *Can Med Assoc J*. 2011; 183: 1249–56.
  25. Hollis SJ, Stevenson MR, McIntosh AS. Incidence, Risk, and Protective Factors of Mild Traumatic Brain Injury in a Cohort of Australian Nonprofessional Male Rugby Players. *Am J Sports Med*. 2009; Dec; 37 (12): 2328–33.
  26. Halstead ME, Walter KD, Moffatt K, Council on sports medicine and fitness. Sport-Related Concussion in Children and Adolescents. *Pediatrics* December. 2018; 142 (6): e20183074.
  27. Virji-Babul N, Borich MR, Makan N, Moore T, Frew K, Emery CA, et al. Diffusion tensor imaging of sports-related concussion in adolescents. *Pediatr Neurol*. 2013; 48 (1): 24–29.
  28. Feldman HM, Yeatman JD, Lee ES, Barde LH, Gaman-Bean S. Diffusion tensor imaging: a review for pediatric researchers and clinicians. *J Dev Behav Pediatr*. 2010; 31 (4): 346–56.
  29. Van BL, Ghesquière P, Lagae L, De SB. Arithmetic difficulties in children with mild traumatic brain injury at the subacute stage of recovery. *Dev Med Child Neurol*. 2015; 57 (11): 1042–8.
  30. Gasparovic C, Yeo R, Mannell M, Ling J, Elgie R, Phillips J, et al. Neurometabolite concentrations in gray and white matter in mild traumatic brain injury: an 1H-magnetic resonance spectroscopy study. *J Neurotrauma*. 2009; 26 (10): 1635–43.
  31. Yeo RA, Phillips JP, Jung RE, Brown AJ, Campbell RC, Brooks WM. Magnetic resonance spectroscopy detects brain injury and predicts cognitive functioning in children with brain injuries. *J Neurotrauma*. 2006; 23 (10): 1427–35.
  32. Vagnozzi R, Signoretti S, Floris R, Marziali S, Manara M, Amorini AM, et al. Decrease in N-acetylaspartate following concussion may be coupled to decrease in creatine. *J Head Trauma Rehabil*. 2013; 28 (4): 284–92.
  33. Babikian T, Freier MC, Ashwal S, Riggs ML, Burley T, Holshouser BA. MR spectroscopy: predicting long-term neuropsychological outcome following pediatric TBI. *J Magn Reson Imaging*. 2006; 2 (4): 801–11.
  34. McCreary M, Meier T, Huber D, Pfitz A, Bigler E, Debert CT, et al. Role of advanced neuroimaging, fluid biomarkers and genetic testing in the assessment of sport-related concussion: a systematic review. *Br J Sports Med*. 2017; 51 (12): 919–29.
  35. Halstead ME, Walter KD. Clinical report—sport-related concussion in children and adolescents. *Pediatrics*. 2010; 126 (3): 597–615.
  36. Dambinova SA, Shikuev AV, Weissman JD, Mullins CD. AMPAR Peptide Values in Blood of Nonathletes and Club Sport Athletes With Concussions. *Military Medicine*. 2013; 178 (3): 285–90.
  37. Дамбинова К. Т., Алиев Е. В., Бондаренко Г. В., Пономарев А. А., Скоромец А. П., Скоромец Т. А. и др. Биомаркеры ишемии головного мозга как новый метод доказательства эффективности нейроцитопротекторов. Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. 2017; 117 (5): 62–67.
  38. Len TK, Neary JP, Asmundson GJG, Goodman DG, Bjornson B, Bhamhani YN. Cerebrovascular reactivity impairment after sport-induced concussion. *Med Sci Sports Exerc*. 2011; 43 (12): 2241–8.
  39. Maugans TA, Farley C, Altave M, Leach J, Cecil KM. Pediatric sports-related concussion produces cerebral blood flow alterations. *Pediatrics*. 2012; 129 (1): 28–37.
  40. Wang Y, West JD, Bailey JN, Westfall DR, Xiao H, Arnold TW, et al. Decreased cerebral blood flow in chronic pediatric mild TBI: an MRI perfusion study. *Dev Neuropsychol*. 2015; 40 (1): 40–44.
  41. Moore DR, Pindus DM, Raine LB, Drollette ES, Scudder MR, Ellemberg D, et al. The persistent influence of concussion on attention, executive control, and neuroelectric function in preadolescent children. *Int J Psychophysiol*. 2016; 99: 85–95.
  42. Moor RD, Jacob JK, Ellemberg D. The long-term outcomes of sport-related concussion in pediatric populations. *Int J Psychophysiol*. 2018; 132 (Pt A): 14–24.
  43. Baillargeon A, Lassonde M, Leclerc S, Ellemberg D. Neuropsychological and neurophysiological assessment of sport concussion in children, adolescents and adults. *Brain Inj*. 2012; 26 (3): 211–20.
  44. Nelson LD, Guskiewicz KM, Barr WB, Hammeke TA, Randolph C, Ahn KW, et al. Age differences in recovery after sport-related concussion: a comparison of high school and collegiate athletes. *J Athl Train*. 2016; 51 (2): 142–52.
  45. Hessen E, Nestvold K, Anderson V. Neuropsychological function 23 years after mild traumatic brain injury: a comparison of outcome after pediatric and adult head injuries. *Brain Inj*. 2007; 21 (9): 963–79.
  46. Babcock L, Byczkowski T, Wade SL, Ho M, Mookerjee S, Bazarian JJ. Predicting postconcussion syndrome after mild traumatic brain injury in children and adolescents who present to the emergency department. *JAMA Pediatr*. 2013; 167 (2): 156–61.
  47. Baillargeon A, Lassonde M, Leclerc S, Ellemberg D. Neuropsychological and neurophysiological assessment of sport concussion in children, adolescents and adults. *Brain Inj*. 2012; 26 (3): 211–20.
  48. Prins ML, Giza CC. Repeat traumatic brain injury in the developing brain. *Int J Dev Neurosci*. 2012; 30 (3): 185–90.
  49. Moore RD, Pindus DM, Drollette ES, Scudder MR, Raine LB, Hillman CH. The persistent influence of pediatric concussion on attention and cognitive control during flanker performance. *Biol Psychol*. 2015; 109: 93–102.
  50. Gessel LM, Fields SK, Collins CL, Dick RW, Comstock RD. Concussions among United States high school and collegiate athletes. *J Athl Train*. 2007; 42 (4): 495–503.
  51. Covassin T, Moran R, Elbin RJ. Sex differences in reported concussion injury rates and time loss from participation: an update of the National Collegiate Athletic Association Injury Surveillance Program from 2004–2005 through 2008–2009. *J Athl Train*. Large study summarizing sex differences in concussion rates and recovery after SRC in collegiate athletes. 2016; 51: 189–94.
  52. Ono KE, Burns TG, Bearden DJ, McManus SM, King H, Reisner A. Sex-based differences as a predictor of recovery trajectories in young athletes after a sports-related concussion. *Am J Sports Med*. 2016; 44 (3): 748–52.
  53. Tanveer SR, Zecavati N, Delasobera EB, Oyegbile TO. Gender differences in concussion and post-injury cognitive findings in an older and younger pediatric population. *Pediatr Neurol*. 2017; 70: 40–49.
  54. Caccese JB, Kaminski TW. Minimizing head acceleration in soccer: a review of the literature. *Sports Medicine*. 2016; 46 (11): 1591–604.
  55. Wallace J, Covassin T, Beidler E. Sex differences in high school athletes' knowledge of sport-related concussion symptoms and reporting behaviors. *J Athl Train*. 2017; 52: 682–8.

