

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 Надежда Тихомирова, 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. Н. Бойко, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
И. В. Борисевич, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
А. Ю. Бушманов, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Р. Валента, 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. Олесева, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Р. В. Петров, д. м. н., профессор, академик РАН (Москва, Россия)
А. С. Радилов, 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)
С. В. Сидоркевич, д. м. н. (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@fmmba.press

ПЕРЕПИСКА С РЕДАКЦИЕЙ editor@fmmba.press

СОТРУДНИЧЕСТВО manager@fmmba.press

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

Журнал включен в Scopus в 2022 г.

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.2022-01

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

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

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



Подписано в печать 31.03.2022
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 Nadezda Tikhomirova, 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)
Boyko AN, DSc, professor (Moscow, Russia)
Borisevich IV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Bushmanov AY, DSc, professor (Moscow, Russia)
Valenta R, PhD, 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)
Sidorkevich SV, DSc (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

Akileev 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)
Panasenkov 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@fmbs.press

CORRESPONDENCE editor@fmbs.press

COLLABORATION manager@fmbs.press

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

Indexed in Scopus in 2022

Indexed in RSCI. IF 2018: 0,570

Listed in HAC 31.01.2020 (№ 1292)

Open access to archive



ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)



Issue DOI: 10.47183/mes.2022-01

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

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

The journal is distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License www.creativecommons.org



Approved for print 31.03.2022
Circulation: 500 copies. Printed by Print.Formula
www.print-formula.ru

МЕТОД	5
Разработка ПЦР-теста для выявления генетических вариантов альфа, бета, гамма, дельта вируса SARS-COV-2 Г. А. Шипулин, Ю. А. Савочкина, А. К. Шурыева, Е. Е. Шивлягина, А. О. Носова, Е. Е. Давыдова, А. Р. Лупарев, Т. В. Малова, С. М. Юдин Development of PCR test for detection of the SARS-CoV-2 genetic variants Alpha, Beta, Gamma, Delta Shipulin GA, Savochkina YuA, Shuryaeva AK, Shivlyagina EE, Nosova AO, Davydova EE, Luparev AR, Malova TV, Yudin SM	
ОБЗОР	13
Поражение печени у больных COVID-19 Д. А. Вологжанин, А. С. Голота, Т. А. Камилова, С. В. Макаренко, С. Г. Щербак Liver damage in patients with COVID-19 Vologzhanin DA, Golota AS, Kamilova TA, Makarenko SV, Scherbak SG	
ОБЗОР	21
Дендримеры PAMAM и перспективы их применения в медицине Е. В. Попова, Д. В. Криворотов, Р. В. Гамазков, А. С. Радиллов PAMAM dendrimers and prospects of their application in medicine Popova EV, Krivorotov DV, Gamazkov RV, Radilov AS	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	29
Особенности динамики психоэмоционального истощения у медицинского персонала COVID-госпиталя с различной интенсивностью трудовой нагрузки С. Е. Назарян, А. С. Самойлов, В. И. Седин Specifics of the workload-dependent dynamics of psycho-emotional exhaustion among medical staff of a COVID hospital Nazaryan SE, Samoilov AS, Sedin VI	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	36
Влияние однократной процедуры комбинированной микрополяризации на вегетативную регуляцию и сенсорно-моторные реакции И. Б. Сиваченко, Д. С. Медведев, Т. А. Фёдорова, М. В. Цимбал, Н. В. Штейнберг, Г. А. Моисеенко The effect of a single procedure of combined micropolarization on autonomic regulation and sensorimotor reactions Sivachenko IB, Medvedev DS, Fedorova TA, Tsimbal MV, Steinberg NV, Moiseenko GA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	43
Антимикробная и вирулицидная активность трехкомпонентного комплекса хлоргексидин-ЭДТА-цинк В. А. Галынкин, А. Х. Еникеев, Е. П. Подольская, А. С. Гладчук, Т. И. Виноградова, Н. В. Заболотных, М. З. Догонадзе, К. А. Краснов Antimicrobial and antiviral activity of three-component complex of chlorhexidine-EDTA-zinc Galinkin VA, Enikeev AKh, Podolskaya EP, Gladchuk AS, Vinogradova TI, Zabolotnykh NV, Dogonadze MZ, Krasnov KA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	51
Моделирование миелоабляционной цитостатической терапии циклофосфаном сопровождается желудочно-кишечным стазом у крыс Т. В. Шефер, Ю. Ю. Ивницкий, В. Л. Рейнюк Modelling myeloablative cytostatic therapy with cyclophosphamide is accompanied by gastrointestinal stasis in rats Schäfer TV, Ivnitsky JuJu, Rejniuk VL	

Обнаружение бромдигидрохлорфенилбензодиазепина (феназепама) и его метаболита в биологическом объекте при сверхнизких концентрациях
А. А. Волкова, Р. А. Калёкин, Н. Е. Москалева, О. Г. Асташкина, А. М. Орлова, П. А. Маркин

Detection of ultra-low concentrations of bromodihydrochlorophenylbenzodiazepine (phenazepam) and its metabolites in biological objects
Volkova AA, Kalekin RA, Moskaleva NE, Astashkina OG, Orlova AM, Markin PA

Инфицированность вирусами гепатитов В, С и ТТV высококвалифицированных спортсменов

Л. И. Мельникова, Т. В. Кожанова, Л. Ю. Ильченко, И. А. Морозов, Н. В. Соболева, Nguyen Thi-Hanh, И. В. Круглова, И. В. Гордейчук

Hepatitis B, C and TTV virus infection in highly trained athletes

Melnikova LI, Kozhanova TV, Ilchenko LYu, Morozov IA, Sobleleva NV, Nguyen Thi-Hanh, Kruglova IV, Gordeychuk IV

Фокальная лазерная коагуляция перипапиллярной неоваскуляризации диска зрительного нерва при пролиферативной диабетической ретинопатии

Х. П. Тахчиди, Н. Х. Тахчиди, Т. А. Касмынина, Е. П. Тебина

Focal laser photocoagulation of the optic disc peripapillary neovascularization in patient with proliferative diabetic retinopathy

Takhchidi KhP, Takhchidi NKh, Kasminina TA, Tebina EP

РАЗРАБОТКА ПЦР-ТЕСТА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ АЛЬФА, БЕТА, ГАММА, ДЕЛЬТА ВИРУСА SARS-COV-2

Г. А. Шипулин, Ю. А. Савочкина, А. К. Шуряева , Е. Е. Шивлягина, А. О. Носова, Е. Е. Давыдова, А. Р. Лупарев, Т. В. Малова, С. М. Юдин

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

Возникновение новых вариантов коронавируса SARS-CoV-2, обладающих повышенной трансмиссивностью и снижающих эффективность его нейтрализации выработанными ранее антителами, представляет угрозу для здоровья населения во всем мире. Метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с флуоресцентными зондами, позволяющими детектировать единичные нуклеотидные замены, подходит для скрининга содержащих РНК SARS-CoV-2 образцов на наличие уже известных мутаций в S-гене, которые имеют функциональное значение, и выявление которых позволяет определять и дифференцировать геноварианты, имеющие наибольшее эпидемиологическое значение. Целью настоящей работы было разработать набор реагентов и методику для оперативного мониторинга распространения приоритетно значимых вариантов SARS-CoV-2. На основе выравнивания полногеномных последовательностей SARS-CoV-2, опубликованных в базе данных GISAID, были выбраны праймеры и LNA-модифицированные зонды для выявления мутаций в S-гене, характерных для генетических линий альфа, бета/гамма и дельта особой эпидемиологической значимости (VOC). Разработан и зарегистрирован набор реагентов в формате ОТ-ПЦР в реальном времени для выявления наиболее значимых мутаций в S-гене SARS-CoV-2, продемонстрированы его высокие аналитические и диагностические характеристики. Показано соответствие результатов выявления линий VOC и их основных мутаций разработанным набором с данными полногеномного секвенирования для 1500 образцов РНК SARS-CoV-2. Применение набора реагентов в сочетании с последующим секвенированием РНК SARS-CoV-2 в рамках проведения эпидемиологического мониторинга позволило оперативно установить факт появления на территории России геноварианта дельта и в дальнейшем отследить динамику изменения его распространенности в Московском регионе в период с апреля по сентябрь 2021 г.

Ключевые слова: коронавирус, COVID-19, SARS-CoV-2, N501Y, P681H, 69-70del, E484K, B.1.1.7, B.1.351, P.1, изоляты особой эпидемиологической значимости

Вклад авторов: Г. А. Шипулин, Ю. А. Савочкина, Е. Е. Давыдова, С. М. Юдин — планирование эксперимента; Г. А. Шипулин, Ю. А. Савочкина, С. М. Юдин — анализ литературы; А. К. Шуряева, Е. Е. Шивлягина, А. О. Носова, А. Р. Лупарев, Т. В. Малова — постановка эксперимента и интерпретация результатов; Ю. А. Савочкина, Е. Е. Шивлягина, А. О. Носова — разработка набора реагентов; А. Р. Лупарев — статистический анализ; Г. А. Шипулин, А. К. Шуряева — написание и редактирование рукописи; Е. Е. Давыдова, С. М. Юдин — редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации и ГОСТ Р ИСО 14155-2014.

 **Для корреспонденции:** Анна Константиновна Шуряева
ул. Погодинская, д. 10, стр. 1, 119121, г. Москва; ashuryaeva@cspmrz.ru

Статья получена: 15.12.2021 **Статья принята к печати:** 13.01.2022 **Опубликована онлайн:** 09.02.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.003

DEVELOPMENT OF PCR TEST FOR DETECTION OF THE SARS-COV-2 GENETIC VARIANTS ALPHA, BETA, GAMMA, DELTA

Shipulin GA, Savochkina YuA, Shuryaeva AK , Shivyagina EE, Nosova AO, Davydova EE, Luparev AR, Malova TV, Yudin SM

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

The emergence of novel SARS-CoV-2 genetic variants with increased transmissivity and reduced antibody neutralization efficiency is a threat to global public health. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with the use of fluorescent probes, which make it possible to detect the single nucleotide substitutions, is a technique suitable for screening the SARS-CoV-2 RNA-containing samples for the already known functionally significant mutations in the S-gene, identification of which allows to define and differentiate the most epidemiologically significant genetic variants. The study was aimed to develop an assay for the large-scale monitoring of the spread of the SARS-CoV-2 top-priority variants. Based on the whole-genome alignment of the SARS-CoV-2 sequences, deposited in the GISAID database, primers and LNA-modified probes were selected to detect mutations in the S gene, typical for the Alpha, Beta/Gamma and Delta variants of concern (VOC). The developed reagent kit for detection of the key mutations in the SARS-CoV-2 S gene by the real time RT-PCR has good analytical and diagnostic characteristics and was authorized as a medical device (reagent) for *in vitro* use. The results of detecting the VOC and the key mutations with the use of the developed reagent kit were consistent with the data of the whole genome sequencing of 1,500 SARS-CoV-2 RNA samples. The developed reagent kit and the subsequent SARS-CoV-2 RNA sequencing assay used to perform the epidemiological monitoring of SARS-CoV-2 variants made it possible to promptly report the emergence of the Delta genetic variant in Russia, and to trace the dynamic changes in the prevalence of Delta in Moscow Region in April–September 2021.

Keywords: coronavirus, COVID-19, SARS-CoV-2, N501Y, P681H, 69-70del, E484K, B.1.1.7, B.1.351, P.1, VOC

Author contribution: Shipulin GA, Savochkina YuA, Davydova EE, Yudin SM — planning the experiment; Shipulin GA, Savochkina YuA, Yudin SM — literature analysis; Shuryaeva AK, Shivyagina EE, Nosova AO, Luparev AR, Malova TV — experimental procedure, data interpretation; Savochkina YuA, Shivyagina EE, Nosova AO — reagent kit development; Luparev AR — statistical analysis; Shipulin GA, Shuryaeva AK — manuscript writing and editing; Davydova EE, Yudin SM — manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was performed in accordance with the requirements of the Declaration of Helsinki and GOST R ISO 14155-2014.

 **Correspondence should be addressed:** Anna K. Shuryaeva
Pogodinskaya, 10, str. 1, 119121, Moscow; ashuryaeva@cspmrz.ru

Received: 15.12.2021 **Accepted:** 13.01.2022 **Published online:** 09.02.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.003

В конце 2019 г. в Китае был выявлен новый коронавирус, вызывающий опасное респираторное заболевание человека — COVID-19. После секвенирования генома вирус был отнесен к бетакоронавирусам и назван SARS-CoV-2 [1–3]. Высокая способность коронавирусов к приобретению новых мутаций хорошо известна [4]. Большинство возникающих мутаций не влияют на свойства вируса, однако некоторые из них могут приводить к функциональным изменениям, в том числе к увеличению скорости распространения вируса и/или тяжести течения заболевания.

С момента начала распространения нового коронавируса в базе данных GISAID опубликовано большое количество последовательностей геномов [5], что позволило следить как за распространением вируса, так и за возникновением новых мутаций в его геноме.

В декабре 2020 г. власти Великобритании заявили о возросшем числе случаев заражения COVID-19. Резкий рост заболеваемости был вызван новым генетическим вариантом коронавируса SARS-CoV-2, имевшим отличия от референсного генома. Он содержал мутации в гене S-белка [6, 7]. На основании филогенетического анализа вновь появившаяся британская линия SARS-CoV-2 была названа B.1.1.7, ее отнесли к вариантам особой эпидемиологической значимости (VOC). Вариант B.1.1.7 имеет ряд характерных мутаций в спайковом белке, в том числе N501Y, A570D, D614G и P681H, а также делеции аминокислот 69–70 и 144Y [8, 9]. Одновременно была выявлена еще одна эпидемиологически важная линия, вызвавшая вспышку в различных провинциях Южноафриканской республики, которая известна как B.1.351. Южноафриканский штамм содержит девять спайковых мутаций в дополнение к D614G, в том числе кластер мутаций (например, 242–244del и R246I) в N-концевом домене (NTD) шипа, три мутации (K417N, E484K и N501Y) в рецептор-связывающем домене (RBD) и одну мутацию (A701V) рядом с сайтом расщепления фурина [10, 11]. В январе 2021 г. специалисты Национального института инфекционных болезней в Японии обнаружили новый вариант SARS-CoV-2, изоляты которого были выявлены у прибывших из Бразилии туристов — линию P.1. Некоторые мутации бразильского штамма были найдены ранее в британском и южноафриканском вариантах. Данный изолят имеет 12 мутаций в спайковом белке, в том числе N501Y и E484K [12]. Позднее описанные выше генетические линии коронавируса назвали буквами греческого алфавита в соответствии с предложенной ВОЗ номенклатурой — альфа (B.1.1.7 и ее субварианты Q.1–Q.8), бета (B.1.351), гамма (P.1). Все три указанных генетических варианта SARS-CoV-2 включены Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) и Европейским центром контроля и профилактики заболеваний (ECDC) в категорию особой эпидемиологической значимости (VOC) и циркулируют по всему миру [6].

Весной 2021 г. в Индии выявили новую линию SARS-CoV-2 — B.1.617.2, которая стремительно распространялась и вызвала новую волну пандемии с резким ростом заболеваемости и числа летальных исходов сначала в Индии, а затем и в других странах в различных регионах мира. Линия B.1.617.2, как и ряд выявленных позднее близких генетических линий AY.1, AY.2–124, содержит следующие характерные мутации в белке S: T19R, E156G, del157/158, L452R, T478K, D614G, P681R и D950N, включая мутации внутри рецептор-связывающего домена [13]. Линия B.1.617.2, как и линии AY.1–124,

отнесены к категории наибольшего эпидемиологического значения, в соответствии с классификацией ВОЗ им дано наименование дельта.

По данным ряда публикаций, мутация N501Y в гене S, которая присутствует в геномах трех из четырех описанных выше линий VOC, влияет на аффинность связывания S-белка с ACE2-рецептором, что может приводить к повышению трансмиссивности [14–16]. Наличие мутации E484K может быть причиной ускользания вируса от моноклональных антител, возникших после ранее перенесенного заболевания, вызванного SARS-CoV-2 вариантами без этой мутации, или после вакцинации [17–19].

Опубликованы данные об увеличении средней продолжительности инфекции, вызванной штаммами, относящимися к линии альфа, по сравнению с аналогичным показателем для не относящихся к этой линии штаммов (13,3 дня против 8,2 дня соответственно) [20]. На сегодняшний момент нет данных, подтверждающих способность генетического варианта SARS-CoV-2 альфа ускользать от моноклональных антител, выработанных после вакцинации [8, 21–23]. При этом, согласно литературным данным, южноафриканский и бразильский варианты могут снижать эффективность некоторых вакцин против COVID-19 [7, 24]. Структурный анализ мутации RBD L452R вместе с расположенной в сайте расщепления фурина мутацией P681R показал, что эти мутации могут способствовать увеличению эффективности связывания с рецептором ACE2 и скорости расщепления S1–S2, обеспечивая увеличение трансмиссивности вируса. Наличие этой мутации в RBD-доме указывает на снижение связывания с выработанными моноклональными антителами и может влиять на их потенциал нейтрализации [13, 25].

Исходя из всего вышесказанного, выявление различных линий коронавируса и отслеживание распространения изолятов SARS-CoV-2, относящихся к линиям особой эпидемиологической значимости, является важной задачей.

В настоящее время секвенирование генома вируса представляет собой самый доступный метод, позволяющий обнаруживать новые быстро возникающие варианты SARS-CoV-2. Однако исследования методом геномного секвенирования являются дорогостоящими и занимают длительное время. Кроме того, в отличие от ПЦР метод имеет дополнительное ограничение по минимальной необходимой концентрации РНК вируса в образце. Метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) подходит для скрининга содержащих РНК SARS-CoV-2 образцов на наличие уже известных имеющих функциональное значение мутаций в S-гене коронавируса. Выявление таких мутаций позволяет определять и дифференцировать включенные в категорию VOC варианты вируса, которые имеют наибольшее эпидемиологическое значение. Использование олигонуклеотидных зондов с модифицированными LNA-нуклеотидами позволяет успешно выявлять даже однонуклеотидные замены в анализируемой последовательности гена [26]. Применение ОТ-ПЦР рекомендовано для увеличения объемов и производительности при скрининге приоритетно значимых генетических вариантов вируса руководством по выявлению и идентификации генетических вариантов SARS-CoV-2, подготовленном экспертами ВОЗ и ECDC [27]. Существуют зарубежные наборы реагентов для выявления важных мутаций в гене S-белка методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Например, набор реагентов корейского производителя PowerChek выявляет мутации,

Таблица. Каналы для флуорофоров и детектируемые мишени для каждой смеси

Канал для флуорофора / ОТ-ПЦР-смесь	Детектируемая РНК-мишень		
	FAM	JOE	ROX
2-A	мутация N501Y в гене S SARS-CoV-2	участок кодона 501 гена S SARS-CoV-2 без мутации N501Y	делеция 69-70del в гене S SARS-CoV-2
2-B	участок кодона 484 гена S SARS-CoV-2 без мутации E484K	мутация E484K в гене S SARS-CoV-2	мутация E484Q в гене S SARS-CoV-2
2-C	мутации P681H/R в гене S SARS-CoV-2	мутация L452R в гене S SARS-CoV-2	мутация P681R в гене S SARS-CoV-2

характерные для линий дельта, альфа, бета и гамма, а набор французского производителя ID детектирует мутации L452R, E484K и E484Q. В России зарегистрированы наборы реагентов для выявления мутаций, характерных только для линии альфа (выпущены ЦНИИЭ Роспотребнадзора и компанией «ДНК-Технология»), другие линии не охвачены.

Таким образом, разработка отечественного набора реагентов для оперативного мониторинга распространения приоритетно значимых вариантов SARS-CoV-2 чрезвычайно актуальна. В связи с этим разработаны методика и набор реагентов на основе ОТ-ПЦР для детекции спектра мутаций в S-гене коронавируса, характерных для четырех генетических вариантов особого эпидемиологического значения, и выявления РНК SARS-CoV-2 вариантов дельта, альфа и бета/гамма (без дифференцировки двух последних) путем выявления соответствующего сочетания основных мутаций. Целью настоящей работы было разработать набор, позволяющий выявлять мутации N501Y, P681H и делецию 69-70del, сочетание которых характерно для генетической линии альфа, мутацию E484K, которая в сочетании с мутацией N501Y характерна для генетических линий бета и гамма SARS-CoV-2, мутации P681R и L452R, сочетание которых характерно для генетической линии дельта, а также определять наличие каждой из указанных мутаций в отдельности. Разработанный набор может служить инструментом мониторинга, обеспечивая оперативное получение данных по динамике распространения штаммов (или генетических вариантов) коронавируса SARS-CoV-2 приоритетного эпидемиологического значения, обладающих функционально значимыми мутациями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн олигонуклеотидов для амплификации целевых участков S гена

Для выбора диагностических праймеров и зондов, детектирующих мутации, характерные для генетических линий коронавируса SARS-CoV-2 особой эпидемиологической значимости, использовали выравнивание полногеномных последовательностей коронавируса SARS-CoV-2, опубликованных в базе данных GISAID (дата обращения: 05.10.2021). На основе выравнивания определены участки с соответствующими мутациями в области S-гена вируса, подобраны праймеры и LNA-модифицированные зонды для выявления следующих мутаций в геноме коронавируса SARS-CoV-2: N501Y, делеции 69-70del, P681H и P681R, L452R, E484K, E484Q. Олигонуклеотиды подбирали в соответствии со стандартными требованиями к выбору праймеров и TaqMan-зондов [28, 29], используя онлайн-ресурсы Oligo Calc [30] и OligoAnalyzer Tool [31]. Термодинамические характеристики флуоресцентных зондов и их вторичную

структуру оценивали с помощью онлайн-сервиса Mfold Web Server [32]. Синтез олигонуклеотидов выполнен специалистами компании АО «Гентерра» (Россия).

Клинические образцы

Мазки из ротоглотки и носоглотки ($n = 10\ 297$) получены ФГБУЗ «Головной центр гигиены и эпидемиологии Федерального медико-биологического агентства» (г. Москва) в период с декабря 2020 г. по сентябрь 2021 г. от пациентов с симптомами ОРВИ. Образцы мазков собирали в пробирки с транспортной средой («ЦНИИЭ Роспотребнадзора»; Россия) и хранили при температуре $-70\ ^\circ\text{C}$ до испытания.

Экстракция РНК

Экстракцию РНК проводили с помощью набора «АмплиТест РИБО-преп» («ЦСП ФМБА»; Россия) в соответствии с инструкцией производителя. РНК элюировали в 50 мкл РНК-буфера. Образцы РНК хранили при температуре не выше $-70\ ^\circ\text{C}$ до использования.

ОТ-ПЦР

ОТ-ПЦР проводили в мультиплексном формате в соответствии с инструкцией. Помимо образцов РНК каждая постановка включала в себя положительные контрольные образцы (ПКО) A, B, C, ПКО W на дикий тип, а также отрицательный контроль постановки.

Анализ каждого образца на наличие мутаций, характерных для генетических линий особого эпидемиологического значения (VOC) альфа, дельта и бета/гамма, проводили в трех пробирках — на смесях 2-A, 2-B и 2-C. Анализировали кривые накопления флуоресцентного сигнала по трем различным каналам (табл.). Объем исследуемой РНК — 10 мкл.

Программа амплификации включала следующие стадии термоциклирования: $50\ ^\circ\text{C}$ — 15 мин, $95\ ^\circ\text{C}$ — 15 мин. Перечисленные ниже стадии повторяли 45 циклов: $95\ ^\circ\text{C}$ — 15 с, $60\ ^\circ\text{C}$ — 30 с, $72\ ^\circ\text{C}$ — 15 с.

Оптимизация набора реагентов «АмплиТест SARS-CoV-2 VOC v.2» выполнена на амплификаторах Rotor-Gene Q (Qiagen; Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories; США) и ДТпрайм («ДНК-Технология»; Россия).

Разработка ПКО

В качестве ПКО использовали смесь рекомбинантных плазмид, содержащих амплифицированные целевые фрагменты S-гена, которые являются мишенями для выбранных праймеров и зондов.

ПЦР-продукты очищали с помощью набора MiniElute Gel Extraction Kit (Qiagen; Германия), лигировали

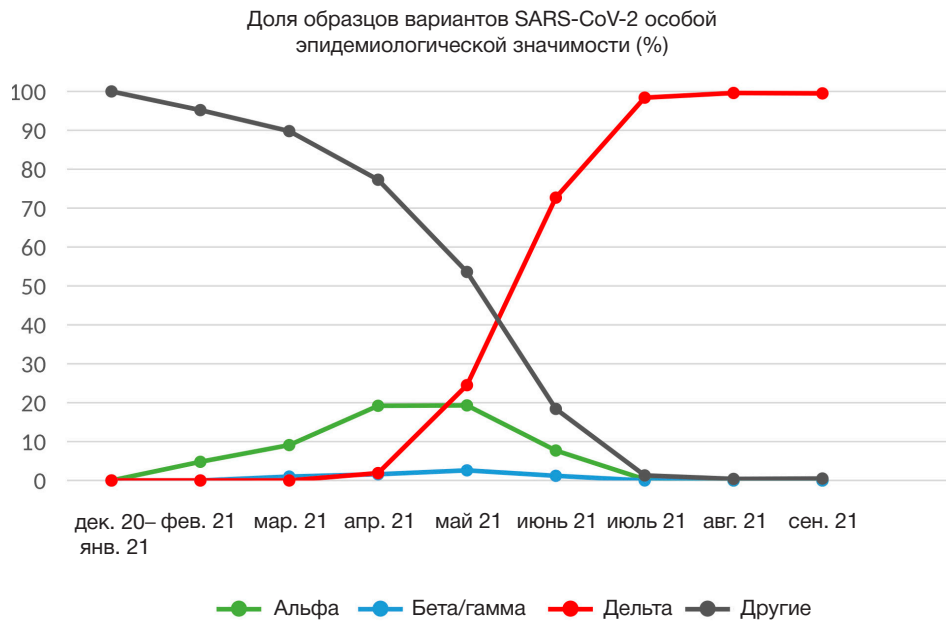


Рис. 1. Результаты тестирования образцов РНК SARS-CoV-2 ($n = 10\,297$), собранных на территории г. Москвы и Московской области в рамках мониторинга распространения линий особой эпидемиологической значимости с декабря 2020 г. по сентябрь 2021 г.

в плазмидный вектор pGEM-T (Promega; США) и трансформировали в *Escherichia coli*. Рекombинантные плазмиды из индивидуальных клонов очищали с помощью набора Plasmid Miniprep Kit (Axxygen; США). Нуклеотидные последовательности ПКО подтверждали с помощью секвенирования по Сэнгеру методом «cycle sequence» с использованием набора ABI PRISM Big Dye v.3.1 (Thermo Fisher Scientific; США) согласно инструкции изготовителя, используя капиллярный автоматический генетический анализатор Applied Biosystems Sanger Sequencing 3500 (Thermo Fisher Scientific; США). Для секвенирования использовали прямой и обратный праймеры, фланкирующие ПЦР-фрагмент.

Реакцию секвенирования проводили в объеме 5 мкл реакционной смеси в тонкостенных микропробирках объемом 0,2 мл. Реакционная смесь содержала 0,8 мкл специфичного праймера (прямого или обратного) в концентрации 1 мкМ и 1 мкл готовой смеси Ready Reaction BigDye Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific; США). Компоненты смеси аккуратно смешивали и проводили термоциклирование на амплификаторе SimpliAmp VeriFlex 96 (Thermo Fisher Scientific; США) по следующей программе: начальная денатурация — 2 мин при 95 °C, затем 45 циклов (денатурация 95 °C — 20 с, отжиг праймера 60 °C — 30 с, элонгация 68 °C — 1 мин). Капиллярный электрофорез проводили на генетическом анализаторе Applied Biosystems Sanger Sequencing 3500 (Thermo Fisher Scientific; США) после очистки образцов от избытка дидезоксинуклеотидов и солей.

Для набора реагентов разработали четыре ПКО: ПКО А, содержащий участок кодона 501 гена S SARS-CoV-2 с мутацией N501Y и участок гена S с делецией 69-70del; ПКО В, содержащий смесь рекombинантных плазмид с участками кодона 484 гена S SARS-CoV-2 с мутациями E484K и E484Q; ПКО С, содержащий плазмиды с мутациями P681H, L452R и P681R в гене S SARS-CoV-2; ПКО W, содержащий плазмиды с участками кодонов 484 и 501 гена S SARS-CoV-2 без мутаций N501Y и E484K.

Концентрацию каждого из ПКО измеряли методом цифровой капельной ПЦР (ddPCR) с использованием системы QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad

Laboratories; США). ПКО вводили на этапе постановки ОТ-ПЦР как отдельные образцы.

Аналитическая чувствительность и специфичность

Для оценки аналитической чувствительности использовали образцы РНК вируса SARS-CoV-2, полученные путем экстракции из биологического материала (мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки), которые исследовали с помощью разработанной диагностической системы для выявления минимального порогового разведения, при котором образец детектируется как положительный. Предварительно концентрацию каждого из образцов измеряли методом цифровой капельной ПЦР (ddPCR) с использованием системы QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad Laboratories; США). Порог чувствительности устанавливали по минимальному разведению, детектированному в трех повторях.

Для оценки аналитической специфичности набора реагентов использовали РНК штамма вируса SARS-CoV-2 № ГК2020/1 из коллекции НИЦЭМ имени Н. Ф. Гамалеи, РНК штаммов коронавирусов HCoV 229E, HCoV OC43, HCoV NI63, SARS-CoV HKU39849, MERS-CoV (European Virus ArchiveGlobal 011N-03868 — Coronavirus RNA specificity panel), штаммов вируса гриппа А (H1N1) (ATCC VR-1469), вируса гриппа А (H3N2) (ATCC VR-776) и вируса гриппа В (Victoria Lineage) (ATCC VR-1930) из коллекции ATCC (American Type Culture Collection; США), штаммов *Streptococcus pneumoniae* (№ 131116), *Streptococcus pyogenes* (№ 130001), *Haemophilus influenzae* (№ 151221), *Staphylococcus aureus* (№ 201108), *Klebsiella pneumoniae* из коллекции патогенных микроорганизмов (ГКПМ) НЦЭСМП Минздрава России, штаммов вируса парагриппа человека типов 1, 2, 3, риновируса человека типов 13, 17, 26 из Государственной коллекции НИИ гриппа имени А. А. Смородинцева в концентрации не менее 1×10^6 ГЭ/мл.

Полногеномное секвенирование образцов (WGS)

Референс-методом выявления мутаций в образцах РНК было полногеномное секвенирование (WGS).

В секвенирование взяли образцы с пороговым циклом (Ct) при постановке ОТ-ПЦР не более 25. Проведена обратная транскрипция образцов РНК с использованием набора реагентов «Реверта-Л» («ЦСП ФМБА»; Россия). Полученную кДНК амплифицировали с помощью панели олигонуклеотидов AmpliSeq for Illumina SARS-CoV-2 Research Panel (Illumina; США), которая содержит 247 ампликонов в двух пулах, полностью покрывающих геном вируса SARS-CoV-2. Подготовку библиотек для высокопроизводительного секвенирования выполняли с помощью набора реагентов AmpliSeq Library PLUS kit (Illumina; США). Качество библиотек оценивали методом капиллярного электрофореза с использованием системы Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent; США). Концентрацию библиотеки измеряли с помощью флуориметра Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific; США) с применением набора реактивов HS Qubit dsDNA (Thermo Fisher Scientific; США). Для секвенирования использовали систему Illumina NextSeq 550 и набор реагентов NextSeq 500/550 v2.5 (300 циклов) (Illumina; США). Все процедуры выполняли в соответствии с рекомендациями производителей.

Статистический анализ

Диагностическую чувствительность (долю положительных результатов теста в группе положительных образцов) рассчитывали как $B/(A+B) \times 100\%$, а диагностическую специфичность (долю отрицательных результатов теста в группе отрицательных образцов) — как $B/(A+B) \times 100\%$, где B — число исследованных проб, для которых с помощью набора получен положительный результат из общего числа проб, A — число исследованных проб, для которых с помощью набора получен отрицательный результат из общего числа проб с истинно положительным результатом. Доверительные интервалы диагностических характеристик рассчитывали по методу Клоппера–Пирсона, доверительную вероятность считали равной 95%.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При разработке набора реагентов в качестве мишеней были выбраны участки S-гена SARS-CoV-2, фланкирующие мутации, характерные для генетических линий SARS-CoV-2 альфа, бета/гамма и дельта. Подобраны праймеры и зонды для выявления мутаций N501Y, P681H и делеции 69-70del, сочетание которых характерно для генетической линии SARS-CoV-2 альфа (B.1.1.7), мутаций P681R и L452R, сочетание которых характерно для генетических линий дельта (B.1.617.2 и все варианты AY), мутации E484K, которая в сочетании с N501Y характерна для генетических линий бета и гамма (B.1.351/P.1, без дифференцировки этих линий).

Набор разработан в формате использования трех ОТ-ПЦР-смесей для проведения анализа, каждая из которых обеспечивает детекцию трех маркеров, регистрируемых по трем различным флуоресцентным каналам. Помимо основных мутаций в гене S спектр определяемых набором генетических маркеров дополнительно включает два кодона E484 и N501, соответствующие референсной последовательности РНК SARS-CoV-2. Они выступают в качестве эндогенного контроля для исключения ложноотрицательного результата.

Для определения аналитической специфичности проведено тестирование образцов других перечисленных выше вирусов и бактерий, ложных положительных результатов выявлено не было. При исследовании РНК

штамма вируса SARS-CoV-2 № ГК2020/1 из коллекции НИЦЭМ имени Н. Ф. Гамалеи с помощью набора не обнаружены мутации в кодонах 501, 484, 681 и 69-70 гена S SARS-CoV-2, результат соответствовал полногеномной нуклеотидной последовательности данного изолята, выложенной в базу данных GISAID (EPI_ISL_421275). Для всех образцов, не содержащих РНК SARS-CoV-2, получен следующий результат: недостаточно РНК SARS-CoV-2 для анализа.

Для определения аналитической чувствительности использовали образцы биологического материала с известной концентрацией РНК вируса SARS-CoV-2, определенной методом цифровой капельной ПЦР. Определяемые генетические варианты воспроизводимо выявляли до концентрации РНК SARS-CoV-2 1×10^3 копий/мл, что определило аналитическую чувствительность набора реагентов.

Диагностические характеристики разработанного набора реагентов оценены в ходе регистрационных клинических испытаний при исследовании образцов РНК SARS-CoV-2, охарактеризованных методом полногеномного секвенирования или секвенирования S-гена по Сенгеру. Для оценки диагностической чувствительности проанализированы 192 образца мазков из носо- и ротоглотки, в том числе 32 образца, содержащие РНК SARS-CoV-2 с комбинацией мутаций в S-гене, характерной для генетической линии альфа (B.1.1.7), 28 образцов, содержащих РНК SARS-CoV-2 с комбинацией мутаций, характерной для генетических линий бета/гамма (B.1.351/P.1), 50 образцов, содержащих РНК SARS-CoV-2 линии дельта (B.1.617.2 и все варианты AY). Для оценки диагностической специфичности использовали 82 образца РНК из мазков из носо- и ротоглотки, содержащих РНК SARS-CoV-2 без анализируемых мутаций. Во всех образцах выявлены все целевые мутации и их комбинации, соответствующие линиям дельта, альфа или бета/гамма. Дискордантные (неспецифичные) результаты не зафиксированы. Таким образом, определен показатель диагностической чувствительности (ДЧ), соответствующий 100% (ДЧ с 95%-й доверительной вероятностью составила 94,2–100% для линии дельта, 91,1–100% для линии альфа, 89,9–100% для линий бета/гамма). Показатель диагностической специфичности составил 100% (с 95%-й доверительной вероятностью — 96,4–100%).

В дальнейшем при практическом применении набора реагентов было показано полное соответствие результатов выявления линий VOC и их основных мутаций в сравнении с результатами полногеномного секвенирования для 1500 образцов, представляющих собой образцы РНК вируса линий альфа, бета, гамма и других линий (получены с марта по май 2021 г.) и дельта (получены с июня по август 2021 г.). Все проанализированные образцы имели соответствующие комбинации мутаций в S-гене, по которым были определены следующие генетические линии SARS-CoV-2: дельта ($n = 750$), альфа ($n = 302$), бета/гамма ($n = 32$), а также другие варианты ($n = 416$). Полученные результаты полностью соответствуют данным полногеномного секвенирования, что указывает на высокие диагностические характеристики набора реагентов.

За период с 1 декабря 2020 г. по 30 сентября 2021 г. протестированы более 10 000 клинических образцов РНК SARS-CoV-2, собранных на территории г. Москвы и Московской области в рамках мониторинга распространения линий SARS-CoV-2 особой эпидемиологической значимости. Полученные результаты учтены по месяцам и представлены с указанием доли выявляемых вариантов (рис.). На

протяжении исследуемого периода (с декабря 2020 г. по сентябрь 2021 г.) наблюдали появление линий особой эпидемиологической значимости или отдельных имеющих функционально важное значение мутаций, изменение их встречаемости и дальнейшее вытеснение новыми вариантами вируса SARS-CoV-2. Так, среди образцов, полученных в декабре 2020 г. – январе 2021 г. не был обнаружен ни один изолят с мутациями, характерными для линий особой значимости, а в последующие несколько месяцев наблюдалось последовательное увеличение доли отдельных линий в каждом периоде по сравнению с предыдущим. За пять месяцев доля образцов РНК SARS-CoV-2, содержащих мутации, характерные для линий бета/гамма, изменилась с 0 до 1,6%, а доля образцов, относящихся к линии альфа, выросла с 0 до 19,2%. Доля варианта дельта резко возросла до 25% к концу мая, достигла 87% к середине июня 2021 г., превысила 95% в первую неделю июля и была выше 99% в последующие месяцы до конца исследуемого периода.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Появление новых вариантов SARS-CoV-2 вызывает серьезную озабоченность во всем мире, так как новые линии потенциально могут иметь более высокую трансмиссивность, влиять на длительность и тяжесть заболевания, снижать эффективность вакцин, увеличивать показатели смертности [6, 7, 14–20, 24].

В настоящее время полногеномное секвенирование представляет собой наиболее распространенный универсальный метод выявления новых вариантов SARS-CoV-2. К сожалению, это очень трудоемкий, дорогостоящий и требующий больших временных затрат метод. ОТ-ПЦР представляет собой эффективную альтернативу, подходящую для выявления ранее охарактеризованных мутаций (маркеров основных линий), детекция которых важна для мониторинга распространения геновариантов и понимания эпидемиологической обстановки.

В результате проделанной работы создана диагностическая система в формате ОТ-ПЦР в реальном времени для выявления мутаций, которые имеют функциональное значение и позволяют определить генетические линии VOC коронавируса SARS-CoV-2. Анализ состоит из этапов выделения РНК, обратной транскрипции РНК, амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени и интерпретации результатов.

Представленный набор позволяет дифференцировать РНК коронавируса SARS-CoV-2 вариантов альфа, бета/

гамма и дельта от других генетических линий по выявляемым сочетаниям характерных мутаций. По данным ряда исследований [15–23], наличие отдельных мутаций (E484K, N501Y, P681H, P681R), связанных с другими генетическими вариантами коронавируса, приводит к имеющим функциональное значение изменениям в структуре S-белка — например, способствующих увеличению трансмиссивности вируса и снижению эффективности его нейтрализации антителами, выработанными при инфекции другими ранее распространенными вариантами вируса или вакцинации. Поэтому выявление данных мутаций отдельно без учета их сочетаний также имеет эпидемиологическое значение.

Набор имеет высокую аналитическую чувствительность (1×10^3 копий/мл РНК SARS-CoV-2) для каждого из определяемых генетических вариантов и 100%-ю аналитическую специфичность в рамках протестированной панели микроорганизмов. Диагностическая чувствительность с 95%-й доверительной вероятностью составила 94,2–100% для линии дельта, 91,1–100% для линии альфа, 89,9–100% для линий бета/гамма, а диагностическая специфичность с 95%-й доверительной вероятностью — 96,4–100%.

Применение разработанного набора реагентов в рамках эпидемиологического мониторинга позволило своевременно отследить появление штаммов SARS-CoV-2 варианта дельта в г. Москве в апреле 2021 г. и оперативно отразить динамику резкого роста доли штаммов дельта среди вариантов SARS-CoV-2, выявляемых у обследуемых в Московском регионе. Необходимо отметить, что возникновение и дальнейшее распространение варианта дельта в России привело к практически полному вытеснению других линий коронавируса.

ВЫВОДЫ

В ЦСП ФМБА России разработан чувствительный, специфичный и простой в использовании набор реагентов «АмплиТест SARS-CoV-2 VOC v.2» для выявления мутаций в S-гене коронавируса, характерных для генетических линий альфа, бета/гамма и дельта, методом ОТ-ПЦР. Набор проверили на образцах РНК коронавируса, результаты исследования валидировали полногеномным секвенированием, получив полное совпадение. Применение разработанного набора реагентов позволяет быстро и эффективно анализировать распространение генетических линий коронавируса и, исходя из результатов, незамедлительно принимать соответствующие противоэпидемические меры.

Литература

1. Bogoch II, Watts A, Thomas-Bachli A, Huber C, Kraemer MUG, Khan K, et al. Pneumonia of unknown aetiology in Wuhan, China: potential for international spread via commercial air travel. *J Travel Med.* 2020; 27 (2): 1–3.
2. Hui DS, I Azhar E, Madani TA, Ntoumi F, Kock R, Dar O, et al. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health — The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *Int J Infect Dis.* 2020; 91: 264–6.
3. Rothan HA, Byrareddy SN. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *J Autoimmun.* 2020 May; 109:102433.
4. Sánchez CM, Gebauer F, Suñé C, Mendez A, Dopazo J, Enjuanes L. Genetic evolution and tropism of transmissible gastroenteritis coronaviruses. *Virology.* 1992 Sep; 190 (1): 92–105.
5. GISAID EpiFlu™ Database. Available from: <http://www.GISAID.org>.
6. World Health Organization. Available from: <https://www.who.int>.
7. Llaure AS, Hodcroft EB. Genetic variants of SARS-CoV-2 — What do they mean? *JAMA.* 2021; 325: 529–31.
8. CDC 2021. Emerging SARS-CoV-2 variants. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/more/science-and-research/scientific-brief-emerging-variants.html>.
9. Grubaugh ND, Hodcroft EB, Fauver JR, Phelan AL, Cevik M. Public health actions to control new SARS-CoV-2 variants. *Cell.*

- 2021;184 (5): 1127–32.
10. Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, Iranzadeh A, Fonseca V, Giandhari J, et al. Emergence and rapid spread of a new severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) lineage with multiple spike mutations in South Africa. *MedRxiv*. 2020; 12.21.20248640.
11. Nelson G, Buzko O, Spilman PR, Niazi K, Rabizadeh S, Soon-Shiong PR. Molecular dynamic simulation reveals E484K mutation enhances spike RBD-ACE2 affinity and the combination of E484K, K417N and N501Y mutations (501Y.V2 variant) induces conformational change greater than N501Y mutant alone, potentially resulting in an escape mutant. *bioRxiv*. 2021.01.13.426558.
12. National Institute of Infectious Diseases of JAPAN Brief report 12.01.2021. Available from: <https://www.niid.go.jp/niid/images/epi/corona/covid19-33-en-210112.pdf>.
13. Cherian S, Potdar V, Jadhav S, Yadav P, Gupta N, Das M, et al. Convergent evolution of SARS-CoV-2 spike mutations, L452R, E484Q and P681R, in the second wave of COVID-19 in Maharashtra, India. *Microorganisms*. 2021; 9 (7): 1542.
14. Lacobucci G. Covid-19: New UK variant may be linked to increased death rate, early data indicate. *BMJ*. 2021; 372: n230.
15. Santos JC, Passos GA. The high infectivity of SARS-CoV-2 B.1.1.7 is associated with increased interaction force between Spike-ACE2 caused by the viral N501Y mutation. *bioRxiv*. 2020.12.29.424708.
16. Davies NG, Abbott S, Barnard RC, Jarvis CI, Kucharski AJ, Munday JD, et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science*. 2021; 372 (6538): eabg3055.
17. Cele S, Gazy I, Jackson L, Hwa SH, Tegally H, Lustig G, et al. Escape of SARS-CoV-2 501Y.V2 from neutralization by convalescent plasma. *Nature*. 2021; 593 (7857): 142–6.
18. Wibmer CK, Ayres F, Hermanus T, Madzivhandila M, Kgagudi P, Oosthuysen B, et al. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. *Nat Med*. 2021; 27: 622–5.
19. Garcia-Beltran WF, Lam EC, St Denis K, Nitido AD, Garcia ZH, Hauser BM, et al. Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. *Cell*. 2021; 184 (9): 2372–2383.e9.
20. Kissler S, Fauver JR, Mack C, Tai C, Breban MI, et al. Densely sampled viral trajectories suggest longer duration of acute infection with B.1.1.7 variant relative to non-B.1.1.7 SARS-CoV-2. Harvard University's DASH repository 2021. *medRxiv*. 2021.
21. Callaway E, Mallapaty S. Novavax offers first evidence that COVID vaccines protect people against variants. *Nature*. 2021; 590: 17.
22. Greaney AJ, Loes AN, Crawford KHD, Starr TN, Malone KD, Chu HY, et al. Comprehensive mapping of mutations to the SARS-CoV-2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human serum antibodies. *Cell Host Microbe*. 2021; 29 (3): 463–476.e6.
23. Wu K, Werner AP, Moliva JI, Koch M, Choi A, et al. mRNA-1273 vaccine induces neutralizing antibodies against spike mutants from global SARS-CoV-2 variants. *BioRxiv*. 2021. 01.25.427948.
24. Elbe S, Buckland-Merrett G. Data, disease and diplomacy: GISAID's innovative contribution to global health. *Global challenges* (Hoboken, NJ). 2017; 1: 33–46.
25. Starr TN, Greaney AJ, Hilton SK, Ellis D, Crawford KHD, Diggins AS, et al. Deep mutational scanning of SARS-CoV-2 receptor binding domain reveals constraints on folding and ACE2 binding. *Cell*. 2020; 182 (5): 1295–1310.e20.
26. You Y, Moreira BG, Behlke MA, Owczarzy R. Design of LNA probes that improve mismatch discrimination. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34 (8): e60.
27. European Centre for Disease Prevention and Control, WHO Regional Office for Europe. Methods for the detection and identification of SARS-CoV-2 variants. 3 March 2021. ECDC and WHO Regional Office for Europe: Stockholm and Copenhagen. 2021.
28. Van Pelt-Verkuil E, van Belkum A, Hays JP. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. Springer Science & Business Media. 2008; 330 p.
29. Yuryev A. Methods in Molecular Biology: PCR Primer Design. Humana Press. 2007; 432 p.
30. Kibbe WA. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res*. 2007. Available from: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>.
31. Integrated DNA Technologies. OligoAnalyzer Tool. Available from: <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>.
32. The mfold Web Server (Hosted by The RNA Institute, College of Arts and Sciences). Available from: <http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>.