## References

- McCrory P, Meeuwisse W, Dvorak J, et al. Consensus statement on concussion in sport—the 5th international conference on concussion in sport held in Berlin. *Br J Sports Med.* 2016; 51 (11): 838–47.
- Giza CC, Hovda DA. The new neurometabolic cascade of concussion. *Neurosurgery.* 2014; 75 (suppl 4): S24–S33.
- Neelakantan M, Ryali B, Cabral MD, Harris A, McCarroll J, Patel DR. Academic Performance Following Sport-Related Concussions in Children and Adolescents: A Scoping Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2020; 17: 7602.
- Davis GA, Anderson V, Babl FE, Gioia, GA, Giza CC, Meehan W, et al. What is the difference in concussion management in children as compared with adults? A systematic review. *Br J Sports Med.* 2017; 51: 949–57.
- Rivara FP, Tennyson R, Mills B, Brownd SR, Emery CA, Gioia G, et al. Consensus Statement on Sports-Related Concussions in Youth Sports. *JAMA Pediatr.* 2020; 174 (1): 79–85.
- Bryan MA, Rowhani-Rahbar A, Comstock RD, Rivara F. Sports- and recreation-related concussions in US youth. *Pediatrics.* 2016; 138: e20154635.
- Zuckerman SL, Kerr ZY, Yengo-Kahn A, Wasserman E, Covassin T, Solomon GS. Epidemiology of sports-related concussion in NCAA athletes from 2009–2010 to 2013–2014: incidence, recurrence, and mechanisms. *Am J Sports Med.* 2015; 43: 2654–62.
- Cancelliere C, Coronado VG, Taylor CA, Xu L. Epidemiology of isolated versus nonisolated mild traumatic brain injury treated in emergency departments in the United States, 2006–2012: sociodemographic characteristics. *J Head Trauma Rehabil.* 2017; 32 (4): E37–E46.
- Kerr ZY, Yeargin S, Valovich McLeod TC, Nittoli VC, Mensch J, Dodge T, et al. Comprehensive coach education and practice contact restriction guidelines result in lower injury rates in youth American football. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine.* 2015; 3 (7): 2325967115594578. DOI: 10.1177/2325967115594578. PMID: 26674011; PMCID: PMC4622331.
- Bompadre V, Jinguji TM, Yanez ND, Satchell EK, Gilbert K, Burton M, et al. Washington State's Lystedt law in concussion documentation in Seattle public high schools. *Journal of Athletic Training.* 2014; 49 (4): 486–92.
- Yang J, Comstock RD, Yi H, Harvey HH, Xun P. New and recurrent concussions in high-school athletes before and after traumatic brain injury laws, 2005–2016. *American Journal of Public Health.* 2017; e1–e7.
- Coronado VG, Haileyesus T, Cheng TA, Bell JM, Haarbauer-Krupa J, Lionbarger MR, et al. Trends in sports- and recreation-related traumatic brain injuries treated in US emergency departments: the National Electronic Injury Surveillance System-All Injury Program (NEISS-AIP) 2001–2012. *J Head Trauma Rehabil.* 2015; 30 (3): 185–97.
- Carroll LJ, Cassidy JD, Holm L, Kraus J, Coronado VG. Methodological issues and research recommendations for mild traumatic brain injury: the WHO collaborating centre task force on mild traumatic brain injury. *J Rehabil Med.* 2004; S (43): 113–25.
- Babikian T, Satz P, Zaucha K, Light R, Lewis RS, Asarnow RF. The UCLA longitudinal study of neurocognitive outcomes following mild pediatric traumatic brain injury. *J Int Neuropsychol Soc.* 2011; 17 (5): 886–95.
- Resch J, Driscoll A, McCaffrey N, Brown C, Ferrara MS, Macciocchi S, et al. ImPact test-retest reliability: reliably unreliable? *J Athl Train.* 2013; 48 (4): 506–11.
- Bruce J, Echemendia R, Meeuwisse W, Comper P, Sisco A. 1 year test-retest reliability of ImPACT in professional ice hockey players. *Clin Neuropsychol.* 2014; 28 (1): 14–25.
- Prasad MR, Swank PR, Ewing-Cobbs L. Long-term school outcomes of children and adolescents with traumatic brain injury. *J Head Trauma Rehabil.* 2017; 32: E24–E32.
- Alexander DG, Shuttleworth-Edwards AB, Kidd M, Malcolm CM. Mild traumatic brain injuries in early adolescent rugby players: Long-term neurocognitive and academic outcomes. *Brain Injury.* 2015; 29: 1113–25.
- Gusev EI, Skvortcova VI. Ishemiya golovnogo mozga. M.: Medicina, 2001; 328 c. Russian.
- Ommaya AK, Gennarelli TA. Cerebral concussion and traumatic unconsciousness. Correlation of experimental and clinical observations of blunt head injuries. *Brain.* 1974; 97 (4): 633–54.
- Buzzini SR, Guskiewicz KM. Sport-related concussion in the young athlete. *Curr Opin Pediatr.* 2006; 18 (4): 376–82.
- Rumjancev AG, Dreval ON, Feniksov VM. Sindrom «Shaken Baby»: diagnostika, lechenie, profilaktika. *Voprosy prakticheskoy pediatrii.* 2007; 2 (2): 23–29. Russian.
- Adam JO, Jai S, Kshitij M. Parenchymal brain injuries in abusive head trauma. *Pediatr Radiol.* 2021; Feb 27.
- Emery C, Kang J, Shrier I, Goulet C, Hagel B, Benson B, et al. Risk of injury associated with bodychecking experience among youth hockey players. *Can Med Assoc J.* 2011; 183: 1249–56.
- Hollis SJ, Stevenson MR, McIntosh AS. Incidence, Risk, and Protective Factors of Mild Traumatic Brain Injury in a Cohort of Australian Nonprofessional Male Rugby Players. *Am J Sports Med.* 2009; Dec; 37 (12): 2328–33.
- Halstead ME, Walter KD, Moffatt K, Council on sports medicine and fitness. Sport-Related Concussion in Children and Adolescents. *Pediatrics* December. 2018; 142 (6): e20183074.
- Virji-Babul N, Borich MR, Makan N, Moore T, Frew K, Emery CA, et al. Diffusion tensor imaging of sports-related concussion in adolescents. *Pediatr Neurol.* 2013; 48 (1): 24–29.
- Feldman HM, Yeatman JD, Lee ES, Barde LH, Gaman-Bean S. Diffusion tensor imaging: a review for pediatric researchers and clinicians. *J Dev Behav Pediatr.* 2010; 31 (4): 346–56.
- Van BL, Ghesquière P, Lagae L, De SB. Arithmetic difficulties in children with mild traumatic brain injury at the subacute stage of recovery. *Dev Med Child Neurol.* 2015; 57 (11): 1042–8.
- Gasparovic C, Yeo R, Mannell M, Ling J, Elgie R, Phillips J, et al. Neurometabolite concentrations in gray and white matter in mild traumatic brain injury: an <sup>1</sup>H-magnetic resonance spectroscopy study. *J Neurotrauma.* 2009; 26 (10): 1635–43.
- Yeo RA, Phillips JP, Jung RE, Brown AJ, Campbell RC, Brooks WM. Magnetic resonance spectroscopy detects brain injury and predicts cognitive functioning in children with brain injuries. *J Neurotrauma.* 2006; 23 (10): 1427–35.
- Vagnozzi R, Signoretti S, Floris R, Marziali S, Manara M, Amorini AM, et al. Decrease in N-acetylaspartate following concussion may be coupled to decrease in creatine. *J Head Trauma Rehabil.* 2013; 28 (4): 284–92.
- Babikian T, Freier MC, Ashwal S, Riggs ML, Burley T, Holshouser BA. MR spectroscopy: predicting long-term neuropsychological outcome following pediatric TBI. *J Magn Reson Imaging.* 2006; 2 (4): 801–11.
- McCrea M, Meier T, Huber D, Pfito A, Bigler E, Debert CT, et al. Role of advanced neuroimaging, fluid biomarkers and genetic testing in the assessment of sport-related concussion: a systematic review. *Br J Sports Med.* 2017; 51 (12): 919–29.
- Halstead ME, Walter KD. Clinical report—sport-related concussion in children and adolescents. *Pediatrics.* 2010; 126 (3): 597–615.
- Dambinova SA, Shikuev AV, Weissman JD, Mullins CD. AMPAR Peptide Values in Blood of Nonathletes and Club Sport Athletes With Concussions. *Military Medicine.* 2013; 178 (3): 285–90.
- Dambinova KT, Aliev EV, Bondarenko GV, Ponomarev AA, Skoromec AP, Skoromec TA, i dr. Biomarkery ishemii golovnogo mozga kak novyj metod dokazatel'stva jeffektivnosti nejrocitoprotektorov. *Zhurnal nevrologii i psichiatrii im. S. S. Korsakova.* 2017; 117 (5): 62–67. Russian.
- Len TK, Neary JP, Asmundson GJG, Goodman DG, Bjornson B, Bhambhani YN. Cerebrovascular reactivity impairment after sport-induced concussion. *Med Sci Sports Exerc.* 2011; 43 (12): 2241–8.
- Maugans TA, Farley C, Altave M, Leach J, Cecil KM. Pediatric sports-related concussion produces cerebral blood flow alterations. *Pediatrics.* 2012; 129 (1): 28–37.
- Wang Y, West JD, Bailey JN, Westfall DR, Xiao H, Arnold TW, et al. Decreased cerebral blood flow in chronic pediatric mild TBI: an MRI perfusion study. *Dev Neuropsychol.* 2015; 40 (1): 40–44.
- Moore DR, Pindus DM, Raine LB, Drollette ES, Scudder MR,

- Ellemberg D, et al. The persistent influence of concussion on attention, executive control, and neuroelectric function in preadolescent children. *Int J Psychophysiol.* 2016; 99: 85–95.
42. Moor RD, Jacob JK, Ellemberg D. The long-term outcomes of sport-related concussion in pediatric populations. *Int J Psychophysiol.* 2018; 132 (Pt A): 14–24.
  43. Baillargeon A, Lassonde M, Leclerc S, Ellemberg D. Neuropsychological and neurophysiological assessment of sport concussion in children, adolescents and adults. *Brain Inj.* 2012; 26 (3): 211–20.
  44. Nelson LD, Guskiewicz KM, Barr WB, Hammeke TA, Randolph C, Ahn KW, et al. Age differences in recovery after sport-related concussion: a comparison of high school and collegiate athletes. *J Athl Train.* 2016; 51 (2): 142–52.
  45. Hessen E, Nestvold K, Anderson V. Neuropsychological function 23 years after mild traumatic brain injury: a comparison of outcome after pediatric and adult head injuries. *Brain Inj.* 2007; 21 (9): 963–79.
  46. Babcock L, Byczkowski T, Wade SL, Ho M, Mookerjee S, Bazarian JJ. Predicting postconcussion syndrome after mild traumatic brain injury in children and adolescents who present to the emergency department. *JAMA Pediatr.* 2013; 167 (2): 156–61.
  47. Baillargeon A, Lassonde M, Leclerc S, Ellemberg D. Neuropsychological and neurophysiological assessment of sport concussion in children, adolescents and adults. *Brain Inj.* 2012; 26 (3): 211–20.
  48. Prins ML, Giza CC. Repeat traumatic brain injury in the developing brain. *Int J Dev Neurosci.* 2012; 30 (3): 185–90.
  49. Moore RD, Pindus DM, Drolette ES, Scudder MR, Raine LB, Hillman CH. The persistent influence of pediatric concussion on attention and cognitive control during flanker performance. *Biol Psychol.* 2015; 109: 93–102.
  50. Gessel LM, Fields SK, Collins CL, Dick RW, Comstock RD. Concussions among United States high school and collegiate athletes. *J Athl Train.* 2007; 42 (4): 495–503.
  51. Covassin T, Moran R, Elbin RJ. Sex differences in reported concussion injury rates and time loss from participation: an update of the National Collegiate Athletic Association Injury Surveillance Program from 2004–2005 through 2008–2009. *J Athl Train.* Large study summarizing sex differences in concussion rates and recovery after SRC in collegiate athletes. 2016; 51: 189–94.
  52. Ono KE, Burns TG, Bearden DJ, McManus SM, King H, Reisner A. Sex-based differences as a predictor of recovery trajectories in young athletes after a sports-related concussion. *Am J Sports Med.* 2016; 44 (3): 748–52.
  53. Tanveer SR, Zecavati N, Delasobera EB, Oyegbile TO. Gender differences in concussion and post-injury cognitive findings in an older and younger pediatric population. *Pediatr Neurol.* 2017; 70: 40–49.
  54. Caccese JB, Kaminski TW. Minimizing head acceleration in soccer: a review of the literature. *Sports Medicine.* 2016; 46 (11): 1591–604.
  55. Wallace J, Covassin T, Beidler E. Sex differences in high school athletes' knowledge of sport-related concussion symptoms and reporting behaviors. *J Athl Train.* 2017; 52: 682–8.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИМПТОМА ЦЕНТРАЛЬНОЙ ВЕНЫ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ДЕМИЕЛИНИЗИРУЮЩИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

С. Е. Белов<sup>1,2</sup>, И. Л. Губский<sup>2</sup>, В. Г. Лелюк<sup>2</sup>, А. Н. Бойко<sup>1,2</sup> ✉<sup>1</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия<sup>2</sup> Федеральный центр мозга и нейротехнологий Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Продолжается поиск биомаркеров, в том числе выявляемых с помощью методов нейровизуализации, обладающих высокой чувствительностью и специфичностью в диагностике РС. В качестве одного из них можно рассматривать симптом центральной вены, выявляемый при МРТ с использованием импульсной последовательности SWI и T2\*-взвешенных изображений. В то же время различаются данные по специфичности и чувствительности различных методов для выявления этого синдрома. Представлено два случая, близких по неврологическим нарушениям, требующих дифференциальной диагностики между РС и вторичной демиелинизацией на фоне системного заболевания (системной красной волчанки). Помимо рутинных МРТ-последовательностей, использовали SWI на томографе с индукцией магнитного поля 3 Тл. Подсчитывали очаги с симптомом центральной вены с определением доли перивенулярного поражения. В случае РС все рассматриваемые феномены локализовались перивенулярно, при вторичной демиелинизации на фоне системной красной волчанки доля очагов с симптомом центральной вены составила 16,7%. Последовательность SWI повышала информативность анализа.