References

1. Bogoch II, Watts A, Thomas-Bachli A, Huber C, Kraemer MUG, Khan K, et al. Pneumonia of unknown aetiology in Wuhan, China: potential for international spread via commercial air travel. *J Travel Med*. 2020; 27 (2): 1–3.
2. Hui DS, I Azhar E, Madani TA, Ntoumi F, Kock R, Dar O, et al. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health — The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *Int J Infect Dis*. 2020; 91: 264–6.
3. Rothan HA, Byrareddy SN. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *J Autoimmun*. 2020 May; 109:102433.
4. Sánchez CM, Gebauer F, Suñé C, Mendez A, Dopazo J, Enjuanes L. Genetic evolution and tropism of transmissible gastroenteritis coronaviruses. *Virology*. 1992 Sep; 190 (1): 92–105.
5. GISAID EpiFlu™ Database. Available from: <http://www.GISAID.org>.
6. World Health Organization. Available from: <https://www.who.int>.
7. Luring AS, Hodcroft EB. Genetic variants of SARS-CoV-2 — What do they mean? *JAMA*. 2021; 325: 529–31.
8. CDC 2021. Emerging SARS-CoV-2 variants. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/more/science-and-research/scientific-brief-emerging-variants.html>.
9. Grubaugh ND, Hodcroft EB, Fauver JR, Phelan AL, Cevik M. Public health actions to control new SARS-CoV-2 variants. *Cell*. 2021;184 (5): 1127–32.
10. Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, Iranzadeh A, Fonseca V, Giandhari J, et al. Emergence and rapid spread of a new severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) lineage with multiple spike mutations in South Africa. *MedRxiv*. 2020; 12.21.20248640.
11. Nelson G, Buzko O, Spilman PR, Niazi K, Rabizadeh S, Soon-Shiong PR. Molecular dynamic simulation reveals E484K mutation enhances spike RBD-ACE2 affinity and the combination of E484K, K417N and N501Y mutations (501Y.V2 variant) induces conformational change greater than N501Y mutant alone, potentially resulting in an escape mutant. *bioRxiv*. 2021.01.13.426558.
12. National Institute of Infectious Diseases of JAPAN Brief report 12.01.2021. Available from: <https://www.niid.go.jp/niid/images/epi/corona/covid19-33-en-210112.pdf>.
13. Cherian S, Potdar V, Jadhav S, Yadav P, Gupta N, Das M, et al. Convergent evolution of SARS-CoV-2 spike mutations, L452R, E484Q and P681R, in the second wave of COVID-19 in Maharashtra, India. *Microorganisms*. 2021; 9 (7): 1542.
14. Lacobucci G. Covid-19: New UK variant may be linked to increased death rate, early data indicate. *BMJ*. 2021; 372: n230.
15. Santos JC, Passos GA. The high infectivity of SARS-CoV-2 B.1.1.7 is associated with increased interaction force between Spike-ACE2 caused by the viral N501Y mutation. *bioRxiv*. 2020.12.29.424708.
16. Davies NG, Abbott S, Barnard RC, Jarvis CI, Kucharski AJ, Munday JD, et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science*. 2021; 372 (6538): eabg3055.

17. Cele S, Gazy I, Jackson L, Hwa SH, Tegally H, Lustig G, et al. Escape of SARS-CoV-2 501Y.V2 from neutralization by convalescent plasma. *Nature*. 2021; 593 (7857): 142–6.
18. Wibmer CK, Ayres F, Hermanus T, Madzivhandila M, Kgagudi P, Oosthuysen B, et al. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. *Nat Med*. 2021; 27: 622–5.
19. Garcia-Beltran WF, Lam EC, St Denis K, Nitido AD, Garcia ZH, Hauser BM, et al. Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. *Cell*. 2021; 184 (9): 2372–2383.e9.
20. Kissler S, Fauver JR, Mack C, Tai C, Breban MI, et al. Densely sampled viral trajectories suggest longer duration of acute infection with B.1.1.7 variant relative to non-B.1.1.7 SARS-CoV-2. Harvard University's DASH repository 2021. medRxiv. 2021.
21. Callaway E, Mallapaty S. Novavax offers first evidence that COVID vaccines protect people against variants. *Nature*. 2021; 590: 17.
22. Greaney AJ, Loes AN, Crawford KHD, Starr TN, Malone KD, Chu HY, et al. Comprehensive mapping of mutations to the SARS-CoV-2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human serum antibodies. *Cell Host Microbe*. 2021; 29 (3): 463–476.e6.
23. Wu K, Werner AP, Moliva JI, Koch M, Choi A, et al. mRNA-1273 vaccine induces neutralizing antibodies against spike mutants from global SARS-CoV-2 variants. *BioRxiv*. 2021. 01.25.427948.
24. Elbe S, Buckland-Merrett G. Data, disease and diplomacy: GISAID's innovative contribution to global health. *Global challenges* (Hoboken, NJ). 2017; 1: 33–46.
25. Starr TN, Greaney AJ, Hilton SK, Ellis D, Crawford KHD, Dingens AS, et al. Deep mutational scanning of SARS-CoV-2 receptor binding domain reveals constraints on folding and ACE2 binding. *Cell*. 2020; 182 (5): 1295–1310.e20.
26. You Y, Moreira BG, Behlke MA, Owczarzy R. Design of LNA probes that improve mismatch discrimination. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34 (8): e60.
27. European Centre for Disease Prevention and Control, WHO Regional Office for Europe. Methods for the detection and identification of SARS-CoV-2 variants. 3 March 2021. ECDC and WHO Regional Office for Europe: Stockholm and Copenhagen. 2021.
28. Van Pelt-Verkuil E, van Belkum A, Hays JP. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. Springer Science & Business Media. 2008; 330 p.
29. Yuryev A. Methods in Molecular Biology: PCR Primer Design. Humana Press. 2007; 432 p.
30. Kibbe WA. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res*. 2007. Available from: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>.
31. Integrated DNA Technologies. OligoAnalyzer Tool. Available from: <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>.
32. The mfold Web Server (Hosted by The RNA Institute, College of Arts and Sciences). Available from: <http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>.

ПОРАЖЕНИЕ ПЕЧЕНИ У БОЛЬНЫХ COVID-19

Д. А. Вологжанин^{1,2}, А. С. Голота¹✉, Т. А. Камилова¹, С. В. Макаренко^{1,2}, С. Г. Щербак^{1,2}¹ Городская больница № 40 Курортного административного района, Санкт-Петербург, Россия² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Спектр клинических проявлений инфекции SARS-CoV-2 продолжает расширяться, возникают важные фундаментальные вопросы, касающиеся ее клеточного тропизма и патогенетических механизмов. Повреждение печени происходит при всех формах COVID-19, особенно при тяжелых и крайне тяжелых, что может быть связано с прямым вирусным поражением, иммунной дисрегуляцией (системным воспалительным ответом и цитокиновым штормом), гипоксическим/ишемическим повреждением, лекарственной гепатотоксичностью и сопутствующими хроническими заболеваниями. Повреждение печени, определяемое в основном по повышению уровней трансаминаз, часто обнаруживают у пациентов с COVID-19, и оно коррелирует с клиническими исходами, включая смертность. Диагностические критерии, патогенез, клинические характеристики, лечение и прогноз поражения печени при COVID-19 должны быть уточнены в дальнейших клинических исследованиях. В настоящее время критически не хватает проверенных вариантов лечения пациентов с COVID-19, что приводит к неотложной необходимости изучения патогенеза полиорганной недостаточности и повреждения печени при этом заболевании. В обзоре представлена информация о патофизиологических механизмах повреждения печени коронавирусом SARS-CoV-2 и развитии печеночной недостаточности при COVID-19. Поиск источников информации проведен в базе данных PubMed по ключевым словам «liver damage in COVID-19» и «immune liver damage in COVID-19».

Ключевые слова: коронавирус SARS-CoV-2, COVID-19, повреждение печени, системная гепатотоксичность, иммунное повреждение печени, лекарственная гепатотоксичность, сопутствующее хроническое заболевание печени

Вклад авторов: А. С. Голота, Т. А. Камилова — поисково-аналитическая работа, написание текста статьи; Д. А. Вологжанин, С. В. Макаренко, С. Г. Щербак — обсуждение и редактирование текста статьи.

✉ **Для корреспонденции:** Александр Сергеевич Голота
ул. Борисова, д. 9, лит. Б, 197706, г. Санкт-Петербург, Россия; golotaa@yahoo.com

Статья получена: 14.03.2022 **Статья принята к печати:** 27.03.2022 **Опубликована онлайн:** 31.03.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.009

LIVER DAMAGE IN PATIENTS WITH COVID-19

Vologzhanin DA^{1,2}, Golota AS¹✉, Kamilova TA¹, Makarenko SV^{1,2}, Scherbak SG^{1,2}¹ City Clinical Hospital No. 40 of the Kurortny District, Saint Petersburg, Russia² St Petersburg University, Saint Petersburg, Russia

The clinical spectrum of SARS-CoV-2 infection continues to expand, raising important fundamental issues regarding the SARS-CoV-2 cellular tropism and pathogenic mechanisms. Liver damage is observed in patients with all forms of COVID-19, especially severe and critical forms, which could be due to the direct viral damage, immune dysregulation (systemic inflammatory response and cytokine storm), hypoxia-ischemia, drug-induced hepatotoxicity, and concomitant chronic disorders. Liver damage, defined primarily by elevated transaminase levels, is often observed in patients with COVID-19 and correlates with clinical outcomes, including mortality. Diagnostic criteria, pathogenesis, clinical characteristics, treatment, and prognosis of liver injury in COVID-19 should be clarified in further clinical trials. Currently, there is a critical shortage of proven treatment options for patients with COVID-19, resulting in an urgent need to study the multiple organ failure and liver damage pathogenesis in patients with this disease. The review provides information about the pathophysiological mechanisms of the SARS-CoV-2-induced liver damage and the development of liver failure in COVID-19. Information sources were searched in the PubMed database using the keywords "liver damage in COVID-19" and "immune liver damage in COVID-19".

Keywords: coronavirus SARS-CoV-2, COVID-19, liver damage, csystemic hepatotoxicity, immune liver damage, drug-induced hepatotoxicity, concomitant chronic liver disease

Author contribution: Golota AS, Kamilova TA — data search and analysis, manuscript writing; Vologzhanin DA, Makarenko SV, Scherbak SG — manuscript discussion and editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Aleksandr S. Golota
Borisova, 9, lit. B, 197706, Saint Petersburg, Russia; golotaa@yahoo.com

Received: 14.03.2022 **Accepted:** 27.03.2022 **Published online:** 31.03.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.009

Коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой респираторный патоген, вызывающий COVID-19. Осложнения после COVID-19 затрагивают почти все органы, включая печень. Прямая вирусная цитотоксичность, дисрегулируемый иммунный ответ, микроциркуляторные дефекты и тромбоз вносят вклад в системную токсичность при COVID-19. Разнообразные проявления COVID-19 связаны с широким органотропизмом коронавируса SARS-CoV-2.

SARS-CoV-2 инфицирует клетки с помощью полифункционального клеточного рецептора ACE2 (angiotensin-converting enzyme-2), который присутствует на клеточных мембранах всех органов, в том числе печени, и делает ткани уязвимыми для вторжения коронавируса.

Клеточная серинпротеаза TMPRSS2 (transmembrane protease serine 2) участвует в инвазии SARS-CoV-2, способствуя интернализации вируса в клетку-мишень [1]. ACE2 и TMPRSS2 экспрессируются на клетках многих тканей, включая железистые клетки желудка, энтероциты, гепатоциты, холангиоциты и эндотелиоциты [2, 3]. Повышенная экспрессия ACE2 на гепатоцитах выявлена при фиброзных/цирротических состояниях печени [2, 4]. Это открытие имеет большое значение: сопутствующее заболевание печени может увеличить печеночный тропизм SARS-CoV-2.

Дисфункция печени может влиять на мультисистемные проявления COVID-19, такие как острый респираторный

дистресс-синдром (ОРДС), коагулопатия и полиорганная недостаточность. Поскольку печень является основным органом метаболизма и детоксикации у человека, даже умеренное снижение ее функции может изменить профиль безопасности и терапевтическую эффективность противовирусных препаратов, метаболизируемых в печени [4].

Эпидемиологические данные о повреждении печени у пациентов с COVID-19

Частота поражения печени в тяжелых случаях COVID-19 (74,4%) выше, чем у пациентов с легким течением заболевания (43,0%). Пациенты с тяжелой формой COVID-19, поступившие в отделение интенсивной терапии (ОИТ), демонстрировали более выраженную дисфункцию печени, чем пациенты с менее тяжелым заболеванием. Частота повышения уровня печеночных трансаминаз в плазме крови пациентов с COVID-19, особенно значительного в тяжелых случаях, достигает 53% у выживших [5, 6] и 78% у умерших [5]. Повышенные уровни аспартаттрансаминазы (АСТ) в сыворотке крови наблюдали почти у 18% пациентов с легкой формой COVID-19 и у 56% пациентов с тяжелой формой, повышенные уровни аланинаминотрансферазы (АЛТ) — почти у 20% пациентов с легкой формой COVID-19 и у 28% пациентов — с тяжелой. Уровни холестатических ферментов печени — щелочной фосфатазы (ЩФ) и гаммаглутамилтрансферазы (ГГТ) повышены у 6,1 и 21,1% пациентов с COVID-19 соответственно [7].

Повышенные уровни трансаминаз и билирубина и снижение концентрации альбумина у пациентов с COVID-19 коррелирует с длительностью госпитализации, риском перевода в ОИТ и смертностью в 30-дневный период. У большинства пациентов после выздоровления уровни трансаминаз возвращаются к норме. Пациенты со стойким повышением уровней трансаминаз находились в тяжелом состоянии или страдали хроническими заболеваниями печени (ХЗП). Повышение уровней ГГТ и ЩФ у пациентов с COVID-19 указывает на повреждение клеток желчных протоков в печени. Повреждение печени может быть вторичным по отношению к повреждению клеток желчных протоков, так как у некоторых пациентов с COVID-19 в биоптатах печени отсутствуют вирусные включения, а патологические изменения проявляются в виде стеатоза микрососудов и умеренного лобулярного и портального воспаления, при этом степень повреждения печени положительно коррелирует с тяжестью инфекции [8].

По результатам метаанализа 11 работ (793 пациента), проведенного в систематическом обзоре, аномально низкий уровень сывороточного альбумина был у 79% (40–99%) пациентов [9]. В метаанализе учитывали значения только исходных лабораторных тестов, выполненных при госпитализации.

В целом, дисфункция печени характерна для 76,3% пациентов, в то время как повреждение печени — для 21,5% пациентов [10].

Механизмы повреждения печени при COVID-19

Патогенез поражения печени, вызванного COVID-19, полностью не выяснен, так как имеющиеся данные все еще скудны и противоречивы. Механизм гепатоцеллюлярного повреждения является многофакторным и включает прямое вирусное повреждение, иммуноопосредованное

повреждение, ишемию и гипоксию, тромбоз и гепатотоксичность лекарственных препаратов [8, 10].

Прямое вирусное повреждение печени

Инфицирование гепатоцитов вирусом SARS-CoV-2, опосредованное клеточным рецептором ACE2, вызывает прямое острое цитопатическое поражение печени и ассоциировано с высокой смертностью [3]. Описаны очаги перипортального и центрлобулярного некроза без значительного воспаления [11].

В дополнение к гепатоцеллюлярному паттерну повышения уровней печеночных ферментов, повреждение печени при COVID-19 может также проявляться холестатическим паттерном. Экспрессия ACE2 на клетках билиарного эпителия приводит к прямому вирусному инфицированию. Происходит набухание эндотелия ветвей печеночной артерии в портальном тракте с сужением просвета, возникают эндотелиит воротной вены, эндотелиолит, тромботический материал в ветвях воротной вены [12].

Экспрессия ACE2 на большей части холангиоцитов (59,7% клеток) и относительно слабая на гепатоцитах (2,6%; средний уровень экспрессии в 20 раз ниже, чем на холангиоцитах), позволяет предположить, что SARS-CoV-2 способствует повреждению печени, вызывая дисфункцию холангиоцитов. Инфицирование SARS-CoV-2 снижает плотность контактов между холангиоцитами и барьерную функцию холангиоцитов. Анализ биоптатов печени в случаях со смертельным исходом показал присутствие коронавируса в цитоплазме гепатоцитов. Значительный апоптоз гепатоцитов в сочетании с присутствием Т-клеток CD4 и CD8 в лобулярном и портальном трактах указывает на прямое инфицирование печени SARS-CoV-2. Эти данные указывают на способность SARS-CoV-2 инфицировать гепатоциты, несмотря на низкую экспрессию ACE2 [10].

Иммуноопосредованное повреждение печени

В процессе заражения SARS-CoV-2 80% иммунных клеток, проникающих в печень, представлены Т-клетками CD8. Инфильтрация Т-лимфоцитов CD4 коррелирует с активацией В-клеток, уровнями нейтрализующих SARS-CoV-2 антител и провоспалительных цитокинов (IL1 β , IL6 и TNF α) и клиренсом SARS-CoV-2 из печени [8]. IL6 служит фактором острого повреждения печени при COVID-19, индуцирующим синусоидальную эндотелиопатию печени с инфильтрацией нейтрофилов и фенотипом гиперкоагуляции [13]. Гиперкоагуляционный и воспалительный фенотип синусоидальных эндотелиоцитов печени считают маркером повреждения эндотелия и предиктором смерти у больных циррозом печени с COVID-19 [14].

Внезапное ухудшение состояния печени на поздней стадии заболевания связано с системным воспалительным ответом, который может повредить несколько органов, в том числе печень, причем пациенты с лимфоцитопенией чаще страдают от дисфункции печени [15]. В клетках печени у пациентов с тяжелой формой COVID-19 присутствуют воспалительные изменения, такие как отек и стеатоз гепатоцитов, пролиферация клеток синуса печени, гиперплазия клеток Купфера и инфильтрация иммунных клеток [16].

При патологоанатомическом исследовании пациентов с COVID-19 обнаружены холестатические особенности,

такие как пролиферация желчных протоков, воспалительные инфильтраты в воротной вене и в некоторых случаях канальцевые/протоковые желчные пробки [17]. Основным фактором, способствующим этому, может быть цитокиновый шторм, характерный для вирусного сепсиса, ассоциированного с SARS-CoV-2, поскольку воспалительные цитокины IL6, TNF α и IL1 β могут вызывать гепатоцеллюлярный холестаз. Стойкий системный IL6-сигналинг, инициированный инфекцией SARS-CoV-2, подавляет синтез альбумина. Гипоальбуминемию при цитокиновом шторме и холестаз в результате подавления выделительной функции гепатобилиарной системы можно рассматривать как часть острой фазы COVID-19. IL6 является сильным митогеном для холангиоцитов, индуцирующим пролиферативный и провоспалительный фенотип [4].

У инфицированных вирусом SARS-CoV-2 повышенные уровни С-реактивного белка (СРБ) и лимфопения служат независимыми факторами риска повреждения печени [18]. Учитывая, что гистопатологический анализ не выявил значительного воспалительного поражения печени [19], изменения уровней ферментов печени у пациентов с SARS-CoV-2, вероятно, вызваны гепатитом, который развивается как вторичная реакция на системное воспаление, вызванное SARS-CoV-2 [10].

Гипоксический гепатит

Эндотелиоциты печеночного синуса играют роль в нарушении перфузии, реагируя на воспалительные сигналы. Ишемически-реперфузионное повреждение печени может привести к воспалению за счет активации клеток Купфера, нейтрофилов и тромбоцитов. В условиях ишемии и гипоксии подавление сигнального пути клеточного выживания клеток в гепатоцитах приводит к некрозу этих клеток. У пациентов с ОРДС гипоксия индуцирует окислительный стресс, стойкое увеличение количества активных форм кислорода и секрецию провоспалительных веществ, вызывающих повреждение и некроз гепатоцитов [8].

Гипоксия является типичным признаком тяжелых случаев COVID-19 и служит основным регулятором экспрессии гепатоцеллюлярного ACE2. Этим можно объяснить, почему внепочечную диссеминацию SARS-CoV-2 наблюдают в основном у пациентов с ОРДС и другими гипоксическими состояниями. Анализ геной экспрессии показал, что первичные гепатоциты, инфицированные SARS-CoV-2, гиперэкспрессируют провоспалительные цитокины, подавляя при этом ключевые метаболические процессы. Эти данные иллюстрируют комплексный характер повреждения печени при COVID-19 с взаимовлиянием множества участвующих в нем молекулярных путей, активируемых вирусом SARS-CoV-2. Желчные протоки пациентов с COVID-19 подвергаются гипоксии из-за дыхательной недостаточности (усугубляемой облитерацией перибиллиарного артериального сплетения в результате васкулитных/тромбогенных изменений). Таким образом, нарушение кровотока и гипоксия, а также непрерывная воспалительная стимуляция — основные триггеры разрушения эпителия желчевыводящих протоков у пациентов с тяжелой формой COVID-19 [4].

Коагуляция и тромбоз

Повышенные уровни маркеров гиперкоагуляции D-димера, фибриногена и фактора FVIII выявлены у

100, 74 и 100% пациентов с крайне тяжелой формой COVID-19. Микроваскулярный тромбоз может привести к терминальной стадии поражения печени. С помощью аутопсии была выявлена инфильтрация лимфоцитов и моноцитов в портальной области с тромбозом и застоем в синусах, в печени — дегенерация гепатоцитов и лобулярный некроз [16]. Эти данные свидетельствуют о том, что состояние гиперкоагуляции у пациентов с COVID-19 является одной из причин повреждения печени.

Гепатотоксичность антикоронавирусной терапии

Лекарственное поражение печени является причиной дисфункции печени различной степени, наблюдаемой у пациентов с COVID-19. Для лечения COVID-19 широко используют противовирусные препараты (осельтамивир, абидор, лопинавир и ритонавир), антибиотики, стероиды и гормоны, которые вызывают побочные реакции, в том числе повреждение печени. В частности, вероятность повреждения печени при применении лопинавира/ритонавира увеличивается в 4 раза. Печень метаболизирует большинство препаратов против SARS-CoV-2. Повышение уровней АЛТ, ЩФ, билирубина и ГГТ наблюдали у лиц, инфицированных SARS-CoV-2, которых лечили лопинавиром, ритонавиром и ремдесивиром [20].

Повреждение печени более вероятно у пациентов, получавших несколько видов лекарственных препаратов, а также большое количество гормонов. Повреждение печени нарушает метаболизм и выведение лекарств и повышает токсичность противовирусных препаратов. Поэтому следует придавать большое значение мониторингу функции печени, хотя в большинстве случаев COVID-19 наблюдается легкое повреждение печени, которое обычно носит временный характер и возвращается в норму без какого-либо специального лечения. Таргетная гепатопротекторная терапия необходима пациентам с тяжелым поражением печени. В основе лечения повреждения печени при COVID-19 лежат подавление воспалительной реакции и коррекция гипоксемии с целью предотвращения синдрома полиорганной дисфункции, а также один или два гепатопротектора в зависимости от нарушенной функции печени пациента [15].

К гепатотоксичным терапевтическим средствам относятся противовирусные препараты, которые нацелены на сам вирус (ремдесивир), на IL6 и его эффекторный сигнальный путь (тоцилизумаб и барицитиниб), а также на системное воспаление (дексаметазон), антибиотики и стероиды.

В рандомизированных клинических исследованиях показано, что комбинация противовирусного препарата ремдесивира, применяемого для лечения инфекции, вызванной SARS-CoV-2, с ингибитором сигнального протеинкиназы JAK барицитинибом улучшает исходы COVID-19 по сравнению с одним ремдесивиром [21].

Комбинированный препарат лопинавир/ритонавир может вызвать некроз печени и подавление пролиферации гепатоцитов, инициирует воспалительные реакции и усугубляет повреждение печени за счет усиления окислительного стресса. Прием лопинавира/ритонавира повышает уровни ферментов печени в 7 раз [20].

Дексаметазон снижает уровни биомаркеров повреждения эндотелия (ангиопэтина-2 и молекул межклеточной адгезии ICAM-1 и sRAGE) и воспаления (СРБ) [22].

Использование в лечении пациентов с COVID-19 эндогенных цитокинов интерферонов, секретируемых

клеткой в ответ на вирусную инфекцию (в том числе SARS-CoV-2) для подавления репликации патогена, вызывало лейкопению, лимфопению, повреждение гепатоцитов, аутоиммунный гепатит и другие тяжелые побочные эффекты [8].

Ингибитор клеточной сигнальной JAK-STAT-системы барицитиниб влияет на гиперовоспалительный статус, возникающий во время инфицирования SARS-CoV-2, и может предотвращать эндоцитоз и вирусную инфекцию, но увеличивает риск тромбоза и в дальнейшем приводит к повреждению печени. Обращает на себя внимание рост числа сообщений о повреждении печени, холестазах и гепатите, которые развились в значительном числе случаев использования ингибиторов протеинкиназы JAK для лечения COVID-19 [23].

Моноклональное антитело против рецептора IL6 тоцилизумаб применяют в комплексной терапии тяжелых случаев COVID-19. Тоцилизумаб необходимо отменить, если уровень печеночных ферментов превышает верхний предел нормы более чем в три раза [8].

Эти данные указывают на то, что в ходе лечения пациентов с COVID-19 следует регулярно контролировать ферменты печени, чтобы свести к минимуму вероятность дальнейших осложнений [24].

Принимая во внимание повышенный риск смерти от COVID-19 у пациентов с ХЗП, Европейская ассоциация по изучению печени (European Association for the Study of the Liver, EASL), Американская ассоциация по изучению заболеваний печени (American Association for the Study of Liver Diseases, AASLD) и Бельгийский консультативный комитет по печени и кишечнику (Belgian Liver and Intestine Advisory Committee, BeLIAC) рекомендовали отдавать приоритет вакцинации против COVID-19 пациентам с ХЗП и реципиентам донорской печени [25].

COVID-19-ассоциированное повреждение печени у пациентов без сопутствующего хронического заболевания печени

Повреждение печени (преимущественно гепатоцеллюлярное, а не холестатическое), наблюдаемое уже при поступлении, коррелирует с клиническими исходами (поступлением в ОИТ, искусственной вентилиацией легких, смертью). Пациенты с аномальным уровнем АСТ при поступлении и пациенты с аномальными уровнями АСТ, АЛТ и ЩФ на пике госпитализации имеют более высокий риск попадания на ИВЛ [26]. Анализ биоптатов пациентов продемонстрировал, что поражение печени коронавирусом является главной причиной нарушения ее функции у пациентов с COVID-19 без ХЗП. SARS-CoV-2 вызывает цитопатию печени с массивным апоптозом и наличием двуядерных (менее зрелых) гепатоцитов в качестве преобладающих гистологических признаков [18, 27].

Из 900 пациентов с COVID-19 28% имели повышенный уровень как минимум одного фермента печени [24]. При исследовании печени пациентов с COVID-19 отмечен эндотелит [28], а в синусоидах печени — фибриновые микротромбы [29]. Аутопсия печени продемонстрировала расширение и увеличение числа ветвей воротной вены, частичный или полный тромбоз просвета воротных и синусоидальных сосудов, фиброз воротного тракта и микротромбы в синусоидах печени. Ни у одного из этих пациентов не было ХЗП до и во время госпитализации. Все образцы печени показали минимальные признаки воспаления. Гистопатологические данные указывают

на вторичный характер нарушений внутрипеченочной сосудистой сети по отношению к системным изменениям, вызванным вирусом [30].

Главным гепатоцеллюлярным изменением при COVID-19 считают микровезикулярный стеатоз. Однако признаки повреждения печени регистрируют и в отсутствие стеатоза, такие как матовостекловидные гепатоциты, агрегаты фибрина в синусоидальном просвете, синусоидальная дилатация с атрофией гепатоцитов, дилатация пространств Диссе, внутрисинусоидальные скопления фибрина и эритроцитов. Синусоидальная дилатация и активация клеток Купфера указывают на наличие тромботического синусоидита. Внутрипеченочную сосудистую патологию, в том числе синусоидальные микротромбы, наблюдали в печени 15% пациентов, умерших от COVID-19, это маркер заболевания печени, вызванного SARS-CoV-2. Совокупность наблюдений позволяет рассматривать тяжелый тромботический синусоидит как негативный прогностический фактор у пациентов с COVID-19 [17]. Повреждение печени может быть также связано с взаимодействием между внутрипеченочными цитотоксическими Т-клетками и клетками Купфера. Гипоксия и шок могут вызывать ОРДС, дисфункцию гипоксии-реперфузии и ишемию печени. Возможно также косвенное повреждение синусоидального эндотелия в результате системного воспаления и по ятрогенным причинам (ИВЛ) [4].

По результатам аутопсии печени умерших пациентов с COVID-19 выявлен также портальный фиброз, сопровождающийся значительной активацией перитонов. PHK SARS-CoV-2 обнаружена в просветах сосудов и эндотелиальных клетках воротных вен при аутопсии печени больных COVID-19 [30]. Эндотелиально-опосредованное воспаление — возможный механизм длительного повреждения печени, так как эндотелиопатия сохраняется при «длинной» COVID-19 [31].

Микро- и макровезикулярный стеатоз наблюдали при аутопсии печени пациентов с COVID-19, у которых инфекция SARS-CoV-2 была единственным фактором повреждения печени. Микровезикулярный стеатоз обычно вызван генетическими или приобретенными дефектами процесса митохондриального β -окисления. SARS-CoV-2 влияет на митохондриальную активность и вызывает аномалии митохондриальной кристы пациентов с COVID-19, ухудшающие метаболическое состояние печени [18].

COVID-19-ассоциированный ОРДС может сопровождать дисфункция правого желудочка, приводящая к застойному повреждению печени в результате повышенного центрального венозного давления. В случаях длительной гемодинамической и/или дыхательной недостаточности гипоксия приводит к гибели гепатоцитов, гистопатологически определяемой как центрилобулярный некроз. Кроме того, острая правосторонняя сердечная недостаточность и, как следствие, застой в печени при COVID-19 могут быть вызваны состоянием гиперкоагуляции [4]. Однако в большинстве случаев поражение печени, связанное с SARS-CoV-2, было легким и не отвечало диагностическим критериям гипоксического гепатита даже у пациентов в ОИТ [7].

Среди особенностей COVID-19 — коагулопатия, характеризующаяся повышенными концентрациями D-димера и фибриногена. Повышенный уровень D-димера связан с тяжелой формой COVID-19 и высокой смертностью. Высокие значения D-димера присутствовали почти у всех пациентов (96%), умерших от тяжелой формы

COVID-19, повышенный уровень АЛТ — у большинства (62%), что свидетельствует о связи повреждения печени с тромбозом сосудов печени и коагулопатией. Ни у одного из этих пациентов не было в анамнезе ХЗП или портальной гипертензии [30]. Вскрытие продемонстрировало наличие тромбоцито-фибриновых микротромбов в синусоидах печени, а также агрегатов тромбоцитов в воротной вене, по меньшей мере, у 50% пациентов [30, 32].

В 86% случаев аутопсии пациентов, умерших от тяжелой COVID-19-ассоциированной пневмонии, был выявлен умеренный центрлобулярный некроз, связанный с малозаметным лобулярным или портальным воспалением, в 57% случаев — стеатоз и холестаз, в 36% случаев — дискретное разрастание желчных протоков. Хотя большинство пациентов лечили препаратами с низкой гепатотоксичностью, гипоксия, вызванная тяжелым повреждением легких, могла ослабить устойчивость гепатоцитов к токсическому повреждению. Сочетание гипоксии, вызванной тяжелой пневмонией, и лекарственной токсичности представляет собой наиболее вероятную причину повреждения печени у умерших пациентов с COVID-19 [19].

Подтверждена корреляция между повреждением печени и тяжестью COVID-19 [33]. Аномальные результаты печеночных тестов в момент госпитализации повышают риск развития тяжелой COVID-19-ассоциированной пневмонии [20]. Тяжесть COVID-19 коррелирует с уровнями АСТ и АЛТ, в частности у пациентов, госпитализированных в ОИТ [24]. У пациентов, поступивших с аномалиями печени, риск смерти коррелирует со степенью повреждения печени: он повышен в 1,4 раза у пациентов с повреждением печени 1-й степени и в 2,8 раза — у пациентов с повреждением печени 2-й степени [34]. Таким образом, повреждение печени служит независимым прогностическим фактором смертности пациентов с инфекцией SARS-CoV-2.

COVID-19 у пациентов с сопутствующим хроническим заболеванием печени

Как показал метаанализ эпидемиологических исследований, общая распространенность ХЗП у пациентов с COVID-19 составила 3%. Инфекция SARS-CoV2 у пациентов с ХЗП связана с повышенной смертностью по сравнению с другими этиологиями [13]. При заболевании печени, диагностированном еще до инфицирования COVID-19, коронавирус влияет на возникновение, тяжесть, прогноз и успех лечения COVID-19 [8]. Люди с ХЗП с большей вероятностью будут инфицированы SARS-CoV-2, поскольку у них низкая иммунная функция. Половина пациентов с аномальными результатами печеночных тестов имели ХЗП, включая неалкогольную жировую болезнь печени (НАЖБП), алкогольную болезнь печени и хронический гепатит В [20]. НАЖБП — наиболее распространенное в мире хроническое дисметаболическое заболевание печени, представляет собой независимый фактор риска прогрессирования COVID-19 (OR 6,4). Оно связано с более высоким риском нарушения функции печени и более длительным периодом выведения вирусов, кроме того, увеличивает риск тяжелого прогрессирования COVID-19, связанный с метаболической дисфункцией [35].

Исследование пациентов в системе здравоохранения Йель-Нью-Хейвен (США) подтвердило, что у пациентов с аномальными биохимическими тестами печени более высокая вероятность тяжелого протекания заболевания. Повреждение печени было преимущественно

гепатоцеллюлярным, а не холестатическим, аномалии печени у этих пациентов при поступлении усиливались на пике госпитализации. Многомерный анализ позволил выявить связь между показателями функции печени и клиническими исходами (поступление в ОИТ, ИВЛ и смерть) [26]. При повышении уровня трансаминаз в сыворотке крови у пациентов с COVID-19 следует учитывать связанную с SARS-CoV-2 реактивацию ранее существовавшего заболевания печени, включая аутоиммунное.

Провоспалительная среда, возникающая при гепатоцеллюлярном и холангиоцеллюлярном COVID-19-ассоциированном повреждении, способствует активации звездчатых клеток печени и, как следствие, индукции фиброза у пациентов с ХЗП [4]. Активацию и пролиферацию клеток Купфера часто можно наблюдать как следствие системного воспаления, в частности, в образцах печени умерших пациентов с COVID-19 [8].

Хроническое поражение печени определяет иммуносупрессию, значительно увеличивающую смертность пациентов, как продемонстрировано у 17 425 445 пациентов с COVID-19 [36].

Пациенты с раком печени тоже имеют высокий риск заражения коронавирусом, особенно если проходят курс химио- или иммунотерапии в больнице [37]. У инфицированных коронавирусом SARS-CoV-2 онкологических больных прогноз хуже, чем у пациентов только с COVID-19; смертность этих пациентов достигает 20% [38].

Трансплантация печени

Риск заражения и тяжелого течения COVID-19 в периоперационном или раннем посттрансплантационном периоде повышен из-за высоких уровней иммуносупрессии [39]. В то же время чрезмерный реактивный ответ врожденного иммунитета может вызывать повреждение печени и полиорганную недостаточность, а иммуносупрессия снижает риск гиперовоспаления и цитокинового шторма у реципиентов донорской печени [15].

Регистр данных о пациентах с COVID-19 и ХЗП содержит данные 1588 пациентов с ХЗП без цирроза, 772 пациентов — с циррозом и 280 пациентов — реципиентов донорской печени [40]. Острая печеночная декомпенсация произошла у 46% пациентов с циррозом, причем у 21% из них не было респираторных симптомов. Смертность пациентов с острой декомпенсацией печени вдвое выше, чем у пациентов с компенсированным циррозом (44% против 22%; $p < 0,001$) [41].

Патогенетическая ось «ЖКТ–печень» при COVID-19

С ранних фаз пандемии желудочно-кишечные симптомы (ЖКС) упоминали как отличительные признаки COVID-19 наряду с респираторными и печеночными симптомами. Согласно результатам метаанализа 60 исследований с участием 4243 пациентов с COVID-19, распространенность ЖКС составляет 17,6% [42]. ЖКС могут появиться раньше или даже в отсутствие респираторных симптомов [43].

Идентификация SARS-CoV-2 в фекалиях и сочетание ЖКС и печеночной симптоматики указывают на дерегуляцию оси «кишечник–печень» у этих пациентов. Высокая экспрессия рецептора ACE2 в эпителии ЖКТ (в 100 раз выше, чем на гепатоцитах) позволяет вирусу SARS-CoV2 проникать в клетки желчных протоков и подавлять функцию печени [8]. Кишечная инфекция, вызванная

COVID-19, может нарушить эпителиальный и сосудистый барьеры кишечника, что приведет к транслокации вируса в печень через воротную вену. Впоследствии вирионы SARS-CoV-2, выходящие из инфицированных гепатоцитов, попадают в желчь [44]. Желчные пути обеспечивают прямую связь между печенью и кишечником, поэтому SARS-CoV-2 может достичь кишечника и инфицировать его через желчь, вызывая повторную инфекцию. Таким образом, предполагаемый гепатобилиарный механизм может создать замкнутый круг, который объясняет худший исход у пациентов с печеночными и кишечными симптомами [4, 45].

При сравнении умерших пациентов с выжившими тяжелооболеченными были идентифицированы иммуномодулирующие и тканевые белки плазмы крови, связанные с выживаемостью больных COVID-19 [46]. Сравнение органоспецифических «сигнатур смерти» показало значимую корреляцию сигнатуры печени с уровнями АЛТ и АСТ. Среди белков, ассоциированных со степенью тяжести COVID-19 были белки THBS2 (thrombospondin 2), ACTA2 (actin alpha 2), HGF (hepatocyte growth factor), PDGFRA (platelet-derived growth factor receptor A) из клеток Купфера, TACSTD2 (tumor-associated calcium signal transducer 2) из холангиоцитов, CA2 (carbonic anhydrase 2) и BLVRB (biliverdin reductase B) из эритроидных клеток печени. Таким образом, протеом плазмы может быть использован в качестве жидкостной биопсии для изучения потенциальных терапевтических мишеней, а также для диагностики и стратификации пациентов с

высоким риском в качестве кандидатов на индивидуальную терапию [46].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Коронавирус SARS-CoV-2 затрагивает в основном дыхательные пути, но имеет тропизм к печени и желчевыводящим путям. Поэтому в борьбе с этой новой коронавирусной инфекцией все активнее участвуют гепатологи. В ближайшие месяцы и годы врачи прогнозируют рост числа заболеваний печени, так как SARS-CoV-2 может непосредственно инфицировать и повреждать ткань печени.

Течение и исход COVID-19 во многом зависят от состояния здоровья пациента и сопутствующих заболеваний. НАЖБП, гепатит В и С, цирроз печени, рак печени и прием иммунодепрессантов после трансплантации печени обычно приводят к иммунодефицитному состоянию. Осложнения возникают раньше и в большей степени у пациентов с системным иммунодефицитом.

По мере распространения пандемии и публикации новых данных о влиянии коронавирусов на инфицированный организм стало возможным определить факторы риска осложнений со стороны печени у пациентов с инфекцией SARS-CoV-2. Изучение клинической информации о пациентах с COVID-19 и заболеваниями печени важно для выявления печеночных осложнений, прогнозирования ответа на лечение, разработки моделей риска печеночных осложнений и клинических рекомендаций для пациентов с заболеваниями печени и коронавирусной инфекцией.

Литература

- Skok K, Stelzl E, Trauner M, et al. Post-mortem viral dynamics and tropism in COVID-19 patients in correlation with organ damage. *Virchows Arch.* 2021; 478 (2): 343–53. DOI: 10.1007/s00428-020-02903-8.
- Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, et al. Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med.* 2020; 383 (2): 120–8. DOI:10.1056/NEJMoa2015432.
- Cabibbo G, Rizzo GEM, Stornello C, Craxi A. SARS-CoV-2 infection in patients with a normal or abnormal liver. *J Viral Hepat.* 2021; 28 (1): 4–11. DOI: 10.1111/jvh.13440.
- Nardo AD, Schneeweiss-Gleixner M, Bakail M, et al. Pathophysiological mechanisms of liver injury in COVID-19. *Liver Int.* 2021; 41 (1): 20–32. DOI: 10.1111/liv.14730.
- Amin M. COVID-19 and the liver: overview. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2021; 33 (3): 309–11. DOI: 10.1097/MEG.0000000000001808.
- Yadav DK, Singh A, Zhang Q, et al. Involvement of liver in COVID-19: systematic review and meta-analysis. *Gut.* 2021; 70 (4): 807–9. DOI: 10.1136/gutjnl-2020-322072.
- Kulkarni AV, Kumar P, Tevethia HV, et al. Systematic review with meta-analysis: liver manifestations and outcomes in COVID-19. *Aliment Pharmacol Ther.* 2020; 52 (4): 584–99. DOI: 10.1111/apt.15916.
- Wang X, Lei J, Li Z, Yan L. Potential Effects of Coronaviruses on the Liver: An Update. *Front Med (Lausanne).* 2021; 8: 651658. DOI: 10.3389/fmed.2021.651658.
- Merola E, Pravadeelli C, de Pretis G. Prevalence of liver injury in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19): a systematic review and meta-analysis. *Acta Gastroenterol Belg.* 2020; 83 (3): 454–60. PMID: 33094594.
- Mohandas S, Vairappan B. SARS-CoV2 infection and the gut-liver axis. *J Dig Dis.* 2020; 21 (12): 687–95. DOI: 10.1111/1751-2980.12951.
- Li Y, Xiao SY. Hepatic involvement in COVID-19 patients: Pathology, pathogenesis, and clinical implications. *J Med Virol.* 2020; 92 (9): 1491–4. DOI: 10.1002/jmv.25973.
- Butikofer S, Lenggenhager D, Wendel Garcia PD, et al. Secondary sclerosing cholangitis as cause of persistent jaundice in patients with severe COVID-19. *Liver Int.* 2021; 41 (10): 2404–17. DOI: 10.1111/liv.14971.
- McConnell MJ, Kondo R, Kawaguchi N, Iwakiri Y. COVID-19 and liver injury: role of inflammatory endotheliopathy, platelet dysfunction and thrombosis. *Hepatol Commun.* 2022; 6 (2): 255–69. DOI: 10.1002/hep4.1843.
- Kaur S, Hussain S, Kolhe K, et al. Elevated plasma ICAM1 levels predict 28-day mortality in cirrhotic patients with COVID-19 or bacterial sepsis. *JHEP Rep.* 2021; 3 (4): 100303. DOI: 10.1016/j.jhepr.2021.100303.
- Zhao J-N, Fan Y, Wu S-D. Liver injury in COVID-19: A minireview. *World J Clin Cases.* 2020; 8 (19): 4303–10. DOI: 10.12998/wjcc.v8.i19.4303.
- Beigmohammadi MT, Jahanbin B, Safaei M, et al. Pathological findings of postmortem biopsies from lung, heart, and liver of 7 deceased COVID-19 patients. *Int J Surg Pathol.* 2021; 29 (2): 135–45. DOI: 10.1177/1066896920935195.
- Fanni D, Cerrone G, Saba L, et al. Thrombotic sinusoiditis and local diffuse intrasinusoidal coagulation in the liver of subjects affected by COVID-19: the evidence from histology and scanning electron microscopy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2021; 25 (19): 5904–12. DOI: 10.26355/eurrev.202110.26866.
- Wang Y, Liu S, Liu H, et al. SARS-CoV-2 infection of the liver directly contributes to hepatic impairment in patients with COVID-19. *J Hepatol.* 2020; 73 (4): 807–16. DOI: 10.1016/j.jhep.2020.05.002.
- Schmit G, Lelotte J, Vanhaebost J, et al. The liver in COVID-19-related death: protagonist or innocent bystander? *Pathobiology.* 2021; 88 (1): 88–94. DOI: 10.1159/000512008.
- Cai Q, Huang D, Yu H, et al. COVID-19: abnormal liver function

- tests. *J Hepatol.* 2020; 73 (3): 566–74. DOI: 10.1016/j.jhep.2020.04.006.
21. Stebbing J, Sanchez Nieves G, Falcone M, et al. JAK inhibition reduces SARS-CoV-2 liver infectivity and modulates inflammatory responses to reduce morbidity and mortality. *Sci Adv.* 2021; 7 (1): eabe4724. DOI: 10.1126/sciadv.abe4724.
 22. Kim WY, Kweon OJ, Cha MJ, et al. Dexamethasone may improve severe COVID-19 via ameliorating endothelial injury and inflammation: A preliminary pilot study. *PLoS One.* 2021; 16 (7): e0254167. DOI: 10.1371/journal.pone.0254167.
 23. Raschi E, Caraceni P, Poluzzi E, De Ponti F. Baricitinib, JAK inhibitors and liver injury: a cause for concern in COVID-19? *Expert Opin Drug Saf.* 2020; 19: 1367–69. DOI: 10.1080/14740338.2020.1812191.
 24. Naeem A, Khamuani MK, Kumar P, et al. Impact of coronavirus diseases on liver enzymes. *Cureus.* 2021; 13 (9): e17650. DOI: 10.7759/cureus.17650.
 25. Cornberg M, Buti M, Eberhardt CS, Grossi PA, Shouval D. EASL position paper on the use of COVID-19 vaccines in patients with chronic liver diseases, hepatobiliary cancer and liver transplant recipients. *J Hepatol.* 2021; 74 (4): 944–51. DOI: 10.1016/j.jhep.2021.01.032.
 26. Hundt MA, Deng Y, Ciarleglio MM, et al. Abnormal liver tests in COVID-19: a retrospective observational cohort study of 1827 patients in a major U.S. hospital network. *Hepatology.* 2020; 72 (4): 1169–76. DOI: 10.1002/HEP.31487.
 27. Pirisi M, Rigamonti C, D'Alfonso S, et al. Liver infection and COVID-19: the electron microscopy proof and revision of the literature. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2021; 25 (4): 2146–51. DOI: 10.26355/eurrev_202102_25120.
 28. Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet.* 2020; 395 (10234): 1417–18. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30937-5.
 29. Duarte-Neto AN, Monteiro RA, da Silva LF, et al. Pulmonary and systemic involvement in COVID-19 patients assessed with ultrasound-guided minimally invasive autopsy. *Histopathology.* 2020; 77: 186–97. DOI: 10.1111/his.14160.
 30. Sonzogni A, Previtali G, Seghezzi M, et al. Liver histopathology in severe COVID 19 respiratory failure is suggestive of vascular alterations. *Liver Int.* 2020; 40 (9): 2110–16. DOI: 10.1111/liv.14601.
 31. Fogarty H, Townsend L, Morrin H, et al. Persistent endotheliopathy in the pathogenesis of long COVID syndrome. *J Thromb Haemost.* 2021; 19 (10): 2546–53. DOI: 10.1111/jth.15490.
 32. Rapkiewicz A, Carsons S, Pittaluga S, et al. Megakaryocytes and platelet-fibrin thrombi characterize multi-organ thrombosis at autopsy in COVID-19: A case series. *EClinicalMedicine.* 2020; 24: 100434. DOI: 10.1016/j.eclinm.2020.100434.
 33. Musa S. Hepatic and gastrointestinal involvement in coronavirus disease 2019 (COVID-19): What do we know till now? *Arab J Gastroenterol.* 2020; 21 (1): 3–8. DOI: 10.1016/j.ajg.2020.03.002.
 34. Chen LY, Chu HK, Bai T, et al. Liver damage at admission is an independent prognostic factor for COVID-19. *J Dig Dis.* 2020; 21 (9): 512–18. DOI: 10.1111/1751-2980.12925.
 35. Mushtaq K, Khan MU, Iqbal F, et al. NAFLD is a predictor of liver injury in COVID-19 hospitalized patients but not of mortality, disease severity on the presentation or progression — The debate continues. *J Hepatol.* 2021; 74 (2): 482–84. DOI: 10.1016/j.jhep.2020.09.006.
 36. Williamson EJ, Walker AJ, Bhaskaran K, et al. OpenSAFELY: factors associated with COVID-19-related hospital death in the linked electronic health records of 17 million adult NHS patients. *Nature.* 2020; 584 (7821): 430–36. DOI: 10.1038/s41586-020-2521-4.
 37. Barry A, Apisarnthanarax S, O'Kane GM, et al. Management of primary hepatic malignancies during the COVID-19 pandemic: recommendations for risk mitigation from a multidisciplinary perspective. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020; 5 (8): 765–75. DOI: 10.1016/S2468-1253(20)30182-5.
 38. Gosain R, Abdou Y, Singh A, et al. COVID-19 and cancer: a comprehensive review. *Curr Oncol Rep.* 2020. 8; 22 (5): 53. DOI: 10.1007/s11912-020-00934-7.
 39. D'Antiga L. Coronaviruses and immunosuppressed patients: the facts during the Third Epidemic. *Liver Transpl.* 2020; 26 (6): 832–4. DOI: 10.1002/lt.25756.
 40. SECURE CIRRHOSIS REGISTRY. <https://covidcirrhosis.web.unc.edu/updates-and-data/>. Accessed 14.12.2021.
 41. Marjot T, Moon AM, Cook JA, et al. Outcomes following SARS-CoV-2 infection in patients with chronic liver disease: An international registry study. *J Hepatol.* 2021; 74 (3): 567–77. DOI: 10.1016/j.jhep.2020.09.024.
 42. Cheung KS, Hung IFN, Chan PPY, et al. Gastrointestinal manifestations of SARS-CoV-2 infection and virus load in fecal samples from a Hong Kong cohort: systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology.* 2020; 159 (1): 81–95. DOI: 10.1053/j.gastro.2020.03.065.
 43. Amirian ES. Potential fecal transmission of SARS-CoV-2: Current Evidence and Implications for Public Health. *Int J Infect Dis.* 2020; 95: 363–70. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.04.057.
 44. Han D, Fang Q, Wang X. SARS-CoV-2 was found in the bile juice from a patient with severe COVID-19. *J Med Virol.* 2021; 93 (1): 102–4. DOI: 10.1002/jmv.26169.
 45. Vespa E, Pugliese N, Colapietro F, Aghemo A. STAY (GI) HEALTHY: COVID-19 and gastrointestinal manifestations. *Tech Innov Gastrointest Endosc.* 2021; 23 (2): 179–89. DOI: 10.1016/j.tige.2021.01.006.
 46. Filbin MR, Mehta A, Schneider AM, et al. Longitudinal proteomic analysis of severe COVID-19 reveals survival-associated signatures, tissue-specific cell death, and cell-cell interactions. *Cell Rep Med.* 2021; 2 (5): 100287. DOI: 10.1016/j.xcrm.2021.100287.

References

1. Skok K, Stelzl E, Trauner M, et al. Post-mortem viral dynamics and tropism in COVID-19 patients in correlation with organ damage. *Virchows Arch.* 2021; 478 (2): 343–53. DOI: 10.1007/s00428-020-02903-8.
2. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, et al. Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med.* 2020; 383 (2): 120–8. DOI: 10.1056/NEJMoa2015432.
3. Cabibbo G, Rizzo GEM, Stornello C, Craxi A. SARS-CoV-2 infection in patients with a normal or abnormal liver. *J Viral Hepat.* 2021; 28 (1): 4–11. DOI: 10.1111/jvh.13440.
4. Nardo AD, Schneeweiss-Gleixner M, Bakail M, et al. Pathophysiological mechanisms of liver injury in COVID-19. *Liver Int.* 2021; 41 (1): 20–32. DOI: 10.1111/liv.14730.
5. Amin M. COVID-19 and the liver: overview. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2021; 33 (3): 309–11. DOI: 10.1097/MEG.0000000000001808.
6. Yadav DK, Singh A, Zhang Q, et al. Involvement of liver in COVID-19: systematic review and meta-analysis. *Gut.* 2021; 70 (4): 807–9. DOI: 10.1136/gutjnl-2020-322072.
7. Kulkarni AV, Kumar P, Tevethia HV, et al. Systematic review with meta-analysis: liver manifestations and outcomes in COVID-19. *Aliment Pharmacol Ther.* 2020; 52 (4): 584–99. DOI: 10.1111/apt.15916.
8. Wang X, Lei J, Li Z, Yan L. Potential Effects of Coronaviruses on the Liver: An Update. *Front Med (Lausanne).* 2021; 8: 651658. DOI: 10.3389/fmed.2021.651658.
9. Merola E, Pravadelli C, de Pretis G. Prevalence of liver injury in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19): a systematic review and meta-analysis. *Acta Gastroenterol Belg.* 2020; 83 (3): 454–60. PMID: 33094594.
10. Mohandas S, Vairappan B. SARSCoV2 infection and the gut-liver axis. *J Dig Dis.* 2020; 21 (12): 687–95. DOI: 10.1111/1751-2980.12951.
11. Li Y, Xiao SY. Hepatic involvement in COVID-19 patients: Pathology, pathogenesis, and clinical implications. *J Med Virol.* 2020; 92 (9): 1491–4. DOI: 10.1002/jmv.25973.

12. Butikofer S, Lengggenhager D, Wendel Garcia PD, et al. Secondary sclerosing cholangitis as cause of persistent jaundice in patients with severe COVID-19. *Liver Int.* 2021; 41 (10): 2404–17. DOI: 10.1111/liv.14971.
13. McConnell MJ, Kondo R, Kawaguchi N, Iwakiri Y. COVID-19 and liver injury: role of inflammatory endotheliopathy, platelet dysfunction and thrombosis. *Hepatol Commun.* 2022; 6 (2): 255–69. DOI: 10.1002/hep4.1843.
14. Kaur S, Hussain S, Kolhe K, et al. Elevated plasma ICAM1 levels predict 28-day mortality in cirrhotic patients with COVID-19 or bacterial sepsis. *JHEP Rep.* 2021; 3 (4): 100303. DOI: 10.1016/j.jhepr.2021.100303.
15. Zhao J-N, Fan Y, Wu S-D. Liver injury in COVID-19: A minireview. *World J Clin Cases.* 2020; 8 (19): 4303–10. DOI: 10.12998/wjcc.v8.i19.4303.
16. Beigmoammadi MT, Jahanbin B, Safaei M, et al. Pathological findings of postmortem biopsies from lung, heart, and liver of 7 deceased COVID-19 patients. *Int J Surg Pathol.* 2021; 29 (2): 135–45. DOI: 10.1177/1066896920935195.
17. Fanni D, Cerrone G, Saba L, et al. Thrombotic sinusoiditis and local diffuse intrasinusoidal coagulation in the liver of subjects affected by COVID-19: the evidence from histology and scanning electron microscopy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2021; 25 (19): 5904–12. DOI: 10.26355/eurrev_202110_26866.
18. Wang Y, Liu S, Liu H, et al. SARS-CoV-2 infection of the liver directly contributes to hepatic impairment in patients with COVID-19. *J Hepatol.* 2020; 73 (4): 807–16. DOI: 10.1016/j.jhep.2020.05.002.
19. Schmit G, Lelotte J, Vanhaebost J, et al. The liver in COVID-19-related death: protagonist or innocent bystander? *Pathobiology.* 2021; 88 (1): 88–94. DOI: 10.1159/000512008.
20. Cai Q, Huang D, Yu H, et al. COVID-19: abnormal liver function tests. *J Hepatol.* 2020; 73 (3): 566–74. DOI: 10.1016/j.jhep.2020.04.006.
21. Stebbing J, Sanchez Nievas G, Falcone M, et al. JAK inhibition reduces SARS-CoV-2 liver infectivity and modulates inflammatory responses to reduce morbidity and mortality. *Sci Adv.* 2021; 7 (1): eabe4724. DOI: 10.1126/sciadv.abe4724.
22. Kim WY, Kweon OJ, Cha MJ, et al. Dexamethasone may improve severe COVID-19 via ameliorating endothelial injury and inflammation: A preliminary pilot study. *PLoS One.* 2021; 16 (7): e0254167. DOI: 10.1371/journal.pone.0254167.
23. Raschi E, Caraceni P, Poluzzi E, De Ponti F. Baricitinib, JAK inhibitors and liver injury: a cause for concern in COVID-19? *Expert Opin Drug Saf.* 2020; 19: 1367–69. DOI: 10.1080/14740338.2020.1812191.
24. Naeem A, Khamuani MK, Kumar P, et al. Impact of coronavirus diseases on liver enzymes. *Cureus.* 2021; 13 (9): e17650. DOI: 10.7759/cureus.17650.
25. Cornberg M, Buti M, Eberhardt CS, Grossi PA, Shouval D. EASL position paper on the use of COVID-19 vaccines in patients with chronic liver diseases, hepatobiliary cancer and liver transplant recipients. *J Hepatol.* 2021; 74 (4): 944–51. DOI: 10.1016/j.jhep.2021.01.032.
26. Hundt MA, Deng Y, Ciarleglio MM, et al. Abnormal liver tests in COVID-19: a retrospective observational cohort study of 1827 patients in a major U.S. hospital network. *Hepatology.* 2020; 72 (4): 1169–76. DOI: 10.1002/HEP.31487.
27. Pirisi M, Rigamonti C, D'Alfonso S, et al. Liver infection and COVID-19: the electron microscopy proof and revision of the literature. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2021; 25 (4): 2146–51. DOI: 10.26355/eurrev_202102_25120.
28. Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet.* 2020; 395 (10234): 1417–18. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30937-5.
29. Duarte-Neto AN, Monteiro RA, da Silva LF, et al. Pulmonary and systemic involvement in COVID-19 patients assessed with ultrasound-guided minimally invasive autopsy. *Histopathology.* 2020; 77: 186–97. DOI: 10.1111/his.14160.
30. Sonzogno A, Previtali G, Seghezzi M, et al. Liver histopathology in severe COVID 19 respiratory failure is suggestive of vascular alterations. *Liver Int.* 2020; 40 (9): 2110–16. DOI: 10.1111/liv.14601.
31. Fogarty H, Townsend L, Morrin H, et al. Persistent endotheliopathy in the pathogenesis of long COVID syndrome. *J Thromb Haemost.* 2021; 19 (10): 2546–53. DOI: 10.1111/jth.15490.
32. Rapkiewicz A, Carsons S, Pittaluga S, et al. Megakaryocytes and platelet-fibrin thrombi characterize multi-organ thrombosis at autopsy in COVID-19: A case series. *EClinicalMedicine.* 2020; 24: 100434. DOI: 10.1016/j.eclim.2020.100434.
33. Musa S. Hepatic and gastrointestinal involvement in coronavirus disease 2019 (COVID-19): What do we know till now? *Arab J Gastroenterol.* 2020; 21 (1): 3–8. DOI: 10.1016/j.ajg.2020.03.002.
34. Chen LY, Chu HK, Bai T, et al. Liver damage at admission is an independent prognostic factor for COVID-19. *J Dig Dis.* 2020; 21 (9): 512–18. DOI: 10.1111/1751-2980.12925.
35. Mushtaq K, Khan MU, Iqbal F, et al. NAFLD is a predictor of liver injury in COVID-19 hospitalized patients but not of mortality, disease severity on the presentation or progression — The debate continues. *J Hepatol.* 2021; 74 (2): 482–84. DOI: 10.1016/j.jhep.2020.09.006.
36. Williamson EJ, Walker AJ, Bhaskaran K, et al. OpenSAFELY: factors associated with COVID-19-related hospital death in the linked electronic health records of 17 million adult NHS patients. *Nature.* 2020; 584 (7821): 430–36. DOI: 10.1038/s41586-020-2521-4.
37. Barry A, Apisarnthanarax S, O'Kane GM, et al. Management of primary hepatic malignancies during the COVID-19 pandemic: recommendations for risk mitigation from a multidisciplinary perspective. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020; 5 (8): 765–75. DOI: 10.1016/S2468-1253(20)30182-5.
38. Gosain R, Abdou Y, Singh A, et al. COVID-19 and cancer: a comprehensive review. *Curr Oncol Rep.* 2020; 8; 22 (5): 53. DOI: 10.1007/s11912-020-00934-7.
39. D'Antiga L. Coronaviruses and immunosuppressed patients: the facts during the Third Epidemic. *Liver Transpl.* 2020; 26 (6): 832–4. DOI: 10.1002/lt.25756.
40. SECURE CIRRHOSIS REGISTRY. <https://covidcirrhosis.web.unc.edu/updates-and-data/>. Accessed 14.12.2021.
41. Marjot T, Moon AM, Cook JA, et al. Outcomes following SARS-CoV-2 infection in patients with chronic liver disease: An international registry study. *J Hepatol.* 2021; 74 (3): 567–77. DOI: 10.1016/j.jhep.2020.09.024.
42. Cheung KS, Hung IFN, Chan PPY, et al. Gastrointestinal manifestations of SARS-CoV-2 infection and virus load in fecal samples from a Hong Kong cohort: systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology.* 2020; 159 (1): 81–95. DOI: 10.1053/j.gastro.2020.03.065.
43. Amirian ES. Potential fecal transmission of SARS-CoV-2: Current Evidence and Implications for Public Health. *Int J Infect Dis.* 2020; 95: 363–70. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.04.057.
44. Han D, Fang Q, Wang X. SARS-CoV-2 was found in the bile juice from a patient with severe COVID-19. *J Med Virol.* 2021; 93 (1): 102–4. DOI: 10.1002/jmv.26169.
45. Vespa E, Pugliese N, Colapietro F, Aghemo A. STAY (GI) HEALTHY: COVID-19 and gastrointestinal manifestations. *Tech Innov Gastrointest Endosc.* 2021; 23 (2): 179–89. DOI: 10.1016/j.tige.2021.01.006.
46. Filbin MR, Mehta A, Schneider AM, et al. Longitudinal proteomic analysis of severe COVID-19 reveals survival-associated signatures, tissue-specific cell death, and cell-cell interactions. *Cell Rep Med.* 2021; 2 (5): 100287. DOI: 10.1016/j.xcrm.2021.100287.

ДЕНДРИМЕРЫ РАМАМ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ

Е. В. Попова ✉, Д. В. Криворотов, Р. В. Гамазков, А. С. Радилов

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

Разработка систем доставки лекарственных веществ на основе разветвленных биосовместимых полимеров — одно из наиболее перспективных направлений современной нанофармацевтики. Исследования в данной области ведут уже не одно десятилетие, а их результаты активно внедряют в производство. Дендримеры — новый класс универсальных синтетических полимеров с поверхностью высокой степени функциональности, — обладают уникальными свойствами: постоянством размера, высокой степенью разветвления, мультивалентностью, растворимостью в воде, четко определенной молекулярной массой, наличием внутренних полостей. С выпуском первого коммерческого продукта на основе дендримера — геля VivaSol, «модельный ряд» дендримерных носителей существенно разросся. Поли(амид)аминовые дендримеры, состоящие из алкилдиаминового ядра и третичных аминовых ветвей, считают одними из наиболее перспективных соединений для разработки препаратов нового поколения. Однако их клиническая адаптация долгое время была ограничена вследствие их токсичности, неопределенности поведения в живых системах и фармакокинетического профиля, а также сложности в подборе терапевтической дозы. В обзоре представлены основные сведения о дендримерах PAMAM и сделана попытка оценить перспективы их применения в терапии различных заболеваний, в том числе COVID-19.

Ключевые слова: дендримеры, лекарственные препараты, COVID-19, системы доставки

Вклад авторов: все авторы статьи в равнозначной степени внесли вклад в поиск и анализ литературы, интерпретацию полученных данных, подготовку и оформление рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Елена Викторовна Попова
ул. Бехтерева, д. 1, корп. 3, литера Р, г. Санкт-Петербург, 192019, Россия; arabka2008@mail.ru

Статья получена: 10.03.2022 **Статья принята к печати:** 24.03.2022 **Опубликована онлайн:** 30.03.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.008

PAMAM DENDRIMERS AND PROSPECTS OF THEIR APPLICATION IN MEDICINE

Popova EV ✉, Krivorotov DV, Gamazkov RV, Radilov AS

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

Development of drug delivery systems based on branched biocompatible polymers is one of the most promising areas of modern nanopharmaceutics. Researchers have been exploring this area several decades now, and the results of their efforts quickly find their way into production. Dendrimers, a new class of universal synthetic polymers with a highly functional surface, have a number of unique properties: constant size, high degree of branching, multivalence, solubility in water, definite molecular weight, internal cavities. With the release of VivaSol gel, the first dendrimer-based commercialized product, the "model range" of dendrimer carriers has grown significantly. Poly(amide-amine) (PAMAM) dendrimers, which consist of an alkyldiamine core and tertiary amine branches, are believed to be among the most promising compounds that can be used in the development of the new generation drugs. However, they were kept out of the list of clinically acceptable compounds for a long time because of their toxicity, unclear behavior in living systems and pharmacokinetic profile, as well the difficulties associated with establishing a therapeutic dose. This review presents basic information about PAMAM dendrimers and attempts to assess the prospects of their application in treatment of various diseases, including COVID-19.

Keywords: dendrimers, drugs, COVID 19, drug delivery systems

Author contribution: all authors of the article took equal parts in the literature search and analysis, data interpretation, manuscript authoring and preparation.

✉ **Correspondence should be addressed:** Elena Viktorovna Popova
Bekhtereva, 1, corp. 3, litera R, St. Petersburg, 192019, Russia; arabka2008@mail.ru

Received: 10.03.2022 **Accepted:** 24.03.2022 **Published online:** 30.03.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.008

Разработка систем доставки лекарственных средств и вакцин является наиболее приоритетным направлением современной фармацевтической химии. На сегодняшний день крупнейшие фармацевтические компании работают в области получения новых систем доставки для лекарственных препаратов, вакцин и siPHK. Одной из ведущих областей их практического применения остается онкология. Однако с 2019 г. с наступлением пандемии COVID-19 получила особую актуальность разработка систем доставки противовирусных препаратов в органы мишени (мозг, легкие, кишечник), а также лекарственных препаратов, которые используют в стандартной терапии. Широкое разнообразие новых систем доставки привело к необходимости регулярно систематизировать сведения о возможностях их применения в клинической практике. Так,

интерес к трехмерным разветвленным монодисперсным полимерам дендримерам в первую очередь обусловлен их уникальной и стабильной структурой [1]. В отличие от других полимеров, их строение можно контролировать в процессе поэтапного синтеза, что и приводит к низкой степени полидисперсности в дополнение к их уникальной геометрии и валентным особенностям. Постоянные заряд и размер дают возможность образовывать хорошо охарактеризованные комплексы с различными препаратами.

Цель данного обзора — обобщить сведения о системах доставки на основе дендримеров PAMAM для различных лекарственных соединений, описанных в научной литературе и применяемых в фармацевтической отрасли. Кроме того, сделан акцент на тенденции применения данного носителя для борьбы с COVID-19.

Перспективы применения дендримеров PAMAM для доставки лекарственных препаратов

Дендримеры PAMAM могут быть успешно использованы для решения различных биомедицинских задач. Системы доставки на основе дендримеров способны служить носителями как для гидрофильных, так и для гидрофобных соединений [2]. Тем не менее прямая клиническая адаптация простых немодифицированных дендримеров PAMAM в настоящее время ограничена, главным образом, из-за их токсичности, непредсказуемого поведения в живых организмах, неизвестной биодоступности, биосовместимости или фармакокинетического профиля; проблемы вызывают также выбор терапевтической дозы и высокая стоимость производства.

Очень маленькие размеры дендримеров PAMAM (1–200 нм) существенно снижают возможность их захвата и разрушения элементами ретикуло-эндотелиальной системы [3]. Из недостатков дендримеров-катионов PAMAM высоких поколений можно назвать их способность разрушать клеточные мембраны [4].

Известно, что дендримеры способны проходить через гематоэнцефалический барьер, что позволяет доставлять включенные в них препараты в мозг. PAMAM наиболее часто используют для лечения заболеваний головного мозга [5]. Например, комплексы этого дендримера и противосудорожного препарата карбамазепина используют при лечении болезни Альцгеймера [6]. Дендримеры PAMAM второго поколения, модифицированные капроильными цепями, эффективны для назальной доставки инсулина [7].

Доказана возможность доставки в мозг нейрореплика галоперидола дендримером PAMAM пятого поколения (препарат известен своей низкой растворимостью в воде) [8]. Галоперидол в комплексе с дендримером после назального введения при меньших дозах оказывал лечебный эффект, сопоставимый с внутривенным введением данного препарата.

Проведен анализ возможностей использования дендримеров как систем доставки иммуногенных пептидов в живой организм. Поскольку биодоступность пептидов недостаточна для индуцирования иммуногенных реакций, а незащищенные пептиды подвержены деградации под действием протеаз, была сделана попытка использовать G4-PAMAM в качестве адьюванта вакцины и в качестве назального носителя пептидного эпитопа pPGT122 [9].

Катионные PAMAM дендримеры пятого и седьмого поколений, меченные ^{14}C , способны накапливаться в поджелудочной железе, что можно применять при лечении сахарного диабета. Кроме того, продемонстрировано, что данные дендримеры быстро (< 2 ч) выводятся почками с мочой [10].

Дендримеры могут быть также использованы как системы доставки белков в организм, например, рибонуклеаз, алкогольдегидрогеназ, альдолаз, в том числе белков плазмы крови — человеческого сывороточного альбумина и γ -глобулина [11].

Лекарственные препараты, применяемые в офтальмологии

До 105 млн жителей всего мира страдают от глаукомы, распространенного и тяжелого хронического заболевания глаз, которое может проявляться в разнообразных клинических формах у людей различного возраста, расы, в том числе у новорожденных [12]. На сегодняшний день на

рынке представлено много новых препаратов для лечения глаукомы, однако их выбор все еще ограничен.

Продемонстрирована возможность применения дендримеров PAMAM для доставки противоопухолевых препаратов нитрата пилокарпина и тропикамида [13]. Биодоступность нитрата пилокарпина в комплексе с дендримером PAMAM при этом увеличивалась.

Разработан гидрогель (mcDH) дендримера PAMAM пятого поколения и диакрилата полиэтиленгликоля (PEG-DA) [14]. На основе гидрогеля создана новая антиглаукомная лекарственная форма бримонидина. Авторами этой работы были также исследованы цитотоксичность системы доставки к фибробластам NIH3T3, кинетика высвобождения бримонидина *in vitro* и его способность проникать через роговицу кролика.

В 2017 г. появилось сообщение о быстрорастворимом нановолоконном скаффолде из дендримера PAMAM с тартратом бримонидина в качестве альтернативы глазным каплям [15]. В течение трехнедельного эксперимента на модели коричневой норвежской крысы реакция на препарат у животных была одинаковой после применения как скаффолда, так и капель с тартратом бримонидина. Отмечены высокая растворимость скаффолдов, полная биосовместимость и эффективная доставка бримонидина.

В исследованиях *in vitro* и *ex vivo* показано, что гидрогели на основе PAMAM способны усиливать эффективность проникновения антиглаукомных препаратов в ткани глаза, вследствие чего снижается дозировка и повышается их эффективность.

Лекарственные препараты, применяемые в онкологии

Рост числа онкологических заболеваний у населения и совершенствование методик лечения данной патологии обусловили динамичное развитие данной области медицинской науки. Одним из наиболее часто применяемых методов лечения онкологических заболеваний является лучевая терапия (ЛТ). Основные задачи ЛТ — полная резорбция опухолевой ткани, торможение роста опухоли и уменьшение симптомов заболевания. Среди ограничений данного метода лечения — необходимость достижения наибольшей эффективности нацеливания и удержания излучения в месте опухоли. В связи с этим перспективным и стремительно развивающимся направлением лучевой терапии онкологических заболеваний является применение радиофармпрепаратов на основе дендримеров. Концепция данного направления заключается в том, что радиофармпрепараты переносят радиоактивный нуклид в опухолевую ткань в нужной концентрации, защищая при этом здоровые ткани от радиационного воздействия. Маркировка дендримеров радионуклидами направлена на снижение дозы радиометок, и, следовательно, на снижение их токсичности и устойчивости к опухолям [16]. Например, дендримеры PAMAM могут специфично нацеливаться на клетки карциномы легких человека A549, сверхэкспрессирующие интегрин $\alpha\text{v}\beta3$. Дендример в свою очередь можно эффективно пометить радиометкой ^{131}I и в дальнейшем использовать в лучевой терапии карциномы легкого со сверхэкспрессией интегрин $\alpha\text{v}\beta3$ [17].

Современная противоопухолевая химиотерапия насчитывает около сотни лекарственных препаратов и несколько групп веществ со схожей химической структурой, механизмом противоопухолевого действия и источником происхождения. Результат действия любых противоопухолевых препаратов — ингибирование

клеточной пролиферации и гибель опухолевых клеток. Перспективность использования дендримеров заключается в создании комплексов «химиопрепарат–дендример» и доставке противоопухолевого препарата в органы, пораженные новообразованием с их последующим высвобождением в высоких концентрациях. Таким образом реализуются основные цели химиотерапии: безрецидивная выживаемость пациента после операции (адъювантная химиотерапия), уменьшение объема оперативного вмешательства (неоадъювантная химиотерапия), улучшение качества жизни (поддерживающая химиотерапия).

Противоопухолевые активные вещества, в состав которых входят карбоксильные группы, такие как метотрексат (MTX) или доксорубин (DOX), могут хорошо взаимодействовать с ядром и поверхностью дендримеров PAMAM. Скорость включения этих препаратов увеличивается с ростом поколения дендримеров (например, до 26 молекул MTX могут войти в дендример PAMAM четвертого поколения с дополнительными цепями полиэтиленгликоля (ПЭГ)).

Один из наиболее известных противораковых препаратов, включаемый в дендримеры, доксорубин [18], можно применять для лечения рака молочной железы, мочевого пузыря, желудка и глиом. Известно, что дендримеры PAMAM способны проникать через эпителиальные барьеры кишечника, что позволяет использовать их в качестве пероральных носителей. В одном из исследований в дендримеры PAMAM, функционализированные фолиевой кислотой (широко используется в качестве вектора для противоопухолевых препаратов) и изотиоцианатом в качестве флуоресцентной метки, включали доксорубин. Полученный комплекс показал высокую эффективность [19].

Большое число работ посвящено разработке лекарственных векторов на основе дендримеров PAMAM для доставки таких противоопухолевых препаратов, как флуороурацил [20], гемцитабин [21], берберин [22], таиландепсин А [23], паклитаксел [24], цисплатин [25] и маллоапелта В [26].

Стандартный химиотерапевтический препарат гемцитабин применяют при прогрессирующем раке поджелудочной железы. Одним из недостатков гемцитабина выделяют короткий период его полураспада. Цель большинства исследований, посвященных разработке систем доставки гемцитабина на основе дендримера, — получение эффективной, наименее токсичной системы для лечения онкологических заболеваний [27].

Изохинолиновый алкалоид берберин (BBR), относящийся к протоберберинам, используют в традиционной медицине для лечения таких заболеваний, как диабет 2-го типа и гиперхолестеринемия. Так как BBR ингибирует рост раковых клеток и индуцирует апоптоз, его применяют и при терапии онкологических заболеваний. Разработан комплекс дендримера PAMAM и BBR и исследована его противоопухолевая активность на клетки рака молочной железы человека MCF-7 и MDA-MB-468 [22, 28]. Система PAMAM-BBR показала более высокий противоопухолевый эффект по сравнению со свободным BBR. Ковалентное сшивание BBR с аминок группами дендримера позволило увеличить включение препарата и даже улучшить его противоопухолевые эффекты. Снижалась гемолитическая токсичность и гипогликемические эффекты BBR.

Продемонстрирована также возможность использования трастузумаба в комплексе с дендримером PAMAM, связанного с паклитакселом или доцетакселом в

целях специфического воздействия на SKBR3 HER-2-позитивные клетки. Более того, полученные конъюгаты продемонстрировали более высокую токсичность по отношению к HER-2-положительным клеткам рака молочной железы человека по сравнению со свободным лекарственным средством или конъюгатом PAMAM-трастузумаб [29].

Противоопухолевый препарат *цис*-дихлордидиаминоплатина(II) (цисплатин) проявляет противоопухолевую активность, связывая ДНК посредством внутривольстных перекрестных связей с d(GpG) (dG = дезоксигуанозин) и с d(ApG) (dA = дезоксиаденозин), что нарушает репликацию и транскрипцию ДНК и вызывает гибель клеток. Цисплатин очень эффективен при лечении многих солидных опухолей, включая рак яичников. Тем не менее его эффективность ограничена не только тем, что опухоли становятся невосприимчивыми к лечению цисплатином, но и появлением системных побочных эффектов, таких как нефротоксичность и нейротоксичность [25]. Комплексы PAMAM–цисплатин показали большую эффективность на всех клеточных линиях рака яичников (даже устойчивых к цисплатину) по сравнению со свободным цисплатином. Комплексы дендримера PAMAM четвертого поколения с цисплатином показали образование аддуктов ДНК, повышенную экспрессию апоптотических генов и высокую активность каспазы в сочетании с улучшенной цитотоксичностью в различных клеточных линиях, устойчивых к цисплатину [30].

Генистеин 4,5,7-тригидроксиизофлавонол, присутствующий в сое и нуте, обладает широким спектром физиологических и фармакологических функций. Известно, что он тормозит рост клеток меланомы человека при переходе G₂/M и, как установлено, ингибирует разрывы нитей ДНК, опосредованные H₂O₂/Cu(II), действуя как прямой поглотитель активных форм кислорода с группой OH в положении C-4, ответственной за его антиоксидантную активность [31].

Связывание ПЕГилированного дендримера PAMAM четвертого и пятого поколений и противоракового препарата 5-фторурацила (5FU) позволило снизить потери при доставке препарата, а также снизить его гемолитическую токсичность [20]. Полное насыщение дендримера PAMAM-NH₂ четвертого поколения наступало при 90 молекулах препарата. В работе [32] было предложено повысить синергическую противоопухолевую эффективность путем разработки системы совместной доставки генного вектора miR-205 и целевого препарата 5FU с помощью ацетилированного PAMAM, конъюгированного с LHRH-пептидом (LHRH-G5.0NHAC). Затем оптимизированную систему совместной доставки оценивали на предмет синергического противоопухолевого эффекта *in vitro* и *in vivo*.

Известно, что фолатные рецепторы (FR) экспрессируются в большом количестве во многих типах опухолевых клеток (например, карциноме молочной железы) [33]. Модифицированные полиэтиленгликолем дендримеры PAMAM четвертого поколения были функционализированы фолиевой кислотой (FA). Затем в комплекс включили 5FU и ^{99m}Tc (технеций-99 м) и получили новый комплекс ПЭГ-PAMAM G4-FA-5FU-^{99m}Tc. При этом FA-специфичный комплекс показал высокую эффективность проникновения в клетки рака молочной железы по сравнению с другими наноносителями и нормальными клетками.

В одном из исследований дендример PAMAM использовали для совместной доставки антисмыслового

олигонуклеотида miR-21 (as-miR-21) и 5FU для лечения глиобластомы человека и повышения цитотоксичности антисмысловой терапии 5FU [34]. Антисмысловая терапия основана на выключении синтеза белка, участвующего в развитии заболевания, за счет ингибирования трансляции его mРНК с помощью комплементарных ей антисмысловых олигонуклеотидов.

Описана система доставки гемцитабина на основе дендримера PAMAM с ядром из ПЭГ, содержащая в своем составе группы анионных карбоновых кислот, модифицированные цепями ПЭГ с одновременной конъюгацией данных цепей с антителами против Flt1 [35]. Flt1 известен как рецептор 1 фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), способствующего ангиогенезу при различных гистоморфологических видах рака. Включение в данную систему гемцитабина позволило повысить его эффективность в снижении опухолевой нагрузки в модели рака поджелудочной железы с ксенотрансплантатом. Данная система доставки гемцитабина изменила также динамику роста миелоидных клеток и уменьшила их число в костном мозге.

Еще одно важное применение дендримеров — использование векторов для адресной доставки противоопухолевых препаратов. К таким векторам относят моноклональные антитела и опухолеспецифичные белки, которые могут распознавать и связывать опухолеспецифичные антигены. Многообещающим объектом для использования в качестве вектора адресной доставки противоопухолевых препаратов можно назвать фолиевую кислоту. Рецептор фолиевой кислоты локализуется на клеточных мембранах большинства опухолей (карциномы, глиомы). После связывания с рецептором комплекс дендримера и препарата посредством рецепторопосредованного эндоцитоза проникает в клетку и высвобождает препарат.

Противовирусные препараты

Вирусные заболевания являются одной из важнейших медицинских и социальных проблем последних двух столетий. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, некоторые острые вирусные инфекции ежегодно уносят жизни до 14 млн человек по всему миру. Вирусы — это неклеточная форма жизни, способная инфицировать живые организмы, проникая через эпителий желудочно-кишечного тракта (энтеровирус, аденовирус), эпителий респираторного тракта (риновирус), кожные покровы (вирус папилломы, ветряная оспа), слизистые оболочки, в ходе гемотрансфузий, трансплантации органов, грудного вскармливания, трансплацентарно.

Среди основных требований к новым противовирусным средствам при их разработке — способность избирательно подавлять определенный этап репродукции вируса (не оказывая при этом влияния на процессы жизнедеятельности других клеток организма); высокая биодоступность, поддерживающая эффективную концентрацию препарата в клетках-мишенях, для излечения и противодействия развитию лекарственной устойчивости.

Включение противовирусных препаратов в дендримеры позволяет обеспечить целевую доставку в органы мишени и пролонгировать действие лекарственных средств, что в свою очередь обеспечивает эффективность лекарственной терапии. Среди противовирусных препаратов наиболее распространены производные интерферонов, ингибиторы вирусной РНК, а также ферментов (нейраминидаза),

обеспечивающих высвобождение новых вирионов. Формированием комплексов интерферонов с дендримерами ученые занимаются не первый год. Был получен комплекс аргинин-модифицированного дендримера PAMAM интерферона бета для лечения глиобластомы, который затем исследовали на мышах [36]. В другой работе авторам удалось получить трансдермальную систему доставки на основе дендримера PAMAM и интерферон-регуляторного фактора 3 (IFN 3).

В литературе имеются единичные указания на создание комплекса дендримера с противовирусным препаратом, например ацикловиром [37].

Дендримеры PAMAM и COVID-19

Можно выделить пять классов лекарственных препаратов, которые применяют в стандартной терапии COVID-19: противовоспалительные (неспецифические противовоспалительные препараты), кортикостероиды для системного использования (глюкокортикостероиды), витамины, противовирусные и антикоагулянты. Адресная доставка позволяет снизить системное воздействие лекарственных препаратов на организм, увеличить их биодоступность, снизить дозу и токсическую нагрузку на органы, обеспечивающие элиминацию препарата из организма.

Комбинированная лекарственная терапия при помощи систем доставки является одним из перспективных направлений в лечении осложненных форм течения COVID-19. Она позволяет не только снизить дозировку вводимых препаратов, но и одновременно достигнуть нескольких терапевтических целей. Например, терапия воспалительных проявлений в легких при COVID-19 включает в себя применение неспецифических противовоспалительных, противовирусных препаратов, кортикостероидов и антикоагулянтов. Данные препараты вводят парентерально и они действуют системно, что значительно увеличивает число побочных эффектов и ятрогенных осложнений от их применения.

Противовирусные препараты при лечении COVID-19

Известно, что противовирусной активностью (вирус герпеса (HSV) и гриппа) обладают и сами дендримеры-катионы PAMAM [38]. Катионные дендримеры с группами NH_2 и OH взаимодействовали с отрицательно заряженной оболочкой вируса MERS-CoV, блокируя тем самым вирус [39]. Комплексы 3'-сиаллактозы или 6'-сиалиллактозы и полиамидаминового дендримера первого поколения были исследованы на противовирусную активность против различных штаммов вируса гриппа [40]. В исследовании отмечено, что комплексы предотвращали проникновение вируса в клетки. На основании анализа данных ингибирования геммоглютинации установлено, что вирусы гриппа человека и вирусы гриппа свиного происхождения подвергались ингибированию (6SL)-конъюгированными дендримерами PAMAM и в меньшей степени (3SL)-конъюгированными дендримерами PAMAM.

Одним из органов-мишеней, поражаемых новой коронавирусной инфекцией, является головной мозг. Основной проблемой в создании терапевтических доз лекарственных препаратов является доставка препарата в головной мозг из-за сложности прохождения им гематоэнцефалического барьера. Поэтому перспективна разработка систем доставки препарата к патологическому

очагу, преодолевающих физиологические барьеры организма и высвобождающих его в терапевтической дозе в пораженной вирусом ткани.

Противовоспалительные препараты при лечении COVID-19

В основе возникновения тяжелых осложнений после новой коронавирусной инфекции лежит развитие системной воспалительной реакции организма с чрезмерной выработкой цитокинов. Фактор некроза опухоли альфа (TNF α) играет центральную роль в большинстве воспалительных заболеваний легких (таких как хроническая обструктивная болезнь легких, астма, острый респираторный дистресс-синдром и острое повреждение легких). TNF α теоретически является перспективной мишенью для терапии против острого и хронического воспаления легких на основе siPHK. Авторы одного из исследований использовали дендримеры PAMAM третьего поколения для доставки в легкие siPHK, нацеленной на TNF α [41]. Эффективность и безопасность полученного комплекса (дендриплекса) изучали на модели острого воспаления легких у мышей. Показано, что дендриплексы обеспечивали эффективную доставку, высокую эффективность трансфекции и высокое поглощение макрофагами RAW264.7.

Описана система доставки оксигеназы гема 1 (HO-1) на основе комплекса дендримера PAMAM второго поколения и дексаметазона для лечения ишемического инсульта [42]. HO-1 является антиоксидантным ферментом, оказывающим противовоспалительное и иммуномодулирующее действие на организм. Противовоспалительный кортикостероидный препарат дексаметазон широко используют для лечения различных острых воспалительных заболеваний. В частности, его применяют для облегчения отека мозга при ишемическом инсульте. Следовательно, комбинированная доставка гена HO-1 и дексаметазона может оказывать аддитивное влияние на ишемизированные структуры головного мозга.

Муколитический отхаркивающий противовоспалительный препарат N-ацетилцистеин применяют при инфекционных и респираторных заболеваниях верхних и нижних дыхательных путей. Выявлена эффективность конъюгатов анионного дендримера PAMAM-COOH и N-ацетилцистеин (NAC) при лечении нейровоспалений [43]. Антиоксидантные и противовоспалительные эффекты конъюгата PAMAM-(COOH)-(NAC) оценивали на микроглиальных клетках *in vitro*. На примере комплекса дендримера PAMAM и NAC было зафиксировано увеличение антиоксидантной активности NAC по сравнению со свободным препаратом [44]. Кроме того, на клетках микроглии (резидентные макрофаги центральной нервной системы) исследовали цитотоксичность, поглощение клетками и эффективность системы доставки. Клеточное поглощение дендримеров было стремительным, с четко выраженной скоростью высвобождения препарата.

Доставка комплекса дендримера PAMAM и метилпреднизолона в легкие — это перспективное направление в лекарственной терапии COVID-19. При выборе дендримера PAMAM четвертого поколения в качестве носителя для метилпреднизолона было продемонстрировано, что после интраназального введения раствора с комплексом дендример оставался в легком в течение пяти дней [45]. Повторные ежедневные введения в течение следующих пяти дней показали, что комплекс не вызывал каких-либо наблюдаемых неспецифических воспалительных реакций в легких.

Известно, что течение COVID-19 может сопровождать агрессивный воспалительный ответ с активным выбросом воспалительных цитокинов. Такая реакция носит название цитокинового шторма. Это неконтролируемый гиперактивный иммунный ответ на инфицирование вирусом SARS-CoV-2, приводящий к обширному поражению легочной ткани в сочетании с полиорганной недостаточностью. Цитокиновый шторм — одна из основных причин гибели пациентов с COVID-19. Для купирования данного патологического состояния в клинической практике применяют иммунодепрессанты в виде рекомбинантных гуманизированных моноклональных антител к рецепторам интерлейкина ИЛ-6 и ИЛ-1: тоцилизумаб, сарилумаб, левилимаб, олокизумаб, канакинумаб. Разработка целевой доставки данных препаратов в зону воспаления является перспективным направлением в лечении осложненных форм течения новой коронавирусной инфекции.

Антикоагулянты при лечении COVID-19

Одним из грозных осложнений течения COVID-19 является развитие внутрисосудистого тромбообразования. Поэтому в клиническом стандарте лечения всегда присутствуют лекарственные препараты, угнетающие активность коагуляционного гемостаза и препятствующие образованию тромбов. Дендримеры PAMAM могут быть применены в качестве противотромбозного средства при антикоагулянтной терапии [19]. Соединения четвертого и пятого поколений, модифицированные аргинином и фолиевой кислотой с кумарин-3-карбоксильной кислотой, показали хороший противотромбозный эффект, высокую гемосовместимость и стабильность. Предложено использовать для лечения венозных тромбозов комплекс дендримера PAMAM и эноксапарина, показавший свою эффективность в экспериментах на мышах [46].

Комплексы PAMAM дендримера с гепарином, одним из наиболее известных антикоагулянтов, могут быть сформированы как путем включения препарата внутрь дендримера, так и за счет электростатического взаимодействия с функциональными группами. Известно, что комплекс дендримера и гепарина, полученный за счет электростатических взаимодействий, увеличивает биосовместимость самого дендримера, а также снижает цитотоксичность [47]. Дендример PAMAM третьего поколения использовали для доставки эноксапарина в легкие, что в итоге привело к предотвращению тромбообразования в кровеносных сосудах [48].

Иммунобиологические препараты

С тех пор как терапия интерферирующей РНК показала эффективность при лечении новой коронавирусной инфекции, вырос интерес к разработке вакцин на основе siPHK и mPHK. Ингаляционное введение комплекса дендримера PAMAM и siPHK может обеспечить гораздо более специфичную и безопасную терапию при лечении COVID-19.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Очевидно, что интерес к разработке систем доставки с использованием дендримеров различных классов будет увеличиваться с каждым годом. Поэтому совершенствование методов доставки уже зарегистрированных лекарственных средств, применяемых в стандартах лечения, видится перспективным направлением современной фармакологии.

Перспективность определяется целевым воздействием на органы мишени, созданием высоких терапевтических концентраций лекарственных препаратов в очаге поражения, а также снижением побочных эффектов и осложнений от проводимого лечения. В настоящее время многие из препаратов на основе дендримеров уже доступны коммерчески и разрешены к клиническому применению.

Особый интерес научное сообщество уделяет разработке систем доставки не только для борьбы с

онкологической патологией, но и с COVID-19. Осенью 2020 г. компания *Starpharma* объявила о завершении тестирования назального спрея против SARS-CoV-2 на основе SPL7013 дендримера. SPL7013 четвертого поколения состоит из двухвалентного ядра бензилгидриламина, выходящих из ядра ветвей L-лизина с 32 поверхностными группами нафталинсульфоокислоты (DNAA), которые придают поверхности дендримера гидрофобность и высокий анионный заряд [49].