**Ключевые слова:** симптом центральной вены, дифференциальная диагностика, рассеянный склероз, демиелинизирующее заболевание, ЦНС, вторичная демиелинизация, МРТ, SWI, SWAN

**Вклад авторов:** С. Е. Белов — анализ литературы, участие в разработке дизайна исследования, подбор пациентов, оценка клинических показателей, написание статьи; И. Л. Губский — участие в разработке дизайна исследования, получение и анализ данных МРТ, написание статьи; В. Г. Лелюк — участие в разработке дизайна исследования, анализ результатов МРТ, участие в написании статьи; А. Н. Бойко — участие в разработке дизайна исследования, подбор пациентов, оценка клинических показателей, написание статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Алексей Николаевич Бойко  
ул. Островитянова, д. 1, 117437, г. Москва; boykoan13@gmail.com

**Статья получена:** 15.07.2021 **Статья принята к печати:** 04.08.2021 **Опубликована онлайн:** 18.08.2021

**DOI:** 10.47183/mes.2021.021

## CENTRAL VEIN SIGN FOR DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF DEMYELINATING DISEASES OF CNS

Belov SE<sup>1,2</sup>, Gubsky IL<sup>2</sup>, Lelyuk VG<sup>2</sup>, Boyko AN<sup>1,2</sup> ✉<sup>1</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia<sup>2</sup> Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies of FMBA, Moscow, Russia

The search for highly sensitive and highly specific biomarkers of MS, including neuroimaging biomarkers, continues. One of such biomarkers is the central vein sign detectable on SW and T2-weighted MR images. The sensitivity and specificity of methods used for central vein sign detection vary. This article describes two clinical cases of patients with similar neurological symptoms which required making differential diagnosis between multiple sclerosis and secondary demyelination in the presence of a systemic disorder (systemic lupus erythematosus). In addition to routine MR sequences, we used SWI generated by a 3T scanner. The lesions with the central vein sign were counted; the proportion of perivenular lesions was determined. In the multiple sclerosis case, all the lesions were perivenular; the proportion of lesions with the central vein sign in the patient with secondary demyelination in the presence of systemic lupus erythematosus was 16.7%. The use of SW images improved the informative value of the analysis.

**Keywords:** central vein sign, differential diagnosis, multiple sclerosis, demyelinating disease, CNS, secondary demyelination, MRI, SWI, SWAN

**Author contribution:** Belov SE — literature analysis, study design, recruitment of patients, clinical analysis, manuscript preparation; Gubsky IL — study design, MRI examinations, MRI data analysis, manuscript preparation; Lelyuk VG — study design, MRI data analysis, manuscript preparation; Boyko AN — study design, recruitment of patients, clinical analysis, manuscript preparation.

**Compliance with ethical standards:** informed consent was obtained from both patients.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexey N. Boyko  
Ostrovityanova, 1, 117437, Москва; boykoan13@gmail.com

**Received:** 15.07.2021 **Accepted:** 04.08.2021 **Published online:** 18.08.2021

**DOI:** 10.47183/mes.2021.021

В связи с появлением и внедрением в клиническую практику препаратов, изменяющих течение рассеянного склероза (ПИТРС), накоплением данных о патогенезе и молекулярных основах развития рассеянного склероза (РС) особое значение приобретает адекватная диагностика данного заболевания. Поскольку пациенты с диагнозом «рассеянный склероз» (РС) нуждаются в длительной и дорогостоящей терапии, его своевременное установление имеет решающее значение. В настоящее время при диагностике РС используют обновленные критерии МакДональда 2017 г. [1], согласно которым необходимы подтверждения диссеминации демиелинизирующего

процесса в пространстве и времени (на основании результатов магнитно-резонансной томографии (МРТ) и/или клинических данных) и исключение других вероятных причин. В означенные критерии включен также анализ цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) на олигоклональные IgG [1]. Однако, несмотря на наличие диагностических критериев, случаи ошибочной диагностики нередки, в связи в том числе и с отсутствием специфичных только для РС МРТ-признаков, биохимических или иммунологических маркеров [2, 3]. Поэтому в настоящее время продолжается активный поиск специфичных биомаркеров данного заболевания. Одним из них может быть симптом центральной вены.

Симптом центральной вены определяют на МРТ при помощи SWI (susceptability-weighted images) — импульсной последовательности или последовательностей на основе градиентного эха с T2\*-взвешенностью. SWI чувствительна к парамагнетикам, суперпарамагнетикам и ферромагнетикам (дезоксигемоглобин, железо) и позволяет фиксировать локальные изменения магнитного поля [4]. Использование SWI при демиелинизирующем процессе в центральной нервной системе (ЦНС) позволяет визуализировать сосуд в очаге повреждения белого вещества (наблюдающаяся при этом гипоинтенсивность связана с наличием преобладания дезоксигемоглобина в центральной вене). Вокруг вены формируется аутоиммунное воспаление и очаг демиелинизации (бляшка) [5, 6].

После публикации Tallantyre и др. в 2008 г. появился ряд работ, демонстрирующий чувствительность симптома центральной вены для диагностики РС, а также дифференциальной диагностики его с другими демиелинизирующими процессами. Несмотря на то что эти исследования немногочисленны и проведены в небольших группах пациентов, они показали перспективность использования рассматриваемого феномена как возможного биомаркера РС [7–17]. В этих работах оценивали долю очагов с феноменом центральной вены и определяли порог, достаточный для надежной дифференциальной диагностики РС и РС-подобных заболеваний. Выводы исследований были примерно одинаковыми: порог частоты расположенных перивенулярно поражений, с высокой чувствительностью и специфичностью позволяющий дифференцировать РС от других демиелинизирующих заболеваний ЦНС, составил 40–50%. В данной работе мы приведем два клинических случая, в которых помимо рутинных МРТ-последовательностей использовали SWI для выявления феномена центральной вены.

### Описание клинических случаев

В приведенных ниже клинических примерах пациентам были проведены стандартные тесты для диагностики РС: осмотр и оценка неврологического статуса с использованием шкалы EDSS (Expanded Disability Status Scale), люмбальная пункция с анализом ЦСЖ и сыворотки на олигоклональные антитела, МРТ с применением внутривенного контрастирования и рутинных для диагностики РС импульсных последовательностей с дополнительным использованием SWI для оценки симптома центральной вены.

Мы использовали томограф Discovery 750w (General Electric; США) с индукцией магнитного поля 3 Тл. На томографах GE SWI имеет коммерческое название SWAN. Его технические характеристики следующие: размер окна (FOV, field of view) — 22 см, число срезов — 178, время эха (TE, time echo) — 28 мс, время повторения (TR, time repetition) — 47 мс, угол отклонения (flip angle) — 8°, количество эхо-импульсов (number of echoes) — 6, толщина среза (slice thickness) — 0,8 мм [18].

Оценку симптома центральной вены проводили в соответствии с критериями Северо-Американской Ассоциации специалистов по нейровизуализации при рассеянном склерозе [19].

Центральная вена на МР-томограммах имеет следующие характеристики:

1) выглядит как тонкая гипоинтенсивная линия или маленькое пятнышко;

2) может быть визуализирована как минимум в двух проекциях и как минимум в одной представляет из себя тонкую линию;

3) имеет диаметр менее 2 мм;

4) проходит частично или полностью через очаг;

5) локализована в очаге центрально (примерно на одинаковом расстоянии от краев) и проходит через границу очага не более чем в двух местах, несмотря на формы очага.