Литература

1. Kharwade R, More S, Warokar A, Agrawal P, Mahajan N. Starburst PAMAM dendrimers: Synthetic approaches, surface modifications, and biomedical applications. *Arabian Journal of Chemistry*. 2020; 13 (7): 6009–39.
2. Abedi-Gaballu F, Dehghan G, Ghaffari M, Yekta R, Abbaspour-Ravasjani S, et al. PAMAM dendrimers as efficient drug and gene delivery nanosystems for cancer therapy. *Applied materials today*, 2018; 12: 177–90.
3. Hannon G, Lysaght J, Liptrott NJ, Prina-Mello A. Immunotoxicity considerations for next generation cancer nanomedicines. *Advanced Science*. 2019; 6 (19): 1900133.
4. Fox LJ, Richardson RM, Briscoe WH. PAMAM dendrimer — cell membrane interactions. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2018; 257: 1–18.
5. Florendo M, Figacz A, Srinageshwar B, Sharma A, Swanson D, et al. Use of Polyamidoamine Dendrimers in Brain Diseases. *Molecules*. 2018; 23: 2238.
6. Igarúa DE, Martínez CS, Temprana CF, Alonso S del V, Jimena Prieto M. PAMAM dendrimers as a carbamazepine delivery system for neurodegenerative diseases: A biophysical and nanotoxicological characterization. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018; 544 (1): 191–202.
7. Yan C, Gu J, Lv Y, Shi W, Wang Y, et al. Caproyl-Modified G2 PAMAM Dendrimer (G2-AC) Nanocomplexes Increases the Pulmonary Absorption of Insulin. *AAPS PharmSciTech*. 2019; 20: 298.
8. Xie H, Li L, Sun Y, Wang Y, Gao S, et al. An Available Strategy for Nasal Brain Transport of Nanocomposite Based on PAMAM Dendrimers via In Situ Gel. *Nanomaterials*. 2019; 9 (2): 147.
9. Alberto RFR, Martiniano B, Saúl RH, Jazmín GM, Mara GS, et al. In silico and in vivo studies of gp120-HIV-derived peptides in complex with G4-PAMAM dendrimers. *RSC Advances*. 2020; 10 (35): 20414–26.
10. Kheraldine H, Rachid O, Habib AM, Moustafa A-E, Benter IF, et al. Emerging innate biological properties of nano-drug delivery systems: A focus on PAMAM dendrimers and their clinical potential. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021; 178: 113908.
11. Thiagarajan G, Sadekar S, Greish K, Ray A, Ghandehari H. Evidence of oral translocation of anionic G6.5 dendrimers in mice. *Molecular pharmaceutics*. 2013; 10 (3): 988–98.
12. Бахрушина Е. О., Анурова М. Н., Демина Н. Б., Лапик И. В., Тураева А. Р., и др. Системы доставки офтальмологических препаратов (обзор). Разработка и регистрация лекарственных средств. 2020; 10 (1): 57–66.
13. Prajapati SK, Jain A. Dendrimers for Advanced Drug Delivery. In *Advanced Biopolymeric Systems for Drug Delivery*. Eds: Springer, Cham. 2020; 339–60.
14. Wang J, Williamson GS, Lancina III MG, Yang H. Mildly cross-linked dendrimer hydrogel prepared via aza-Michael addition reaction for topical brimonidine delivery. *Journal of biomedical nanotechnology*. 2017; 13 (9): 1089–96.
15. Belamkar A, Harris A, Zukerman R, Siesky B, Oddone F, et al. Sustained release glaucoma therapies: Novel modalities for overcoming key treatment barriers associated with topical medications. *Annals of Medicine*. 2022; 54 (1): 343–58.
16. Liko F, Hindre F, Fernandez-Megia E. Dendrimers as innovative radiopharmaceuticals in cancer radionanotherapy. *Biomacromolecules*. 2016; 17 (10): 3103–14.
17. Jinhe Z, Ruimin W, Jianqiu Z, Yongming C, Wang X, et al. RGDyC peptide-Modified PAMAM Dendrimer Conjugates Labeled with Radionuclide¹³¹I for SPECT Imaging and Radiotherapy of Lung Carcinoma. *Journal of Nuclear Medicine*. 2019; 60 (1): 1056.
18. Marcinkowska M, Sobierajska E, Stanczyk M, Janaszewska A, Chworos A, et al. Conjugate of PAMAM Dendrimer, Doxorubicin and Monoclonal Antibody—Trastuzumab: The New Approach of a Well-Known Strategy. *Polymers*. 2018; 10: 187.
19. Araújo R, Santos S, Igne Ferreira E, Giarolla J. New Advances in General Biomedical Applications of PAMAM Dendrimers. *Molecules*. 2018; 23 (11): 2849–76.
20. Bhadra D, Bhadra S, Jain S, Jain NK. A PEGylated dendritic nanoparticulate carrier of fluorouracil. *Int J Pharm*. 2003; 257 (1–2): 111–24.
21. Surekha B, Kommana NS, Dubey SK, Kumar AP, Shukla R, et al. PAMAM dendrimer as a talented multifunctional biomimetic nanocarrier for cancer diagnosis and therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2021; 204: 111837.
22. Gupta L, Sharma AK, Gothwal A, Khan MS, Khinchi MP, et al. Dendrimer encapsulated and conjugated delivery of berberine: A novel approach mitigating toxicity and improving in vivo pharmacokinetics. *International journal of pharmaceutics*. 2017; 528 (1–2): 88–99.
23. Chen G, Jaskula-Sztul R, Harrison A, Dammalapati A, Xu W, et al. KE108-conjugated unimolecular micelles loaded with a novel HDAC inhibitor thailandepsin-A for targeted neuroendocrine cancer therapy. *Biomaterials*. 2016; 97: 22–33.
24. Srivastava A, Tripathi PK. PAMAM dendrimer-vitamin conjugate for delivery of paclitaxel as anticancer agent. *International Journal of Green Pharmacy*, 2020; 14 (4): 360–6.
25. Xu X, Li Y, Lu X, Sun Y, Luo J, et al. Glutaryl polyamidoamine dendrimer for overcoming cisplatin-resistance of breast cancer cells. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2018; 18 (10): 6732–9.
26. Le PN, Pham DC, Nguyen DH, Tran NQ, Dimitrov V, et al. Poly (N-isopropylacrylamide)-functionalized dendrimer as a thermosensitive nanoplateform for delivering malloapelta B against HepG2 cancer cell proliferation. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. 2017; 8 (2): 025014.
27. Parsian M, Mutlu P, Yalcin S, Tezcaner A, Gunduz U. Half generations magnetic PAMAM dendrimers as an effective system for targeted gemcitabine delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016; 515 (1–2): 104–13.
28. Majidzadeh H, Araj-Khodaei M, Ghaffari M, Torbati M, Dolatabadi JEN, et al. Nano-based delivery systems for berberine: A modern anticancer herbal medicine. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2020; 194: 111188.
29. Marcinkowska M, Stanczyk M, Janaszewska A, Gajek A, Ksiezak M, et al. Molecular Mechanisms of Antitumor Activity of PAMAM Dendrimer Conjugates with Anticancer Drugs and a Monoclonal Antibody. *Polymers*. 2019; 11 (9): 1422.
30. Yellepeddi VK, Kumar A, Maher DM, Chauhan SC, Vangara KK, et al. Biotinylated PAMAM dendrimers for intracellular delivery of cisplatin to ovarian cancer: role of SMVT. *Anticancer research*. 2011; 31 (3): 897–906.
31. Chanphai P, Tajmir-Riahi HA. Encapsulation of micronutrients

- resveratrol, genistein, and curcumin by folic acid-PAMAM nanoparticles. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2018; 449 (1): 157–66.
32. Tang Q, Liu D, Chen H, He D, Pan W, et al. Functionalized PAMAM-Based system for targeted delivery of miR-205 and 5-fluorouracil in breast cancer. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2022; 67: 102959.
 33. Narmani A, Arani MAA, Mohammadnejad J, Vaziri AZ, Solymani S, et al. Breast tumor targeting with PAMAM-PEG-5FU-99mTc as a new therapeutic nanocomplex: in in-vitro and in-vivo studies. *Biomedical Microdevices*. 2020; 22 (2): 1–13.
 34. Ren Y, Kang CS, Yuan XB, Zhou X, Xu P, et al. Co-delivery of as-miR-21 and 5-FU by poly (amidoamine) dendrimer attenuates human glioma cell growth in vitro. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2010; 21 (3): 303–14.
 35. Yoyen-Ermis D, Ozturk-Atar K, Kursunel MA, Aydin C, Ozkazanc D, et al. Tumor-induced myeloid cells are reduced by gemcitabine-loaded PAMAM dendrimers decorated with anti-Flt1 antibody. *Molecular pharmaceutics*. 2018; 15 (4): 1526–33.
 36. Bai CZ, Choi S, Nam K, An S, Park JS. Arginine modified PAMAM dendrimer for interferon beta gene delivery to malignant glioma. *International journal of pharmaceutics*. 2013; 445 (1–2): 79–87.
 37. Chauhan AS. Dendrimers for drug delivery. *Molecules*. 2018; 23 (4): 938.
 38. Bourne N, Stanberry LR, Kern ER, Holan G, Matthews B, et al. Dendrimers, a new class of candidate topical microbicides with activity against herpes simplex virus infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000; 44 (9): 2471–4.
 39. Vahedifard F, Chakravarthy K. Nanomedicine for COVID-19: The role of nanotechnology in the treatment and diagnosis of COVID-19. *Emergent materials*. 2021; 4 (1): 75–99.
 40. Günther SC, Maier JD, Vetter J, Podvalnyy N, Khaznini N, et al. Antiviral potential of 3'-sialyllactose-and 6'-sialyllactose-conjugated dendritic polymers against human and avian influenza viruses. *Scientific reports*. 2020; 10 (1): 1–9.
 41. Bohr A, Tsapis N, Foged C, Andreana I, Yang M, et al. Treatment of acute lung inflammation by pulmonary delivery of anti-TNF- α siRNA with PAMAM dendrimers in a murine model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2020; 156: 114–120.
 42. Jeon P, Choi M, Oh J, Lee M. Dexamethasone-Conjugated Polyamidoamine Dendrimer for Delivery of the Heme Oxygenase-1 Gene into the Ischemic Brain. *Macromolecular Bioscience*. 2015; 15 (7): 1021–8.
 43. Wang B, Navath RS, Romero R, Kannan S, Kannan R. Anti-inflammatory and anti-oxidant activity of anionic dendrimer-N-acetyl cysteine conjugates in activated microglial cells. *International journal of pharmaceutics*. 2009; 377 (1–2): 159–68.
 44. Kurtoglu YE, Navath RS, Wang B, Kannan S, Romero R, et al. Poly (amidoamine) dendrimer-drug conjugates with disulfide linkages for intracellular drug delivery. *Biomaterials*. 2009; 30 (11): 2112–21.
 45. Inapagolla R, Guru BR, Kurtoglu YE, Gao X, Lieh-Lai M, et al. In vivo efficacy of dendrimer-methylprednisolone conjugate formulation for the treatment of lung inflammation. *International journal of pharmaceutics*. 2010; 399 (1–2): 140–7.
 46. Vaidya A, Jain S, Pathak K, Pathak D. Dendrimers: Nanosized multifunctional platform for drug delivery. *Drug Delivery Letters*. 2018; 8 (1): 3–19.
 47. Thanh VM, Nguyen TH, Tran TV, Ngoc UTP, Ho MN, et al. Low systemic toxicity nanocarriers fabricated from heparin-mPEG and PAMAM dendrimers for controlled drug release. *Materials Science and Engineering: C*. 2018; 82: 291–8.
 48. Pandey P, Mehta M, Shukla S, Wadhwa R, Singhvi G, et al. Emerging nanotechnology in chronic respiratory diseases. *Nanofabrications in Human Health*. 2020: 449–68.
 49. Paull JRA, Luscombe CA, Castellarnau A, Heery GP, Bobardt MD, Gallay PA. Protective Effects of Astodimer Sodium 1% Nasal Spray Formulation against SARS-CoV-2 Nasal Challenge in K18-hACE2 Mice. *Viruses*. 2021; 13: 1656.

References

1. Kharwade R, More S, Warokar A, Agrawal P, Mahajan N. Starburst PAMAM dendrimers: Synthetic approaches, surface modifications, and biomedical applications. *Arabian Journal of Chemistry*. 2020; 13 (7): 6009–39.
2. Abedi-Gaballu F, Dehghan G, Ghaffari M, Yekta R, Abbaspour-Ravasjani S, et al. PAMAM dendrimers as efficient drug and gene delivery nanosystems for cancer therapy. *Applied materials today*. 2018; 12: 177–90.
3. Hannon G, Lysaght J, Liptrott NJ, Prina-Mello A. Immunotoxicity considerations for next generation cancer nanomedicines. *Advanced Science*. 2019; 6 (19): 1900133.
4. Fox LJ, Richardson RM, Briscoe WH. PAMAM dendrimer — cell membrane interactions. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2018; 257: 1–18.
5. Florendo M, Figacz A, Srinageshwar B, Sharma A, Swanson D, et al. Use of Polyamidoamine Dendrimers in Brain Diseases. *Molecules*. 2018; 23: 2238.
6. Igarúa DE, Martínez CS, Temprana CF, Alonso S del V, Jimena Prieto M. PAMAM dendrimers as a carbamazepine delivery system for neurodegenerative diseases: A biophysical and nanotoxicological characterization. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018; 544 (1): 191–202.
7. Yan C, Gu J, Lv Y, Shi W, Wang Y, et al. Caproyl-Modified G2 PAMAM Dendrimer (G2-AC) Nanocomplexes Increases the Pulmonary Absorption of Insulin. *AAPS PharmSciTech*. 2019; 20: 298.
8. Xie H, Li L, Sun Y, Wang Y, Gao S, et al. An Available Strategy for Nasal Brain Transport of Nanocomposite Based on PAMAM Dendrimers via In Situ Gel. *Nanomaterials*. 2019; 9 (2): 147.
9. Alberto RFR, Martiniano B, Saúl RH, Jazmín GM, Mara GS, et al. In silico and in vivo studies of gp120-HIV-derived peptides in complex with G4-PAMAM dendrimers. *RSC Advances*. 2020; 10 (35): 20414–26.
10. Kheraldine H, Rachid O, Habib AM, Moustafa A-E, Benter IF, et al. Emerging innate biological properties of nano-drug delivery systems: A focus on PAMAM dendrimers and their clinical potential. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021; 178: 113908.
11. Thiagarajan G, Sadekar S, Greish K, Ray A, Ghandehari H. Evidence of oral translocation of anionic G6.5 dendrimers in mice. *Molecular pharmaceutics*. 2013; 10 (3): 988–98.
12. Baxrushina EO, Anurova MN, Demina NB, Lapik IV, Turaeva AR, i dr. Sistemy dostavki oftal'mologicheskix preparatov (obzor). *Razrabotka i registraciya lekarstvennyx sredstv*. 2020; 10 (1): 57–66. Russian.
13. Prajapati SK, Jain A. Dendrimers for Advanced Drug Delivery. In *Advanced Biopolymeric Systems for Drug Delivery*. Eds: Springer, Cham. 2020; 339–60.
14. Wang J, Williamson GS, Lancina III MG, Yang H. Mildly cross-linked dendrimer hydrogel prepared via aza-Michael addition reaction for topical brimonidine delivery. *Journal of biomedical nanotechnology*. 2017; 13 (9): 1089–96.
15. Belamkar A, Harris A, Zukerman R, Siesky B, Oddone F, et al. Sustained release glaucoma therapies: Novel modalities for overcoming key treatment barriers associated with topical medications. *Annals of Medicine*. 2022; 54 (1): 343–58.
16. Liko F, Hindre F, Fernandez-Megia E. Dendrimers as innovative radiopharmaceuticals in cancer radionanotherapy. *Biomacromolecules*. 2016; 17 (10): 3103–14.
17. Jinhe Z, Ruimin W, Jianqiu Z, Yongming C, Wang X, et al. RGDyC peptide-Modified PAMAM Dendrimer Conjugates Labeled with Radionuclide¹³¹I for SPECT Imaging and Radiotherapy of Lung Carcinoma. *Journal of Nuclear Medicine*. 2019; 60 (1): 1056.
18. Marinkowska M, Sobierajska E, Stanczyk M, Janaszewska A, Chworos A, et al. Conjugate of PAMAM Dendrimer, Doxorubicin and Monoclonal Antibody—Trastuzumab: The New Approach of a Well-Known Strategy. *Polymers*. 2018; 10: 187.

19. Araújo R, Santos S, Igne Ferreira E, Giarolla J. New Advances in General Biomedical Applications of PAMAM Dendrimers. *Molecules*. 2018; 23 (11): 2849–76.
20. Bhadra D, Bhadra S, Jain S, Jain NK. A PEGylated dendritic nanoparticulate carrier of fluorouracil. *Int J Pharm*. 2003; 257 (1–2): 111–24.
21. Surekha B, Kommana NS, Dubey SK, Kumar AP, Shukla R, et al. PAMAM dendrimer as a talented multifunctional biomimetic nanocarrier for cancer diagnosis and therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2021; 204: 111837.
22. Gupta L, Sharma AK, Gothwal A, Khan MS, Khinchi MP, et al. Dendrimer encapsulated and conjugated delivery of berberine: A novel approach mitigating toxicity and improving in vivo pharmacokinetics. *International journal of pharmaceutics*. 2017; 528 (1–2): 88–99.
23. Chen G, Jaskula-Sztul R, Harrison A, Dammalapati A, Xu W, et al. KE108-conjugated unimolecular micelles loaded with a novel HDAC inhibitor thailandepsin-A for targeted neuroendocrine cancer therapy. *Biomaterials*. 2016; 97: 22–33.
24. Srivastava A, Tripathi PK. PAMAM dendrimer-vitamin conjugate for delivery of paclitaxel as anticancer agent. *International Journal of Green Pharmacy*. 2020; 14 (4): 360–6.
25. Xu X, Li Y, Lu X, Sun Y, Luo J, et al. Glutaryl polyamidoamine dendrimer for overcoming cisplatin-resistance of breast cancer cells. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2018; 18 (10): 6732–9.
26. Le PN, Pham DC, Nguyen DH, Tran NQ, Dimitrov V, et al. Poly (N-isopropylacrylamide)-functionalized dendrimer as a thermosensitive nanoplatform for delivering malloapelta B against HepG2 cancer cell proliferation. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. 2017; 8 (2): 025014.
27. Parsian M, Mutlu P, Yalcin S, Tezcaner A, Gunduz U. Half generations magnetic PAMAM dendrimers as an effective system for targeted gemcitabine delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016; 515 (1–2): 104–13.
28. Majidzadeh H, Araj-Khodaei M, Ghaffari M, Torbati M, Dolatabadi JEN, et al. Nano-based delivery systems for berberine: A modern anticancer herbal medicine. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2020; 194: 111188.
29. Marcinkowska M, Stanczyk M, Janaszewska A, Gajek A, Ksiezak M, et al. Molecular Mechanisms of Antitumor Activity of PAMAM Dendrimer Conjugates with Anticancer Drugs and a Monoclonal Antibody. *Polymers*. 2019; 11 (9): 1422.
30. Yellepeddi VK, Kumar A, Maher DM, Chauhan SC, Vangara KK, et al. Biotinylated PAMAM dendrimers for intracellular delivery of cisplatin to ovarian cancer: role of SMVT. *Anticancer research*. 2011; 31 (3): 897–906.
31. Chanphai P, Tajmir-Riahi HA. Encapsulation of micronutrients resveratrol, genistein, and curcumin by folic acid-PAMAM nanoparticles. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2018; 449 (1): 157–66.
32. Tang Q, Liu D, Chen H, He D, Pan W, et al. Functionalized PAMAM-Based system for targeted delivery of miR-205 and 5-fluorouracil in breast cancer. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2022; 67: 102959.
33. Narmani A, Arani MAA, Mohammadnejad J, Vaziri AZ, Solymani S, et al. Breast tumor targeting with PAMAM-PEG-5FU-99mTc as a new therapeutic nanocomplex: in vitro and in vivo studies. *Biomedical Microdevices*. 2020; 22 (2): 1–13.
34. Ren Y, Kang CS, Yuan XB, Zhou X, Xu P, et al. Co-delivery of as-miR-21 and 5-FU by poly (amidoamine) dendrimer attenuates human glioma cell growth in vitro. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2010; 21 (3): 303–14.
35. Yoyen-Ermis D, Ozturk-Atar K, Kursunel MA, Aydin C, Ozkazanc D, et al. Tumor-induced myeloid cells are reduced by gemcitabine-loaded PAMAM dendrimers decorated with anti-Flt1 antibody. *Molecular pharmaceutics*. 2018; 15 (4): 1526–33.
36. Bai CZ, Choi S, Nam K, An S, Park JS. Arginine modified PAMAM dendrimer for interferon beta gene delivery to malignant glioma. *International journal of pharmaceutics*. 2013; 445 (1–2): 79–87.
37. Chauhan AS. Dendrimers for drug delivery. *Molecules*. 2018; 23 (4): 938.
38. Bourne N, Stanberry LR, Kern ER, Holan G, Matthews B, et al. Dendrimers, a new class of candidate topical microbicides with activity against herpes simplex virus infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000; 44 (9): 2471–4.
39. Vahedifard F, Chakravarthy K. Nanomedicine for COVID-19: The role of nanotechnology in the treatment and diagnosis of COVID-19. *Emergent materials*. 2021; 4 (1): 75–99.
40. Günther SC, Maier JD, Vetter J, Podvalnyy N, Khanzhin N, et al. Antiviral potential of 3'-sialyllactose-and 6'-sialyllactose-conjugated dendritic polymers against human and avian influenza viruses. *Scientific reports*. 2020; 10 (1): 1–9.
41. Bohr A, Tsapis N, Foged C, Andreana I, Yang M, et al. Treatment of acute lung inflammation by pulmonary delivery of anti-TNF- α siRNA with PAMAM dendrimers in a murine model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2020; 156: 114–120.
42. Jeon P, Choi M, Oh J, Lee M. Dexamethasone-Conjugated Polyamidoamine Dendrimer for Delivery of the Heme Oxygenase-1 Gene into the Ischemic Brain. *Macromolecular Bioscience*. 2015; 15 (7): 1021–8.
43. Wang B, Navath RS, Romero R, Kannan S, Kannan R. Anti-inflammatory and anti-oxidant activity of anionic dendrimer-N-acetyl cysteine conjugates in activated microglial cells. *International journal of pharmaceutics*. 2009; 377 (1–2): 159–68.
44. Kurtoglu YE, Navath RS, Wang B, Kannan S, Romero R, et al. Poly (amidoamine) dendrimer-drug conjugates with disulfide linkages for intracellular drug delivery. *Biomaterials*. 2009; 30 (11): 2112–21.
45. Inapagolla R, Guru BR, Kurtoglu YE, Gao X, Lieh-Lai M, et al. In vivo efficacy of dendrimer-methylprednisolone conjugate formulation for the treatment of lung inflammation. *International journal of pharmaceutics*. 2010; 399 (1–2): 140–7.
46. Vaidya A, Jain S, Pathak K, Pathak D. Dendrimers: Nanosized multifunctional platform for drug delivery. *Drug Delivery Letters*. 2018; 8 (1): 3–19.
47. Thanh VM, Nguyen TH, Tran TV, Ngoc UTP, Ho MN, et al. Low systemic toxicity nanocarriers fabricated from heparin-mPEG and PAMAM dendrimers for controlled drug release. *Materials Science and Engineering: C*. 2018; 82: 291–8.
48. Pandey P, Mehta M, Shukla S, Wadhwa R, Singhvi G, et al. Emerging nanotechnology in chronic respiratory diseases. *Nanoformulations in Human Health*. 2020: 449–68.
49. Paull JRA, Luscombe CA, Castellarnau A, Heery GP, Bobardt MD, Gallay PA. Protective Effects of Astodimer Sodium 1% Nasal Spray Formulation against SARS-CoV-2 Nasal Challenge in K18-hACE2 Mice. *Viruses*. 2021; 13: 1656.

ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИКИ ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНОГО ИСТОЩЕНИЯ У МЕДИЦИНСКОГО ПЕРСОНАЛА COVID-ГОСПИТАЛЯ С РАЗЛИЧНОЙ ИНТЕНСИВНОСТЬЮ ТРУДОВОЙ НАГРУЗКИ

С. Е. Назарян , А. С. Самойлов, В. И. Седин

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

С начала 2020 г. появилась острая потребность в развитии медико-психологического обеспечения медицинского персонала, задействованного в оказании медицинской помощи пациентам с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) в стационарных условиях. Она продиктована необходимостью диагностики рисков развития у врачей психических состояний, приводящих к снижению эффективности профессиональной деятельности и, в итоге, к заболеваниям. Кроме того, недостаточно изучены вопросы влияния на распространенность деструктивных психических состояний у медиков интенсивности нагрузки при работе непосредственно в «красной зоне» в отделениях с повышенным риском смертности у пациентов. Целью работы было изучить динамику психоэмоционального истощения у медперсонала COVID-госпиталя с различной интенсивностью трудовой нагрузки. Проанализированы результаты психологического обследования 121 человека с использованием «Опросника профессионального выгорания Маслаха» (MBI) в течение четырехнедельной работы в «заразной» зоне и двухнедельного пребывания в обсервации. В группу с высокой интенсивностью нагрузки вошло 79 медиков, в группу со средней интенсивностью — 42. Показано, что у медперсонала, чей труд был связан с большей интенсивностью, чаще встречается высокий уровень показателей психоэмоционального истощения. Так, по шкале «Эмоциональное истощение» достоверные различия ($p \leq 0,05$) получены на третьей и пятой неделях исследования. На пятой неделе исследования, т. е. после окончания работы в «заразной зоне», в группе с высокой интенсивностью нагрузки медиана составила 25 (23,5; 27), в то время как в группе со средней интенсивностью она была на 56% ниже и составила 14 (14; 15).

Ключевые слова: медицинский персонал, COVID-19, психоэмоциональное состояние, профессиональное выгорание, психологическое обследование, психоэмоциональное истощение, эмоциональное истощение, деперсонализация, редукция профессиональных достижений

Вклад авторов: В. И. Седин — планирование исследования, анализ и интерпретация данных; С. Е. Назарян — анализ литературы, сбор данных, обработка результатов; А. С. Самойлов — планирование исследования.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Федерального медицинского биофизического центра имени А. И. Бурназяна (протокол № 34 от 7 апреля 2020 г.). Все участники подписали информированное согласие на психологическое обследование и использование реабилитационной программы.

 **Для корреспонденции:** Светлана Евгеньевна Назарян
ул. Маршала Новикова, д. 23, г. Москва, 123098, Россия; sveta-nazaryan@yandex.ru

Статья получена: 01.03.2022 **Статья принята к печати:** 15.03.2022 **Опубликована онлайн:** 28.03.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.010

SPECIFICS OF THE WORKLOAD-DEPENDENT DYNAMICS OF PSYCHO-EMOTIONAL EXHAUSTION AMONG MEDICAL STAFF OF A COVID HOSPITAL

Nazaryan SE , Samoilov AS, Sedin VI

Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

In the beginning of 2020 there appeared an urgent need for substantial advancement of the medical and psychological support for medical personnel involved in medical care provided to patients with the new coronavirus infection (COVID-19) in hospital settings. This need originated from the necessity to diagnose the risks of doctors developing mental states that adversely affect their professional performance and, subsequently, lead to disorders. In addition, there are under-researched matters of dependence of the prevalence of destructive mental states on the intensity of workload experienced by doctors in the "red zones", where the risk of patient fatalities is high. This study aimed to investigate the workload-dependent dynamics of psycho-emotional exhaustion among the medical staff of a COVID hospital. We analyzed the psychological tests (MBI, Maslach Burnout Inventory) that 121 people completed during a four-week assignment in the "infectious" zone and two weeks in the observation department. Seventy-nine doctors comprised the heavy workload group and 42 were in the moderate workload group. The study showed that healthcare workers experiencing heavier workloads exhibit high values of the psycho-emotional exhaustion indicators more often. We registered significant differences ($p \leq 0.05$) by the Emotional Exhaustion scale at the third and fifth weeks of the study. By the fifth week, i.e., when the assignment in the "infectious zone" was over, heavy workload group had the median of 25 (23.5; 27), while in the moderate workload group it was 14 (14; 15), which is 56% lower.

Keywords: healthcare workers, COVID-19, psycho-emotional state, professional burnout, psychological testing, psycho-emotional exhaustion, emotional exhaustion, depersonalization, professional degradation

Author contributions: VI Sedin — study planning, data analysis and interpretation; SE Nazaryan — literature analysis, data collection, processing of the results; AS Samoilov — study planning.

Compliance with the ethical standards: the study was approved by the Ethical Committee of A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center (minutes #34 of April 7, 2020). All participants signed the informed consent form agreeing to psychological examination and rehabilitation program activities.

 **Correspondence should be addressed:** Svetlana E. Nazaryan
Marshala Novikova, 23, Moscow, 123098, Russia; sveta-nazaryan@yandex.ru

Received: 01.03.2022 **Accepted:** 15.03.2022 **Published online:** 28.03.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.010

Решение проблем, связанных с развитием психоэмоционального истощения и других негативных психических состояний, например, стойкого снижения настроения, ухудшения самочувствия, нарушений сна, астенизации, эмоционального истощения, формирования синдрома профессионального выгорания [1–4] у

медицинского персонала, особенно COVID-госпиталя, чья профессиональная деятельность связана с выполнением профессиональных обязанностей в стрессогенных условиях, обуславливает необходимость разработки программы и проведения профилактических психокоррекционных мероприятий, направленных на преодоление развития

негативных психических состояний и, в конечном счете, нарушений профессиональной эффективности [5]. Многие исследователи отмечают, что деятельность различных специалистов в экстремальных условиях связана с высоким уровнем риска развития у них негативных психических состояний, например, стойкого снижения настроения, ухудшения самочувствия, нарушений сна, астенизации, эмоционального истощения, формирования синдрома профессионального выгорания и т. д. [1, 6, 7].

Рядом авторов подтверждена ведущая роль психоэмоционального напряжения в развитии негативных состояний при экстремальных условиях профессиональной деятельности [8, 9]. Работа в карантинных условиях, или в так называемой «заразной» зоне, в непосредственном контакте с пациентами, инфицированными COVID-19, является ведущим фактором развития перечисленных нарушений психического состояния у медицинского персонала [10, 11]. Например, исследование с участием более 2000 медицинских работников было проведено в период пика пандемии COVID-19 в Италии. Выявлено, что у медицинских работников в отделениях интенсивной терапии, непосредственно контактирующих с инфицированными пациентами, в 66% случаев были отмечены симптомы посттравматического стрессового расстройства, в 64% — высокий уровень тревожности и в 42% — тяжелая депрессия. Авторы подтвердили, что медицинский персонал отделений, в которых пациенты имеют высокий риск смерти, более подвержен нарушениям со стороны психического здоровья [12]. Аналогичные исследования проводили и в Российской Федерации [2, 4, 13, 14]. Так, по результатам исследования с участием 248 человек, направленного на выявление профессионального выгорания и эмоциональной дезадаптации у медицинских работников, более 60% медицинского персонала сталкиваются с развитием у них эмоционального выгорания, 23% — симптомами депрессии, а 25% — высоким уровнем тревоги [13]. Авторы работы утверждают, что частота этих симптомов у медицинского персонала, непосредственно работающего с пациентами COVID-19, выше, чем у тех, кто не работает с ними. При повторном обследовании тех же медицинских работников через четыре месяца встречаемость симптомов эмоционального выгорания уменьшилась до 35%, симптомы депрессии снизились до 8,3%, однако частота проявления симптомов тревоги выросла до 29,3%.

Известно, что трудовая нагрузка на медицинский персонал в отделениях COVID-стационара неодинакова. Это подтверждают данные об особенностях труда врачебного и сестринского состава, изложенные в нормативных документах [15, 16]. На это обращает внимание и руководство стационарами, регулирующее уровень заработной платы медработников в различных отделениях COVID-стационара.

Целью исследования было изучить особенности динамики психоэмоционального истощения у медицинского персонала COVID-госпиталя в отделениях с различной интенсивностью трудовой нагрузки.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Критерии включения медицинских работников в исследование: постоянное нахождение в COVID-стационаре; пребывание в условиях «заразной» зоны и обсервации; исполнение должностных обязанностей медицинского персонала, в которых предусматривался

прямой контакт с инфицированными пациентами COVID-стационара. Критерии исключения: отказ медицинского персонала от участия в исследовании; нарушение плана исследования.

Исследование проводили в группе, состоящей из 121 человека, среди них 87 женщин и 34 мужчины. Врачей — 42, медицинских сестер — 79. В группу с высокой интенсивностью трудовой нагрузки были отнесены 26 врачей и 53 медсестры, выполняющих свои должностные обязанности в «заразной» зоне COVID-стационара в отделениях с высоким риском смертности среди пациентов и высоким риском заражения для медицинского персонала (реанимационное отделение, приемный покой и отделения для пациентов с тяжелым течением заболевания). В группу со средней интенсивностью труда вошли 20 врачей и 22 медсестры, работающих в отделениях COVID-стационара с низким риском смертности среди пациентов (два отделения долечивания).

Критерий «интенсивность» оценивали эксперты с учетом напряженности работы в лечебных отделениях COVID-стационара, а также вероятностью летального исхода для пациентов и заражения персонала коронавирусной инфекцией. В качестве экспертов выступали врачи, имеющие стаж и опыт работы в подразделениях интенсивной терапии не менее 10 лет, а также представители руководства клинических подразделений Центра, на базе которого проводили исследование (всего 12 человек). Был выделен медицинский персонал с высокой и средней интенсивностью трудовой нагрузки, при этом эксперты не выделили ни одного медика с низкой интенсивностью нагрузки.

Для выявления признаков эмоционального выгорания у медицинского персонала COVID-госпиталя была организована система дистанционного мониторингирования посредством передачи интернет-ссылки перенесенного в Google-форму опросника на личные мобильные телефоны в мессенджере WhatsApp. В работе была использована методика «Опросник профессионального выгорания Маслач MBI (англ. Maslach Burnout Inventory)» в адаптации Н. Е. Водопьяновой [17]. Анализ результатов обследования проводили по трем шкалам методики: «Эмоциональное истощение», «Деперсонализация» и «Редукция профессиональных достижений». Исследование проводили в течение шести недель: четыре недели — работы в «заразной» зоне, две недели — нахождение в обсервации. Исходное психологическое обследование участников было проведено до начала работы в «заразной» зоне, затем еженедельно в конце каждой недели в онлайн-формате.

Проверку данных на нормальность распределения проводили с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. Поскольку большая часть данных не соответствовала критерию нормальности распределения, последующий статистический анализ проводили с помощью непараметрических методов анализа данных: путем попарного сравнения двух групп в каждой точке времени с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Отличие считали достоверным при достижении уровня статистической значимости $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В целях получения исходных оценок показателей «Эмоциональное истощение», «Деперсонализация» и «Редукция профессиональных достижений» методики

Таблица 1. Средние значения показателей профессионального выгорания при исходном обследовании у медицинского персонала в зависимости от пола

Показатели (шкалы) методик	Мужчины (n = 34)	Женщины (n = 87)	Референсные значения
Эмоциональное истощение	16,65 ± 4,25	15,53 ± 4,81	16,0–24,0
Деперсонализация	3,21 ± 1,47	2,78 ± 1,37	6,0–10,0
Редукция личных достижений	37,85 ± 1,88	36,79 ± 2,34	31,0–36,0

«Опросник профессионального выгорания» было проведено психологическое обследование участников исследования до начала их работы в «заразной» зоне (табл. 1).

Сравнение средних значений оценок изучаемых показателей, полученных при исходном обследовании, с их референсными значениями [17] показало отсутствие негативных отклонений, что свидетельствует об отсутствии у медицинского персонала признаков профессионального выгорания перед началом работы в «заразной» зоне.

Результаты анализа данных психологического обследования медицинского персонала с различной интенсивностью трудовой нагрузки в период его нахождения в «заразной» зоне и в обсервации представлены в табл. 2.

На рис. 1 представлена динамика показателя «Эмоциональное истощение» в зависимости от интенсивности трудовой нагрузки на всем протяжении исследования.

Признаки эмоционального истощения у медицинского персонала, задействованного в отделениях с высоким риском смертности пациентов и в отделениях восстановительного лечения в первую неделю практически отсутствовали. Так, в первой группе значения показателя находились в диапазоне 15,65 ± 4,89, во второй группе — 16,21 ± 4,29 соответственно.

Самые высокие значения показателя «Эмоциональное истощение», выходящие за пределы нормальных значений, в группе медицинских работников с интенсивной трудовой нагрузкой зафиксированы на пятой неделе исследования и составили 25,08 ± 2,36. К концу исследования значения показателя снизились до верхней границы низкого уровня эмоциональной истощенности и лежали в диапазоне 15,08 ± 2,63.

В группе со средней интенсивностью трудовой нагрузки наиболее высокие значения показателя «Эмоциональное истощение», соответствующие среднему уровню, зафиксированы на четвертой неделе исследования (22,93 ± 2,83). Далее значения показателя снизились и на пятой неделе находились в диапазоне 14,21 ± 1,05. К концу

исследования значения показателя достигли нормальных значений (15,43 ± 2,58).

Достоверные различия подтверждены на третьей и пятой неделях исследования.

На рис. 2 показана динамика показателя «Деперсонализация». Исходное обследование в обеих группах выявило отсутствие признаков деперсонализации, значения показателя в группе медиков с высокой интенсивностью трудовой нагрузки находились в диапазоне 2,85 ± 1,41, в группе со средней интенсивностью — в диапазоне 3,00 ± 1,43.

В первой группе в конце второй недели исследования значения показателя увеличиваются (5,28 ± 2,01) и на третьей неделе зафиксированы наиболее высокие значения, которые составили 7,30 ± 1,16. Далее намечается тенденция к снижению значений показателя от четвертой недели (6,24 ± 1,28) и до конца исследования (4,76 ± 1,33).

Во второй группе отмечается аналогичная динамика. Значения показателя увеличиваются со второй (5,76 ± 2,24) недели и достигают максимальных значений на третьей неделе исследования (7,57 ± 1,21). К концу четвертой недели (6,67 ± 1,59) значения показателя снижаются и к концу шестой находятся в диапазоне 3,81 ± 1,21.

Достоверные отличия зафиксированы на пятой и шестой неделях исследования.

При анализе медианных значений наибольшие межгрупповые различия выявлены на пятой неделе исследования. Так в группе с высокой интенсивностью трудовой нагрузки медиана находилась на уровне 6 (5; 7), а в группе со средней интенсивностью — 4 (3; 4). В обеих группах показатель «Деперсонализация» нарастал от первой к третьей неделе, был устойчиво высоким на четвертой неделе, а с пятой недели отмечался тренд к снижению значений. Выявленная динамика была более ярко выражена в группе с высокой интенсивностью трудовой нагрузки. Это связано с большим потоком пациентов, значительной эмоциональной и физической нагрузками.

Таблица 2. Сводные данные динамики показателей профессионального выгорания у медицинского персонала в группах с различным уровнем интенсивности трудовой нагрузки

Методика	Группа, интенсивность	Неделя исследования					
		1	2	3	4	5	6
		M ± SD	M ± SD	M ± SD	M ± SD	M ± SD	M ± SD
Эмоциональное истощение	1-я группа высокая n = 79	15,65 ± 4,89	19,57 ± 2,93	19,76 ± 2,92	22,06 ± 2,91	25,08 ± 2,36	15,08 ± 2,63
	2-я группа средняя n = 42	16,21 ± 4,29	19,19 ± 2,87	12,67 ± 9,92*	22,93 ± 2,83	14,21 ± 1,05*	15,43 ± 2,58
Деперсонализация	1-я группа высокая n = 79	2,85 ± 1,41	5,28 ± 2,01	7,30 ± 1,16	6,24 ± 1,28	5,82 ± 1,59	4,76 ± 1,33
	2-я группа средняя n = 42	3,00 ± 1,43	5,76 ± 2,24	7,57 ± 1,21	6,67 ± 1,59	3,36 ± 1,03*	3,81 ± 1,21*
Редукция личных достижений	1-я группа высокая n = 79	37,00 ± 2,32	34,87 ± 1,71	30,49 ± 1,91	34,11 ± 1,33	36,58 ± 2,20	39,73 ± 1,37
	2-я группа средняя n = 42	37,26 ± 2,19	35,24 ± 1,82	30,29 ± 1,99	34,12 ± 1,35	36,12 ± 2,48	39,88 ± 1,19

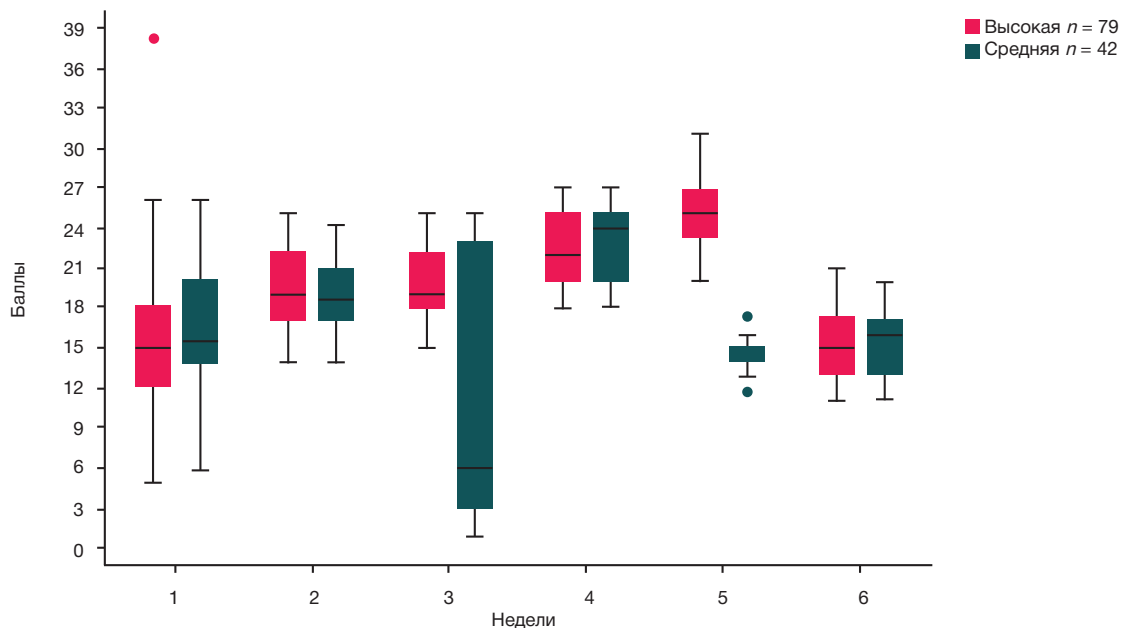


Рис. 1. Динамика показателя «Эмоциональное истощение» в группах с различной интенсивностью трудовой нагрузки (Me [Q₁; Q₃])

Данные динамики показателя «Редукция профессиональных достижений» на всем протяжении исследования представлены на рис. 3.

При исходном обследовании значения показателя демонстрировали отсутствие признака в обеих группах ($37,00 \pm 2,32$ и $37,26 \pm 2,19$ соответственно).

В группе медицинских работников с высокой интенсивностью трудовой нагрузки к концу второй недели исследования значения показателя снижаются ($34,87 \pm 1,71$) и минимальные значения показателя фиксируются на третьей неделе исследования ($30,49 \pm 1,91$). От конца четвертой недели ($34,11 \pm 1,33$) отмечается тенденция к росту значений показателя: на пятой неделе значения находились в диапазоне $36,58 \pm 2,20$, а на шестой — в диапазоне $39,73 \pm 1,37$. Это свидетельствует о наличии признаков редукции профессиональных достижений в период максимальной нагрузки (вторая и третья недели).

В группе со средней интенсивностью трудовой нагрузки отмечена аналогичная тенденция. Значения показателя снижаются от второй к третьей неделе исследования ($35,24 \pm 1,82$ и $30,29 \pm 1,99$ соответственно). Далее отмечается рост значений показателя, финальное

обследование выявило отсутствие признаков редукции профессиональных достижений ($39,88 \pm 1,19$).

На всем протяжении исследования достоверных межгрупповых различий не обнаружено, значения этого показателя не выходили за пределы референсных значений. Это подтверждали данные медианных значений и межквартильных размахов данных на всем протяжении исследования. Группы сравнения по этому показателю были максимально разнородны на пятой неделе исследования, но при этом значения показателя «Редукция профессиональных достижений» не имели практически значимых отличий и составили 37 (35; 38) и 36 (34; 38) соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Многочисленные исследования, проведенные учеными разных стран, подтверждают наличие у каждого второго медицинского работника, включенного в систему терапии пациентов с новой коронавирусной инфекцией, психологических дезадаптационных расстройств, а также симптоматики, свидетельствующей о нарастании утомления, раздражительности, агрессии. Наиболее

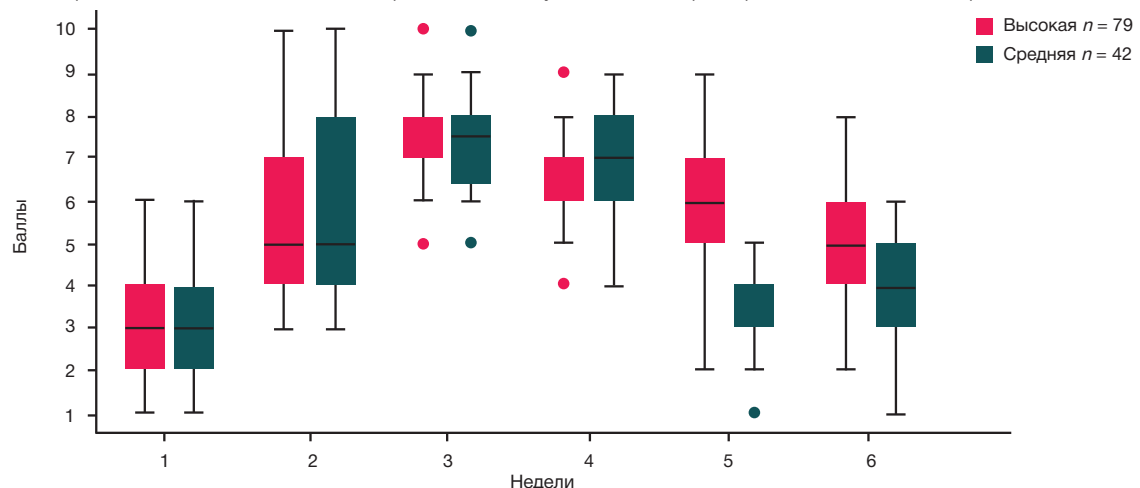


Рис. 2. Динамика показателя «Деперсонализация» в группах с различной интенсивностью трудовой нагрузки (Me [Q₁; Q₃])

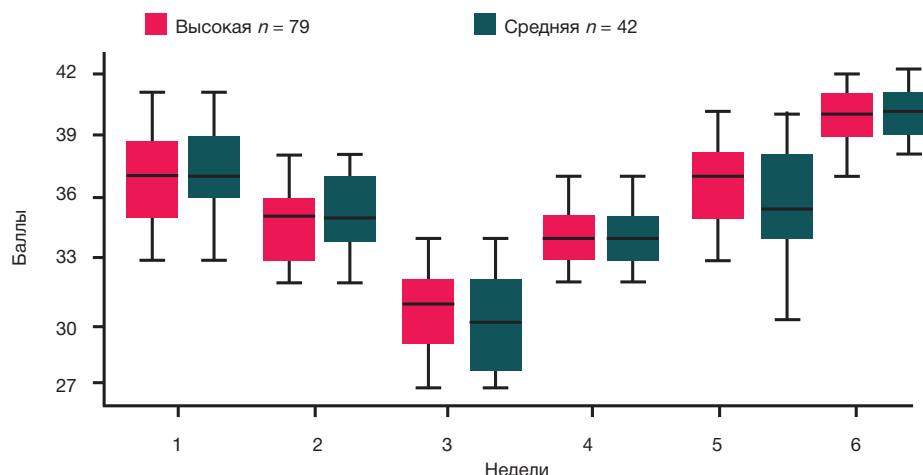


Рис. 3. Динамика показателя «Редукция профессиональных достижений» в группах с различной интенсивностью трудовой нагрузки (Me [Q₁; Q₃])

стрессогенными условиями труда медицинского персонала в карантинных зонах авторы работ считают осознание высокой вероятности инфицирования с возможным летальным исходом, несовершенство медикаментозной терапии и уход за больными с тяжело протекающими осложнениями [18–23].

Полученные результаты согласуются с данными других исследователей. Авторы подтверждают, что медицинский персонал отделений с пациентами с высоким риском смерти более подвержен нарушениям со стороны психического здоровья [24, 25].

Обобщая результаты нашего исследования, можно проследить общую динамику психоэмоциональных состояний медицинского персонала, находящегося в экстремальных ситуациях. Сама профессиональная деятельность медицинского персонала в группах с различной степенью интенсивности трудовой нагрузки имеет свою психологическую специфику, что требует от личности задействования различного рода ресурсов.

По трем шкалам «Опросника профессионального выгорания» выявлено, что у медицинского персонала обеих групп на второй, третьей и четвертой неделях исследования психическое состояние характеризовали умеренные проявления признаков психастении, апатии и эмоциональной опустошенности. В целом можно отметить, что первая неделя работы прошла без выраженных эмоциональных потрясений, что может свидетельствовать о том, что предварительная подготовка медицинского персонала была проведена на хорошем уровне. Вторую неделю характеризовало проявление эмоциональной истощенности и деперсонализации, что связано с эмоциональной насыщенностью работы. На третьей и четвертой неделях продолжают увеличиваться показатели по шкале «Эмоциональная истощенность» вплоть до выхода за пределы референсных значений. На пятой и шестой неделях сохраняется тенденция к снижению значений по шкалам «Эмоциональная истощенность» и «Деперсонализация», при этом происходит прирост значений показателей по шкале «Редукция профессиональных достижений», которая может проявляться в недооценке своей компетентности, возрастающем недовольстве собой,

преуменьшении ценности профессиональной деятельности, негативном самовосприятии в профессиональной сфере, появлением чувства собственной несостоятельности, безразличием к работе.

ВЫВОДЫ

Наиболее сложными с точки зрения психоэмоциональных нарушений оказались вторая, третья и четвертая недели работы в «заразной» зоне. При оценке динамики изучаемых показателей необходимо также учитывать особенности профессиональной деятельности по критерию «Интенсивность». При анализе данных следует обращать внимание на величину межквартильного размаха, который в начале был больше, а к концу работы в «заразной» зоне его значения уменьшаются, т. е. значения оценок показателей становятся характерными для большинства участников исследования. Медицинский персонал, работающий в отделениях, отнесенных к категории высокой интенсивности трудовой нагрузки, чаще сталкивался с тяжелым течением заболевания и смертностью среди пациентов, поэтому в динамике их психологического состояния обращает на себя внимание низкая вариативность и высокий уровень показателей психоэмоционального выгорания в период выполнения профессиональных обязанностей. Учет особенностей динамики развития негативных психологических состояний у медицинского персонала, осуществляющего свою профессиональную деятельность в сложных эпидемиологических условиях, имеет значение при разработке психопрофилактических и психокоррекционных программ для специалистов, чья профессиональная деятельность осуществляется в экстремальных условиях при ограничении возможностей прямого контакта в реализации мероприятий психологического сопровождения. Актуальными, в данном случае, будут методы когнитивно-поведенческой терапии (прочтение или онлайн-просмотр лекций, содержащих тематические блоки о возможных негативных психических состояниях и способах их самокоррекции, методики для переключения внутренних установок в поведении — психофизическая гимнастика), методики арт-терапии для самостоятельного применения.

Литература

1. Бушманов А. Ю., Галстян И. А., Соловьев В. Ю., Кончаловский М. В. Уроки для здравоохранения: авария на ЧАЭС и пандемия COVID-19. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2020. 65 (3): 79–84.
2. Назарян С. Е., Самойлов А. С., Пустовойт В. И., Петрова М. С. Психосоциальное состояние медицинских сотрудников, участвующих в работе инфекционных стационаров COVID-19. В сборнике: Материалы XX юбилейного Всероссийского форума «Здравница-2021»; 15–17 июня 2021 г.; Москва, 2021; с. 86–89.
3. Седин В. И., Колочкин С. Н. Теория и практика бесконтактной психодиагностики. Аппаратные средства в психологической подготовке. В сборнике: Материалы межрегиональной научно-практической конференции психологов силовых структур «Научно-методические аспекты использования программно-аппаратных средств и тренажеров в психологической подготовке военнослужащих»; 25 октября, 2017 г.; Москва, 2018; с. 59–63.
4. Холмогорова А. Б., Петриков С. С., Суроегина А. Ю., Микита О. Ю., Рахманина А. А., Рой А. П. Проблема профессионального выгорания и психического здоровья медицинских работников во время пандемии COVID-19. Журнал им. Н. В. Склифосовского. Неотложная медицинская помощь. 2020; 9 (3): 321–37.
5. Самойлов А. С., Назарян С. Е. Программа восстановления для медицинских работников в условиях медицинской мобилизации. Современные вопросы биомедицины. 2020; 3: 35–37.
6. Булыгина В. Г. Влияние экстремальных факторов служебной деятельности на психическое здоровье специалистов опасных профессий (обзор зарубежных исследований). В сб.: В. Г. Булыгина, С. В. Шпорт, А. А. Дубинский, М. М. Проничева. Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. 2017; 3: 93–100.
7. Соболевников В. В. Психология профессиональной деятельности в особых и экстремальных условиях. М.: Юрайт, 2019; 190 с.
8. Bhattacharyya M, Pal MS, Sharma YK, Majumdar D. Changes in sleep patterns during prolonged stays in Antarctica. Int J Biometeorol. 2008; 52 (8): 869–79.
9. Ушаков И. Б., Уйба В. В., Сапеев А. О. Медико-биологические риски, связанные с выполнением дальних космических полетов. Медицина экстремальных ситуаций. 2017; 1: 43–64.
10. Lee SA. How much “Thinking” about COVID-19 is clinically dysfunctional? Brain, Behavior, and Immunity. 2020; 87: 97–98.
11. Labrague LJ, de Los Santos JAA. COVID-19 anxiety among front-line nurses: Predictive role of organisational support, personal resilience and social support. J Nurs Manag. 2020; 28 (7): 1653–61.
12. Luceño-Moreno L, Talavera-Velasco B, García-Albuera Y, Martín-García J. Symptoms of posttraumatic stress, anxiety, depression, levels of resilience and burnout in Spanish health personnel during the COVID-19 Pandemic. Int J Environ Res Public Health. 2020. 17 (15): 5514.
13. Петриков С. С., Холмогорова А. Б., Суроегина А. Ю., Микита О. Ю., Рой А. П., Рахманина А. А. Профессиональное выгорание, симптомы эмоционального неблагополучия и дистресса у медицинских работников во время эпидемии COVID-19. Консультативная психология и психотерапия. 2020; 65 (3): 8–45.
14. Сорокин М. Ю., Касьянов Е. Д., Рукавишников Г. В., Макаревич О. В., Незнамов Н. Г., Лутова Н. Б. и др. Психологические реакции населения как фактор адаптации к пандемии COVID-19. Обзор психиатрии и медицинской психологии имени В. М. Бехтерева. 2020; (2): 87–94.
15. Приказ Министерства труда и социальной защиты Российской Федерации от 31 июля 2020 г. 475н Об утверждении профессионального стандарта «Медицинская сестра/медицинский брат». Доступно по ссылке: <https://normativ.kontur.ru/document?moduleId=1&documentId=370329>.
16. Методические рекомендации МР 3.1.0229-21 «Рекомендации по организации противоэпидемических мероприятий в медицинских организациях, осуществляющих оказание медицинской помощи пациентам с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) (подозрением на заболевание) в стационарных условиях» (утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 18 января 2021 г.). Доступно по ссылке: <https://base.garant.ru/400232151/>.
17. Водопьянова Н. Е., Старченкова Е. Н. Синдром выгорания: Диагностика и профилактика. 2-е изд. СПб.: Питер, 2008; 254 с.
18. Arafa A, Mohammed Z, Mahmoud O, Elshazley M, Ewis A. Depressed, anxious, and stressed: What have healthcare workers on the frontlines in Egypt and Saudi Arabia experienced during the COVID-19 pandemic? Journal of Affective Disorders. 2021; 278: 365–71.
19. Gorini A, Fiabane E, Sommaruga M, Barbieri S, Sottotetti F, Rovere MT et al. Mental health and risk perception among Italian healthcare workers during the second month of the Covid-19 pandemic. Archives of Psychiatric Nursing. 2020. 34 (6): 537–44.
20. Huang JZ, Han MF, Luo TD, Ren AK, Zhou XP. Mental health survey of medical staff in a tertiary infectious disease hospital for COVID-19. Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi. 2020; 38 (3): 192–5.
21. Lasalvia A, Bonetto C, Porru S, Carta A, Tardivo S, Bovo C, et al. Psychological impact of COVID-19 pandemic on healthcare workers in a highly burdened area of north-east Italy. Epidemiol Psychiatr Sci. 2020; DOI: 10.1017/S2045796020001158.
22. Song X, Fu W, Liu X, Luo Z, Wang R, Zhou N. Mental health status of medical staff in emergency departments during the Coronavirus disease 2019 epidemic in China. Brain, behavior, and immunity. 2020; 88: 60–65.
23. Zhu J, Sun L, Zhang L, Wang H, Fan A, Yang B. Prevalence and influencing factors of anxiety and depression symptoms in the first-line medical staff fighting against COVID-19 in Gansu. Front Psychiatry. 2020; 11: 386.
24. Antonijevic J, Binic I, Zikic O, Manojlovic S, Tosic-Golubovic S, Popovic N. Mental health of medical personnel during the COVID-19 pandemic. Brain and Behavior. 2020; 10 (12): 01881.
25. Rossi R, Succi V, Pacitti F, Siracusano A, Rossi A, Di Lorenzo G. Mental health outcomes among frontline and second-line health care workers during the Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Pandemic in Italy. JAMA Network Open. 2020; 3 (5): 2010185.

References

1. Bushmanov AYU, Galstyan IA, Solovov VYu, Konchalovskij MV. Uroki dlya zdravooxraneniya: avariya na ChAEhS i pandemiya COVID-19. Medicinskaya radiologiya i radiacionnaya bezopasnost'. 2020. 65 (3): 79–84. Russian.
2. Nazaryan SE, Samojlov AS, Pustovojt VI, Petrova MS. Psixoehmocional'noe sostoyanie medicinskix sotrudnikov, uchastvuyushix v rabote infekcionnyx stacionarov COVID-19. V sbornike: Materialy XX yubilejnogo Vserossijskogo foruma «Zdravnica-2021»; 15–17 iyunya 2021 g.; Moskva, 2021; s. 86–89. Russian.
3. Sedin VI, Kolyuchkin SN. Teoriya i praktika beskontaktnoj psixodiagnostiki. Apparatnye sredstva v psixologicheskoy podgotovke. V sbornike: Materialy mezhregional'noj nauchno-prakticheskoy konferencii psixologov silovyx struktur «Nauchno-metodicheskie aspekty ispol'zovaniya programmo-apparatnyx sredstv i trenazherov v psixologicheskoy podgotovke voennosluzhashix»; 25 oktyabrya, 2017 g.; Moskva, 2018; s. 59–63. Russian.

4. Xolmogorova AB, Petrikov SS, Surogina AYU, Mikita OYu, Raxmanina AA, Roj AP. Problema professional'nogo vygoraniya i psixicheskogo zdorov'ya medicinskix rabotnikov vo vremya pandemii COVID-19. Zhurnal im. N. V. Sklifosovskogo. Neotlozhnaya medicinskaya pomoshh'. 2020; 9 (3): 321–37. Russian.
5. Samojlov AS, Nazaryan SE. Programma vosstanovleniya dlya medicinskix rabotnikov v usloviyax medicinskoj mobilizacii. Sovremennye voprosy biomeditsiny. 2020; 3: 35–37. Russian.
6. Bulygina VG. Vliyaniye ehkstremaal'nyx faktorov sluzhebnoj deyatel'nosti na psixicheskoe zdorov'e specialistov opasnyx professij (obzor zarubezhnyx issledovaniy). V sb.: V. G. Bulygina, S. V. Shport, A. A. Dubinskij, M. M. Pronicheva. Mediko-biologicheskie i social'no-psixologicheskie problemy bezopasnosti v chrezvychajnyx situacijax. 2017; 3: 93–100. Russian.
7. Sobolnikov VV. Psixologiya professional'noj deyatel'nosti v osobyx i ehkstremaal'nyx usloviyax. M.: Yurajt, 2019; 190 s. Russian.
8. Bhattacharyya M, Pal MS, Sharma YK, Majumdar D. Changes in sleep patterns during prolonged stays in Antarctica. Int J Biometeorol. 2008; 52 (8): 869–79.
9. Ushakov IB, Ujba VV, Sapeckij AO. Mediko-biologicheskie riski, svyazannye s vypolneniem dal'nix kosmicheskix poletov. Medicina ehkstremaal'nyx situacij. 2017; 1: 43–64. Russian.
10. Lee SA. How much “Thinking” about COVID-19 is clinically dysfunctional? Brain, Behavior, and Immunity. 2020; 87: 97–98.
11. Labrague LJ, de Los Santos JAA. COVID-19 anxiety among front-line nurses: Predictive role of organisational support, personal resilience and social support. J Nurs Manag. 2020; 28 (7): 1653–61.
12. Luceño-Moreno L, Talavera-Velasco B, García-Albuérne Y, Martín-García J. Symptoms of posttraumatic stress, anxiety, depression, levels of resilience and burnout in Spanish health personnel during the COVID-19 Pandemic. Int J Environ Res Public Health. 2020. 17 (15): 5514.
13. Petrikov SS, Xolmogorova AB, Surogina AYU, Mikita OYu, Roj AP, Raxmanina AA. Professional'noe vygoranie, simptomy ehmocional'nogo neblagopoluchiya i distressa u medicinskix rabotnikov vo vremya ehpidemii COVID-19. Konsul'tativnaya psixologiya i psixoterapiya. 2020; 65 (3): 8–45. Russian.
14. Sorokin MYu, Kasyanov ED, Rukavishnikov GV, Makarevich OV, Neznakov NG, Lutova NB, i dr. Psixologicheskie reakcii naseleniya kak faktor adaptacii k pandemii COVID-19. Obozrenie psixiatrii i medicinskoj psixologii imeni V. M. Bextereva. 2020; (2): 87–94. Russian.
15. Prikaz Ministerstva truda i social'noj zashhity Rossijskoj Federacii ot 31 iyulya 2020 g № 475n Ob utverzhdenii professional'nogo standarta «Medicinskaya sestra/medicinskij brat». Dostupno po ssylke: <https://normativ.kontur.ru/document?moduleId=1&documentId=370329>. Russian.
16. Metodicheskie rekomendacii MP 3.1.0229-21 «Rekomendacii po organizacii protivoehpidemicheskix meropriyatij v medicinskix organizacijax, osushhestvlyayushhix okazanie medicinskoj pomoshhi pacientam s novoj koronavirusnoj infekciej (COVID-19) (podozreniem na zabolevanie) v stacionarnyx usloviyax» (utv. Federal'noj sluzhboj po nadzoru v sfere zashhity prav potrebitel'ej i blagopoluchiya cheloveka 18 yanvarya 2021 g.). Dostupno po ssylke: <https://base.garant.ru/400232151/>. Russian.
17. Vodopyanova NE, Starchenkova EN. Sindrom vygoraniya: Diagnostika i profilaktika. 2-e izd. SPb.: Piter, 2008; 254 s. Russian.
18. Arafa A, Mohammed Z, Mahmoud O, Elshazley M, Ewis A. Depressed, anxious, and stressed: What have healthcare workers on the frontlines in Egypt and Saudi Arabia experienced during the COVID-19 pandemic? Journal of Affective Disorders. 2021; 278: 365–71.
19. Gorini A, Fiabane E, Sommaruga M, Barbieri S, Sottotetti F, Rovere MT et al. Mental health and risk perception among Italian healthcare workers during the second month of the Covid-19 pandemic. Archives of Psychiatric Nursing. 2020. 34 (6): 537–44.
20. Huang JZ, Han MF, Luo TD, Ren AK, Zhou XP. Mental health survey of medical staff in a tertiary infectious disease hospital for COVID-19. Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi. 2020; 38 (3): 192–5.
21. Lasalvia A, Bonetto C, Porru S, Carta A, Tardivo S, Bovo C, et al. Psychological impact of COVID-19 pandemic on healthcare workers in a highly burdened area of north-east Italy. Epidemiol Psychiatr Sci. 2020; DOI: 10.1017/S2045796020001158.
22. Song X, Fu W, Liu X, Luo Z, Wang R, Zhou N. Mental health status of medical staff in emergency departments during the Coronavirus disease 2019 epidemic in China. Brain, behavior, and immunity. 2020; 88: 60–65.
23. Zhu J, Sun L, Zhang L, Wang H, Fan A, Yang B. Prevalence and influencing factors of anxiety and depression symptoms in the first-line medical staff fighting against COVID-19 in Gansu. Front. Psychiatry. 2020; 11: 386.
24. Antonijevic J, Binic I, Zikic O, Manojlovic S, Tosic-Golubovic S, Popovic N. Mental health of medical personnel during the COVID-19 pandemic. Brain and Behavior. 2020; 10 (12): 01881.
25. Rossi R, Succi V, Pacitti F, Siracusano A, Rossi A, Di Lorenzo G. Mental health outcomes among frontline and second-line health care workers during the Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Pandemic in Italy. JAMA Network Open. 2020; 3 (5): 2010185.

ВЛИЯНИЕ ОДНОКРАТНОЙ ПРОЦЕДУРЫ КОМБИНИРОВАННОЙ МИКРОПОЛЯРИЗАЦИИ НА ВЕГЕТАТИВНУЮ РЕГУЛЯЦИЮ И СЕНСОРНО-МОТОРНЫЕ РЕАКЦИИ

И. Б. Сиваченко^{1,3} ✉, Д. С. Медведев^{1,2}, Т. А. Фёдорова¹, М. В. Цимбал¹, Н. В. Штейнберг¹, Г. А. Моисеенко³

¹ Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

² Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

³ Институт физиологии имени И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Метод микрополяризации уже показал свою эффективность для восстановления нарушенных мозговых функций, а также для улучшения внутримозговых процессов в норме. Перспективным направлением представляется комбинирование методов стимуляции, поскольку сочетание методов позиционирования электродов может повысить результативность процедур и найти применение в различных сферах деятельности: сопровождении операторов, спортсменов, сотрудников МЧС и др. Целью исследования было оценить влияние однократной комбинированной микрополяризации на функциональное состояние вегетативной нервной системы и сенсорно-моторные реакции условно здоровых лиц. В исследовании с участием 31 человека использовали методики для оценки сенсорно-моторных реакций, кардиоритмографии со спектральным анализом вариабельности сердечного ритма, проводили оценку зрачковых рефлексов. Процедуру комбинированной микрополяризации добровольцы проходили однократно, в течение 40 мин. Наиболее эффективными оказались схемы комбинации трансспинальной и транскраниальной микрополяризации с позиционированием в области премоторной зоны коры головного мозга (краткосрочное смещение вегетативного баланса в сторону парасимпатического влияния — на 48,7%; оптимизация функции восстановления зрачка — на 26,4%; увеличение помехоустойчивости — на 32,2%), и комбинации «солнечной» и транскраниальной микрополяризации в области проекции височной зоны коры головного мозга (увеличение коэффициента переходного периода в ортостатической пробе — на 15,8%; замедления зрительно-моторной реакции — на 6,2%).

Ключевые слова: транскраниальная микрополяризация, функциональное состояние, вегетативная регуляция, сенсорно-моторные реакции, транскраниальная стимуляция, постоянный ток

Вклад авторов: И. Б. Сиваченко — планирование, координация и организация исследования, анализ результатов, выводы и обсуждение; Д. С. Медведев — организация исследования, научное руководство, выводы и обсуждение; Т. А. Фёдорова, М. В. Цимбал, Н. В. Штейнберг — проведение практической части исследования с добровольцами, обработка полученных данных; Г. А. Моисеенко — консультирование, анализ результатов, выводы и обсуждение.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом НИИ ГПЭЧ ФМБА России (протокол № 2 от 28 февраля 2019 г.). Все добровольцы подписали информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Иван Борисович Сиваченко
ул. Бехтерева, д. 1, к. 3, г. Санкт-Петербург, 192019, Россия; avans_d@mail.ru

Статья получена: 02.03.2022 **Статья принята к печати:** 15.03.2022 **Опубликована онлайн:** 24.03.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.006

THE EFFECT OF A SINGLE PROCEDURE OF COMBINED MICROPOLARIZATION ON AUTONOMIC REGULATION AND SENSORIMOTOR REACTIONS

Sivachenko IB^{1,3} ✉, Medvedev DS^{1,2}, Fedorova TA¹, Tsimbal MV¹, Steinberg NV¹, Moiseenko GA³

¹ Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russia

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

³ Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg, Russia

Micropolarization was already proved an effective method for restoring impaired brain functions and improving intracerebral processes in the absence of impairments. Combining stimulation methods is a promising approach: a combination of electrode positioning methods can increase the efficacy of the procedures and find application in various fields, from sports through machinery operation to support of operatives of the Ministry of Emergency Situations, etc. This study aimed to assess the effect of a single combined micropolarization procedure on the functional state of the autonomic nervous system and sensorimotor reactions of conventionally healthy individuals. It involved 31 people and relied on the methods enabling evaluation of sensorimotor reactions, cardiorhythmography with spectral analysis of heart rate variability and pupillary reflexes assessment. Volunteers underwent the combined micropolarization procedure once, the duration of the procedure was 40 minutes. The most effective combinations were transspinal plus transcranial micropolarization with positioning in the region of premotor cortex (short-term shift of the autonomic balance towards parasympathetic influence by 48.7%; optimization of the pupil recovery function by 26.4%; increase in interference immunity by 32.2%) and "solar" plus transcranial micropolarization in the area of the temporal zone of cerebral cortex (15.8% increase of the orthostatic test transition period ratio; 6.2% deceleration of the visual-motor reaction).

Keywords: transcranial micropolarization, functional state, autonomic regulation, sensorimotor reactions, transcranial stimulation, direct current

Author contribution: Sivachenko IB — planning, coordination and organization of the study, analysis of the results, conclusions and discussion; Medvedev DS — organization of the study, research supervision, conclusions and discussion; Fedorova TA, Tsimbal MV, Steinberg NV — execution of the practical part of the study with volunteers, processing of the data obtained; Moiseenko GA — consulting, analysis of the results, conclusions and discussion.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of FMBA of Russia (minutes #2 of February 28, 2019). All volunteers signed the informed written consent to participation in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ivan B. Sivachenko
Bekhtereva st., 1, korp. 3, St. Petersburg, 192019, Russia; avans_d@mail.ru

Received: 02.03.2022 **Accepted:** 15.03.2022 **Published online:** 24.03.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.006

Современными исследованиями показана эффективность применения метода микрополяризации как для восстановления функций при патологических процессах [1, 2], так и для функционального улучшения внутримозговых процессов в норме [3–5]. Отмечено [5–7], что использование метода микрополяризации способствует снижению тяжести проявлений синдрома хронической усталости; нормализации процессов вегетативной регуляции (сосудистого тонуса, артериального давления; стимуляции гуморального и клеточного иммунитета); нормализации психофизиологического состояния, антистрессорному и антидепрессивному эффектам, повышению работоспособности, снижению утомляемости и др.

Перспективными представляются комбинированные методы стимуляции, включающие проведение транскраниальной микрополяризации коры головного мозга и дополнительного воздействия транспинальной стимуляции (как постоянным током, так и магнитными импульсами) спинномозговых нервов из позвоночного канала [6, 7].

Метод транспинальной микрополяризации применяют для лечения нарушений функционирования мозговых систем, связанных с регуляцией сосудистого тонуса [7]. Транспинальная микрополяризация оптимизирует парасимпатическое влияние на сердечный ритм за счет реализации нервного пути активизации вегетативной нервной системы (ВНС) [6].

Предложен вариант «солярной» микрополяризации [8, 9], когда воздействие оказывают на область солнечного сплетения, в которой расположено большое скопление вегетативных нейронов, принимающих до 90% сигналов от метасимпатической нервной системы абдоминальной области и тесно связанных с блуждающим и симпатическим нервами. Нейронные ганглии в районе солнечного сплетения выполняют важную регулируемую роль со стороны ВНС.

Таким образом, для совершенствования методологии практического использования микрополяризации представляется актуальным оценить и сопоставить эффекты различных схем комбинированной микрополяризации.

Цель исследования — оценить влияние однократной комбинированной микрополяризации на функциональное состояние ВНС и сенсорно-моторные реакции условно здоровых лиц.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании принял участие 31 доброволец из числа студентов Санкт-Петербургского медико-социального института (20 человек) и других образовательных учреждений (11 человек) в возрасте 20–25 лет, из которых 17 мужчин и 14 женщин. Критерии включения: наличие добровольного информированного согласия; прохождение осмотра врачами-специалистами — неврологом и терапевтом. Критерии исключения: наличие острых психических расстройств, судорожных состояний, эпилепсии; травмы и опухоли головного мозга; инфекционные поражения центральной нервной системы; гипертензия или гипотензия, гидроцефалия; тиреотоксикоз; мерцательная аритмия, повреждения кожи в местах наложения электродов; наличие вживленных кардиостимуляторов; наличие в анамнезе клинически значимых аллергических реакций, алкоголизма, наркомании.

Оценка состояния отделов нервной системы включала в себя проведение следующих методик: 1) кардиоритмографию (КРГ) со спектральным анализом вариабельности сердечного ритма (АПК «ВНС микро», Нейрософт; Россия); 2) оценку зрачковых рефлексов с помощью теста «Пупиллометрия» (цифровой пупиллометрический комплекс КСРЗРц-01; ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА; Россия); 3) оценку пространственно-временных реакций тестами «РДО», «ПЗМР», «Помехоустойчивость».

В качестве основных критериев оценки вегетативных реакций на однократное применение процедуры микрополяризации использовали классические показатели вариабельности сердечного ритма: частотный спектр в высоком, среднем и низком диапазонах, их соотношение, коэффициент ортостатической пробы, а также показатели реакции зрачка.

Время сужения и время расширения зрачка отражают функции холинергической (парасимпатической) и адренергической (симпатической) составляющих двойной иннервации зрачка. Скорости сужения и расширения указывают на активность парасимпатической и симпатической составляющих в фазах сужения и расширения зрачка, амплитуда сужения свидетельствует о вегетативной активности в пупилломоторной системе. Разница между показателем начального и конечного диаметров зрачка более чем 0,45 мм свидетельствует о недостаточном восстановлении зрачка, связанном с преобладанием парасимпатической активности, что является признаком утомления. Для количественной оценки зрачковой реакции проводили автоматизированную математическую обработку пупиллограммы по ряду общепринятых пупиллометрических показателей: начальный диаметр зрачка, предшествовавший световому стимулу; конечный диаметр зрачка; время латентного периода зрачковой реакции; время сужения зрачка (парасимпатическая фаза); время расширения зрачка (симпатическая фаза); средняя скорость сужения зрачка; средняя скорость расширения зрачка; амплитуда сужения зрачка. Реакция зрачка является надежным показателем уровня внимания [10].

Тесты «Реакция на движущийся объект (РДО)», «Простая зрительно-моторная реакция (ПЗМР)» и «Внимание и помехоустойчивость (Помехоустойчивость)» позволили оценить скоростные и качественные характеристики сенсорных и моторных процессов, косвенным образом судить о степени уравновешенности психических процессов в аспекте особенностей высшей нервной деятельности (так как время реакций зависит от характеристик процессов возбуждения и торможения, а также функционального состояния, в частности степени утомления).

После тестирования проводили процедуру комбинированной микрополяризации длительностью 40 мин с последующим повторением комплекса тестов.

Комбинированная микрополяризация включала в себя транспинальный, транскраниальный и «солярный» варианты по различным схемам.

Транспинальную микрополяризацию осуществляли постоянным током 200 мкА путем наложения на область проекции выхода спинномозговых нервов из позвоночного канала (анод располагали латерально от остистого отростка седьмого шейного позвонка С7, катод — контрлатерально пояснично-крестцовой зоне на уровне остистых отростков L5–S1).

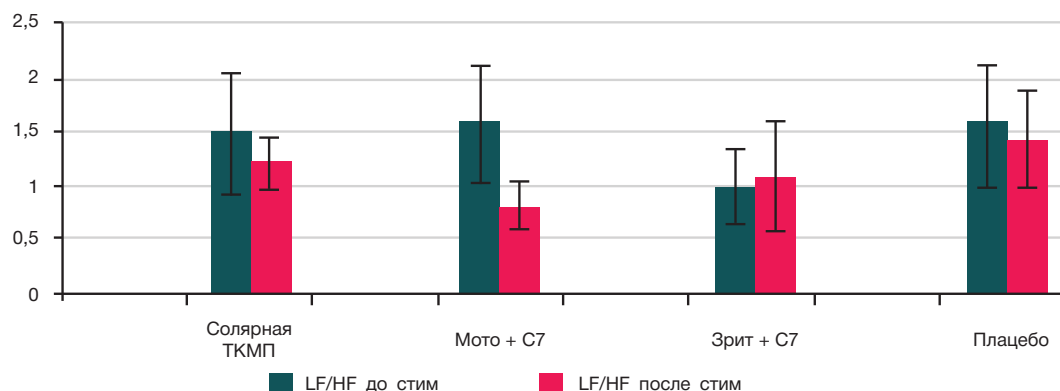


Рис. 1. Изменение соотношения LF/HF после проведенной процедуры микрополяризации. * — изменения статистически значимы ($p < 0,05$; критерий Уилкоксона)

Транскраниальную микрополяризацию осуществляли воздействием постоянным током 200 мкА на область проекции первичной зрительной зоны коры головного мозга (анод — О1 левого полушария, катод — контрлатерально пояснично-крестцовой зоне на уровне остистых отростков L5–S1), на область проекции первичной моторной зоны коры головного мозга (анод — М1, катод — область правого плеча), на область проекции височной зоны коры головного мозга (анод — Т3, катод — область правого плеча).

«Солярную» микрополяризацию осуществляли воздействием постоянным током 200 мкА на область проекции солнечного сплетения (анод ± чуть ниже пупочной области, катод — область правого плеча).

Вся выборка была разделена на четыре группы.

– Группу 1 (8 человек) подвергали однократному воздействию комбинированной микрополяризации: трансспинальной и транскраниальной (зона воздействия — область проекции первичной моторной зоны коры головного мозга). Условное обозначение схемы «Мото + C7».

– Группу 2 (8 человек) подвергали однократному воздействию комбинированной микрополяризации: трансспинальной и транскраниальной (зона воздействия — область проекции первичной зрительной зоны коры головного мозга). Условное обозначение «Зрит + C7».

– Группу 3 (8 человек) подвергали однократному воздействию комбинированной микрополяризации: транскраниальной (зона воздействия — область проекции височной зоны коры головного мозга) и «солярной» (вегетативные узлы солнечного сплетения). Условное обозначение схемы «Солярная ТКМП».

– Группе 4 (7 человек) — проводили плацебо-воздействие. Участникам данной группы электроды накладывали по схеме «Мото + C7», прибор на протяжении

всего времени воздействия был выключен. Условное обозначение схемы «Плацебо».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 1–4 представлены усредненные значения показателей спектрального анализа вариабельности сердечного ритма по всем четырем группам до и после однократной процедуры микрополяризации.

Были выявлены достоверные ($p < 0,05$; критерий Уилкоксона) изменения показателя LF/HF (рис. 1). Отмечено снижение данного показателя на 48,7% относительно исходного уровня в группе воздействия на область проекции премоторной зоны коры головного мозга. Относительно группы плацебо-воздействия снижение LF/HF составило 43,5%. Существенных изменений в динамике показателя в группе сравнения не выявлено. Тенденция к снижению значений показателя заметна и в двух других группах позиционирования и комбинирования воздействия.

По показателю VLF (максимально низкочастотный диапазон спектра ритма сердца, отражающему уровень нейро-гуморальной активности, статистически значимых различий в группах, в том числе плацебо-воздействия, не выявлено ($p > 0,05$; критерий Уилкоксона) (рис. 2).

Общая спектральная мощность ритма сердца TP отражает суммарный вклад всех оцениваемых компонентов в регуляцию ВНС. По данному показателю статистически значимых различий также выявлено не было (рис. 3; $p > 0,05$).

В группе, получившей «солярную» микрополяризацию, отмечено достоверное ($p < 0,05$; критерий Уилкоксона) увеличение на 15,8% коэффициента K30:15 (рис. 4). При этом существенное изменение отмечено только в

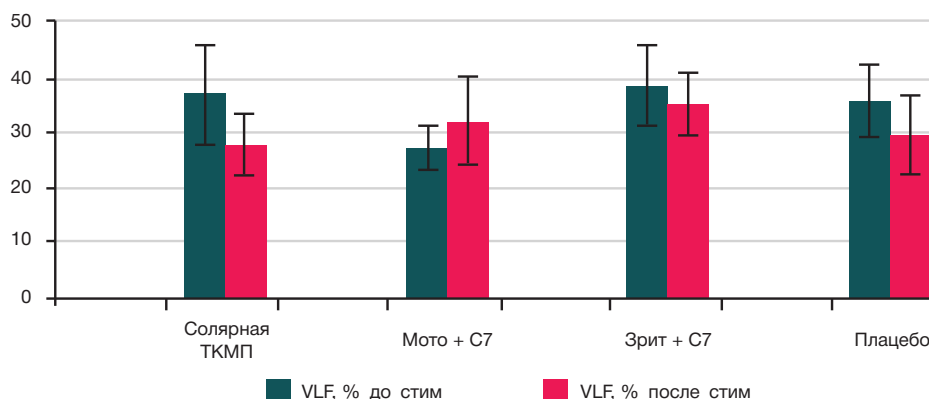


Рис. 2. Изменение VLF-составляющей в спектре ритма сердца после процедуры микрополяризации

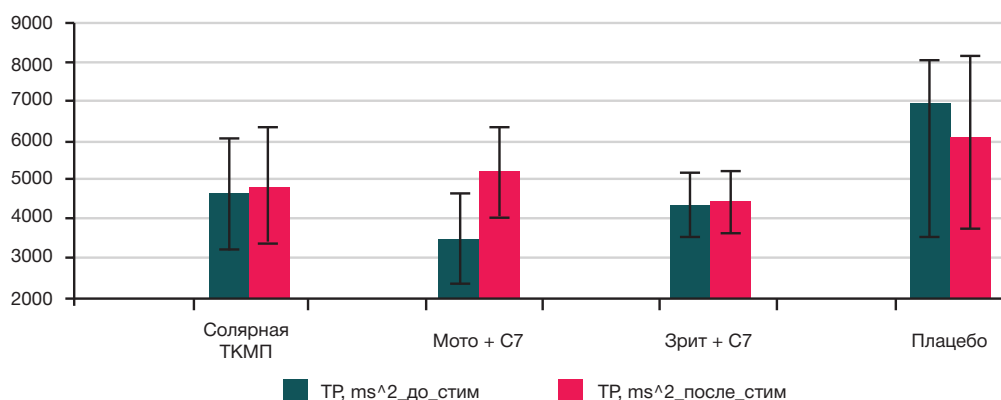


Рис. 3. Изменение общей мощности спектра (TP) после процедуры микрополяризации

группе комбинированной «соляной» микрополяризации. Относительно группы плацебо-воздействия прирост показателя составил 12,8%.

На рис. 5–7 представлены значения интегральных характеристик центральной нервной системы до и после однократной процедуры микрополяризации, предъявленной участникам четырех групп различных схем воздействия.

Были выявлены достоверные ($p < 0,05$) изменения среднего времени реакции в тесте простой зрительно-моторной реакции (рис. 5). Отмечено увеличение показателя на 6,2% относительно исходного уровня в группе, получившей процедуру «соляной» микрополяризации.

По показателю «баланс нервных процессов» теста «РДО» статистически значимых различий выявлено не было ($p > 0,05$).

В группе участников, получавших воздействие по схеме «Мото + C7», отмечено достоверное ($p < 0,05$; критерий Уилкоксона) увеличение на 32,2% значений помехоустойчивости. У участников данной группы повысились уровень внимания и помехоустойчивость (рис. 7). Относительно группы плацебо-воздействия прирост показателя составил 12,8%.

На основании результатов пупиллометрии у лиц после процедуры микрополяризации отмечено небольшое количество статистически значимых различий в динамике (см. таблицу). В группе лиц, получавших комплексную микрополяризацию соляных ганглиев и височной зоны, имело место достоверное снижение на 26,4% разницы между показателем начального и конечного диаметров зрачка. При этом указанное значение в данной группе было более 0,45 мм, что подтверждает недостаточное восстановление зрачка.

При анализе показателей пупиллометрии до и после процедуры микрополяризации по схеме «Зрит + C7» отмечаются особенности изменения времени расширения зрачка. Так, показано достоверное небольшое снижение (2,2%) времени расширения, что характеризует активизацию парасимпатических механизмов регуляции.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сочетание анодной транскраниальной стимуляции в первичной моторной области позиционирования электрода (анод — M1, катод — область правого плеча) и транспинальной стимуляции (анод — C7, катод — контрлатерально пояснично-крестцовой зоне на уровне остистых отростков L5-S1) оказало позитивное влияние на вегетативную регуляцию — оптимизация парасимпатического и симпатического влияния (снижение значения соотношения LF/HF, что, предположительно, способствовало концентрации внимания (повышению помехоустойчивости)).

Низкочастотный и высокочастотный диапазоны в спектре ритма сердца LF и HF отражают активность симпатического и парасимпатического отделов ВНС. Их соотношение LF/HF характеризует вегетативный баланс и дает представление о вовлечении центрального звена регуляции. Отмеченное снижение данного показателя можно интерпретировать как увеличение активности парасимпатического отдела ВНС.

В ответ на сочетание транскраниальной стимуляции области височной зоны коры головного мозга (анод — T3, катод — область правого плеча) и стимуляции проекции солнечного сплетения выявлен эффект активизации процессов восстановления (показатели K30:15 ортостатической пробы и диаметр зрачка).

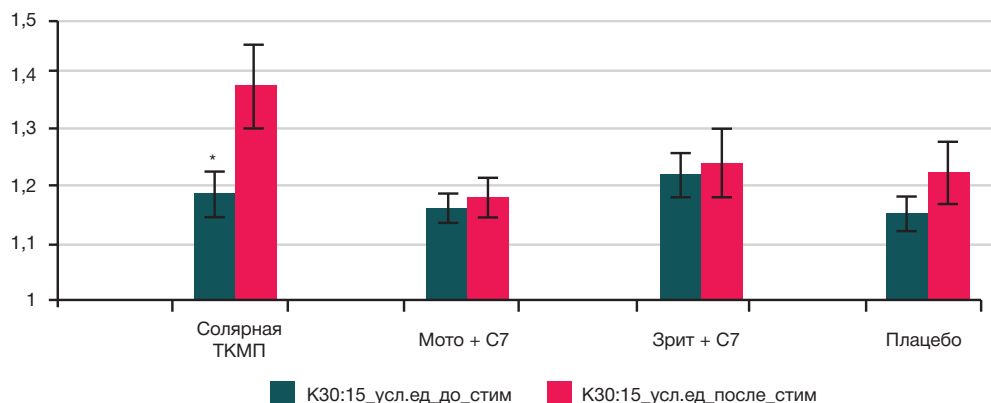


Рис. 4. Изменение коэффициента K30:15 после процедуры микрополяризации. * — изменения статистически значимы ($p < 0,05$; критерий Уилкоксона)

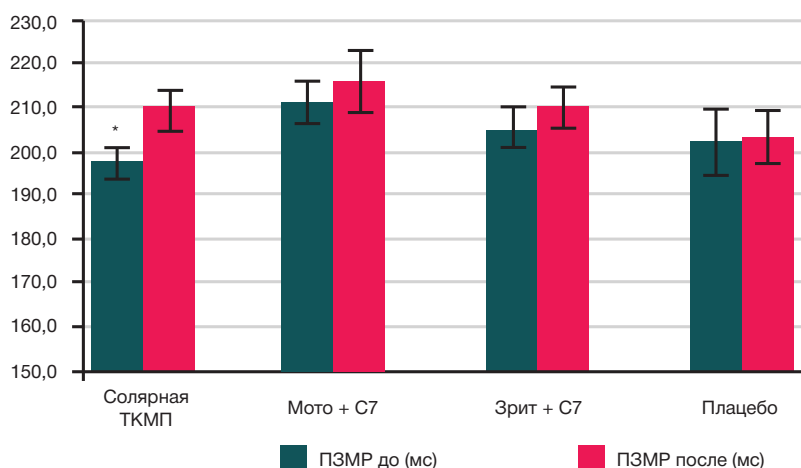


Рис. 5. Изменение среднего времени реакции (тест ПЗМР) после процедуры микрополяризации. * — изменения статистически значимы ($p < 0,05$; критерий Уилкоксона)

Коэффициент К30:15 характеризует скорость оптимизации состояния при переходе из положения лежа в положение стоя (ортостатическая проба). По выявленной динамике можно предполагать улучшение общего состояния организма после применения однократной процедуры микрополяризации.

Тесная связь функции зрачка с различными отделами центральной и вегетативной нервных систем позволяет рассматривать его в качестве чувствительного индикатора функционального состояния человека [11]. ВНС, обеспечивающая адаптацию организма, как к различным воздействиям внешней среды, так и к высокой физической нагрузке, реагирует на них одной из первых. Исследование функции зрачка, тесно связанной с состоянием ВНС у здоровых лиц, имеет большое значение, поскольку ее нарушение при утомлении может проявляться раньше других признаков, свидетельствующих об истощении центральной и автономной нервной системы и адаптационных возможностей. Снижение разницы между показателем начального и конечного диаметров зрачка свидетельствует об оптимизации активности симпатического и парасимпатического отделов ВНС. Полученные результаты согласуются с данными других авторов, изучавших реакцию пупилломоторной системы у лиц в условиях коррекционной работы [12, 13].

На уровне модуляции сенсорно-моторных реакций отмечена активизация процессов торможения, что подтверждается увеличением времени зрительно-

моторной реакции. Изменения среднего времени реакции в тесте простой зрительно-моторной реакции можно интерпретировать как усиление тормозных влияний. Эффект может быть обусловлен усилением вклада активности парасимпатического отдела ВНС в регуляцию функционального состояния.

Значимых эффектов сочетания транскраниальной стимуляции области проекции первичной зрительной зоны КГМ (анод — О1, катод — L5-S1) и транспинальной стимуляции (анод — С7, катод — L5-S1) не выявлено.

Обнаруженные эффекты комбинированной микрополяризации в различных схемах позиционирования электродов позволяют совершенствовать методики проведения процедур микрополяризации. Практическое применение указанных схем может быть результативно в области профессионального спорта. Так, например, оптимизация процессов вегетативной регуляции имеет первостепенное значение для спортсменов в биатлоне, где крайне важен оптимальный переход от динамических к статическим физическим действиям.

ВЫВОДЫ

В исследовании проведена оценка влияния однократной комбинированной микрополяризации на активность ВНС и сенсорно-моторные реакции условно здоровых лиц. Рассмотрено три схемы позиционирования электродов. По результатам исследования выявлены

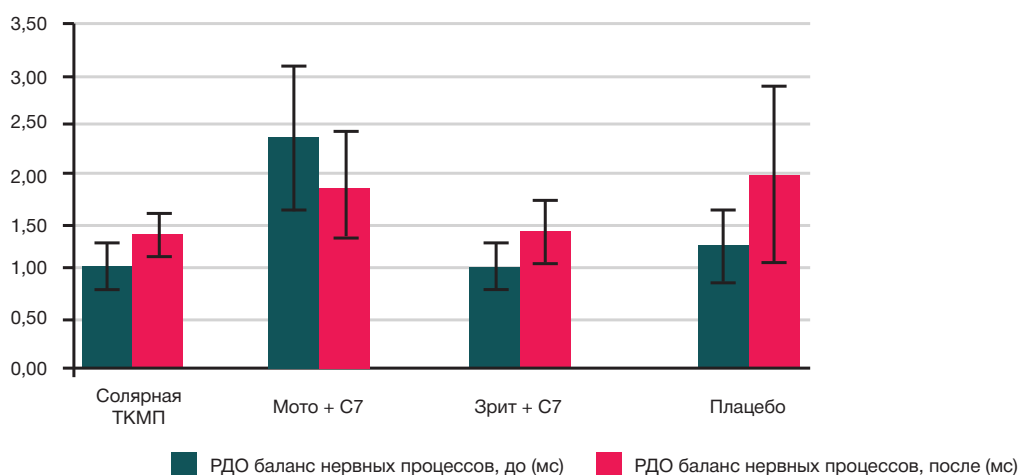


Рис. 6. Изменение баланса торможения и возбуждения (тест «РДО») после процедуры микрополяризации

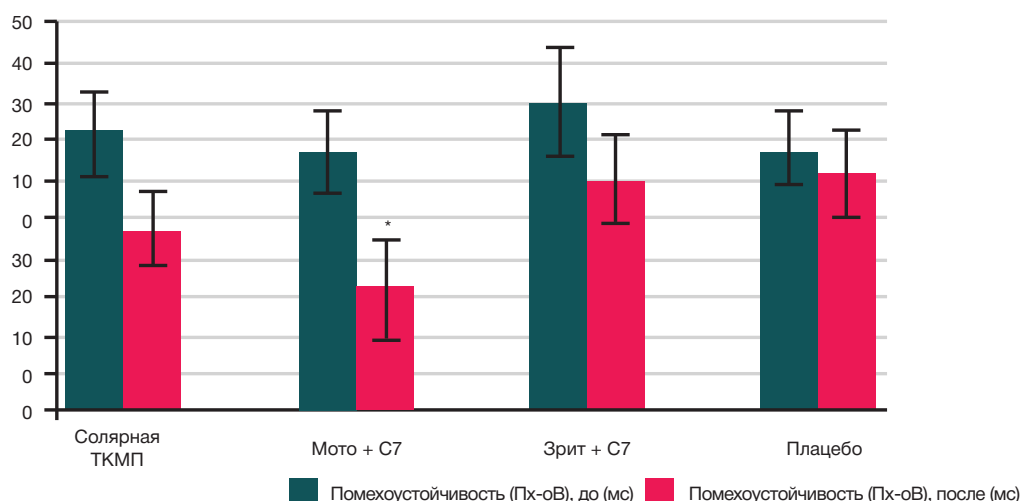


Рис. 7. Изменение значений помехоустойчивости после процедуры микрополяризации. * — изменения статистически значимы ($p < 0,05$; критерий Уилкоксона)

дифференцированные эффекты различных вариантов однократной комбинированной микрополяризации. Наиболее эффективными оказались схемы: 1) комбинация трансспинальной и транскраниальной микрополяризации с позиционированием в области премоторной зоны коры головного мозга по показателям: смещение вегетативного баланса в сторону парасимпатического влияния по показателю LF/HF на 48,7%; оптимизация функции восстановления зрачка на 26,4%; увеличение

помехоустойчивости на 32,2%; 2) комбинация «соляной» и транскраниальной микрополяризации в области проекции височной зоны коры головного мозга по показателям: увеличение коэффициента К30:15 в ортостатической пробе на 15,8%; увеличение времени зрительно-моторной реакции на 6,2%. Перспективным представляется дальнейшее изучение характеристик времени воздействия и силы тока при проведении процедур комбинированной микрополяризации с целью подбора более эффективных режимов стимуляции.

Таблица. Динамика показателей пупиллометрии после процедуры микрополяризации

Группа	Соляная ТКМП		Мото + С7		Зрит + С7		Платцебо	
	До стимуляции	После стимуляции	До стимуляции	После стимуляции	До стимуляции	После стимуляции	До стимуляции	После стимуляции
Дн	6,26 ± 0,30	6,03 ± 0,28	5,97 ± 0,32	6,18 ± 0,17	5,52 ± 0,41	5,75 ± 0,40	5,82 ± 0,30	5,94 ± 0,27
Тл	0,28 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,27 ± 0,01
Ас	1,67 ± 0,12	1,64 ± 0,08	1,57 ± 0,10	1,61 ± 0,07	1,60 ± 0,14	1,66 ± 0,11	1,61 ± 0,09	1,61 ± 0,12
Тс	0,51 ± 0,03	0,53 ± 0,02	0,46 ± 0,03	0,48 ± 0,02	0,46 ± 0,02	0,51 ± 0,02	0,48 ± 0,03	0,51 ± 0,03
Тр	2,21 ± 0,03	2,20 ± 0,02	2,26 ± 0,03	2,23 ± 0,02	2,26 ± 0,02	2,21 ± 0,02*	2,24 ± 0,03	2,22 ± 0,03
Вс	3,28 ± 0,17	3,14 ± 0,16	3,46 ± 0,14	3,38 ± 0,18	3,46 ± 0,23	3,24 ± 0,14	3,40 ± 0,17	3,20 ± 0,16
Вр	0,76 ± 0,06	0,75 ± 0,04	0,67 ± 0,07	0,72 ± 0,03	0,72 ± 0,06	0,83 ± 0,10	0,72 ± 0,05	0,73 ± 0,06
Дк	5,73 ± 0,29	5,63 ± 0,26	5,71 ± 0,31	5,75 ± 0,14	5,19 ± 0,35	5,39 ± 0,33	5,31 ± 0,32	5,42 ± 0,29
Дн-Дк	0,53 ± 0,06	0,39 ± 0,06*	0,26 ± 0,05	0,44 ± 0,07	0,33 ± 0,08	0,36 ± 0,13	0,51 ± 0,12	0,52 ± 0,11

Примечание: Дн (мм) — начальный диаметр зрачка, предшествовавший световому стимулу; Дк (мм) — конечный диаметр зрачка; Тл (с) — время латентного периода зрачковой реакции; Тс (с) — время сужения зрачка (парасимпатическая фаза); Тр (с) — время расширения зрачка (симпатическая фаза); Вс (мм/с) — средняя скорость сужения зрачка; Вр (мм/с) — средняя скорость расширения зрачка; Ас (мм) — амплитуда сужения зрачка. Реакция зрачка является надежным показателем уровня внимания; * — значение статистически значимо по отношению к фону ($p < 0,05$; критерий Уилкоксона).

Литература

1. Липатова А. С., Каде А. Х., Трофименко А. И., Поляков П. П. Коррекция стресс-индуцированных нейроиммуноэндокринных нарушений у самцов крыс с низкой устойчивостью к стрессу применением транскраниальной электростимуляции. Человек и его здоровье. 2018; 3: 58–68.
2. Князева О. В., Белоусова М. В., Прусаков В. Ф., Зайкова Ф. М. Применение транскраниальной микрополяризации в комплексной реабилитации детей с расстройством экспрессивной речи. Вестник современной клинической медицины. 2019; 1: 64–69.
3. Каркищенко Н. Н., Вартаков А. А., Чудина Ю. А., Чайванов Д. Б. Алгоритм расчета вариативности и величины воздействия электрического тока на основе математической модели растекания тока при транскраниальной микрополяризации по данным стереотаксических координат. Биомедицина. 2017; 1: 4–9.
4. Брагина О. А., Семьякина-Глушкова О. В., Трофимов А. О., Брагин Д. Е. О механизмах модуляции мозгового кровотока при транскраниальной электрической стимуляции. Медицинский альманах. 2018; 5 (56): 68–71.
5. Чайванов Д. Б., Чудина Ю. А. Применение нейромодуляции для коррекции психофункциональных состояний в процессе трансактного анализа. Вестник РУДН. Серия: Психология и педагогика. 2011; 4: 38–43.
6. Муравьев С. В., Кравцова Е. Ю., Черкасова В. Г., Антропов Е. С., Влияние трансвертебральной микрополяризации спинного мозга на систему вегетативной регуляции по данным

вариационной кардиоинтервалографии у детей и подростков с заболеваниями позвоночника. Медицинский альманах. 2017; 2 (47): 66–69.