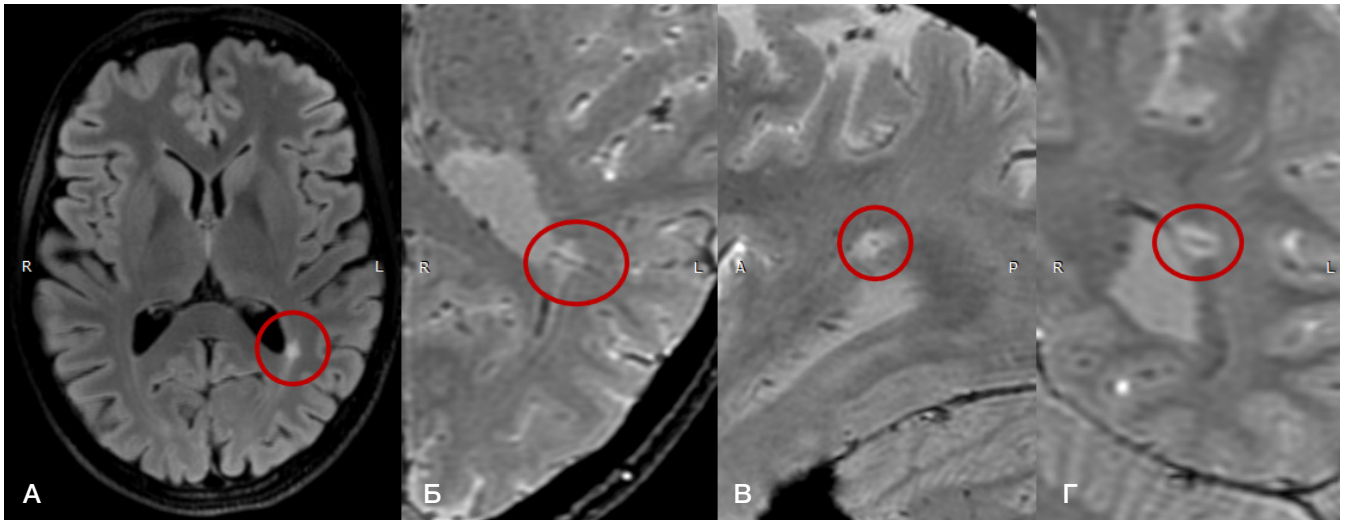
Критерии исключения для очага: повреждение менее 3 мм в диаметре; сливные очаги; очаг с несколькими разными венами; плохо визуализируемый очаг.

### Случай 1

Женщина, 32 года. Поступила с жалобами на онемение в правой руке, чувство жжения в левой половине тела, левых конечностях. Данные жалобы появились около месяца назад. Пациентка обратилась к неврологу. В результате МРТ головного мозга с контрастированием выявлена МР-картина множественных очагов в белом веществе головного мозга, вероятно демиелинизирующего характера, один из очагов накапливал контрастное вещество. На снимках есть очаги разной давности процесса, с накоплением контраста и без него. Через несколько дней добавилось ощущение болезненности при прикосновении, нарушения поверхностной чувствительности в левой половине туловища и конечностей по типу дизестезий. Проведена пульс-терапия метилпреднизолоном 5 г с некоторой положительной динамикой. Госпитализирована в неврологическое отделение для уточнения диагноза и лечения. Анамнез жизни: хронический гипотиреоз (принимает Л-тироксин, 50 мг), антитела (АТ) к аквапорины 4 (IgG+A+M): < 1:10 (норма: < 1:10); олигоклональный IgG (ЦСЖ/сыворотка) от 14 апреля 2021 г. — 2-й тип синтеза, типичный для аутоиммунного процесса в ЦНС. При исследовании зрительных вызванных потенциалов от 14 апреля 2021 г.: патологии не обнаружено.

Данные осмотра: состояние удовлетворительное. Положение: активное. Сознание: ясное. Рост — 172 см, вес — 58 кг. Телосложение нормостеническое. Частота дыхания 18 в минуту. Частота сердечных сокращений — 68 в минуту. Артериальное давление — 110/70 мм рт. ст. Симптом поколачивания отрицательный с двух сторон. Мочеиспускание свободное, дизурических жалоб нет. Стул контролирует, регулярный.

Неврологический статус: сознание ясное, речь не нарушена. Контактна, ориентирована в месте, времени и собственной личности правильно. Фон настроения ровный. Общемозговой и менингеальной симптоматики нет. Черепные нервы: I пара (*n. olfactorius*): обоняние не нарушено. II пара (*n. opticus*): зрение не нарушено. Нарушения полей зрения нет. III пара (*n. oculomotorius*), IV пара (*n. trochlearis*), VI пара (*n. abducens*): произвольные движения глазных яблок в полном объеме. Глазные щели: D = S. Зрачки: OD = OS, округлой формы, величина соответствует освещению. Фотореакции (прямая, содружественная) сохранены. V пара (*n. trigeminus*): корнеальные рефлексы живые. Чувствительность на лице не нарушена. Трофика и сила функции жевательных мышц не нарушены. VII пара (*n. facialis*): лицо симметрично. Расстройства чувствительности на передних 2/3 поверхности языка нет. VIII пара (*n. vestibulocochlearis*): слух сохранен. Нистагма нет. IX пара (*n. glossopharyngeus*), X пара (*n. vagus*), XI пара (*n. accessorius*): глоточный рефлекс



**Рис. 1.** Магнитно-резонансные томограммы первого пациента. **А.** T2-взвешенное изображение с подавлением сигнала свободной жидкости (FLAIR); аксиальный срез. Визуализируется перивентрикулярный очаг в области заднего рога левого бокового желудочка (красный овал). **Б.** Изображение, взвешенное по магнитной восприимчивости (SWI); аксиальный срез. Визуализируется симптом центральной вены в очаге, расположенном около заднего рога левого бокового желудочка (красный овал). **В.** Изображение, взвешенное по магнитной восприимчивости (SWI), сагиттальный срез; симптом центральной вены в виде точки в том же очаге (красный овал). **Г.** Изображение, взвешенное по магнитной восприимчивости (SWI), коронарный срез; симптом центральной вены в виде тонкой линии в том же очаге (красный овал)

живой D = S. *Uvula* находится по средней линии. Дисфония, дизартрия, дисфагия не выявлены. Положение головы не нарушено, произвольные движения головы и мышц плечевого пояса в полном объеме. XII пара (*n. hypoglossus*): язык по средней линии. Мышечный тонус не изменен. Парезов нет. Сухожильные рефлексы: повышены S < = D. Брюшные рефлексы не вызываются. Патологических рефлексов Бабинского нет с двух сторон. Нарушения поверхностной чувствительности в левых конечностях. Вибрационная чувствительность не нарушена. Симптомы натяжения периферических нервов (Ласега, Нери, Вассермана, Мацкевича) отсутствуют. S-образный сколиоз грудно-поясничного отделов позвоночника, дугой вправо. Правая лопатка выстоит. В позе Ромберга пациентка слегка пошатывается. Координаторные пробы выполняет удовлетворительно с обеих сторон. Нарушения функции тазовых органов отрицает. Оценка по шкале EDSS составила 2,0 балла, что указывает на умеренную степень инвалидизации.

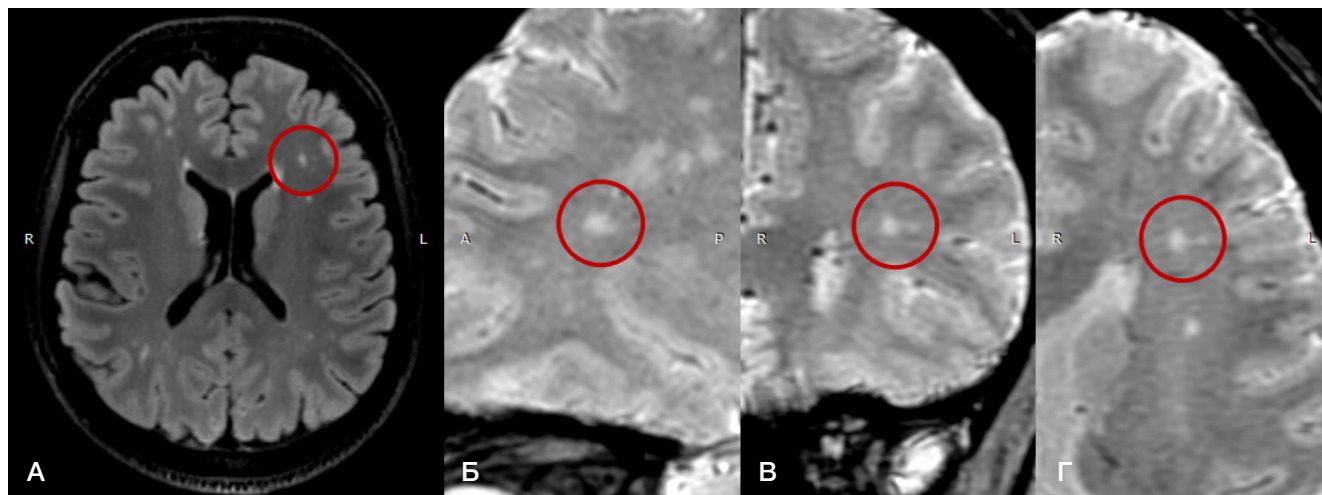
MPT головного и шейно-грудного отдела спинного мозга от 23 апреля 2021 г.: МР-картина супра- и инфратенториальных очагов в белом веществе головного мозга, вероятнее, демиелинизирующего характера (МР-картина соответствует критериям диссеминации в пространстве и критериям диссеминации во времени). При подсчете и оценке очагов на SWI и FLAIR общее количество супратенториальных очагов достигло шести. Из них подходят для оценки — четыре. Все четыре очага демонстрируют симптом центральной вены. Из двух, не подходящих под критерии оценки из-за размеров менее 3 мм, один очаг также демонстрировал данный симптом (рис. 1)

#### Случай 2

Женщина, 42 года. Госпитализирована в марте 2021 г. Жалобы при госпитализации: общая слабость, быстрая утомляемость, головные боли, головокружение, онемение в конечностях, мигрирующие боли во всем теле, нечеткость и выпадение участков зрения, неуверенность в левой ноге при ходьбе, периодическое недержание мочи.

Анамнез жизни: в августе 2017 г. случился приступ системного головокружения с тошнотой и рвотой, который продолжался 6–8 ч; пациентке был назначен бетастистин. Повторный приступ головокружения возник в ноябре, сопровождался тошнотой и рвотой; пациентка была госпитализирована в стационар, выписана без верифицированного диагноза. Ухудшение состояния произошло в мае 2018 г.; постепенно нарастает общемозговая симптоматика (головокружение), прогрессирующее ухудшение зрения, возникло онемение в конечностях, боли в позвоночнике, суставах, общая слабость. В анамнезе имеет место появление безболезненных язв на слизистой ротовой полости, повышенное выпадение волос (со слов пациентки). В области щек и носа появилась маляриная сыпь («бабочка»); отмечена повышенная фоточувствительность кожи. Однократно была проведена пульс-терапия метилпреднизолоном с положительным эффектом. Иммуномодулирующую терапию пациентке не назначали. В 2018 г. проведена люмбальная пункция: 3-й тип синтеза олигоклональных IgG (присутствуют и в сыворотке, и в ЦСЖ). Антитела к аквапорины 4 не обнаружены. Анти-МОГ (от 11 марта 2019 г.): 10,5 пг/мл (норма 0–15). Госпитализирована с целью проведения дообследования и подбора терапии.

Данные объективного осмотра: состояние удовлетворительное. Положение: активное. Рост — 165 см. Вес — 55 кг. Температура тела — 36,8 °C. На коже лица в области щек и крыльев носа отмечена зона маляриной сыпи по типу «бабочки». ЧДД — 16 в мин. АД — 120/70 мм рт. ст. Стул в норме. Мочеиспускание не нарушено. Неврологический статус: сознание ясное. Ориентация на местности, во времени, идентификация собственной личности — правильные. Продуктивному контакту доступна. Общемозговая симптоматика — головокружение несистемного характера. Менингеальных симптомов нет. Черепные нервы: I пара (*n. olfactorius*): обоняние (со слов пациентки) не нарушено, обонятельные галлюцинации отсутствуют. II пара (*n. opticus*): зрение снижено, прогрессивно ухудшается; выпадение полей зрения при ориентировочной оценке, зрительные галлюцинации



**Рис. 2.** Магнитно-резонансные томограммы второго пациента. **А.** T2-взвешенное изображение с подавлением сигнала свободной жидкости (FLAIR), аксиальный срез. Визуализируется округлый очаг в глубоком белом веществе левой лобной доли (красный овал). **Б.** Изображение, взвешенное по магнитной восприимчивости (SWI), аксиальный срез. Тот же очаг, симптом центральной вены не регистрируется (красный овал). **В.** Изображение, взвешенное по магнитной восприимчивости (SWI), сагиттальный срез. Тот же очаг, симптом центральной вены не визуализируется; рядом расположен более мелкий очаг, не подлежащий оценке (красный овал). **Г.** Изображение, взвешенное по магнитной восприимчивости (SWI), коронарный срез. Тот же очаг, симптом центральной вены не наблюдается (красный овал)

не выявлены. Цветовое восприятие не изменено. III пара (*n. oculomotorius*), IV пара (*n. trochlearis*), VI пара (*n. abducens*): произвольные движения глаз в полном объеме. Птоз не обнаружен. Зрачки: OD = OS. Фотореакции (прямая, содружественная) сохранены, аккомодация и конвергенция не снижены. V пара (*n. trigeminus*): корнеальные рефлексы живые. Чувствительность на лице сохранена. Трофика и сила функции жевательных мышц не нарушены. VII пара (*n. facialis*): лицо в покое и при проведении мимических проб симметрично. Мимика не снижена. Лакримации, сухости склеры, расстройств чувствительности на передних 2/3 поверхности языка нет. VIII пара (*n. vestibulocochlearis*): слух сохранен. Ощущение шума, звона в ушах нет. IX пара (*n. glossopharyngeus*): пареза мягкого неба нет, глоточный рефлекс живой. Uvula — по средней линии. X пара (*n. vagus*): глотание сохранено, элементы дисфагии, дисфонии не выявлены. XI пара (*n. accessorius*): положение головы не нарушено, произвольные движения головы и мышц плечевого пояса не ограничены. XII пара (*n. hypoglossus*): язык по средней линии, гипотрофии языка, фибрилляции нет. Двигательная система: сила в конечностях достаточная, мышечный тонус снижен. Сухожильные рефлексы: D = S, высокие, с расширенной рефлексогенной зоной. Симптом Бабинского отсутствует с двух сторон. Фасцикуляции, фибрилляции отсутствуют. Синкинезии не выявлены. Гиперкинезов нет. Тремор отсутствует. Система чувствительности: выявлена гипестезия в правых конечностях по проводниковому типу. Симптомы натяжения периферических нервов (Ласега, Нери) отрицательные. Система координации: в позе Ромберга несистемное пошатывание. Координаторные пробы выполняет с двух сторон с легкой интенцией. Походка не нарушена.