7. Сирбиладзе Г. К., Суслова Г. А., Пинчук Д. Ю., Сирбиладзе Т. К. Возможность применения транспинальной микрополяризации для коррекции церебрального кровообращения. Педиатрия. 2017; 6: 50–55.
8. Скоромец Т. А., Нарышкин А. Г., Горелик А. Л. Солярная микрополяризация в комплексном лечении больных с заболеваниями вегетативной нервной системы. Методические рекомендации. СПб.: Изд. Центр СПб НИПНИ им. В.М. Бехтерева, 2011; 13 с.
9. Нарышкин А. Г., Галанин И. В., Горелик А. Л., Скоромец Т. А.,

Второв А. В., Лисичик М. В., и др. Неспецифический метод лечения соматоформных, вегетативных и гипоталамических расстройств. Обзор психиатрии и медицинской психологии. 2015; 3: 56–63.

10. Суворов Н. Ф., Таиров О. П. Психофизиологические механизмы избирательного внимания. Л.: Наука, 1985; 286 с.
11. Бакуткин В. В. Исследование зрачковых реакций в медицинской практике. Саратов: Амирит, 2017; 120 с.
12. Filipe JA. Assessment of autonomic function in high level athletes by pupillometry. Auton Neurosci. 2003; 104 (1): 66–72.
13. Stang J. Assessment of Parasympathetic Activity in Athletes: Comparing Two Different Methods. Medicine and Science in Sports and Exercise. 2016; 48 (2): 316–22.

References

1. Lipatova AS, Kade AX, Trofimenko AI, Polyakov PP. Korrekciya stress-inducirovannykh nejroimmunoendokrinnykh narushenij u samcov krysa s nizkoj ustojchivost'yu k stressu primeneniem transkraniyal'noj ehlektrostimulyacii. Chelovek i ego zdorov'e. 2018; 3: 58–68. Russian.
2. Knyazeva OV, Belousova MV, Prusakov VF, Zaikova FM. Primenenie transkraniyal'noj mikropolyarizacii v kompleksnoj rehabilitacii detej s rasstrojstvom ehkspressivnoj rechi. Vestnik sovremennoj klinicheskoy mediciny. 2019; 1: 64–69. Russian.
3. Karkishhenko NN, Vartanov AA, Chudina YuA, Chajvanov DB. Algoritm rascheta variabel'nosti i velichiny vozdejstviya ehlektricheskogo toka na osnove matematicheskoy modeli rastekaniya toka pri transkraniyal'noj mikropolyarizacii po dannym stereotakticheskix koordinat. Biomedicina. 2017; 1: 4–9. Russian.
4. Bragina OA, Semyachkina-Glushkovskaya OV, Trofimov AO, Bragin DE. O mexanizmax modulyacii mozgovogo krovotoka pri transkraniyal'noj ehlektricheskoy stimulyacii. Medicinskij al'manax. 2018; 5 (56): 68–71. Russian.
5. Chajvanov DB, Chudina YuA. Primenenie nejromodulyacii dlya korrekcii psixofunkcional'nyx sostoyanij v processe transaktnogo analiza. Vestnik RUDN. Seriya: Psixologiya i pedagogika. 2011; 4: 38–43. Russian.
6. Muravyev SV, Kravcova EYu, Cherkasova VG, Antropov ES, Vliyanie transvertebral'noj mikropolyarizacii spinnogo mozga na sistemu vegetativnoj regulyacii po dannym variacionnoj kardiointervalografii u detej i podrostkov s zabolevaniyami pozvonochnika. Medicinskij al'manax. 2017; 2 (47): 66–69. Russian.
7. Sirbiladze GK, Suslova GA, Pinchuk DYU, Sirbiladze TK. Vozmozhnost' primeneniya transspinal'noj mikropolyarizacii dlya korrekcii cerebral'nogo krovoobrashheniya. Peditriya. 2017; 6: 50–55. Russian.
8. Skoromec TA, Naryshkin AG, Gorelik AL. Solyarnaya mikropolyarizaciya v kompleksnom lechenii bol'nyx s zabolevaniyami vegetativnoj nevrnoj sistemy. Metodicheskie rekomendacii. SPb.: Izd. Centr SPb NIPNI im. V.M. Bextereva, 2011; 13 s. Russian.
9. Naryshkin AG, Galanin IV, Gorelik AL, Skoromec TA, Vtorov AV, Lisichik MV, i dr. Nespecificheskij metod lecheniya somatofornnyx, vegetativnyx i gipotalamicheskix rasstrojstv. Obozrenie psixiatrii i medicinskoj psixologii. 2015; 3: 56–63. Russian.
10. Suvorov NF, Tairov OP. Psixofiziologicheskie mexanizmy izbiratel'nogo vnimaniya. L.: Nauka, 1985; 286 s. Russian.
11. Bakutkin VV. Issledovanie zrachkovyx reakcij v medicinskoj praktike. Saratov: Amirit, 2017; 120 s. Russian.
12. Filipe JA. Assessment of autonomic function in high level athletes by pupillometry. Auton Neurosci. 2003; 104 (1): 66–72.
13. Stang J. Assessment of Parasympathetic Activity in Athletes: Comparing Two Different Methods. Medicine and Science in Sports and Exercise. 2016; 48 (2): 316–22.

АНТИМИКРОБНАЯ И ВИРУЛИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ ТРЕХКОМПОНЕНТНОГО КОМПЛЕКСА ХЛОРГЕКСИДИН-ЭДТА-ЦИНК

В. А. Галынкин¹, А. Х. Еникеев¹, Е. П. Подольская^{2,3}, А. С. Гладчук^{2,4}, Т. И. Виноградова⁵, Н. В. Заболотных⁵, М. З. Догонадзе⁵, К. А. Краснов² ✉

¹ ООО «РОСБИО», Санкт-Петербург, Россия

² Научно-клинический центр токсикологии имени С. Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

³ Институт аналитического приборостроения, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

⁵ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия

Хлоргексидина биглюконат (ХГ) широко используют в качестве дезинфицирующего средства, однако он мало эффективен в отношении спорообразующих микроорганизмов, а также вирусов. Целью работы было повысить биоцидную активность хлоргексидина путем его использования в составе комплекса, включающего этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) и хлорид цинка. Структура трехкомпонентного комплекса ХГ-ЭДТА-цинк доказана методом МАЛДИ-МС, биоцидная активность изучена в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Показано, что комплекс значительно превосходит индивидуальный хлоргексидин, как по уровню активности, так и по широте биоцидного действия. В отношении изученных бактериальных и грибных штаммов комплекс ХГ-ЭДТА-Зн был в 4–5 раз активнее, чем биглюконат хлоргексидина. В концентрации 1,0–0,008 мг/мл (в зависимости от вида микроорганизма) *in vitro* комплекс проявлял как бактериостатическое, так и бактерицидное действие в отношении основных возбудителей бактериальных болезней птиц. В клинических условиях показана его высокая эффективность при лечении дерматитов у мелких домашних и сельскохозяйственных животных; *in vitro* и *in vivo* выявлена высокая противотуберкулезная активность, сопоставимая с препаратом монофлуксацином, в том числе на лекарственно устойчивых штаммах микобактерий. В экспериментах *in vitro* на примере вируса полиомиелита и аденовируса доказано наличие у комплекса ХГ-ЭДТА-Зн вирулицидного действия.

Ключевые слова: хлоргексидин, ЭДТА, цинк, комплекс, МАЛДИ, антисептическая, противотуберкулезная, противовирусная активность

Финансирование: ООО «РОСБИО»

Вклад авторов: В. А. Галынкин — организация микробиологических и вирусологических исследований; А. Х. Еникеев — общее руководство; Е. П. Подольская — масс-спектрометрический анализ; А. С. Гладчук — химико-аналитические исследования; Т. И. Виноградова — руководство исследованиями противотуберкулезной активности; Н. В. Заболотных — изучение противотуберкулезной активности *in vitro*; М. З. Догонадзе — изучение противотуберкулезной активности на животных; К. А. Краснов — обработка и интерпретация данных, подготовка материалов к печати.

Соблюдение этических стандартов: все процедуры с модельными животными были проведены в соответствии с Правилами лабораторной практики и директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/ЕС (2010 г.) о защите животных, используемых для научных целей.

✉ Для корреспонденции: Константин Андреевич Краснов
ул. Бехтерева, д. 1/2, к. 54, г. Санкт-Петербург, 199106, Россия; krasnov_tox@mail.ru

Статья получена: 27.12.2021 Статья принята к печати: 24.01.2022 Опубликовано онлайн: 07.02.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.002

ANTIMICROBIAL AND ANTIVIRAL ACTIVITY OF THREE-COMPONENT COMPLEX OF CHLORHEXIDINE-EDTA-ZINC

Galinkin VA¹, Enikeev AKh¹, Podolskaya EP^{2,3}, Gladchuk AS^{2,4}, Vinogradova TI⁵, Zabolotnykh NV⁵, Dogonadze MZ⁵, Krasnov KA² ✉

¹ ООО "ROSBIO", St. Petersburg, Russia

² Federal State-Financed Institution Golikov Research Clinical Center of Toxicology under the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russia

³ Institute of Analytical Instrumentation, St. Petersburg, Russia

⁴ Saint Petersburg State University, St Petersburg, Russia

⁵ Saint-Petersburg State Research Institute of Phthiopulmonology, St. Petersburg, Russia

Chlorhexidine bigluconate (CHX) is widely used as a disinfectant, but it is not effective against spore-forming microorganisms, as well as viruses. In this work, a method has been found to increase the biocidal activity of chlorhexidine by using it as part of a complex including ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and zinc chloride. The structure of the three-component complex CHX-EDTA-zinc is proved by the MALDI-MS method. The biocidal activity of the chlorhexidine complex has been studied *in vitro* and *in vivo* experiments. It is shown that the complex is significantly superior to chlorhexidine alone, both in terms of activity level and in the breadth of biocidal action. In relation to the studied bacterial and fungal strains, the CHX-EDTA-Zn complex was 4–5 times more active than chlorhexidine bigluconate. In concentrations from 1.0 mg/ml to 0.008 mg/ml (depending on the type of micro-organism), *in vitro* the complex showed both bacteriostatic and bactericidal effects against the main pathogens of bacterial diseases of birds. In clinical conditions, the complex has shown high efficiency in the treatment of dermatitis in small domestic and farm animals. Also, *in vitro* and *in vivo*, the complex showed unexpectedly high antitubercular activity comparable to that of monofloxacin, including on drug-resistant strains of mycobacteria. *in vitro* experiments involving polio virus and adenovirus have shown that the CHX-EDTA-Zn complex possesses virulent action.

Keywords: chlorhexidine, EDTA, zinc, complex, MALDI, antiseptic, anti-tuberculosis, antiviral activity

Funding: ООО "ROSBIO"

Author contribution: Galinkin VA — organization of microbiological and virological research; Enikeev AKh — general management; Podolskaya EP — mass spectrometric analysis; Gladchuk AS — chemical-analytical studies; Vinogradova TI — management of studies of anti-tuberculosis activity; Zabolotnykh NV — study of antitubercular activity *in vitro*; Dogonadze MZ — study of antitubercular activity in animals; Krasnov KA — data processing and interpretation, preparation of the materials for publication.

Compliance with ethical standards: all procedures with animal models were carried out in accordance with the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of the European Union (2010) on protection of animals used for scientific purposes.

✉ Correspondence should be addressed: Konstantin A. Krasnov
Bekhtereva, 1/2, k. 54, St. Petersburg, 199106, Russia; krasnov_tox@mail.ru

Received: 27.12.2021 Accepted: 12.01.2022 Published online: 07.02.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.002

Дезинфицирующие средства повсеместно используют в медицинской практике, в быту и многих других областях человеческой деятельности. Особенно важна роль мероприятий по дезинфекции в условиях эпидемий или при угрозе распространения опасных инфекций, в связи с чем обеспечение медицинских организаций и населения эффективными антисептическими средствами относится к задачам государственной важности. Общими требованиями, предъявляемыми к таким средствам, являются эффективность подавления всех типов патогенной микрофлоры, включая возбудителей микробных, грибковых и вирусных инфекций, а также безопасность для человека и окружающей среды. Существующие препараты лишь частично удовлетворяют этим требованиям, поэтому разработка новых антисептических средств остается актуальной.

К числу наиболее известных антисептиков относится хлоргексидин (1,6-ди-[бис-(4-хлорфенил)бигуанидо]гексана биглюконат), который уже более 60 лет применяют в медицинской, ветеринарной и бытовой практике; до настоящего времени он остается одним из самых востребованных антисептических агентов [1]. Препарат приобрел популярность благодаря своей высокой бактерицидной активности в отношении широкого спектра грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, включая грибы, а также за счет способности сохранять высокую активность при соприкосновении с различными биологическими субстратами (кровь, слюна, гной и т. д.) [2].

Молекула хлоргексидина состоит из двух симметричных хлорфенилзамещенных бигуанидовых групп, соединенных гидрофобной гексаметиленовой цепочкой, при физиологическом значении pH существует в виде бикатиона [3]. Механизм антимикробного действия хлоргексидина, как и у большинства катионных антисептиков, реализуется на уровне клеточной мембраны [4].

Хлоргексидин служит активным началом различных дезинфицирующих средств местного назначения, его используют для обработки ран, ожогов, для стерилизации операционного поля, кожных покровов, он входит в состав растворов и ополаскивателей для лечения простудных заболеваний [5]. Хлоргексидин незаменим в стоматологической практике, где он приобрел статус «золотого стандарта», на который в свое время было принято ориентироваться при разработке новых антисептиков [6].

Вместе с тем, хлоргексидин обладает рядом существенных недостатков. В частности, при комнатной температуре он практически не действует на бактериальные споры и поэтому малоэффективен против спорообразующих патогенов [5]. Малоэффективны к хлоргексидину и кислотоустойчивые микроорганизмы [7], к числу которых относят возбудителей туберкулеза и проказы. Серьезным недостатком хлоргексидина является отсутствие у него выраженной вирулицидной активности. Хотя у хлоргексидина отмечается некоторое действие на ВИЧ, герпес 1 и 2, грипп А [2, 5], по отношению к большинству вирусов он обладает слабым эффектом или совсем не проявляет такового, как, например, к коронавирусу SARS-CoV-2, согласно результатам недавних клинических исследований [8].

Наконец, общей проблемой повсеместно используемых препаратов является появление резистентных микробных штаммов. Долгое время считалось, что лекарственная устойчивость микроорганизмов к хлоргексидину не

вырабатывается [2], но современные данные опровергают это мнение. Установлено, что, например, *K. pneumoniae* способна адаптироваться к хлоргексидину, что приводит к появлению патогенных штаммов, практически нечувствительных к рекомендуемым концентрациям антисептика [9].

Как показывают наши исследования, антисептическая активность хлоргексидина может быть увеличена за счет его использования в комбинации с другими химическими средствами. В связи с этим представляется интересным изучить целевую активность хлоргексидина в присутствии комплексообразующих вспомогательных веществ: трилона Б (натриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты, ЭДТА) и хлорида цинка. Соли и комплексы цинка обладают умеренным антимикробным, противогрибковым и противовирусным действием [10], а ЭДТА, хотя не обладает самостоятельной антисептической активностью, но за счет образования устойчивых комплексов с большинством катионов металлов [11] увеличивает проницаемость клеточных мембран для других веществ, в том числе цинка, а возможно, и хлоргексидина. Целью работы было изучить молекулярную структуру нового хлоргексидинового комплекса, а также провести подробное исследование его биоцидных свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Комплексное соединение хлоргексидина в виде водного раствора, содержащего 0,2% хлоргексидина биглюконата, 1% натриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и 0,5% хлорида цинка, предоставлено ООО «Росбио» (СПб).

Масс-спектрометрическое исследование

Анализ осуществляли методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации — масс-спектрометрии (МАЛДИ-МС). Исходный раствор комплекса разбавляли водой в 100 раз. На ячейку МАЛДИ-мишени наносили 0,5 мкл полученного раствора, добавляли 0,5 мкл раствора матрицы (5 мг/мл) и высушивали. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту, которую растворяли в 70%-м ацетонитриле с добавкой 0,1%-й трифторуксусной кислоты (ТФУ). После высушивания при комнатной температуре образцы анализировали с помощью тандемного времяпролетного масс-спектрометра ultrafleXtreme (Bruker Daltonics; Германия) на базе Научного парка СПбГУ.

Масс-спектры регистрировали в диапазоне m/z 600–1500 в режиме «рефлектор» с детектированием положительных ионов. Для одного спектра суммировалось 15 000 актов облучения образца лазером (Nd:YAG 355 нм). Для калибровки масс-спектрометра использовали калибровочную смесь Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics; Германия).

Элементный состав комплекса хлоргексидин-ЭДТА-Zn устанавливали стандартным методом (CHN-анализ), а количественное содержание цинка определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой, используя спектрометр Optima 2100DV (Perkin Elmer; США). Для выделения индивидуального комплекса исходный раствор концентрировали упариванием в вакууме до 1/10 от первичного объема, выделившийся кристаллический продукт отделяли, промывали водой и сушили на воздухе

Таблица 1. Антимикробная активность комплекса ХГ-ЭДТА-Zn в сравнении с биглюконатом хлоргексидина (ХГ)

Антисептик	Культура					
	<i>Bac. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Bac. mycoides</i>	<i>Sac. cerevisiae</i>	<i>P. breri-compactum</i>	<i>Asp. niger</i>
	Площадь зоны, свободной от роста, см ²					
Комплекс ХГ-ЭДТА-Zn	16,8	13,7	15,2	16,8	19,4	18,5
ХГ	3,6	4,1	4,1	4,0	4,4	3,6
Индекс активности Комплекс / ХГ	4,7	3,3	3,7	4,2	4,4	5,1

при 40 °С до постоянного веса. Полученный комплекс представлял собой бесцветный мелкокристаллический порошок ограниченно растворимый в воде. В исходном растворе содержалось 0,34% данного комплекса, что в пересчете на чистый хлоргексидин составляло 0,2%. Данные элементного анализа: найдено С — 44,50%, Н — 5,21%, N — 19,44%, Zn — 7,57%. $C_{32}H_{44}Cl_2N_{12}O_8Zn$ — MW 858,21; вычислено С — 44,64%, Н — 5,15%, N — 19,52%, Zn — 7,60%. Данные масс-спектра МАЛДИ-МС: m/z 859,27.

Микробиологические исследования *in vitro* и *in vivo*

Эксперименты *in vitro* и клинические испытания антисептических свойств комплекса хлоргексидин-ЭДТА-Zn на животных проводили на базе УО «Витебская ордена «Знак почета» Государственная Академия ветеринарной медицины» (Беларусь) и ОАО «Агрокомбинат «Юбилейный» (Беларусь). Тестирование препарата проводили на чашках Петри методом кратных разбавлений. Каждый микроорганизм тестировали в двух сериях экспериментов, используя культуру, выращенную на двух разных питательных средах [12].

Исследования *in vivo* включали лечение дерматитов у домашних и сельскохозяйственных животных (собак, кошек, кроликов и овец), антисептик применяли один раз в сутки методом аппликаций в течение 5–14 дней.

Изучение противотуберкулезной активности

Проведено на базе ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России. Активность *in vitro* оценивали в отношении чувствительного референтного штамма микобактерий туберкулеза (МБТ) *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* (Институт гигиены и эпидемиологии, Прага, 1976) и клинического изолята *M. tuberculosis* 5582 с множественной лекарственной устойчивостью (коллекция штаммов МБТ СПб НИИФ). Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) определяли с помощью метода REMA [13] на культурах *M. tuberculosis H37Rv* и клинического изолята 5582 с устойчивостью к изониазиду, рифампицину, стрептомицину и пиразинамиду. За значение МИК принимали минимальную концентрацию препарата, при которой средний уровень флуоресценции значительно не превышал 1% от уровня в контрольной культуре МБТ, растущей без ингибитора. Рост бактерий регистрировали как визуально по изменению цвета индикатора резазурина (с голубого на розовый), так и с помощью планшетного флуориметра FLUOstarOptima (Германия) при длине волны возбуждения — 520 нм, излучения — 590 нм).

Противотуберкулезную активность *in vivo* исследовали на мышцах-самцах линии C57black/6 массой 16–18 г (питомник «Андреевка», Научный центр биомедицинских технологий ФМБА; Россия) [14, 15], используя две модели туберкулеза: при заражении стандартным тест-штаммом *M. tuberculosis H37Rv*, и лекарственно устойчивым

штаммом МБТ 5582. Введение лечебных препаратов модельным животным начинали в обеих сериях опытов на четвертый день после заражения. Все препараты вводили внутривентрально ежедневно, кроме субботы и воскресения, до окончания эксперимента. Комплекс ХГ-ЭДТА-Zn вводили в двух дозах: 7 мг/кг и 14 мг/кг. В качестве сравнения служил противотуберкулезный препарат моксифлоксацин в средней терапевтической дозе 7 мг/кг. Общее время эксперимента составляло 40 дней.

Изучение вирулицидной активности

Изучение вирулицидной активности проводили на базе «Института вирусологии им. Д. И. Ивановского» в соответствии с Методическими указаниями [16]. Использовали вакцинный штамм вируса полиомиелита (тип 1, титр вируса — 6,5 lgТЦИД₅₀; НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова, Россия), аденовирус человека (тип 5, титр вируса — 5,5 lg ТЦИД₅₀; Государственная коллекция вирусов Института вирусологии им. Д. И. Ивановского, Россия). Для работы с вирусом полиомиелита использовали перевиваемую культуру клеток почки зеленых мартишек Vero, для работы с аденовирусом — перевиваемую линию клеток Нер2.

Статистическая обработка данных

Для статистической обработки использовали пакет прикладных программ Statistica 7.0 (StatSoft; США). Метрические показатели представляли в виде среднего и ошибки среднего ($M \pm m$). Оценку достоверности различия метрических показателей проводили с использованием критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка биоцидной активности

Изучение активности 0,05%-го ХГ-ЭДТА-цинкового комплекса *in vitro* в сравнении с биглюконатом хлоргексидина в той же концентрации проведено на серии культур стандартных микроорганизмов. Результаты оценки площади зоны отсутствия роста культур на чашках Петри представлены в табл. 1.

Результаты *in vitro* оценки антимикробной активности в отношении основных возбудителей бактериальных болезней птиц представлены в табл. 2.

В концентрации 1,0–0,008 мг/мл (в зависимости от вида возбудителя) комплекс ХГ-ЭДТА-Zn обладает как бактериостатическим, так и бактерицидным действием в отношении всех исследованных болезнетворных культур.

Результаты исследований *in vivo*, полученные в клинических условиях при лечении дерматитов у домашних и сельскохозяйственных животных, представлены в табл. 3.

Таблица 2. Активность комплекса ХГ-ЭДТА-Zn в отношении возбудителей болезней птиц

Вид культуры	Питательная среда	Номер пробы и концентрация активного вещества, мг/мл									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		1,0	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	0,008	0,004	0,002
<i>E. coli-1</i>	МПБ	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+
	Среда Эндо	–	–	–	–	–	–	–	±	+	+
<i>E. coli-2</i>	МПБ	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+
	Среда Эндо	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+
<i>S. enteritidis</i>	МПБ	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+
	Среда Эндо	±	±	±	±	+	+	+	+	+	+
<i>S. gallinarum</i>	МПБ	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+
	Среда Эндо	–	–	–	±	+	+	+	+	+	+
<i>S. typhimurium</i>	МПБ	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+
	Среда Эндо	–	–	±	±	±	+	+	+	+	+
<i>P. vulgaris</i>	МПБ	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+
	МПА	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>St. aureus</i>	МПБ	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+
	МПА	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+
<i>St. epidermidis</i>	МПБ	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
	МПА	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+

Примечание: «—» — полное отсутствие роста; «+» — рост единичных колоний; «+» — обычный рост; МБП — мясопептонный бульон; МПА — мясопептонный агар.

Применение антисептика методом аппликаций в течение 5–14 дней приводило к полному выздоровлению животных. Аллергических реакций или других негативных побочных эффектов при лечении не было отмечено.

Результаты тестирования противотуберкулезной активности *in vitro* в отношении штамма *M. tuberculosis* 5582 представлены на рис. 1.

По результатам тестирования *in vitro* на модели *M. tuberculosis* H37Rv, комплекс ХГ-ЭДТА-Zn обладает выраженной противотуберкулезной активностью: значение МИК составляет 6,2 мкг/мл.

Результаты изучения противотуберкулезной активности *in vivo*. Результаты исследования терапевтической эффективности комплекса ХГ-ЭДТА-Zn в сравнении с моксифлоксацином представлены в табл. 4, а данные по высеваемости МБТ из легких — в табл. 5.

К окончанию эксперимента на 40-й день от инфицирования в группе контроля (без лечения) летальность составила 70% в случае *M. tuberculosis* H37Rv; и 40% — в случае штамма 5582. При этом на

обеих моделях в группе контроля обнаружено резкое увеличение коэффициентов массы легких и селезенки, а также тотальное поражение легочной ткани с участками некроза, в посевах гомогенатов легких регистрировался сплошной рост МБТ.

Лечебный эффект комплекса ХГ-ЭДТА-Zn подтвержден на обеих моделях туберкулеза, при заражении мышей стандартным тест-штаммом *M. tuberculosis* H37Rv и лекарственно устойчивым штаммом МБТ 5582, в сравнении с известным противотуберкулезным препаратом моксифлоксацин в средней терапевтической дозе (7 мг/кг). На обеих моделях туберкулеза комплекс оказывал протективное действие, предотвращая гибель инфицированных мышей (см. табл. 4). На модели лекарственно чувствительного штамма *M. tuberculosis* H37Rv препарат достоверно снижал величину всех тестируемых параметров по сравнению с группой контроля. В дозе 14 мг/кг действие препарата было достоверно более выраженным, чем в дозе 7,0 мг/кг, т. е. наблюдаемый эффект был дозозависимым. По снижению

Таблица 3. Активность комплекса ХГ-ЭДТА-Zn в отношении возбудителей болезней птиц

Показатели	Животные	Серозно-катаральный дерматит	Гнойно-катаральный дерматит	Дерматиты паразитарной этиологии (в комплексной терапии)
Число опытных животных	Собаки	14	10	6
	Кошки	7	2	–
	Кролики	–	–	12
	Овцы	–	–	7
Продолжительность лечения, дней	Собаки	5	7–10	6–14
	Кошки	5	10–12	–
	Кролики	–	–	6–9
	Овцы	–	–	6–12
Выздоровело животных	Собаки	11	9	5
	Кошки	7	2	–
	Кролики	–	–	10
	Овцы	–	–	7

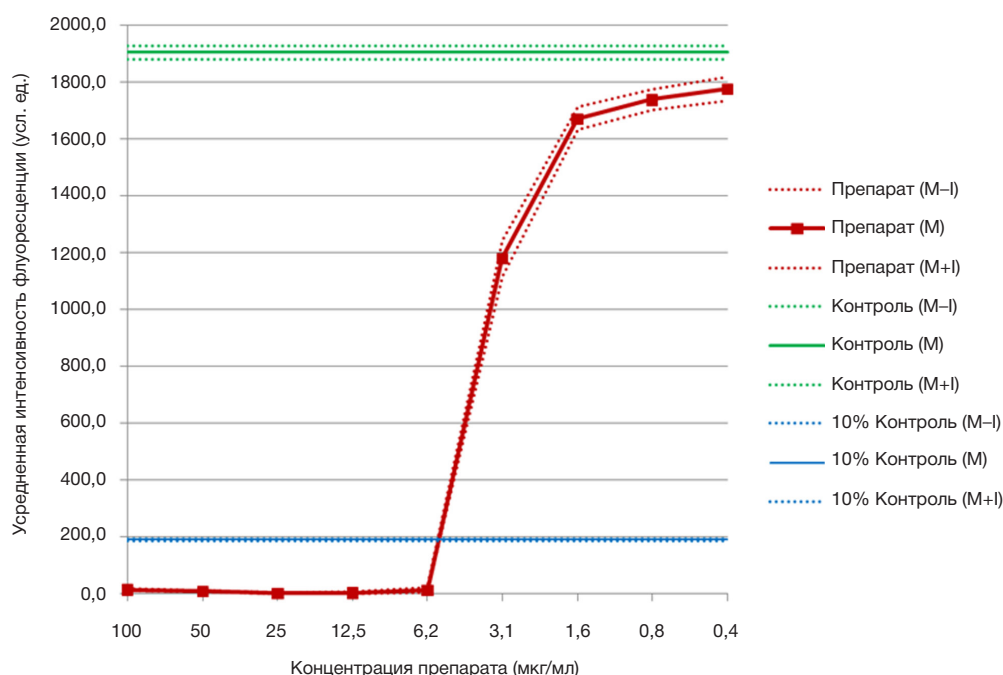


Рис. 1. Изменение интенсивности роста тест-штамма *M. tuberculosis* H37Rv при воздействии комплекса ХГ-ЭДТА-Zn. М — среднее значение, (M-I) и (M+I) — нижняя и верхняя границы доверительного интервала (при $\alpha = 0,05$)

показателей пораженности легких комплекс ХГ-ЭДТА-Zn в дозе 14 мг/кг на обеих моделях туберкулеза был практически так же активен, как моксифлоксацин в дозе 7 мг/кг, а по показателям селезенки он незначительно уступал моксифлоксацину.

Результаты изучения вирулицидной активности. Результаты оценки степени ингибирования репродукции вирусов, выраженные в единицах ТЦИД₅₀ (50%-я тканевая цитопатическая инфекционная доза) представлены в табл. 6.

Как в суспензионном тесте (смешение), так и при обработке поверхностей, контаминированных вирусом полиомиелита и аденовирусом человека, раствор комплекса с содержанием хлоргексидина 0,2% в течение 1–5 мин инактивировал данные вирусы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что ЭДТА дает прочный комплекс с катионом цинка (константа нестойкости $[Zn\ Edta]^{2+} K_n$ равна $3,2 \times 10^{-17}$) [11]. Описано также получение комплексного соединения хлоргексидина с ЭДТА [17]. Однако более сложные, трехкомпонентные комплексы, включающие ЭДТА, цинк и хлоргексидин, не изучены. Как мы предположили, в водной среде биглюконат хлоргексидина, динатриевая соль ЭДТА и хлорид цинка могут образовывать комплексное соединение со структурой, представленной на рис. 2. Действительно, в МАЛДИ-масс-спектре был обнаружен сигнал с m/z 859,27, соответствующий протонированной форме МН⁺ предсказанной структуры. Фрагментный

Таблица 4. Показатели тяжести течения туберкулезной инфекции у мышей при заражении *M. tuberculosis* H37Rv и заражении лекарственно устойчивым штаммом 5582 (через пять недель от начала лечения)

№ группы	Препарат, доза <i>per os</i>	Летальность, %	Коэффициенты массы, у. е.		Индекс поражения легких, у. е.
			легких	селезенки	
Модель заражения <i>M. tuberculosis</i> H37Rv					
1	Контроль заражения (нелеченные)	70	2,13 ± 0,18	1,89 ± 0,19	3,25 ± 0,11
2	Моксифлоксацин 7,0 мг/кг	0	1,12 ± 0,06 $p_{1-2} < 0,001$	0,83 ± 0,03 $p_{1-2} < 0,002$	2,45 ± 0,03 $p_{1-2} < 0,001$
3	ХГ-ЭДТА-Zn 7,0 мг/кг	0	1,28 ± 0,08 $p_{1-3} < 0,002$	1,05 ± 0,07 $p_{1-3} < 0,002$	2,55 ± 0,08 $p_{1-3} < 0,001$
4	ХГ-ЭДТА-Zn 14 мг/кг	0	1,24 ± 0,09 $p_{1-4} < 0,002$	1,01 ± 0,09 $p_{1-4} < 0,002$	2,52 ± 0,05 $p_{1-4} < 0,001$
Модель заражения штаммом 5582 с множественной лекарственной устойчивостью					
5	Контроль заражения (нелеченные)	40	1,13 ± 0,03	1,05 ± 0,04	2,92 ± 0,04
6	Моксифлоксацин 7,0 мг/кг	0	0,98 ± 0,04 $p_{1-2} < 0,01$	0,69 ± 0,05 $p_{1-2} < 0,001$	2,30 ± 0,08 $p_{1-2} < 0,001$
7	ХГ-ЭДТА-Zn 14,0 мг/кг	0	1,01 ± 0,03 $p_{1-3} < 0,05$	0,91 ± 0,05 $p_{1-3} < 0,05$, $p_{2-3} < 0,01$	2,48 ± 0,05 $p_{1-3} < 0,001$, $p_{2-3} < 0,05$

Таблица 5. Высеваемость МБТ из легких у мышей, зараженных *M. tuberculosis* H37R и 5582, через пять недель от начала лечения с использованием комплекса ХГ-ЭДТА-Zn

№ группы	Препарат, доза <i>per os</i>	Число колоний МБТ в легких, КОЕ × 10 ³	Число жизнеспособных микобактерий в легких, lg
Заражение <i>M. tuberculosis</i> H37Rv			
1	Контроль заражения (нелеченные)	129,6 ± 4,3	5,11 ± 0,01
2	Моксифлоксацин 7,0 мг/кг	24,6 ± 4,6 $p_{1-2} < 0,001$	4,36 ± 0,09 $p_{1-2} < 0,001$
3	ХГ-ЭДТА-Zn 7,0 мг/кг	41,99 ± 5,54 $p_{1-3} < 0,001, p_{2-3} < 0,05$	4,61 ± 0,05 $p_{1-3} < 0,001, p_{2-3} < 0,05$
4	ХГ-ЭДТА-Zn 14 мг/кг	35,40 ± 3,19 $p_{1-4} < 0,001$	4,54 ± 0,05 $p_{1-4} < 0,001$
Заражение штаммом 5582 с множественной лекарственной устойчивостью			
6	Контроль заражения (нелеченные)	18,39 ± 1,60	4,26 ± 0,04
7	Моксифлоксацин 7,0 мг/кг	9,04 ± 1,57 $p_{1-2} < 0,01$	3,93 ± 0,07 $p_{1-2} < 0,01$
8	ХГ-ЭДТА-Zn 14,0 мг/кг	11,48 ± 1,58 $p_{1-3} < 0,02$	4,04 ± 0,06 $p_{1-3} < 0,02$

масс-спектр данного иона содержал сигналы с m/z 567,2 (ион протонированного аддукта хлоргексидина и цинка), m/z 505,3 (ион протонированного хлоргексидина) и m/z 353,3 (ион протонированного комплекса ЭДТА-Zn), что однозначно доказывало его структуру. В структуре данного комплекса, очевидно, содержится центральный четырехкоординированный двухзарядный катион цинка, двухзарядный катион хлоргексидиния и четырехзарядный анион полностью депротонированной молекулы ЭДТА. Следует отметить достаточно высокую стабильность тройного комплекса, о чем свидетельствует тот факт, что он сохраняется в жестких условиях испарения под действием лазера.

Стабильность тройного комплекса ХГ-ЭДТА-Zn можно объяснить внутримолекулярным солеобразованием, в результате чего катионные и анионные фрагменты в данной системе стехиометрически уравнивают друг друга, образуя в сумме электронейтральную молекулу.

Включение хлоргексидина в состав прочного тройного комплекса с участием ЭДТА и цинка сопровождается повышением биоцидной активности (см. табл. 1). В отношении исследованных бактериальных и грибных штаммов комплекс ХГ-ЭДТА-Zn в 4–5 раз более активен, чем биглюконат хлоргексидина.

Комплекс хлоргексидина демонстрирует также высокую эффективность *in vitro* в отношении основных возбудителей бактериальных болезней птиц (см. табл. 2), а также *in vivo* в клинических условиях при лечении дерматитов у домашних и сельскохозяйственных животных — собак, кошек, кроликов и овец (см. табл. 3). Можно заключить, что комплекс ХГ-ЭДТА-Zn может быть

эффективным средством для лечения бактериальных и грибковых заболеваний кожи различной этиологии, для заживления царапин, трещин, ожогов, инфицированных ран, пиодермии.

Как показывают наши исследования, комплекс ХГ-ЭДТА-Zn проявляет заметную противотуберкулезную активность, что весьма неожиданно, поскольку хлоргексидин сам по себе обладает очень слабым воздействием на микобактерии туберкулеза (МБТ). В экспериментах *in vitro* активность (МИК) комплекса по сравнению со стандартным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv (см. рис. 1) составляет 6,2 мкг/мл, а по сравнению с лекарственно устойчивым штаммом МБТ 5582 активность в 2 раза выше (МИК 3,1 мкг/мл), т. е. активность по сравнению с лекарственно устойчивым штаммом в 2 раза выше, чем в случае с стандартным туберкулезным штаммом.

Еще более неожиданно наличие у комплекса ХГ-ЭДТА-Zn противотуберкулезного действия *in vivo* — в условиях перорального введения на мышах, хотя известно, что хлоргексидин в свободном виде практически не всасывается из ЖКТ. Достоверность лечебного эффекта препарата подтверждается на двух моделях туберкулеза — на основании данных по выживаемости животных, по результатам оценки физиологических показателей (см. табл. 4) и данных по высеваемости МБТ из легких (см. табл. 5). На модели лекарственно чувствительного штамма *M. tuberculosis* H37Rv комплекс ХГ-ЭДТА-Zn уступает моксифлоксацину, а на модели лекарственно устойчивого штамма его эффект практически равен моксифлоксацину.

Полученные результаты позволяют рассматривать комплекс ХГ-ЭДТА-Zn не только как средство дезинфекции,

Таблица 6. Вирулицидная активность комплекса ХГ-ЭДТА-Zn

Объект	Способ обработки	Время обработки, мин	Снижение репродукции вируса, lg ТЦИД ₅₀	
			Полиомиелит	Аденовирус
Вирусная суспензия	Смешение 1 : 9	5	3,5	4,0
Искусственная кожа	Протирка	1	4,0	4,0
		2 × 1,5	5,0	4,5
Латекс	Протирка	3	4,0	4,0
Металл	Протирка	5	4,7	4,5
Стекло	Протирка	5	5,0	4,3
Пластик	Протирка	5	4,3	4,3

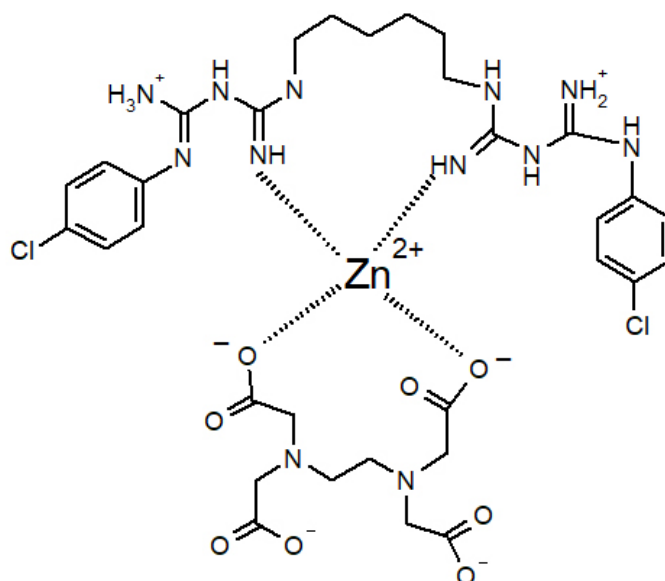


Рис. 2. Структурная формула ХГ-ЭДТА-Zn комплекса

но и как потенциальный противотуберкулезный препарат, который может быть использован в качестве вспомогательного средства при лечении лекарственно устойчивых форм туберкулеза.

Помимо бактерий, биоцидный эффект комплекса ХГ-ЭДТА-Zn распространяется и на вирусы (см. табл. 6). Полученные результаты свидетельствуют, что комплекс ХГ-ЭДТА-Zn может быть использован для дезинфекции объектов, контаминированных данными вирусами.

ВЫВОДЫ

Трехкомпонентный комплекс хлоргексидин-ЭДТА-Zn обладает выраженным биоцидным эффектом в отношении

болезнетворных бактерий, грибов, микобактерий туберкулеза и вирусов, причем по уровню биоцидной активности и широте спектра действия он значительно превосходит хлоргексидин. В целом, комплекс хлоргексидин-ЭДТА-Zn представляется перспективным дезинфицирующим средством, которое может быть использовано для борьбы с распространением опасных бактериальных и вирусных инфекций. На моделях экспериментального туберкулеза при системном введении комплекс хлоргексидин-ЭДТА-Zn проявляет лечебный эффект, сопоставимый с моксифлоксацином. Это позволяет рекомендовать данный комплекс для дальнейшего изучения в качестве возможного средства лечения лекарственно устойчивых форм туберкулеза.

Литература

1. Квашнина Д. В., Ковалишена О. В. Оценка применения хлоргексидина как антисептического средства. Медицинский альманах. 2016; 43 (3): 62–66.
2. Зверьков А. В., Зузова А. П. Хлоргексидин: прошлое, настоящее и будущее одного из основных антисептиков. Антимикробные препараты. 2013; 15 (4): 279–85.
3. Gilbert P, Moore LE. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. J Appl Microbiol. 2005; 99: 703–15.
4. Hugo WB. Disinfection mechanisms. In: Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ, eds. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. Oxford: Blackwell, 1992; p. 187–210.
5. Машковский М. Д. Лекарственные средства. М.: Новая Волна, 2006.
6. Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard? Periodontol. 1997; 15: 55–62.
7. Junco-Lafuente MP, Baca-García P, Mesa-Aguado FL. Utilización de la clorhexidina en la prevención oral de pacientes de la tercera edad. Revista del Ilustre Consejo General de Colegios de Odontólogos y Estomatólogos de España. 2001; 6: 81–89.
8. Carrouel F, Conte MP, Fisher J, Gonçalves LS, Dussart C, Llodra JC, Bourgeois D. COVID-19: A Recommendation to Examine the Effect of Mouthrinses With β -Cyclodextrin Combined With Citrox in Preventing Infection and Progression. J Clin Med. 2020; 9 (4): 1126.
9. Wand ME, Bock LJ, Bonney LC, Sutton JM. Mechanisms of Increased Resistance to Chlorhexidine and Cross-Resistance to Colistin following Exposure of *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates to Chlorhexidine. Antimicrob. Agents Chemother. 2017; 61 (1): 1162–16.
10. Gupta M, Mahajan V, Mehta K, Chauhan P. Zinc Therapy in dermatology: a review. Dermatology Research and Practice. 2014; 9. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/drpr/2014/709152/>.
11. Дятлова Н. М., Темкина В. Я., Попов К. И. Комплексоны и комплексонаты металлов. М.: Химия, 1988; 544 с.
12. Методы лабораторных исследований и испытаний медико-профилактических дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности: Руководство. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010; 615 с.
13. Palomino J-C, Martín A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin Microtitre Assay Plate — Simple and Inexpensive method for Detection of Dgug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46 8: 2720–2.
14. Александрова А. Е., Ариэль Б. М., Оценка тяжести туберкулезного процесса в легких мышей. Проблемы туберкулеза. 1993; 3: 52–53.
15. Franzblau SG, DeGroote MA, Cho SH, Andries K, Nuermberger E, Ormel M, et al. Comprehensive analysis of methods used for the evaluation of compounds against Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis. 2012; 92: 453–88.
16. Методические указания по изучению и оценке вирулицидной активности дезинфицирующих средств. Руководство. МУ

3.5.2431-08. M., 2010.

17. Rasimick BJ, Nekich M, Hladek MM, Barry L. Musikant BI,

Deutsch AS. Interaction between Chlorhexidine Digluconate and EDTA. JOE. 2008; 34 (12): 1521–3.

References

1. Kvashnina DV, Kovalishena OV. Ocenka primeneniya hlorgeksidina kak antisepticheskogo sredstva. Medicinskij al'manah. 2016; 43 (3): 62–66. Russian.
2. Zverkov AV, Zuzova AP. Hlorgeksidin: proshloe, nastojashhee i budushhee odnogo iz osnovnyh antiseptikov. Antimikrobnye preparaty. 2013; 15 (4): 279–85. Russian.
3. Gilbert P, Moore LE. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. J Appl Microbiol. 2005; 99: 703–15.
4. Hugo WB. Disinfection mechanisms. In: Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ, eds. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. Oxford: Blackwell, 1992; p. 187–210.
5. Mashkovskij MD. Lekarstvennye sredstva. M.: Novaja Volna, 2006. Russian.
6. Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard? Periodontol. 1997; 15: 55–62.
7. Junco-Lafuente MP, Baca-García P, Mesa-Aguado FL. Utilización de la clorhexidina en la prevención oral de pacientes de la tercera edad. Revista del Ilustre Consejo General de Colegios de Odontólogos y Estomatólogos de España. 2001; 6: 81–89.
8. Carrouel F, Conte MP, Fisher J, Gonçalves LS, Dussart C, Llodra JC, Bourgeois D. COVID-19: A Recommendation to Examine the Effect of Mouthrinses With β -Cyclodextrin Combined With Citrox in Preventing Infection and Progression. J Clin Med. 2020; 9 (4): 1126.
9. Wand ME, Bock LJ, Bonney LC, Sutton JM. Mechanisms of Increased Resistance to Chlorhexidine and Cross-Resistance to Colistin following Exposure of *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates to Chlorhexidine. Antimicrob. Agents Chemother. 2017; 61 (1): 1162–16.
10. Gupta M, Mahajan V, Mehta K, Chauhan P. Zinc Therapy in dermatology: a review. Dermatology Research and Practice. 2014; 9. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/dr/2014/709152/>.
11. Djalova NM, Temkina VYa, Popov KI. Kompleksy i kompleksony metallov. M.: Himija, 1988; 544 s. Russian.
12. Metody laboratornyh issledovanij i ispytanij mediko-profilakticheskikh dezinfekcionnyh sredstv dlja ocenki ih jeffektivnosti i bezopasnosti: Rukovodstvo. M.: Federal'nyj centr gigieny i jepidemiologii Rospotrebnadzora, 2010; 615 s. Russian.
13. Palomino J-C, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin Microtitre Assay Plate — Simple and Inexpensive method for Detection of Dgug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemotherap. 2002; 46 8: 2720–2.
14. Aleksandrova AE, Arijel BM. Ocenka tjazhesti tuberkuleznogo processa v legkih myshej. Problemy tuberkuleza. 1993; 3: 52–53. Russian.
15. Franzblau SG, DeGroote MA, Cho SH, Andries K, Nuermberger E, Ormel M, et al. Comprehensive analysis of methods used for the evaluation of compounds against Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis. 2012; 92: 453–88.
16. Metodicheskie ukazaniya po izucheniju i ocenke virulicidnoj aktivnosti dezinficirujushhih sredstv. Rukovodstvo. MU 3.5.2431-08. M., 2010. Russian.
17. Rasimick BJ, Nekich M, Hladek MM, Barry L. Musikant BI, Deutsch AS. Interaction between Chlorhexidine Digluconate and EDTA. JOE. 2008; 34 (12): 1521–3.