MPT головного мозга и шейно-грудного отдела спинного мозга от 3 марта 2021 г.: МР-картина множественных супратенториальных очагов в белом веществе головного мозга неспецифического характера (не соответствуют критериям диссеминации в пространстве и во времени), нельзя исключить аутоиммунный генез. При введении контрастного препарата при немедленном и отсроченном (спустя 15 мин) сканировании контрастное усиление не наблюдается. При подсчете и оценке очагов на SWI и FLAIR общее число супратенториальных очагов — около 40.

Точный подсчет произвести невозможно из-за маленьких размеров и сливного характера некоторых очагов. Из них подходят для оценки — шесть, остальные очаги не подходят для оценки ввиду малых размеров (менее 3 мм). Из шести очагов симптом центральной вены наблюдался только в одном (16,7%) (рис. 2).

### Обсуждение клинических случаев

#### Случай 1

Доля очагов с симптомом центральной вены у данной пациентки составила 100%. Учитывая довольно типичную картину заболевания, а также соответствие критериям МакДональда, был установлен диагноз: рассеянный склероз, ремиттирующее течение (по критериям МакДональда, 2017) [1].

#### Случай 2

С учетом 3-го типа синтеза олигоклональных антител, отсутствия антител к аквапорино 4, отсутствия выполнения критериев рассеянного склероза по данным МРТ (критерии МакДональда 2017 [1]) данных за первичное демиелинизирующее заболевание на данный момент нет. Состояние пациентки соответствует критериям системного аутоиммунного заболевания (4 из 11): наличие маляриной сыпи на лице, повышенная фоточувствительность, повышенный титр антинуклеарного фактора (до 1:640), а также указание в анамнезе на безболезненные язвы в ротовой полости, артрит. Был установлен диагноз. Основное заболевание: системное заболевание соединительной ткани неуточненное, вероятная системная красная волчанка. Осложнение: вторичное демиелинизирующее поражение ЦНС на фоне аутоиммунного системного заболевания.

### Заключение

В данных клинических примерах показана возможность использования симптома центральной вены в дифференциальной диагностике РС. Несмотря на довольно типичные случаи и отсутствие сомнений при

постановке диагноза и в первом, и во втором случаях, оценка МРТ головного мозга на SWI может помочь в трудных случаях, требующих дифференциальной диагностики первичной и вторичной демиелинизации. Метаанализы, обобщающие результаты немногочисленных работ на тему диагностической значимости симптома центральной вены в дифференциальной диагностике РС и РС-подобных заболеваний (болезнь малых сосудов головного мозга, вторичная демиелинизация на фоне ревматологических заболеваний, заболевания спектра оптиконеуромиелимита)

показывают, что при доле очагов с симптомом центральной вены более 45% диагноз «рассеянный склероз» вероятен с 97%-й чувствительностью и 99%-й специфичностью [15, 17, 18, 19]. Однако частота и подходы к анализу данного симптома при различных заболеваниях требуют дальнейшего изучения, так как имеющиеся исследования сделаны на маленьких выборках пациентов, а спектр заболеваний, требующих дифференциальную диагностику с РС, в доступных публикациях, довольно узок [20].

## Литература

1. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018; 17 (2): 162–73. DOI: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2.
2. Solomon AJ. Diagnosis, Differential Diagnosis, and Misdiagnosis of Multiple Sclerosis. *Continuum (Minneapolis, Minn).* 2019; 25 (3): 611–35. DOI: 10.1212/CON.0000000000000728.
3. Solomon AJ, Klein EP, Bourdette D. "Undiagnosing" multiple sclerosis: the challenge of misdiagnosis in MS. *Neurology.* 2012; 78 (24): 1986–91. DOI: 10.1212/WNL.0b013e318259e1b2.
4. Clarke MA, Pareto D, Pessini-Ferreira L, et al. Value of 3T Susceptibility-Weighted Imaging in the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Am J Neuroradiol.* 2020; 41 (6): 1001–8 DOI: 10.3174/ajnr.A6547.
5. Oh J, Sicotte NL. New imaging approaches for precision diagnosis and disease staging of MS? *Mult Scler.* 2020; 26 (5): 568–75. DOI: 10.1177/1352458519871817.
6. Tallantyre EC, Brookes MJ, Dixon JE, Morgan PS, Evangelou N, Morris PG. Demonstrating the perivascular distribution of MS lesions in vivo with 7-Tesla MRI. *Neurology.* 2008; 70: 2076–8. DOI: 10.1212/01.wnl.0000313377.49555.2e.
7. Tallantyre EC, Dixon JE, Donaldson I, Owens T, Morgan P S, Morris PG, Evangelou N. Ultra-high-field imaging distinguishes MS lesions from asymptomatic white matter lesions. *Neurology.* 2011; 76: 534–9 DOI: 10.1212/WNL.0b013e31820b7630.
8. Mistry N, Dixon J, Tallantyre E, Tench C, Abdel-Fahim R, Jaspan T, Morgan PS, Morris P, Evangelou N. Central veins in brain lesions visualized with high-field magnetic resonance imaging: a pathologically specific diagnostic biomarker for inflammatory demyelination in the brain. *JAMA Neurol.* 2013; 70 (5): 623–8 DOI: 10.1001/jamaneurol.2013.1405.
9. Maggi P, Absinta M, Grammatico M, et al. Central vein sign differentiates Multiple Sclerosis from central nervous system inflammatory vasculopathies. *Ann Neurol.* 2018; 83 (2): 283–94 DOI: 10.1002/ana.25146.
10. Maggi P, Absinta M, Sati P, et al. The "central vein sign" in patients with diagnostic "red flags" for multiple sclerosis: A prospective multicenter 3T study. *Mult Scler.* 2020; 26 (4): 421–32 DOI: 10.1177/1352458519876031.
11. Campion T, Smith RJP, Altmann DR, et al. FLAIR\* to visualize veins in white matter lesions: A new tool for the diagnosis of multiple sclerosis? *Eur Radiol.* 2017; 27 (10): 4257–63. DOI: 10.1007/s00330-017-4822-z.
12. Clarke MA, Samaraweera AP, Falah Y, et al. Single Test to ARIve at Multiple Sclerosis (STAR-MS) diagnosis: A prospective pilot study assessing the accuracy of the central vein sign in predicting multiple sclerosis in cases of diagnostic uncertainty. *Mult Scler.* 2020; 26 (4): 433–41. DOI: 10.1177/1352458519882282.
13. Cortese R, Magnollay L, Tur C, et al. Value of the central vein sign at 3T to differentiate MS from seropositive NMOSD. *Neurology.* 2018; 90 (14): e1183–e1190. DOI: 10.1212/WNL.0000000000005256.
14. Sparacia G, Agnello F, Gambino A, Sciortino M, Midiri M. Multiple sclerosis: High prevalence of the 'central vein' sign in white matter lesions on susceptibility-weighted images. *Neuroradiol J.* 2018; 31 (4): 356–61. DOI: 10.1177/1971400918763577.
15. Suh CH, Kim SJ, Jung SC, Choi CG, Kim HS. The "Central Vein Sign" on T2\*-weighted Images as a Diagnostic Tool in Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-analysis using Individual Patient Data. *Sci Rep.* 2019; 9 (1): 18188. DOI: 10.1038/s41598-019-54583-3.
16. Sinnecker T, Clarke MA, Meier D, et al. Evaluation of the central vein sign as a diagnostic imaging biomarker in multiple sclerosis. *JAMA Neurol.* 2019; 76 (12): 1446–56. DOI: 10.1001/jamaneurol.2019.2478.
17. Bhandari A, Xiang H, Lechner-Scott J, Agzarian M. Central vein sign for multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Clin Radiol.* 2020; 75 (6): 479.e9–479.e15. DOI: 10.1016/j.crad.2020.01.011.
18. Gaitán MI, Yañez P, Paday Formenti ME, Calandri I, Figueiredo E, Sati P, et al. SWAN-Venule: An Optimized MRI Technique to Detect the Central Vein Sign in MS Plaques. *Am J Neuroradiol.* 2020; 41 (3): 456–60. DOI: 10.3174/ajnr.A6437.
19. Sati P, Oh J, Constable RT, Evangelou N, Guttmann CR, Henry RG, et al. NAIMS Cooperative. The central vein sign and its clinical evaluation for the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement from the North American Imaging in Multiple Sclerosis Cooperative. *Nat Rev Neurol.* 2016; 12 (12): 714–22. DOI: 10.1038/nrneurol.2016.166.
20. Белов С. Е., Бойко А. Н. Симптом центральной вены в дифференциальной диагностике рассеянного склероза. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*, 2020, 12 (Прил. 1): 29–32.