МОДЕЛИРОВАНИЕ МИЕЛОАБЛЯЦИОННОЙ ЦИТОСТАТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ЦИКЛОФОСФАНОМ СОПРОВОЖДАЕТСЯ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫМ СТАЗОМ У КРЫС

Т. В. Шефер¹✉, Ю. Ю. Ивницкий², В. Л. Рейнюк²

¹ Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² Научно-клинический центр токсикологии имени академика С. Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

Циклофосфан применяют для лечения лимфом, лейкозов, некоторых солидных опухолей и аутоиммунных заболеваний. При миелоабляционной цитостатической терапии его назначают в дозах, вызывающих необратимую панцитопению. Ранние токсические эффекты при таких дозах проявляются астеническим и эметическим синдромами, ограничивающими переносимость лечения. Введение циклофосфана крысам в дозах ≥ 600 мг/кг сопровождается гипераммониемией и симптоматикой, характерной для острой интоксикации солями аммония. Возможным механизмом этих феноменов является эндотоксемия, обусловленная повышением проницаемости энтерогематического барьера вследствие нарушений моторики желудочно-кишечного тракта. Целью настоящей работы была проверка этой гипотезы. Рентгенологически изучали перистальтику желудочно-кишечного тракта крыс в течение 25 ч после введения циклофосфана в дозе 1000 мг/кг, биологически эквивалентной его миелоабляционной дозе для человека. Внутривенное, подкожное или внутримышечное введение циклофосфана замедляло желудочно-кишечный транзит сульфата бария. При подкожном введении циклофосфана этот эффект был умеренным, а при внутримышечном — проявлялся полной остановкой транзита. Таким образом, моделирование на крысах миелоабляционной цитостатической терапии циклофосфаном сопряжено с развитием желудочно-кишечного стаза. Выявленные изменения могут способствовать поступлению в кровь продуктов жизнедеятельности кишечной микрофлоры и формированию эндотоксемии.

Ключевые слова: циклофосфан, миелоабляционная цитостатическая терапия, крысиная модель, рентгенография, желудочно-кишечный стаз

Вклад авторов: Т. В. Шефер — разработка экспериментальной модели, планирование исследования, экспериментальная часть, обработка и визуализация данных; Ю. Ю. Ивницкий — научный замысел, разработка экспериментальной модели, интерпретация результатов; В. Л. Рейнюк — организация экспериментальной части работы. Все авторы участвовали в обсуждении результатов, подготовке и редактировании рукописи статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование выполняли с соблюдением правил биоэтики, утвержденных Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и иных научных целях (ETS N 123).

✉ **Для корреспонденции:** Тимур Васильевич Шефер
ул. Лесопарковая, д. 4, г. Санкт-Петербург, 195043; schafer@yandex.ru

Статья получена: 14.12.2021 **Статья принята к печати:** 15.01.2022 **Опубликована онлайн:** 31.01.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.001

MODELLING MYELOABLATIVE CYTOSTATIC THERAPY WITH CYCLOPHOSPHAMIDE IS ACCOMPANIED BY GASTROINTESTINAL STASIS IN RATS

Schäfer TV¹✉, Ivnitsky JuJu², Rejniuk VL²

¹ State Scientific Research Test Institute of the Military Medicine of Defense Ministry of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia

² Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical Biological Agency, Saint-Petersburg, Russia

Cyclophosphamide is used for the treatment of lymphoma, leukaemia, some solid tumours, and autoimmune disorders. When carrying out myeloablative cytostatic therapy, the doses of cyclophosphamide are prescribed, which cause irreversible pancytopenia. Early toxic effects of such doses are manifested by asthenic and emetic syndromes, limiting the treatment tolerance. Administration of cyclophosphamide in a dose of ≥ 600 mg/kg is accompanied by hyperammonaemia and symptoms, specific to the acute ammonium salt intoxication. Endotoxemia, resulting from the increase in the intestinal barrier permeability due to the impaired gastrointestinal motility, is considered the possible mechanism underlying these phenomena. The study was aimed to test this hypothesis. Radiographic assessment of the rat gastrointestinal peristalsis was performed within 25 h after administration of cyclophosphamide in a dose of 1000 mg/kg, which was equivalent to myeloablative dose for humans. Intraperitoneal, subcutaneous or intragastric administration of cyclophosphamide slowed down the gastrointestinal transit of bariumsulfate. In the case of subcutaneous cyclophosphamide injection, a moderate effect was observed. In the case of cyclophosphamide administered by gavage, the effect was manifested by a complete halt of transit. Thus, modelling myeloablative cytostatic therapy with cyclophosphamide in rats is associated with gastrointestinal stasis. The changes reported may promote the entry of the gut microbial products into the bloodstream and ensuing endotoxemia.

Keywords: cyclophosphamide, myeloablative cytostatic therapy, rat model, radiography, gastrointestinal stasis

Author contribution: Schäfer TV — developing the experimental model, study planning, experimental procedure, data processing and visualization; Ivnitsky JuJu — rationale, developing the experimental model, data interpretation; Rejniuk VL — setting up the experiment. All authors contributed to discussion, manuscript writing and editing.

Compliance with ethical standards: the study was carried out in accordance with the principles of bioethics, approved by the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (ETS N 123).

✉ **Correspondence should be addressed:** Timur V. Schäfer
Lesoparkovaya, 4, Saint-Petersburg, 195043; schafer@yandex.ru

Received: 14.12.2021 **Accepted:** 15.01.2022 **Published online:** 31.01.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.001

Циклофосфан применяют для лечения лимфом, лейкозов, некоторых солидных опухолей [1] и аутоиммунных заболеваний [2]. При миелоабляционной цитостатической терапии его назначают в дозах, уничтожающих опухоль, но вызывающих летальную панцитопению [3, 4]. Благодаря последующей пересадке аллогенных стволовых кроветворных

клеток такие дозы на порядок больше используемых в консервативной терапии [5] и превышают 120 мг/кг [6]. Ранние токсические эффекты циклофосфана в таких дозах проявляются астеническим и эметическим синдромами [7], ограничивающими его переносимость. У крыс циклофосфан в биологически эквивалентных дозах (≥ 600 мг/кг)

вызывал гипераммониемию и симптоматику, характерную для острой интоксикации солями аммония: атаксию, тремор, утрату рефлексов и судороги [8]. Возможным механизмом гипераммониемии при острой интоксикации циклофосфаном является повышение проницаемости энтерогематического барьера [8–11]. Угнетение перистальтики кишечника повышает проницаемость его стенки [12]. В связи с этим целью настоящей работы было изучить влияние циклофосфана в миелоабляционной дозе на желудочно-кишечную перистальтику.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе исследования использовали 24 самца аутбредных крыс-альбиносов с массой тела 161–190 г, приобретенных в питомнике ФГУП «ПЛЖ «Рапполово». При работе с животными соблюдали «Правила лабораторной практики», утвержденные Приказом Минздрава России № 199н от 1 апреля 2016 г. [13], и требования «Руководства по содержанию и уходу за лабораторными животными» [14, 15]. Рацион состоял из стандартного корма для крыс и питьевой воды *ad libitum*. За сутки до эксперимента корм исключали, доступ к воде не ограничивали.

Животных случайным образом распределили в шесть групп по четыре особи. В трех контрольных группах вводили воду — внутривентриально, подкожно или внутривентриально. В трех соответствующих опытных группах вводили циклофосфан в виде свежеприготовленного водного раствора в объеме 10 мл/кг в дозе 1000 мг/кг. При любом пути введения эта доза была абсолютно летальной: все животные погибали в течение двух недель; при внутривентриальном введении она соответствовала 3,5 ЛД₅₀.

Сразу после введения циклофосфана всем крысам с помощью зонда вводили в желудок 35%-ную водную суспензию сульфата бария (10 мл/кг). Спустя 1, 3, 5 и 25 ч животных помещали в пластмассовые пеналы и попарно (контрольное и опытное) исследовали рентгенографически на цифровой установке Siemens Iconos R200 (Siemens; Германия). Рентгенограммы изучали с помощью планиметрической линейки, рассчитывая абсолютное и относительное (в процентах) значения площади тени рентгеноконтрастного вещества в желудке, а также в двенадцатиперстной, тощей, слепой, нисходящей ободочной и прямой кишках. Отличные от нуля или 100% относительные значения, усредненные для каждой группы животных, ранжировали, относя к одному из интервалов (1–25, 26–50, 51–75, 76–99%), которые маркировали различными тонами серого цвета; отсутствие тени маркировали белым, а тень от 100% введенной бариевой взвеси — черным цветом. Полученные результаты представляли в виде схемы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Через час после введения бариевой взвеси интактным крысам часть ее переходила из желудка в двенадцатиперстную кишку. Через 3 ч эту взвесь наблюдали в тощей, а через 5 ч — и в слепой кишке. Спустя 25 ч после начала эксперимента основная часть наблюдавшегося на рентгенограммах сульфата бария находилась в нисходящей ободочной и прямой кишках.

На фоне внутривентриального введения циклофосфана бариевая взвесь не достигала даже тощей кишки, а на фоне внутривентриального введения — вовсе не покидала желудок. После подкожного введения циклофосфана

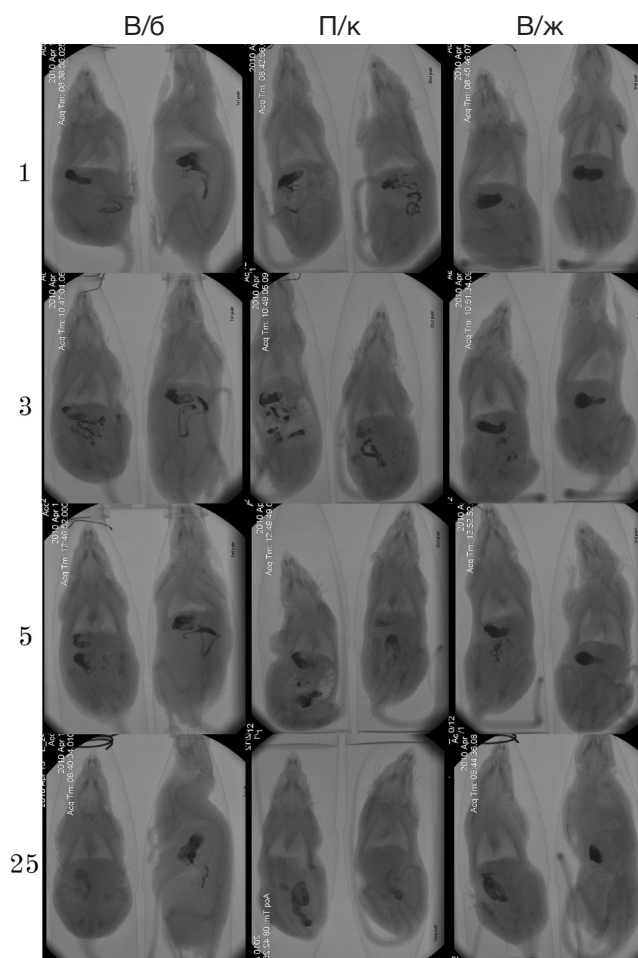


Рис. 1. Рентгенограммы крыс в разные сроки (указаны слева в часах) после введения циклофосфана в дозе 1000 мг (пути указаны сверху: в/б — внутривентриально; п/к — подкожно; в/ж — внутривентриально) и сульфата бария (в/ж, сразу после введения циклофосфана). В каждом окне слева — контрольная крыса

замедление транзита было меньшим: через 3 ч рентгеноконтрастное вещество покидало желудок, но через 25 ч не достигало ободочной кишки (рис. 1, 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Развитие у крыс желудочно-кишечного стаза после введения циклофосфана согласуется с описанным ранее [16] замедлением перистальтики желудка после подкожного введения крысам циклофосфана в дозах 50–200 мг/кг. Значительность эффекта при внутривентриальном введении может быть обусловлена гидролизом в кислом желудочном содержимом альдофосфамида, транспортной формы циклофосфана, с образованием более активных алкилирующих метаболитов [17, 18].

В настоящей работе доза циклофосфана соответствовала его миелоабляционной дозе 155 мг/кг для человека [19]. Поэтому полученные данные ясно указывают на возможность развития желудочно-кишечного стаза при использовании циклофосфана для подготовки пациентов к трансплантации аллогенных стволовых кроветворных клеток.

Желудочно-кишечный стаз — потенциально летальное осложнение у пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии [20, 21]. Он повышает проницаемость энтерогематического барьера [22, 23], ведет к поступлению

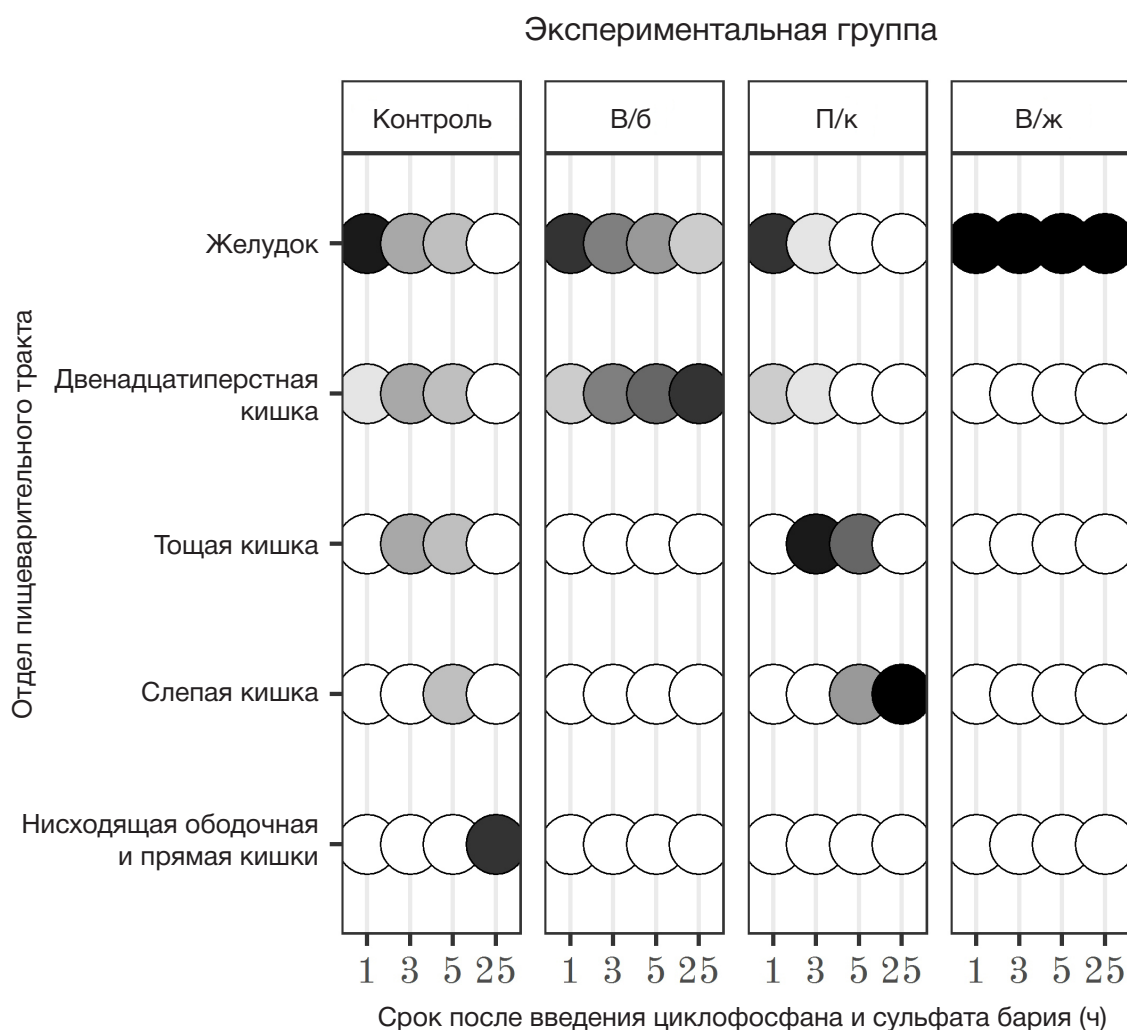


Рис. 2. Влияние циклофосфана в дозе 1000 мг/кг на прохождение бариевой взвеси по желудочно-кишечному тракту крыс. Тон кружков меняется пропорционально доле площади тени рентгеноконтрастного вещества в соответствующем отделе желудочно-кишечного тракта: черные кружки — 100% от введенного количества сульфата бария; белые кружки — отсутствие сульфата бария

в кровь липополисахаридов грамотрицательных бактерий, развитию системного воспаления [24, 25] и сепсиса [26]. Повышенная проницаемость энтерогемаического барьера интенсифицирует и поступление в кровь из химуса токсичных азотистых метаболитов, в частности, аммиака. У крыс на фоне острой интоксикации циклофосфаном усугубление гипераммониемии внутрижелудочным введением ацетата аммония ведет к быстрому развитию неврологических расстройств и существенно сокращает продолжительность жизни животных [27].

ВЫВОДЫ

Моделирование на крысах миелоабляционной цитостатической терапии с использованием циклофосфана ведет к развитию желудочно-кишечного стаза. Выявленные изменения перистальтики пищеварительного тракта могут способствовать поступлению в кровь продуктов жизнедеятельности кишечной микрофлоры, формированию эндотоксемии и вовлекаться в развитие ранних токсических эффектов циклофосфана.

Литература

1. Emadi A, Jones RJ, Brodsky RA. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nature reviews. Clinical Oncology*. 2009; 6 (11): 638–47.
2. Brodsky RA. High dose cyclophosphamide treatment for autoimmune disorders. *Scientific World Journal*. 2002; 28 (2): 1808–15.
3. Kharfan-Dabaja MA, Reljie T, El-Asmar J, Nishihori T, Ayala E, Hamadani M, et al. Reduced-intensity or myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for mantle cell lymphoma: a systematic review. *Future Oncology*. 2016; 22 (12): 2631–42.
4. Yee GC, McGuire TR. Allogeneic bone marrow transplantation in the treatment of hematologic diseases. *Clinical Pharmacy*. 1985; 4 (2): 149–60.
5. Haioun C, Lepage E, Gisselbrecht C, Salles G, Coiffier B, Brice P, et al. Survival benefit of high-dose therapy in poor-risk aggressive non-Hodgkin's lymphoma: final analysis of Etude des lymphomes de l'Adulte study. *Journal of Clinical Oncology*. 2000; 18: 3025–30.
6. Atilla E, Atilla PA, Demirel T. A review of myeloablative vs reduced intensity/non-myeloablative regimens in allogeneic hematopoietic stem cell transplantations. *Balkan Medical Journal*. 2017; 34 (1): 1–9.
7. Легеза В. И., Галеев И. Ш., Селезнев А. Б. Эметический синдром. СПб.: Фолиант, 2005; 144 с.
8. Ивницкий Ю. Ю., Шефер Т. В., Тяптин А. А., Рейнюк В. Л.

- Изменения химического состава крови и головного мозга крыс при моделировании миелоабляционного режима применения циклофосфана. Токсикологический вестник. 2019; 156 (3): 13–8.
9. Шефер Т. В., Рейнюк В. Л., Ивницкий Ю. Ю. Перераспределение аммиака из желудочно-кишечного тракта в общий кровоток при внутрибрюшинном введении циклофосфана крысам. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2010; 150 (8): 170–6.
 10. Dore MP, Pes GM, Murino A, Quarta Colosso B, Pennazio M. Short article: small intestinal mucosal injury in patients taking chemotherapeutic agents for solid cancers. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 2017; 29 (5): 568–71.
 11. Schäfer TV, Ivnitsky JJ, Rejniuk VL. Cyclophosphamide-induced leakage of gastrointestinal ammonia into the common bloodstream in rats. *Drug and Chemical Toxicology*. 2011; 34 (1): 25–31.
 12. Ghareghani M, Reiter RJ, Zibara K, Fathadi N. Latitude, vitamin D, melatonin, and gut microbiota act in concert to initiate multiple sclerosis: a new mechanistic pathway. *Frontiers in Immunology*. 2018; 9: 2484.
 13. Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики: Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 1 апреля 2016 г. № 199н. М., 2016.
 14. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур: ГОСТ 33215–2014. М.: Стандартинформ, 2016; 12 с.
 15. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами: ГОСТ 33216–2014. М.: Стандартинформ, 2016; 15 с.
 16. Visnovský P. The effect of cyclophosphamide and methotrexate on gastric emptying and secretion in rats. *Bratislavské lekárske listy*. 1992; 93 (2): 90–2 (на словацком языке).
 17. Anderson LW, Chen TL, Colvin OM, Grochow LB, Collins JM, Kennedy MJ, et al. Cyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide/aldophosphamide kinetics in patients receiving high-dose cyclophosphamide chemotherapy. *Clinical Cancer Research*. 1996; 2 (9): 1481–7.
 18. De Jonge ME, Huitema AD, Rodenhuis S, Beijnen JH. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Clinical Pharmacokinetics*. 2005; 44 (11): 1135–64.
 19. Хабриев Р. У., редактор. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина, 2005; 832 с.
 20. Deane AM, Chapman MJ, Reintam Blaser A, McClave SA, Emmanuel A. Pathophysiology and treatment of gastrointestinal motility disorders in the acutely ill. *Nutrition in Clinical Practice*. 2019; 34 (1): 23–36.
 21. Frazer C, Hussey L, Bemker M. Gastrointestinal motility problems in critically ill patients. *Critical care nursing clinics of North America*. 2018; 30 (1): 109–21.
 22. Herbert MK, Holzer P. Standardized concept for the treatment of gastrointestinal dysmotility in critically ill patients—current status and future options. *Clinical Nutrition*. 2008; 27 (1): 25–41.
 23. Ukleja A. Altered GI motility in critically ill patients: current understanding of pathophysiology, clinical impact, and diagnostic approach. *Nutrition in Clinical Practice*. 2010; 25 (1): 16–25.
 24. Buchholz BM, Bauer AJ. Membrane Tlr signaling mechanisms in the gastrointestinal tract during sepsis. *Neurogastroenterology and Motility*. 2010; 22: 232–45.
 25. Shimizu K, Ogura H, Asahara T, Nomoto K, Morotomi M, Nakahori Y, et al. Gastrointestinal dysmotility is associated with altered gut flora and septic mortality in patients with severe systemic inflammatory response syndrome: a preliminary study. *Neurogastroenterology and Motility*. 2011; 23 (4): 330–5.
 26. Chapman MJ, Nguyen NQ, Deane AM. Gastrointestinal dysmotility: clinical consequences and management of the critically ill patient. *Gastroenterology clinics of North America*. 2011; 40 (4): 725–39.
 27. Ivnitsky JJ, Schäfer TV, Rejniuk VL. Promotion of the toxic action of cyclophosphamide by digestive tract luminal ammonia in rats. *ISRN Toxicology [Internet]*. 2011. Article ID 450875. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2011/450875/>.

References

1. Emadi A, Jones RJ, Brodsky RA. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nature reviews. Clinical Oncology*. 2009; 6 (11): 638–47.
2. Brodsky RA. High dose cyclophosphamide treatment for autoimmune disorders. *Scientific World Journal*. 2002; 28 (2): 1808–15.
3. Kharfan-Dabaja MA, Reljie T, El-Asmar J, Nishihori T, Ayala E, Hamadani M, et al. Reduced-intensity or myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for mantle cell lymphoma: a systematic review. *Future Oncology*. 2016; 22 (12): 2631–42.
4. Yee GC, McGuire TR. Allogeneic bone marrow transplantation in the treatment of hematologic diseases. *Clinical Pharmacy*. 1985; 4 (2): 149–60.
5. Haioun C, Lepage E, Gisselbrecht C, Salles G, Coiffier B, Brice P, et al. Survival benefit of high-dose therapy in poor-risk aggressive non-Hodgkin's lymphoma: final analysis of Etude des lymphomes de l'Adulte study. *Journal of Clinical Oncology*. 2000; 18: 3025–30.
6. Atilla E, Atilla PA, Demirer T. A review of myeloablative vs reduced intensity/non-myeloablative regimens in allogeneic hematopoietic stem cell transplantations. *Balkan Medical Journal*. 2017; 34 (1): 1–9.
7. Legeza VI, Geleev IS, Seleznyov AB. Emetic syndrome. *Saint Petersburg: Foliant*, 2005; 144 p. Russian.
8. Ivnitsky JJ, Schäfer TV, Tyapin AA, Rejniuk VL. Changes in the chemical composition of the blood and brain of rats under the conditions of modeling the myeloablation regimen of cyclophosphamide administration. *Toxicologicheskii vestnik*. 2019; 156 (3): 13–8. Russian.
9. Schäfer TV, Rejniuk VL, Ivnitsky JJ. Ammonia redistribution from the gastrointestinal tract to general circulation after intraperitoneal injection of cyclophosphamide to rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2010; 150 (8): 170–6. Russian.
10. Dore MP, Pes GM, Murino A, Quarta Colosso B, Pennazio M. Short article: small intestinal mucosal injury in patients taking chemotherapeutic agents for solid cancers. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 2017; 29 (5): 568–71.
11. Schäfer TV, Ivnitsky JJ, Rejniuk VL. Cyclophosphamide-induced leakage of gastrointestinal ammonia into the common bloodstream in rats. *Drug and Chemical Toxicology*. 2011; 34 (1): 25–31.
12. Ghareghani M, Reiter RJ, Zibara K, Fathadi N. Latitude, vitamin D, melatonin, and gut microbiota act in concert to initiate multiple sclerosis: a new mechanistic pathway. *Frontiers in Immunology*. 2018; 9: 2484.
13. On Approval of the Rules of Good Laboratory Practice: Order of the Ministry of Health of the Russian Federation from April 1, 2016, No 199n. Moscow, 2016.
14. Guidelines for the maintenance and care of laboratory animals. Rules of equipment of premises and organization of procedures: GOST 33215–2014. Moscow: Standartinform, 2016; 12 p. Russian.
15. Guidelines for the maintenance and care of laboratory animals. Rules for the maintenance and care of laboratory rodents and rabbits: GOST 33216–2014. Moscow: Standartinform, 2016; 15 p. Russian.
16. Visnovský P. The effect of cyclophosphamide and methotrexate on gastric emptying and secretion in rats. *Bratislavské lekárske listy*. 1992; 93 (2): 90–2. Slovak.
17. Anderson LW, Chen TL, Colvin OM, Grochow LB, Collins JM, Kennedy MJ, et al. Cyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide/aldophosphamide kinetics in patients receiving high-dose cyclophosphamide chemotherapy. *Clinical Cancer Research*. 1996; 2 (9): 1481–7.

18. De Jonge ME, Huitema AD, Rodenhuis S, Beijnen JH. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Clinical Pharmacokinetics*. 2005; 44 (11): 1135–64.
19. Habriev RU, editor. Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Moscow: Medicina, 2005; 832 p. Russian.
20. Deane AM, Chapman MJ, Reintam Blaser A, McClave SA, Emmanuel A. Pathophysiology and treatment of gastrointestinal motility disorders in the acutely ill. *Nutrition in Clinical Practice*. 2019; 34 (1): 23–36.
21. Frazer C, Hussey L, Bemker M. Gastrointestinal motility problems in critically ill patients. *Critical care nursing clinics of North America*. 2018; 30 (1): 109–21.
22. Herbert MK, Holzer P. Standardized concept for the treatment of gastrointestinal dysmotility in critically ill patients—current status and future options. *Clinical Nutrition*. 2008; 27 (1): 25–41.
23. Ukleja A. Altered GI motility in critically ill patients: current understanding of pathophysiology, clinical impact, and diagnostic approach. *Nutrition in Clinical Practice*. 2010; 25 (1): 16–25.
24. Buchholz BM, Bauer AJ. Membrane Tlr signaling mechanisms in the gastrointestinal tract during sepsis. *Neurogastroenterology and Motility*. 2010; 22: 232–45.
25. Shimizu K, Ogura H, Asahara T, Nomoto K, Morotomi M, Nakahori Y, et al. Gastrointestinal dysmotility is associated with altered gut flora and septic mortality in patients with severe systemic inflammatory response syndrome: a preliminary study. *Neurogastroenterology and Motility*. 2011; 23 (4): 330–5.
26. Chapman MJ, Nguyen NQ, Deane AM. Gastrointestinal dysmotility: clinical consequences and management of the critically ill patient. *Gastroenterology clinics of North America*. 2011; 40 (4): 725–39.
27. Ivnitsky JJ, Schäfer TV, Rejniuk VL. Promotion of the toxic action of cyclophosphamide by digestive tract luminal ammonia in rats. *ISRN Toxicology [Internet]*. 2011. Article ID 450875. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2011/450875/>.

ОБНАРУЖЕНИЕ БРОМДИГИДРОХЛОРФЕНИЛБЕНЗОДИАЗЕПИНА (ФЕНАЗЕПАМА) И ЕГО МЕТАБОЛИТА В БИОЛОГИЧЕСКОМ ОБЪЕКТЕ ПРИ СВЕРХНИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ

А. А. Волкова^{1,2}, Р. А. Калёкин^{1,2}✉, Н. Е. Москалева^{1,3}, О. Г. Асташкина^{1,4}, А. М. Орлова¹, П. А. Маркин^{1,3}¹ Российский центр судебно-медицинской экспертизы, Москва, Россия² Российский университет дружбы народов, Москва, Россия³ Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова, Москва, Россия⁴ Бюро судебно-медицинской экспертизы, Москва, Россия

В экстремальных ситуациях важна роль достоверного обнаружения психотропных веществ при минимальных терапевтических концентрациях, что позволит проводить адекватную реанимационную терапию. В медицинской практике широко используют группу производных бензодиазепинов, среди которых бромдигидрохлорфенилбензодиазепин (феназепам). Помимо положительного клинического эффекта феназепам обладает большим числом побочных эффектов, способных привести к отравлениям вплоть до летального исхода. Целью исследования было разработать методику обнаружения метаболитов феназепама методом ВЭЖХ-ТМС высокого разрешения для целей и задач судебно-медицинской экспертизы при наличии сверхнизких концентраций в моче. В исследовании использовали мочу шести пациентов (мужчин и женщин в возрасте 28–40 лет), принимавших феназепам в минимальных терапевтических концентрациях в разовых случаях, по назначению врача. По результатам исследования разработаны оптимальные условия хроматографирования аналитов после пробоподготовки мочи, с временем удерживания феназепама $7,05 \pm 0,06$ мин, выявлены характерные ионы (m/z) 179, 183, 206, 242, 271, 285, 320, 348 (основной) для идентификации феназепама.

Ключевые слова: феназепам, бромдигидрохлорфенилбензодиазепин, 3-гидроксифеназепам, высокоэффективная жидкостная хроматография, судебно-химическое исследование, химико-токсикологический анализ, моча

Вклад авторов: А. А. Волкова, Р. А. Калёкин, А. М. Орлова, О. Г. Асташкина — сбор данных, написание статьи; А. А. Волкова, Р. А. Калёкин, Н. Е. Москалева, П. А. Маркин — проведение экспериментальной части исследования.

Соблюдение этических стандартов: исследование спланировано и проведено с соблюдением требований Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2000 г.) и последующих ее пересмотров; все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Роман Анатольевич Калёкин
ул. Поликарпова, д. 12/13, г. Москва, 125284, Россия; himija@rc-sme.ru

Статья получена: 23.02.2022 **Статья принята к печати:** 11.03.2022 **Опубликована онлайн:** 25.03.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.007

DETECTION OF ULTRA-LOW CONCENTRATIONS OF BROMODIHYDROCHLOROPHENYLBENZODIAZEPINE (PHENAZEPAM) AND ITS METABOLITES IN BIOLOGICAL OBJECTS

Volkova AA^{1,2}, Kalekin RA^{1,2}✉, Moskaleva NE^{1,3}, Astashkina OG^{1,4}, Orlova AM¹, Markin PA^{1,3}¹ Russian Center of Forensic Medical Expertise, Moscow, Russia² Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia³ Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia⁴ Bureau of Forensic Medical Examination, Moscow, Russia

In extreme situations, reliable detection of the minimum therapeutic concentrations of psychotropic substances is important, since this allows one to provide adequate resuscitation. The group of benzodiazepine derivatives, which includes bromodihydrochlorophenylbenzodiazepine (phenazepam), is widely used in clinical practice. Along with the positive clinical effect, phenazepam has numerous side effects, capable of causing poisoning, even death. The study was aimed to develop the method for detection of the phenazepam metabolites by high-resolution HPLC–TMS suitable for achieving the aims and objectives of forensic medical expertise in case of the ultra-low urine substance concentrations. Urine of six patients (males and females aged 28–40), who were prescribed phenazepam and took the drug at minimum therapeutic concentrations on an ad hoc basis, was used during the study. Optimum conditions for the analyte chromatography after the urine sample preparation were defined with the phenazepam retention time of 7.05 ± 0.06 min; specific ions (m/z) 179, 183, 206, 242, 271, 285, 320, 348 (main) were defined for identification of phenazepam.

Keywords: phenazepam, bromodihydrochlorophenylbenzodiazepine, 3-hydroxyphenazepam, high-performance liquid chromatography, forensic chemistry research, chemical toxicological analysis, urine

Author contribution: Volkova AA, Kalekin RA, Orlova AM, Astashkina OG — data acquisition, manuscript writing; Volkova AA, Kalekin RA, Moskaleva NE, Markin PA — experimental procedure.

Compliance with ethical standards: the study was planned and conducted in accordance with the requirements of the Declaration of Helsinki of the World Medical Association (2000) and subsequent revisions thereto; the informed consent was submitted by all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Roman A. Kalekin
Polikarpova, 12/13, Moscow, 125284, Russia; himija@rc-sme.ru

Received: 23.02.2022 **Accepted:** 11.03.2022 **Published online:** 25.03.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.007

В экстремальных ситуациях важна роль достоверного обнаружения психотропных веществ при минимальных терапевтических концентрациях, что позволит проводить адекватную реанимационную терапию. В настоящее время производные бензодиазепинов являются одними из наиболее распространенных психотропных средств, которые применяют при тревожных расстройствах и других психосоматических состояниях. Наиболее мощный из бензодиазепинов и часто используемый в медицинской практике [1–5] бромдигидрохлорфенилбензодиазепин (феназепам) помимо положительного клинического эффекта обладает большим числом побочных действий [6], которые при неправильном медицинском применении или с немедицинскими целями могут привести к отравлениям вплоть до летального исхода [7–9].

Бромдигидрохлорфенилбензодиазепин — анксиолитическое средство (транквилизатор) бензодиазепинового ряда. Оказывает анксиолитическое, седативно-снотворное, противосудорожное и центральное миорелаксирующее действие. Химическое название — 7-бром-5-(орто-хлорфенил)-2,3-дигидро-1Н-1,4-бензодиазепин-2-он; молекулярная формула — $C_{15}H_{10}BrClN_2O$; наиболее известно на территории РФ под торговым названием «феназепам». Лекарственная форма — таблетки по 0,5; 1,0 и 2,5 мг [10] и в виде раствора 1 мг/мл по 0,5 и 1,0 мл [11]. Является рецептурным лекарственным средством (отпуск по рецепту формы № 148–1/у-88), в 2021 г. поставлен на предметно-количественный учет (ПКУ) при отпуске как сильнодействующее вещество. Для феназепама риск лекарственной зависимости и синдром отмены был и остается достаточно высоким, чем обусловлены случаи отравления, а наличие побочных эффектов, например галлюцинации, эйфория и другие, определяют потенциальную возможность злоупотребления этим препаратом [1, 9].

Феназепам применяют в небольших количествах, так как он оказывает высокий терапевтический эффект, а его возможность потенцирования эффекта во много раз другими веществами предполагает его низкие концентрации в биологических объектах организма. Поскольку немедицинское применение, комбинация с другими психотропными средствами и алкоголем и наличие побочных эффектов могут привести к наступлению острого и летального отравления феназепамом, разработка методики обнаружения и идентификации его сверхнизких концентраций современными методами в биологических объектах до настоящего времени остается актуальной задачей судебно-химического и химико-токсикологического исследования. Одновременное обнаружение метаболитов феназепама и действующего вещества в нативном виде (бромдигидрохлорфенилбензодиазепин) позволяет достоверно утверждать о применении его пациентом/потерпевшим и отсутствии ложноположительного результата при подлоге в виде добавления его в биологический объект. Из неинвазивных наиболее распространенным биологическим объектом в клинических лабораториях (в том числе в химико-токсикологических) является биологическая жидкость — моча [12, 13].

В настоящее время высокоэффективную жидкостную хроматографию — tandemную масс-спектрометрию (ВЭЖХ-ТМС) успешно применяют в качестве надежного селективного и чувствительного метода для скрининга, идентификации и количественной оценки малых молекул [14–16]. Цель исследования — разработать методику обнаружения феназепама и его основного

метаболита методом ВЭЖХ-ТМС высокого разрешения (ВР) с использованием технологии Orbitrap для целей и задач судебно-медицинской экспертизы при наличии сверхнизких концентраций в биологическом объекте (моча).

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

У пациентов ($n = 6$) отбирали образцы мочи утром натощак через 8 ± 1 ч после приема терапевтических концентраций феназепама (1 мг в таблетированной форме) по назначению врача при психосоматических расстройствах. Критерии включения пациентов: первичный прием препарата, позволяющий избежать депонирования и увеличения концентрации в организме человека. Критерии исключения: коморбидные пациенты с текущими назначениями психотропных препаратов; заболевания почек; лица старше 45 лет и моложе 25 лет. Средний возраст пациентов обоего пола составлял 34 ± 6 лет. Забор проб биологической жидкости производили неинвазивным способом, добровольно с согласия пациентов и на анонимных условиях.

Исследовали действующее вещество бромдигидрохлорфенилбензодиазепин лекарственного препарата «Феназепам» (ЛП-005121-191018) после очистки от вспомогательных веществ. Для исследования были получены рабочие образцы (РО) — спиртовой раствор с содержанием 1 мг/мл исследуемого вещества.

Для работы использовали: ВЭЖХ-ТМС с высоким разрешением и технологию Orbitrap [15, 16]; масс-спектрометр Orbitrap Exploris 120 MS (ThermoFisher Scientific; США), представляющий собой автономный прибор OrbitrapTM с источником ионизации при атмосферном давлении (ИАД) для высокопроизводительных задач масс-спектрометрии (МС) с жидкостной хроматографией (ЖХ).

Поскольку при направлении на судебно-медицинскую экспертизу для химико-токсикологического исследования симптоматика побочных эффектов у феназепама ярко выражена для производных бензодиазепина, пробоподготовку проводили по общепринятой схеме для соединений производных бензодиазепинов. Изолирование феназепама проводили в двух вариациях: 1) без проведения гидролиза: нативную мочу объемом 5 мл подщелачивали гидроксидом натрия (3–6 мл) до pH 10; 2) после солянокислого гидролиза методом жидкостной экстракции: к 5 мл утренней мочи добавляли 5 мл концентрированной соляной кислоты и нагревали в закрытой пробирке на кипящей водяной бане в течение часа (кислотный гидролиз). Далее нейтрализовали, подщелачивая 60%-м гидроксидом натрия (3–6 мл) до pH 10. Затем в обоих вариантах экстрагировали дважды хлороформом по 10 мл в делительной воронке при умеренном ручном встряхивании в течение 3 мин. После отстаивания хлороформ сливали в выпарительную чашку и упаривали досуха на водяной бане, сухой остаток растворяли в 0,5 мл ацетонитрила и отправляли на исследование.

Условия хроматографирования ВЭЖХ-ТМС ВР

Программное обеспечение — Thermo Scientific Xcalibur 4.4 (Thermo Scientific; США); колонка TF Accucore PhenylHexyl column ($100 \times 2,1$ мм, 2,6 мм), температура колонки 30 °С.

Предварительно разработали комбинированную подвижную фазу. Для повышения экспрессности анализа

Таблица 1. Градиент подвижной фазы

Время, мин	Скорость потока подвижной фазы, мл/мин	Подвижная фаза А, %	Подвижная фаза В, %
0	0,5	99,0	1,0
1,0	0,5	99,0	1,0
10,0	0,5	1,0	99,0
11,5	0,5	1,0	99,0
12,0	0,5	99,0	1,0
13,5	0,5	99,0	1,0

и уменьшения ширины хроматографических пиков использовали разные градиенты по составу подвижной фазы и изменяли скорость ее подачи. Подвижная фаза представлена в градиентном режиме: подвижная фаза А — 2 мМ раствор аммония формиата 0,1%-й муравьиной кислоты (рН 3,0) в воде и подвижная фаза В — 2 мМ раствор аммония формиата 0,1% муравьиной кислоты в смеси ацетонитрила и метанола (1 : 1). Скорость потока — 0,5 мл/мин. Градиентный режим представлен в табл. 1.

Детектирование проводили в режиме информационно зависимой фрагментации. Режим полного сканирования с обнаружением ddMS2 следующий: диапазон сканирования — 100–1000 m/z; RF Lens 50%, сбор данных с высоким разрешением Orbitrap 120 000 FWHM. Режим диапазона сканирования автоматический. Автоопределение времени инъекции ионов в ловушку. Порог интенсивности для фрагментации — 2000. Обнаружение вершины — 30%, изолирующее окно — 1 m/z, режим энергии столкновения — ступенчатый, тип энергии столкновения — абсолютный. Энергия диссоциации (HCD) — 15, 30, 45%. Разрешение для фрагментов — 30 000. Для оптимизации условий качественного и количественного анализа уточнение окон обнаружения проводили рутинным для лаборатории методом. Режим исключения ионов осуществляли после получения одного спектра за 3 с.

В работе использовали систему, оснащенную источником ионизации со следующими параметрами: тип ионного источника — H-ESI; напряжение электроспрея — положительная ионизация 3500 V; напряжение электроспрея — отрицательная ионизация 2500 V. Распыляющий газ — азот 50 отн. ед., вспомогательный газ — азот 13 отн. ед. Температура капилляра — 280 °C; температура испарителя — 350 °C. Встроенная подстройка массы — EASY-IC™ (флуорантрен).

Идентификацию нативного соединения феназепама и его метаболита после хроматографирования проводили

при использовании библиотек масс-спектрометрической информации: TRACEFINDER 5.1 SP1; TOXFINDER 1.0; EFS_HRAM_Compound_Database; Toxicology_HRAM_Compound_Database; Thermo Scientific™ mzVault HRAM MS/MS spectral library; COMPOUND DISCOVERER 3.1; MzCloud.

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при доверительной вероятности $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Применение выбранного режима сканирования позволило получить максимальную чувствительность (ввиду отсутствия потерь в процессе соударительной ионизации), что необходимо при оценке временных окон обнаружения, так как при оптимизации метода на быстрое разделение могли возникнуть ложноотрицательные результаты из-за низкой скорости сканирования, в то время как ее существенное повышение могло привести к значительному падению интенсивности сигналов, что очень важно при определении метаболитов при низких (терапевтических) концентрациях в биологических жидкостях (моче). Условия хроматографирования — комбинированный градиент подвижной фазы и температурный режим позволили уменьшить количество коэлюирующихся соединений из мочи и обеспечили получение достоверных результатов (рис. 1 и 3).

При изолировании после гидролиза наблюдали только пик феназепама (2-амино,5-бром)-2'-хлорбензофенон не обнаружили), а без гидролиза — феназепам и 3-гидроксифеназепам.

На представленных хроматограммах идентифицирован феназепам и его метаболит 3-гидроксифеназепам по избранным ионам. Обнаружение проводили по временам удерживания с последующей идентификацией после

Таблица 2. Результаты хроматографирования мочи методом ВЭЖХ-TMC BP

Вещество	Элементарная композиция	Теоретическая масса протонированного иона, m/z	Наблюдаемая масса протонированного иона, m/z	Время удерживания, мин ($n = 6$)	Статистические параметры времени удерживания*
Феназепам	$C_{15}H_{10}BrClN_2O$	349,61	348,97	$a = 7,05$ (6,98; 7,05; 6,95; 7,15; 7,06; 7,11)	$\sigma^2 = 0,00572$; $\sigma = 0,07563$; $V = 1,07 \%$; $A/m_a = -0,07035$; $E/m_e = -2,14563$; $\bar{a} = 0,05667$
3-Гидроксифеназепам	$C_{15}H_{10}BrClN_2O_2$	365,61	364,97	$a = 6,77$ (6,65; 6,88; 6,77; 6,85; 6,70; 6,77)	$\sigma^2 = 0,00756$; $\sigma = 0,08695$; $V = 1,28 \%$; $A/m_a = -0,08377$; $E/m_e = -2,12896$; $\bar{a} = 0,06333$

Примечание: σ^2 — дисперсия, σ — среднеквадратическое отклонение; V — коэффициент вариации; A/m_a — отношение показателя асимметрии к его ошибке; E/m_e — отношение показателя эксцесса к его ошибке; $\bar{a}$ — среднее линейное отклонение.

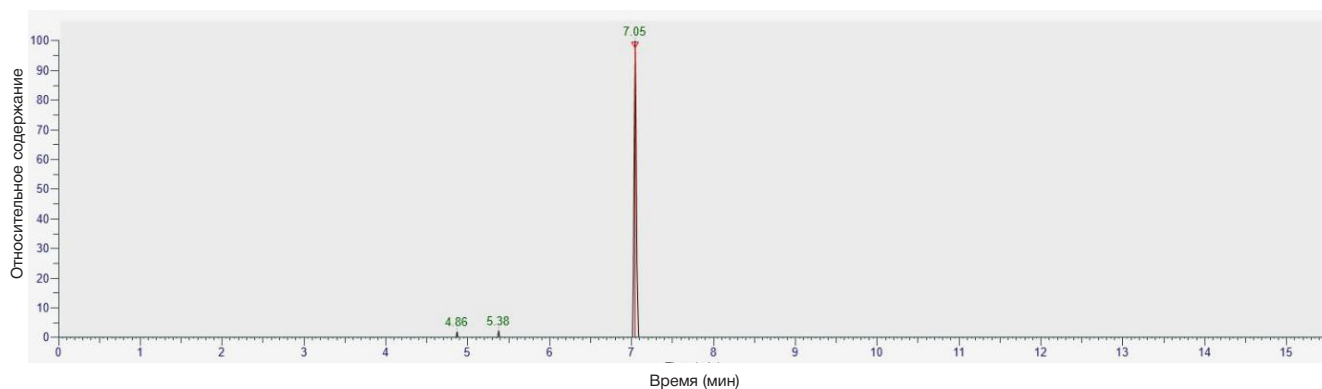


Рис. 1. Хроматограмма хлороформного экстракта мочи феназепама в режиме SIM по иону m/z 348

анализа характерных ионов масс-спектров данных соединений. Статистическая обработка значений времени удерживания приведена в табл. 2.

В организме феназепам метаболизируется до 3-гидроксифеназепама. Доля нативного феназепама, который выводится, составляет 47–89%, поэтому определение возможно и рекомендуется проводить по феназепаму.

При идентификации кроме времени удерживания значимым фактором являются спектральные характеристики исследуемых веществ (рис. 2).

Провели статистическую обработку полученных данных и валидационную оценку (табл. 3) по параметрам: «оценка переноса аналита», «определение интерференционных эффектов», «подавление/повышение ионизации» [17]. Параметры валидационных характеристик соответствуют критериям приемлемости.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные полные спектры исследованных веществ с диссоциацией масс-спектров ионов, характерных фрагментам молекулы в различных функциональных группах, позволяют выделить характерные ионы для феназепама: 179, 183, 206, 242, 271, 285, 320, 348 (основной) m/z .