## References

1. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018; 17 (2): 162–73. DOI: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2.
2. Solomon AJ. Diagnosis, Differential Diagnosis, and Misdiagnosis of Multiple Sclerosis. *Continuum (Minneapolis, Minn).* 2019; 25 (3): 611–35. DOI: 10.1212/CON.0000000000000728.
3. Solomon AJ, Klein EP, Bourdette D. "Undiagnosing" multiple sclerosis: the challenge of misdiagnosis in MS. *Neurology.* 2012; 78 (24): 1986–91. DOI: 10.1212/WNL.0b013e318259e1b2.
4. Clarke MA, Pareto D, Pessini-Ferreira L, et al. Value of 3T Susceptibility-Weighted Imaging in the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Am J Neuroradiol.* 2020; 41 (6): 1001–8 DOI: 10.3174/ajnr.A6547.
5. Oh J, Sicotte NL. New imaging approaches for precision diagnosis and disease staging of MS? *Mult Scler.* 2020; 26 (5): 568–75. DOI: 10.1177/1352458519871817.
6. Tallantyre EC, Brookes MJ, Dixon JE, Morgan PS, Evangelou N, Morris PG. Demonstrating the perivascular distribution of MS lesions in vivo with 7-Tesla MRI. *Neurology.* 2008; 70: 2076–8. DOI: 10.1212/01.wnl.0000313377.49555.2e.

7. Tallantyre EC, Dixon JE, Donaldson I, Owens T, Morgan P S, Morris PG, Evangelou N. Ultra-high-field imaging distinguishes MS lesions from asymptomatic white matter lesions. *Neurology*. 2011; 76: 534–9 DOI: 10.1212/WNL.0b013e31820b7630.
8. Mistry N, Dixon J, Tallantyre E, Tench C, Abdel-Fahim R, Jaspan T, Morgan PS, Morris P, Evangelou N. Central veins in brain lesions visualized with high-field magnetic resonance imaging: a pathologically specific diagnostic biomarker for inflammatory demyelination in the brain. *JAMA Neurol*. 2013; 70 (5): 623–8 DOI: 10.1001/jamaneurol.2013.1405.
9. Maggi P, Absinta M, Grammatico M, et al. Central vein sign differentiates Multiple Sclerosis from central nervous system inflammatory vasculopathies. *Ann Neurol*. 2018; 83 (2): 283–94 DOI: 10.1002/ana.25146.
10. Maggi P, Absinta M, Sati P, et al. The "central vein sign" in patients with diagnostic "red flags" for multiple sclerosis: A prospective multicenter 3T study. *Mult Scler*. 2020; 26 (4): 421–32 DOI: 10.1177/1352458519876031.
11. Champion T, Smith RJP, Altmann DR, et al. FLAIR\* to visualize veins in white matter lesions: A new tool for the diagnosis of multiple sclerosis? *Eur Radiol*. 2017; 27 (10): 4257–63. DOI: 10.1007/s00330-017-4822-z.
12. Clarke MA, Samaraweera AP, Falah Y, et al. Single Test to ARrive at Multiple Sclerosis (STAR-MS) diagnosis: A prospective pilot study assessing the accuracy of the central vein sign in predicting multiple sclerosis in cases of diagnostic uncertainty. *Mult Scler*. 2020; 26 (4): 433–41. DOI: 10.1177/1352458519882282.
13. Cortese R, Magnollay L, Tur C, et al. Value of the central vein sign at 3T to differentiate MS from seropositive NMOSD. *Neurology*. 2018; 90 (14): e1183–e1190. DOI: 10.1212/WNL.0000000000005256.
14. Sparacia G, Agnello F, Gambino A, Sciortino M, Midiri M. Multiple sclerosis: High prevalence of the 'central vein' sign in white matter lesions on susceptibility-weighted images. *Neuroradiol J*. 2018; 31 (4): 356–61. DOI: 10.1177/1971400918763577.
15. Suh CH, Kim SJ, Jung SC, Choi CG, Kim HS. The "Central Vein Sign" on T2\*-weighted Images as a Diagnostic Tool in Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-analysis using Individual Patient Data. *Sci Rep*. 2019; 9 (1): 18188. DOI: 10.1038/s41598-019-54583-3.
16. Sinnecker T, Clarke MA, Meier D, et al. Evaluation of the central vein sign as a diagnostic imaging biomarker in multiple sclerosis. *JAMA Neurol*. 2019; 76 (12): 1446–56. DOI: 10.1001/jamaneurol.2019.2478.
17. Bhandari A, Xiang H, Lechner-Scott J, Agzarian M. Central vein sign for multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Clin Radiol*. 2020; 75 (6): 479.e9–479.e15. DOI: 10.1016/j.crad.2020.01.011.
18. Gaitán MI, Yañez P, Paday Formenti ME, Calandri I, Figueiredo E, Sati P, et al. SWAN-Venule: An Optimized MRI Technique to Detect the Central Vein Sign in MS Plaques. *Am J Neuroradiol*. 2020; 41 (3): 456–60. DOI: 10.3174/ajnr.A6437.
19. Sati P, Oh J, Constable RT, Evangelou N, Guttmann CR, Henry RG, et al. NAIMS Cooperative. The central vein sign and its clinical evaluation for the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement from the North American Imaging in Multiple Sclerosis Cooperative. *Nat Rev Neurol*. 2016; 12 (12): 714–22. DOI: 10.1038/nrneurol.2016.166.
20. Belov SE, Boyko AN. The symptom of the central vein in the differential diagnosis of multiple sclerosis. *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*, 2020, 12 (Suppl. 1): 29–32. Russian.