Согласно данным, представленным в табл. 3, можно выделить для каждого исследуемого соединения характерный ион, однако идентификацию необходимо проводить не менее чем по пяти. При исследовании возможно выполнение анализа в режиме селективного ионного мониторинга (SIM) по заданным ионам. Для феназепама наиболее интенсивным в масс-спектрах является ион с m/z 348. Следует отметить, что ионы, находящиеся в «неинформативном» диапазоне (т. е.

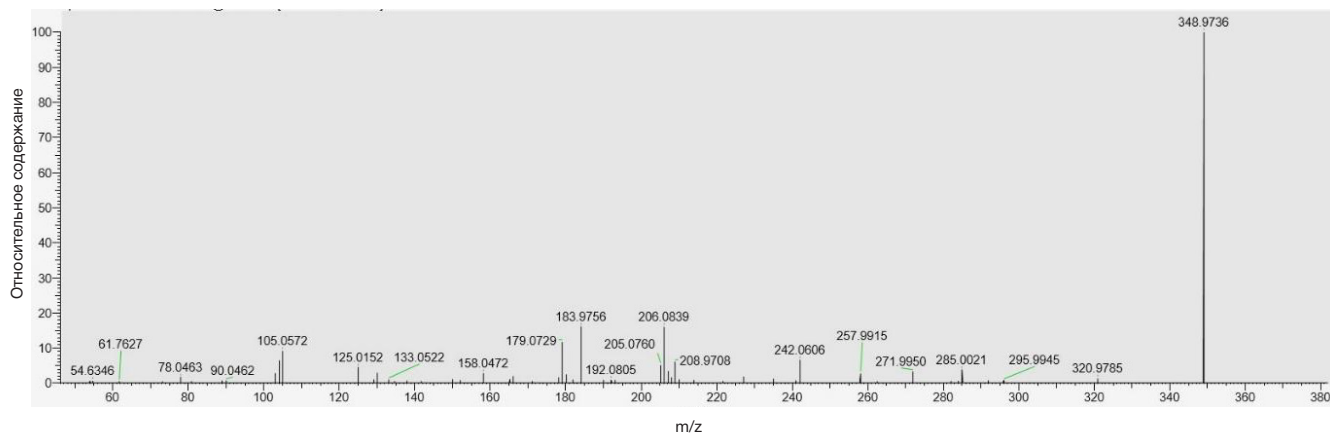


Рис. 2. Масс-спектр феназепама

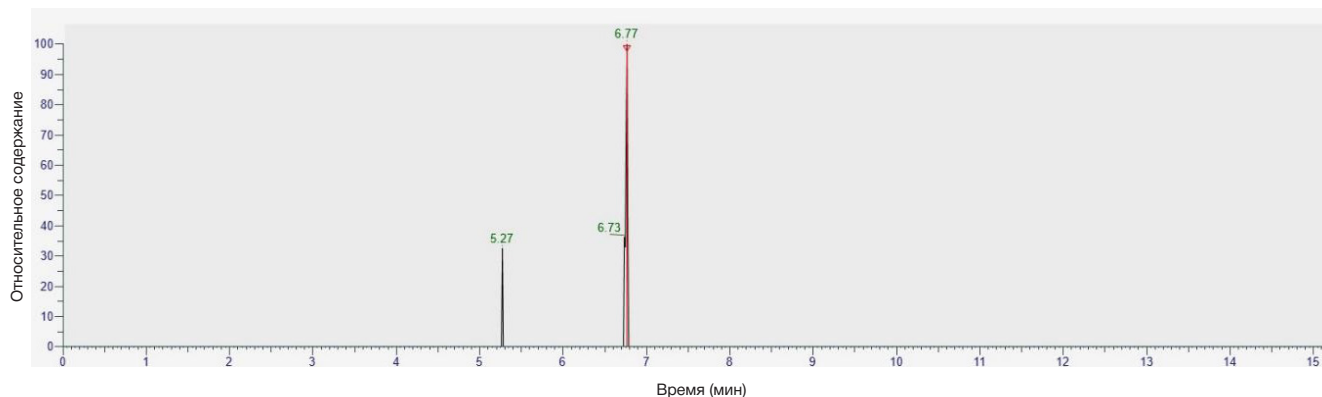


Рис. 3. Хроматограмма хлороформного экстракта мочи 3-гидроксифеназепама в режиме SIM по иону m/z 348

Таблица 3. Оценка параметров валидационных характеристик при идентификации феназепама и его метаболита методом ВЭЖХ-ТМС ВР

Параметр	Результат
Оценка переноса аналита	«Переноса» аналита для 10 нг/мл не происходит
Определение интерференционных эффектов	Отсутствуют интерференционные эффекты внутри группы лекарственных препаратов — метаболиты других агонистов бензодиазепиновых рецепторов (клобазам, залеплон, феназепам)
Подавление/повышение ионизации	от -4,1 до 1,1% RSD < 11%

менее 150 а.е.м.), присутствуют в обоих изучаемых соединениях, поэтому на результаты идентификации сильно влияют компоненты матрицы исследуемого образца и «фона» хроматографической колонки. Следовательно, рекомендовано оптимально использовать для идентификации данные более 150 а.е.м.

ВЫВОДЫ

Разработана методика идентификации феназепама в извлечениях из мочи методом ВЭЖХ-ТМС с ВР с использованием технологии Orbitrap для установления

факта наличия феназепама в сверхнизких концентрациях в биологических объектах человека (на примере мочи) для использования в судебно-химическом и химико-токсикологическом исследованиях. Обнаружено и установлено время удерживания метаболита 3-гидроксифеназепама после перорального приема и определены характерные ионы для использования при идентификации. Проведена валидационная оценка разработанной методики по параметрам: «оценка переноса аналита», «определение интерференционных эффектов», «подавление/повышение ионизации», по которым она соответствует критериям приемлемости.

Литература

- Дорофеева О. А. Клинико-фармакологические закономерности терапевтического действия разных лекарственных форм феназепама у больных с тревожными расстройствами. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. Москва, 2009. 24 с.
- Калёкин Р. А. Судебно-медицинская (химическая) оценка нейрорептиков. Судебно-химическое исследование и токсикологическая характеристика нейрорептиков производных бензамида. LAP LAMBERT. Academic Publishing GmbH & Co., 2012; 110 с.
- Калёкин Р. А., Саломатин Е. М., Калёкина В. А., Волкова А. А. Лабораторная диагностика отравлений нейрорептиками производными бензамида в наркологии: возможности и проблемы. Наркология. 2008; 7 (4–76): 33–37.
- Калёкин Р. А., Саломатин Е. М., Калёкина В. А., Волкова А. А. Проблемы и ошибки в судебно-химических исследованиях на наркотические и психотропные вещества. В сборнике: В. В. Колкутин, редактор. О проблемных вопросах в организации производства судебно-медицинских экспертиз. Материалы Всероссийской научно-практической конференции. 2009; с. 313–317.
- Калёкин Р. А., Саломатин Е. М., Калёкина В. А. Перспективы разработки судебно-химического и химико-токсикологического анализа нейрорептиков замещенных бензамидов. В сборнике: В. А. Клевко, редактор. Современные проблемы медико-криминалистических, судебно-химических и химико-токсикологических экспертных исследований. Сборник материалов Всесоюзной научно-практической конференции, посвященной памяти профессора Ю.М. Кубицкого. 2007; с. 212–218.
- Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Феназепам ЛП-005121-191018.
- Орлова А. М., Калёкин Р. А., Волкова А. А., Невмятова С. Р., Полушкина Н. В. Обнаружение клобазам в моче методом тонкослойной хроматографии. Вестник ВГУ, Химия. Биология. Фармация. 2021; 4: 18–24.
- Орлова А. М., Калёкин Р. А., Савчук С. А. Особенности исследования прегабалина для целей и задач судебно-химических и химико-токсикологических исследований. Судебная медицина. 2018; 4 (S1): 109.
- Порсева Н. Ю., Дворская О. Н. Правовые аспекты оборота снотворных препаратов, способных вызывать лекарственную зависимость. Современные проблемы науки и образования. 2015; 3: 242.
- Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Феназепам Р №003672/01-160609.
- Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Феназепам ЛСР-001772/09-100309.
- Орлова А. М., Калёкин Р. А., Павлова А. З. Судебно-медицинская экспертиза вещественных доказательств и возможности исследования прегабалина при судебно-химическом и судебно-токсикологическом исследовании в комбинации с другими сильнодействующими веществами. Судебно-медицинская наука и практика. Материалы научно-практической конференции молодых ученых и специалистов. (28 ноября, 2018). М.: АНО ИЦ, ЮрИнфоЗдрав, 2019; 13: 97–100.
- Калёкин Р. А., Павлова А. З., Орлова А. М., Булыгина И. Е. К вопросу установления факта отравления психотропными и сильнодействующими веществами в биологических объектах неинвазивного отбора. Актуальные вопросы судебной медицины и общей патологии. Матер. науч. прак. конф. Декабрьские чтения в РУДН (21 декабря, 2018). М., 2019; с. 80–84.
- Калёкин Р. А., Саломатин Е. М., Калёкина В. А., Волкова А. А. Дифференциация нейрорептиков группы производных бензамидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В сборнике: Материалы Всероссийского совещания судебно-медицинских экспертов по применению правил и медицинских критериев определения степени тяжести вреда, причиненного здоровью человека. 2008; с. 226–8.
- Heifer AG, Michely JA, Weber AA, Meyer MR, Maurer HH. Liquid chromatography-high resolution-tandem mass spectrometry using Orbitrap technology for comprehensive screening to detect drugs and their metabolites in blood plasma. Analytica Chimica Acta. 2017; 965: 83–95. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.03.002>.
- Heifer AG, Michely JA, Weber AA, Meyer MR, Maurer HH. Orbitrap technology for comprehensive metabolite-based liquid chromatographic-high resolution-tandem mass spectrometric urine drug screening — exemplified for cardiovascular drugs. Analytica Chimica Acta. 2015; 891: 221–33.
- Барсегян С. С., Саломатин Е. М., Плетенева Т. В., Максимова Т. В., Долинкин А. О. В сборнике: Р. А. Калёкин, редактор.

Методические рекомендации по валидации аналитических методик, используемых в судебно-химическом и химико-

токсикологическом анализе биологического материала. Методические рекомендации. М.: РЦСМЭ, 2014.

References

1. Dorofeeva OA. Kliniko-farmakologicheskie zakonomernosti terapevticheskogo dejstviya raznykh lekarstvennykh form fenazepam u bol'nykh s trevozhnymi rasstrojstvami. Avtoreferat dissertacii na soiskanie uchenoj stepeni kandidata medicinskix nauk. Moskva, 2009; 24 s. Russian.
2. Kalekin RA. Sudebno-medicinskaya (ximicheskaya) ocenka nejroleptikov. Sudebno-ximicheskoe issledovanie i toksikologicheskaya xarakteristika nejroleptikov proizvodnykh benzamida. LAP LAMBERT. Academic Publishing GmbH & Co., 2012; 110 s. Russian.
3. Kalekin RA, Salomatin EM, Kalekina VA, Volkova AA. Laboratornaya diagnostika otravlenij nejroleptikami proizvodnymi benzamida v narkologii: vozmozhnosti i problemy. Narkologiya. 2008; 7 (4–7): 33–37. Russian.
4. Kalekin RA, Salomatin EM, Kalekina VA, Volkova AA. Problemy i oshibki v sudebno-ximicheskix issledovaniyax na narkoticheskie i psixotropnye veshhestva. V sbornike: V. V. Kolkutin, redaktor. O problemnykh voprosax v organizacii proizvodstva sudebno-medicinskix ehkspertiz. Materialy Vserossijskoj nauchno-prakticheskoy konferencii. 2009; s. 313–317. Russian.
5. Kalekin RA, Salomatin EM, Kalekina VA. Perspektivy razrabotki sudebno-ximicheskogo i ximiko-toksikologicheskogo analiza nejroleptikov zameshchennykh benzamidov. V sbornike: V. A. Klevno, redaktor. Sovremennye problemy mediko-kriminalisticheskix, sudebno-ximicheskix i ximiko-toksikologicheskix ehkspertnyx issledovaniy. Sbornik materialov Vsesoyuznoj nauchno-prakticheskoy konferencii, posvyashhennoj pamyati professora Yu.M. Kubickogo. 2007; s. 212–218. Russian.
6. Instrukciya po medicinskomu primeneniyu lekarstvennogo preparata Fenazepam LP-005121-191018. Russian.
7. Orlova AM, Kalekin RA, Volkova AA, Nevmyatova SR, Polushkina NV. Obnaruzhenie klobazama v moche metodom tonkoslojnoj xromatografii. Vestnik VGU, Ximiya. Biologiya. Farmaciya. 2021; 4: 18–24. Russian.
8. Orlova AM, Kalekin RA, Savchuk SA. Osobennosti issledovaniya pregabalina dlya celej i zadach sudebno-ximicheskix i ximiko-toksikologicheskix issledovaniy. Sudebnaya medicina. 2018; 4 (S1): 109. Russian.
9. Porseva NYu, Dvorskaya ON. Pravovye aspekty oborota snotvornyx preparatov, sposobnyx vyzvat' lekarstvennuyu zavisimost'. Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. 2015; 3: 242. Russian.
10. Instrukciya po medicinskomu primeneniyu lekarstvennogo preparata Fenazepam R #003672/01-160609. Russian.
11. Instrukciya po medicinskomu primeneniyu lekarstvennogo preparata Fenazepam LSR-001772/09-100309. Russian.
12. Orlova AM, Kalekin RA, Pavlova AZ. Sudebno-medicinskaya ehkspertiza veshhestvennykh dokazatel'stv i vozmozhnosti issledovaniya pregabalina pri sudebno-ximicheskome i sudebno-toksikologicheskom issledovanii v kombinacii s drugimi sil'nodejstvuyushimi veshhestvami. Sudebno-medicinskaya nauka i praktika. Materialy nauchno-prakticheskoy konferencii molodyx uchenyx i specialistov. (28 noyabrya, 2018). M.: ANO IC, YurInfoZdrav, 2019; 13: 97–100. Russian.
13. Kalekin RA, Pavlova AZ, Orlova AM, Bulygina IE. K voprosu ustanovleniya fakta otravleniya psixotropnymi i sil'nodejstvuyushimi veshhestvami v biologicheskix ob'ektax ne invazivnogo otbora. Aktual'nye voprosy sudebnoj mediciny i obshhej patologii. Mater. nauch. prak. konf. Dekabr'skie chteniya v RUDN (21 dekabrya, 2018). M., 2019; s. 80–84. Russian.
14. Kalekin RA, Salomatin EM, Kalekina VA, Volkova AA. Differenciatsiya nejroleptikov grupy proizvodnykh benzamidov metodom vysokoehfektivnoj zhidkostnoj xromatografii (VEhZhX). V sbornike: Materialy Vserossijskogo soveshaniya sudebno-medicinskix ehkspertov po primeneniyu pravil i medicinskix kriteriev opredeleniya stepeni tyazhesti vreda, prichinennogo zdorov'yu cheloveka. 2008; s. 226–8. Russian.
15. Helfer AG, Michely JA, Weber AA, Meyer MR, Maurer HH. Liquid chromatography-high resolution-tandem mass spectrometry using Orbitrap technology for comprehensive screening to detect drugs and their metabolites in blood plasma. Analytica Chimica Acta. 2017; 965: 83–95. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.03.002>.
16. Helfer AG, Michely JA, Weber AA, Meyer MR, Maurer HH. Orbitrap technology for comprehensive metabolite-based liquid chromatographic-high resolution-tandem mass spectrometric urine drug screening — exemplified for cardiovascular drugs. Analytica Chimica Acta. 2015; 891: 221–33.
17. Barsegyan SS, Salomatin EM, Pleteneva TV, Maksimova TV, Dolinkin AO. V sbornike: R. A. Kalyokin, redaktor. Metodicheskie rekomendacii po validacii analiticheskix metodik, ispol'zuemyx v sudebno-ximicheskome i ximiko-toksikologicheskom analize biologicheskogo materiala. Metodicheskie rekomendacii. M.: RCSMEH, 2014. Russian.

ИНФИЦИРОВАННОСТЬ ВИРУСАМИ ГЕПАТИТОВ В, С И ТТВ ВЫСОКОКВАЛИФИЦИРОВАННЫХ СПОРТСМЕНОВ

Л. И. Мельникова¹✉, Т. В. Кожанова², Л. Ю. Ильченко^{2,3}, И. А. Морозов², Н. В. Соболева², Nguyen Thi-Hanh³, И. В. Круглова⁴, И. В. Гордейчук²

¹ Клиническая больница № 85 Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М. П. Чумакова, Москва, Россия

³ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

⁴ Федеральный научно-клинический центр спортивной медицины и реабилитации Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Медико-биологическое сопровождение направлено на обеспечение подготовки спортсменов в различные периоды тренировочно-соревновательного процесса, отказ от допуска к нему из-за отклонений в состоянии здоровья вследствие инфицирования вирусами гепатитов является достаточно трудной задачей. Целью исследования было оценить частоту выявления маркеров инфицирования вирусами гепатитов В, С и ТТВ у высококвалифицированных спортсменов. В многоцентровом открытом одномоментном клиническом исследовании у 240 мужчин и 144 женщин в возрасте 14–49 лет (спортсменов игровых, сложнокоординационных, технических и других видов спорта). Получено 384 образца сыворотки крови. Все спортсмены заполняли анкету, включавшую демографические данные, характеристику вида спорта, сведения о факторах риска инфицирования, информацию о наличии перенесенного острого вирусного гепатита и вакцинопрофилактике. В сыворотке крови методом иммуноферментного анализа определяли маркеры инфицирования вирусами гепатитов В, С и ТТВ. У двух из обследуемых спортсменов выявлен HBsAg. В 7% (27/384) образцов обнаружены anti-HBcore (суррогатный маркер латентной HBV-инфекции), у 1% (4/384) спортсменов — суммарные антитела к вирусу гепатита С (anti-HCV). Anti-HCV был выявлен в сочетании с anti-HBcore у одной спортсменки (возраст — 14 лет, занимается теннисом). В образцах сывороток крови 89,1%, 83,1%, 85,4% спортсменов обнаружены DNA TTV, TTMDV и TTMV соответственно. Установлена высокая частота обнаружения маркеров вирусов гепатитов.

Ключевые слова: высококвалифицированные спортсмены, маркеры вирусов, гепатит В, гепатит С, гепатит ТТВ

Вклад авторов: Л. И. Мельникова, И. В. Круглова — сбор материала, анализ полученных данных; Т. В. Кожанова — определение маркеров инфицирования вирусов гепатитов, написание текста; Л. Ю. Ильченко — разработка дизайна исследования, анализ полученных данных; И. А. Морозов — дизайн исследования, редактирование текста; Н. В. Соболева — определение маркеров инфицирования вирусов гепатитов, статистическая обработка; Nguyen Thi-Hanh — обзор литературы; И. В. Гордейчук — редактирование и утверждение финального варианта статьи.

Соблюдение этических стандартов: этическим комитетом КБ № 85 ФМБА России (протокол № 157 от 19 сентября 2018 г.). Все участники подписали информированное согласие на взятие образца крови, определение маркеров вирусов гепатитов и публикацию полученных результатов.

✉ **Для корреспонденции:** Любовь Ивановна Мельникова
Каширское шоссе, 13, г. Москва, 115230, Россия; mel165@mail.ru

Статья получена: 16.02.2022 **Статья принята к печати:** 05.03.2022 **Опубликована онлайн:** 22.03.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.005

HEPATITIS B, C AND TTV VIRUS INFECTION IN HIGHLY TRAINED ATHLETES

Melnikova LI¹✉, Kozhanova TV², Ilchenko LY^{2,3}, Morozov IA², Soboleva NV², Nguyen Thi-Hanh³, Kruglova IV⁴, Gordeychuk IV²

¹ Clinical Hospital № 85 of Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russia

² Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Moscow, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

⁴ Federal Scientific and Clinical Center for Sports Medicine and Rehabilitation of Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russia

Biomedical support is aimed at provision of the athletes' training at various stages of the training and competition process. Withholding of access to this process due to health problems resulting from hepatitis virus infection is a demanding task. The study was aimed to assess the detection rate of the hepatitis B virus, hepatitis C virus and TT virus infection markers in highly trained athletes. A total of 384 blood serum samples were collected from 240 males and 144 females aged 14–49 (athletes engaged in playing sports, precision sports, technical sports, etc.) within the framework of the multicenter open-label cross-sectional clinical trial. All athletes answered a questionnaire, which included demographic information, characteristics of sports, information about the infection risk factors, information about the fact of past acute viral hepatitis and vaccination. Markers of infection with hepatitis B virus, hepatitis C virus and TTV were identified in blood serum by enzyme immunoassay. HbsAg was detected in two surveyed athletes. Anti-HBcore (surrogate marker of latent HBV infection) was detected in 7% of samples (27/384); 1% of athletes (4/384) had a positive hepatitis C virus total antibody test (anti-HCV). Anti-HCV in combination with anti-HBcore was detected in one female athlete (14 years of age, tennis player). DNA of TTV, TTMDV and TTMV was detected in blood serum samples of 89.1%, 83.1% and 85.4% of athletes, respectively. High detection rate of the hepatitis virus markers was observed.

Keywords: highly trained athletes, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis TTV, virus markers

Author contribution: Melnikova LI, Kruglova IV — collection of material, data analysis; Kozhanova TV — identification of markers of hepatitis virus infection, manuscript writing; Ilchenko LY — research design development, data analysis; Morozov IA — research design, manuscript editing; Soboleva NV — identification of the hepatitis virus infection markers, statistical data processing; Nguyen Thi-Hanh — literature analysis; Gordeychuk IV — manuscript editing, approval of the final version of the article.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Clinical Hospital No. 85 of FMBA of Russia (protocol № 157 dated September 19, 2018). All subjects submitted the informed consent to blood sampling, identification of the hepatitis virus infection markers, and publication of results.

✉ **Correspondence should be addressed:** Lubov I. Melnikova
Kashirskoe shosse, 13G, Moscow, 115230, Russia; mel165@mail.ru

Received: 16.02.2022 **Accepted:** 05.03.2022 **Published online:** 22.03.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.005

Спорт — одна из составляющих физической культуры, а спорт высших достижений — деятельность, направленная на получение высоких спортивных результатов, требующая мобилизации эмоционального состояния и всех функциональных возможностей организма.

Достижение высоких спортивных результатов основано на научно-методическом обеспечении системы подготовки спортсменов в различные периоды тренировочно-соревновательного процесса. Медико-биологическое сопровождение — это обследование соревновательной деятельности спортсменов, а также этапные комплексные, текущие и углубленные медицинские обследования (УМО), которые проводят по специально разработанным программам на базе медицинских учреждений [1, 2].

Вирусный гепатит — диффузное воспалительное заболевание печени, вызванное гепатотропными вирусами; оно имеет разные пути передачи и особенности эпидемиологии [3].

За последние 30 лет было идентифицировано по крайней мере пять различных вирусов гепатита: А (HAV), В (HBV), дельта или D (HDV), С (HCV) и Е (HEV) [3]. Появляются данные, что существуют другие гепатотропные вирусы, способные играть роль в патогенезе как острого, так и хронического заболевания печени (ХЗП). Так, из клинических образцов, полученных от пациентов с острым или хроническим гепатитом (ХГ), были выделены вирус гепатита G (*Pegivirus*), вирус ТТ и вирус SEN [4]; однако вирусологические и эпидемиологические исследования не позволили окончательно определить их значение в патогенезе заболевания [3, 4].

Среди этиологических факторов, приводящих к развитию заболеваний печени, наибольшее значение по-прежнему принадлежит вирусам гепатитов В и С. Так, показатель заболеваемости на 100 тыс. населения острым гепатитом В (ОГВ) в 2020 г. составил 0,35; хроническим гепатитом В (ХГВ) — 4,4; острым гепатитом С (ОГС) — 0,66; хроническим гепатитом С (ХГС) — 16,7 [5]. Инфекции, вызванные вирусом гепатита дельта и *Torque teno virus* (ТТВ), в нашей стране официально не регистрируют.

Принимая во внимание распространенность вирусных гепатитов в мире, можно утверждать, что спортсмены так же подвержены риску инфицирования. Они могут быть инфицированы непосредственно на сборах, а также и в период отдыха. Спортсмены могут заразиться вирусным гепатитом в результате деятельности, не связанной со спортом. Однако риск передачи вируса во время некоторых видов спорта действительно существует. Кроме того, занимающиеся командными видами спорта, имеют длительный тесный контакт с членами команды, а совместный прием еды и напитков может увеличить вероятность распространения вирусных гепатитов с пероральным механизмом передачи [6]. Фактическая распространенность вирусных гепатитов среди спортсменов не известна [6, 7].

В связи с этим возникают вопросы относительно безопасности занятий спортом и участия спортсменов в соревнованиях после установления диагноза острого или хронического вирусного гепатита. Спортивные врачи должны выносить решение относительно сроков допуска спортсмена к тренировочному процессу и соревнованиям, а также понимать риск передачи вирусов во время занятий спортом и иметь возможность консультировать спортсменов по этому поводу. Наконец, те, кто занимается охраной здоровья спортсменов, должны быть знакомы со стратегиями профилактики вирусных гепатитов [8].

Для спортсменов заражение вирусами HBV и HCV гораздо чаще происходит во время занятий, не связанных со спортом. Это незащищенные сексуальные контакты; введение инъекционных препаратов, включая психоактивные вещества и анаболические стероиды; совместное использование личных вещей (например, бритв, зубных щеток, щипчиков для ногтей). Случаи передачи инфекции были зарегистрированы также при нанесении татуировок, при пирсинге, боди-арте [9].

Кроме того, медицинские работники должны учитывать риск горизонтальной передачи HBV и HCV у спортсменов [10]. В течение занятий спортом инфицированная кровь может загрязнять кожу или слизистые оболочки других членов команды или контактировавших с ними лиц [10].

Целью исследования было оценить частоту выявления маркеров инфицирования HBV, HCV и ТТ у высококвалифицированных спортсменов.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В Центре диагностики и лечения хронических вирусных гепатитов на базе поликлиники № 5 ФГБУЗ КБ № 85 ФМБА России и ФГБУ ФНКЦСМ ФМБА России проведено многоцентровое открытое одномоментное клиническое исследование.

В период прохождения углубленного медицинского обследования у 384 спортсменов произвели забор крови. Критерии включения: высокая квалификация; возраст 14–49 лет; наличие информированного согласия на взятие образца крови, определение маркеров вирусов гепатитов и публикацию полученных результатов.

Все спортсмены заполнили анкету, разработанную авторами исследования (табл. 1).

В образцах крови были проведены определение маркеров вирусов гепатитов. Серологические маркеры инфицирования HBV и HCV (поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg), антитела к ядерному антигену вируса гепатита В (anti-HBcore), антитела вируса гепатита С (anti-HCV)) выявляли методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем в соответствии с инструкцией производителя: «ДС-ИФА-HBsAg-0,01»; «ДС-ИФА-HBsAg-0,01-подтверждающая»; «ДС-ИФА-HBc»; «ДС-ИФА-HCV», «ДС-ИФА-АНТИ-HCV-СПЕКТР-GM» («Диагностические системы»; Россия).

Во всех образцах сывороток крови определяли дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) вирусов семейства *Anelloviridae* в полимеразной цепной реакции (ПЦР). Выделение нуклеиновых кислот из образцов сыворотки крови проводили с помощью набора реагентов «Набор для выделения дезоксирибонуклеиновой кислоты/рибонуклеиновой кислоты (ДНК/РНК) из сыворотки или плазмы на магнитных частицах MP@SiO₂» («Силекс»; Россия) по протоколу производителя.

Для выявления ДНК вирусов семейства *Anelloviridae* образцы сыворотки крови были проанализированы в ПЦР с вложенными праймерами [4], позволяющими дифференцировать ТТВ, *Torque teno midi virus* (TTMDV) и *Torque teno mini virus* (TTMV) на основании величины амплифицированного фрагмента. Размеры продуктов амплификации составляли 112–117 нт — для ТТВ, 88 нт — для TTMDV и 70–72 нт — для TTMV. Полученный продукт величиной 207 пар нуклеотидов (п. н.) определяли методом электрофореза в 2%-м агарозном геле в ТВЕ-буфере (Трис-борат-ЭДТА).

Таблица 1. Анкета спортсмена высокой квалификации

ФИО	Заполните или подчеркните
Возраст (полных лет)	
Пол	мужчины / женщины
Место рождения	
Вид спорта	
Спортивная квалификация	
Острый вирусный гепатит в анамнезе	А, В, С, Е (когда?)
Вакцинация против ГА	Да, нет (когда?)
Вакцинация против ГВ	Да, нет (когда?)
Хирургические операции	Да, нет (когда?)
Переливания крови и кровезаменителей	Да, нет (когда?)
Стоматологическая помощь	Да, нет (когда?)
Наличие татуировок, пирсинга	Да, нет (когда?)
Иглотерапия	Да, нет (когда)
Выезд в зарубежные страны (указать какие?)	
Контакты с больными вирусными гепатитами	
Дата взятия образца крови	

Примечание: ГА — гепатит А, ГВ — гепатит В.

В ходе статистического анализа первичных данных для количественных переменных были рассчитаны основные выборочные показатели. Частоту выявленных серологических маркеров (HBsAg, anti-HBcore, anti-HCV) и ДНК вирусов семейства *Anelloviridae* вычисляли как долю от их общего количества в выборке.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выборочная совокупность спортсменов, образцы крови которых включены в исследование (384 из 384), сформирована случайным отбором и представлена спортсменами, занимающимися разными видами спорта (игровыми, сложнокоординационными, техническими и др.) (табл. 2).

Маркеры инфицирования HBV

Среди 384 образцов крови HBsAg был определен у двух лиц (мужчина, фехтование; женщина, волейбол). Частота обнаружения anti-HBcore в общей группе составила 7% (27/384). Спортсменки имеют более высокий риск встречи с HBV, чем спортсмены (18/144 и 9/240 соответственно).

При анализе анкетных данных была установлена группа лиц с отягощенным анамнезом. Среди факторов риска инфицирования у спортсменов с наличием anti-HBcore преобладали: стоматологическая помощь — у 16 (59,3%), травмы — у 8 (29,6%), хирургические операции — у 9 (33,3%), иглотерапия — у 2 (7,4%), нанесение татуировок — у 1 (3,7%). По факторам риска среди мужчин и женщин различий не выявлено. Средний возраст спортсменов с наличием anti-HBcore составил $16,1 \pm 2,5$ лет.

Anti-HBcore обнаружены в сыворотке крови у четырех спортивных гимнастов, у восьми спортсменов, занимающихся хоккеем на траве, у двух — пятиборьем и хоккеем, у двух — гольфом и плаванием и по одному положительному образцу выявлено среди спортсменов, занимающихся фристайлом, гольфом, фехтованием, большим теннисом, легкой атлетикой, универсальным боем и стрельбой пулевой.

Лишь 11,7% (45/384) спортсменов, согласно анкетным данным, была проведена вакцинация (три дозы) против ГВ.

Однако у одного из них выявляли маркеры HBV-инфекции (anti-HBscore) (женщина, спортивная гимнастика.) Оценка протективного уровня суммарных антител к поверхностному антигену вируса гепатита В (anti-HBs) у спортсменов на данном этапе исследования завершена не полностью.

У пациентов, положительных по HBsAg, выявлены HBV-ДНК, уровень виремии более 2000 МЕ/мл, повышение активности аланиновой аминотрансферазы до 1,5 норм от верхней границы, фиброз 1-й ст. по данным фиброэластометрии. На фоне приема энтекавира в дозе 0,5 мг/сут. через 12 недель достигнут неопределяемый уровень HBV-ДНК, терапия и наблюдение продолжены.

Маркеры инфицирования HCV

Согласно проведенному нами исследованию, только у 1% (4/384) спортсменов выявили anti-HCV. После дополнительно проведенного обследования, включавшего определение HCV-РНК, уровня виремии, оценку активности ХГС и стадии фиброза, была начата комбинированная терапия софосбувиром 400 мг/сут. в сочетании с даклатасвиром 60 мг/сут. (12 недель). На момент написания статьи наблюдение за спортсменами после завершения противовирусной терапии с достижением устойчивого вирусологического ответа составило 1,5–2 года.

Anti-HCV были обнаружены в сочетании с anti-HBcore у одной спортсменки (возраст — 14 лет), которая занималась теннисом. Биохимические показатели, характеризующие функциональное состояние печени (в частности, аминотрансферазы, билирубин), не превышали верхней границы нормы. Ультразвуковое исследование органов брюшной полости патологии не выявило. С целью исключения латентного течения вирусной инфекции проведено определение маркеров репликации — HBV-ДНК и HCV-РНК, получен отрицательный результат. Наблюдение за спортсменкой продолжено.

Маркеры инфицирования вирусами TTV, TTMDV, TTMV

Согласно проведенному исследованию, у 89,1% (342/384) спортсменов обнаружен TTV, у 83,1% (319/384) — TTMDV

Таблица 2. Характеристика спортсменов по полу и принадлежности к виду спорта

Вид спорта	Мужчины	Женщины
Теннис	15	5
Универсальный бой	8	4
Биатлон	4	4
Бобслей	9	–
Волейбол	–	3
Гребной слалом	15	1
Гольф	1	6
Дзюдо	1	2
Санний спорт	1	–
Легкая атлетика	12	10
Плавание	4	4
Прыжки	3	1
Пятиборье	–	3
Синхронное плавание	–	12
Ски-кросс	1	1
Слоупстайл	1	–
Сноуборд	1	–
Спортивная гимнастика	15	6
Стрельба пулевая	17	13
Сумо	5	10
Шорт-трек	10	6
Футбол	–	12
Триатлон	–	1
Фехтование	24	11
Фристайл	19	8
Хоккей	27	2
Хоккей на траве	47	18
Шахматы	–	1
Всего	240	144

и у 85,4% (328/384) — ТТМВ (табл. 3). У 69% (265/384) спортсменов выявлена комбинация ТТВ + ТТМДВ + ТТМВ. Отклонений среди биохимических показателей выявлено не было.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В статье представлены результаты исследования 384 образцов сывороток крови, полученных от 384 высококвалифицированных спортсменов разных видов спорта. Установлена высокая частота обнаружения маркеров вирусов гепатитов: ТТВ — 89,1%, ТТМДВ — 83,1% и у ТТМВ — 85,4%, HBV — у 7%, HCV — у 1%.

Необходимо подчеркнуть, что диагностический поиск этиологии гепатита, ограниченный исследованием HBsAg, неэффективен, что позволяет пациентам, имеющим anti-HBscore, пополнять группу лиц с гепатитом неустановленной этиологии [4, 11]. Кроме того, такие пациенты с наибольшей вероятностью способны передавать инфекцию другим.

Ранее присутствие лишь стабильно выявляемых anti-HBscore рассматривали как свидетельство перенесенной инфекции с элиминацией вируса и ремиссии заболевания [2]. Однако у пациентов, положительных по anti-HBscore, уровень HBV-ДНК в сыворотке крови, как правило, минимален или определяется только в ткани печени. Сегодня наличие anti-HBscore в отсутствие HBsAg рассматривают как суррогатный маркер латентной

(скрытой) HBV-инфекции, а отсутствие определяемого уровня HBV-ДНК в сыворотке крови не является фактом, исключающим ее наличия.

Так, для окончательного суждения о статусе спортсменов с наличием HBsAg проводят определение более полного спектра серологических маркеров HBV (anti-HBs, anti-HBe), повторное исследование HBsAg, HBV-ДНК и фиброэластометрию с целью выявления и/или оценки стадии фиброза печени.

Помимо HBV-инфекции сохраняется высокая актуальность гепатита С (ГС) как одной из важнейших медико-социальных проблем здравоохранения во многих странах мира, в том числе и в Российской Федерации, что обусловлено значимым социально-экономическим ущербом, повсеместным распространением, тяжестью течения и активным вовлечением в эпидемический процесс лиц репродуктивного и трудоспособного возраста [12].

Согласно оценкам Всемирной организации здравоохранения, число инфицированных HCV в мире достигает 71 млн человек [3]. Однако показатели регистрируемой заболеваемости острым и хроническим ГС не полностью отражают масштабы инфицирования популяции. ГС может протекать бессимптомно на протяжении десятилетий.

В нашем исследовании частота наиболее часто определяемого маркера ГС — anti-HCV — среди спортсменов (1%) не превышает условный средний

Таблица 3. Маркеры инфицирования вирусами гепатитов среди спортсменов

Маркеры инфицирования	Мужчины, n (%)	Женщины, n (%)
anti-HBcore IgG Из них: anti-HBcore IgG + TTV anti-HBcore IgG + anti-HCV	9/240 (3,8%) 9/9 (100%) 0/9 (0%)	18/144 (12,5%) 14/18 (77%) 1/18 (5,5%)
mono anti-HCV	3/240 (0,8%)	1/144 (1,44%)
mono TTV	214/240 (89,2%)	128/144 (88,9%)
mono TTMDV	199/240 (82,9%)	120/144 (83,3%)
mono TTMV	206/240 (85,8%)	122/144 (84,7%)
TTV+ TTMDV	184/240 (76,7%)	109/144 (75,7%)
TTMDV + TTMV	178/240 (74,2%)	106/144 (73,6%)
TTV + TTMDV + TTMV	168/240 (70%)	97/144 (67,4%)

показатель частоты выявления этих антител (3,5%) в странах Восточной Европы [3] и, следовательно, позволяет предполагать о невысокой распространенности ГС в стране. Однако коинфекция HCV с другими гепатотропными и негепатотропными вирусами может стать наиболее значимой причиной появления скрытых форм хронического гепатита [4].

С 1997 г. в течение десяти последующих лет японскими вирусологами Н. Okamoto, Т. Nishizawa, М. Ninomiya и др. были открыты вирусы с геном в виде кольцевой одноцепочечной молекулы ДНК [13, 14]. Лишь в 2009 г. они были зарегистрированы в качестве нового семейства *Anelloviridae*. Уже тогда было известно о чрезвычайно высокой распространенности вирусов, которая приближается к 100% не только у человека, но и у шимпанзе и африканских мартышек. Такая распространенность вирусов семейства *Anelloviridae* обусловлена свойствами как парентерально передаваемых, так и энтеральных вирусов. Считается, что заражение ими происходит бессимптомно. Эти вирусы представлены множеством родов и генотипов (в частности, TTV (*genus Alphatorquevirus*) — 29 генотипами, TTMV (*genus Betatorquevirus*) — 12, TTMDV (*genus Gammatorquevirus*) — 15) [15]. В организме человека могут сосуществовать несколько вирусов. Они могут вызывать поражение различных органов и систем, но не все из них имеют отношение к патологии печени.

В течение последних 10 лет исследователями была установлена не только чрезвычайно высокая распространенность этих вирусов среди населения во многих странах мира, но подтверждена гепатотропность и гепатопатогенность некоторых генотипов [15, 16].

Описан характер хронической патологии печени, вызываемой вирусами этой группы, получены электронно-микроскопические изображения TTV, TTMDV, TTMV [17]. В то же время некоторые исследователи до настоящего времени убеждены в отсутствии патогенности семейства *Anelloviridae* для человека, полагая, что их существование в организме — результат длительного (многовекового) периода коэволюции вируса и хозяина.

К сожалению, в англоязычной медицинской литературе отсутствуют данные об инфицированности спортсменов, что не позволяет провести анализ и сопоставление полученных результатов с аналогичными зарубежными исследованиями.

Анализ анкетных данных обследованных спортсменов высоких достижений, в образцах сывороток которых выявили анти-HBcore, анти-HCV и TTV/TTMD/TTMV,

показал, что ранее они не были осведомлены о своем положительном статусе.

Все вышеизложенное свидетельствует о необходимости исследования у спортсменов более широкого спектра маркеров инфицирования вирусами, не ограничиваясь лишь определением HBsAg и anti-HCV. Важным аспектом изучения является коинфекция различными гепатотропными и негепатотропными вирусами, их взаимовлияние, а также роль в развитии и прогрессировании хронических заболеваний печени.

Выводы

Спортсмены подвержены инфицированию такими же вирусными агентами, что и другие представители популяции людей, в том числе вирусами гепатитов [18]. Риск передачи инфекции, вызываемой HBV и HCV, действительно существует, но распространенность их не настолько высока. При развитии у спортсмена ОБГ нет необходимости в длительном ограничении физической активности. Спортсмены с диагнозом острый гепатит находятся под соответствующим медицинским наблюдением, цель которого — не допустить прогрессирования и хронизации патологического процесса в печени. Если все-таки хронический гепатит развивается, современные эффективные терапевтические подходы позволяют полностью элиминировать HCV или достичь клинического выздоровления в случаях хронической HBV-инфекции. Так как распространенность среди населения вирусных гепатитов высока, при отборе детей в спортивные секции и школы необходимо проводить определение маркеров HBsAg, anti-HBcore, anti-HCV, а также располагать информацией о вакцинопрофилактике против ГА и ГВ. Отказ от допуска к тренировочно-соревновательному процессу из-за отклонений в состоянии здоровья в связи с инфицированием вирусами гепатитов является достаточно трудной задачей, решение которой нередко вызывает негативную реакцию со стороны заинтересованной федерации, родственников и лиц, затративших на подготовку спортсмена высоких достижений огромные моральные и материальные ресурсы. Вакцинопрофилактика против вирусных гепатитов сегодня представляется современной стратегией, предупреждающей инфицирование и развитие острых вирусных гепатитов. Ее проведение должно стать частью целенаправленной подготовки спортсменов к достижению высших спортивных результатов.

Литература

1. Самойлов А. С., Разинкин С. М., Петрова В. В. Проведение этапного медицинского обследования спортсменов циклических видов спорта на базе специализированного центра спортивной медицины. М.: ФМБА России, 2018; 65 с.
2. Meeusen R, Duclos M, Foster C, et al. Prevention, Diagnosis, and Treatment of the Overtraining Syndrome: Joint Consensus Statement of the European College of Sport Science and the American College of Sports Medicine. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2013; 45 (1): 186–205. DOI: 10.1249/MSS.0b013e318279a10a.
3. Lanini S, Ustianowski A, Pisapia R, et al. Viral Hepatitis: Etiology, Epidemiology, Transmission, Diagnostics, Treatment, and Prevention. *Infect Dis Clin North Am*. 2019; 33 (4): 1045–62. DOI: 10.1016/j.idc.2019.08.004.
4. Ninomiya M, Nishizawa T, Takahashi M, et al. Identification and genomic characterization of a novel human torque teno virus of 3.2 kb. *J Gen Virol*. 2007; 88 (7): 1939–44. DOI: 10.1099/vir.0.82895-0.
5. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2021; 256 с.
6. Harrington DW. Viral hepatitis and exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2000; 32: 422–30.
7. Мельникова Л. И., Ильченко Л. Ю., Зубков Ю. П., Круглова И. В., Самойлов А. С., Гордейчук И. В. и др. Современная лабораторная диагностика, противовирусная терапия и профилактика хронических гепатитов В, С, D у спортсменов. Москва, 2013; 70 с.
8. Bruckner P, Khan K: Common sports-related infections. In *Clinical Sports Medicine*, edn 2. Edited by Bruckner P, Khan K. Sydney: The McGraw-Hill Companies. 2000: 779–86.
9. Haley RW, Fischer RP: Commercial tattooing as a potentially important source of hepatitis C infection: clinical epidemiology of 626 consecutive patients unaware of their hepatitis C serological status. *Medicine*. 2001; 80: 134–51.
10. Tobe K, Matsuura K, Ogura T, et al.: Horizontal transmission of hepatitis B among players of an American football team. *Arch Intern Med*. 2000; 160: 2541–5.
11. Морозов И. А., Ильченко Л. Ю., Федоров И. Г. и др. Скрытый гепатит В: клиническое значение и проблемы диагностики. *Архивъ внутренней медицины*. 2012; 4 (6): 39–45.
12. HEPAHEALTH. Project Report. Risk Factors and the Burden of Liver Disease in Europe and Selected Central Asian Countries. [Electronic resource]. Available from: www.easl.eu (date of the application: 25.11.2021).
13. Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A Novel DNA Virus (TTV) Associated With Elevated Transaminase Levels in Posttransfusion Hepatitis of Unknown Etiology. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 241 (1): 92–7. DOI: 10.1006/bbrc.1997.7765.
14. Virus Taxonomy: 2018b Release. Available from: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy> (date of the application: 25.11.2021).
15. Al-Qahtani AA, Alabsi ES, Abu Odeh R, et al. Prevalence of anelloviruses (TTV, TTMDV, and TTMV) in healthy blood donors and in patients infected with HBV or HCV in Qatar. *J Virology*. 2016; 13 (1): 208–13. DOI: 10.1186/s12985-016-0664-6.
16. Itoh Y, Takahashi M, Fukuda M, et al. Visualization of TT virus particles recovered from the sera and feces of infected humans. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 279 (2): 718–24. DOI: 10.1006/bbrc.2000.4013.
17. Морозов И. А., Зверкова Е. А., Кюрегян К. К. и др. Вирусы рода *Anelloviridae* при хронической патологии печени. *Экспериментальная клиническая гастроэнтерология*. 2015; 7 (119): 4–11.
18. Ильченко Л. Ю., Морозов И. А., Кожанова Т. В. и др. Выявляемость маркеров инфицирования вирусами гепатитов у высококвалифицированных спортсменов. *Архивъ внутренней медицины*. 2020; 4: 305–13. DOI: 10.20514/2226-6704-2020-10-4-305-313.

References

1. Samojlov AS, Razinkin SM, Petrova VV. Provedenie jetapnogo medicinskogo obsledovaniya sportsmenov ciklicheskih vidov sporta na baze specializirovannogo centra sportivnoj mediciny. M.: FMBA Rossii, 2018; 65 s. Russian.
2. Meeusen R, Duclos M, Foster C, et al. Prevention, Diagnosis, and Treatment of the Overtraining Syndrome: Joint Consensus Statement of the European College of Sport Science and the American College of Sports Medicine. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2013; 45 (1): 186–205. DOI: 10.1249/MSS.0b013e318279a10a.
3. Lanini S, Ustianowski A, Pisapia R, et al. Viral Hepatitis: Etiology, Epidemiology, Transmission, Diagnostics, Treatment, and Prevention. *Infect Dis Clin North Am*. 2019; 33 (4): 1045–62. DOI: 10.1016/j.idc.2019.08.004.
4. Ninomiya M, Nishizawa T, Takahashi M, et al. Identification and genomic characterization of a novel human torque teno virus of 3.2 kb. *J Gen Virol*. 2007; 88 (7): 1939–44. DOI: 10.1099/vir.0.82895-0.
5. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2021; 256 с. Russian.
6. Harrington DW. Viral hepatitis and exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2000; 32: 422–30.
7. Melnikova LI, Ilchenko LYU, Zubkov YUP, Kruglova IV, Samojlov AS., Gordejchuk I. V. i dr. Sovremennaja laboratornaja diagnostika, protivovirusnaja terapija i profilaktika hronicheskikh gepatitov V, S, D u sportsmenov. Moskva, 2013; 70 s. Russian.
8. Bruckner P, Khan K: Common sports-related infections. In *Clinical Sports Medicine*, edn 2. Edited by Bruckner P, Khan K. Sydney: The McGraw-Hill Companies. 2000: 779–86.
9. Haley RW, Fischer RP: Commercial tattooing as a potentially important source of hepatitis C infection: clinical epidemiology of 626 consecutive patients unaware of their hepatitis C serological status. *Medicine*. 2001; 80: 134–51.
10. Tobe K, Matsuura K, Ogura T, et al.: Horizontal transmission of hepatitis B among players of an American football team. *Arch Intern Med*. 2000; 160: 2541–5.
11. Morozov IA, Il'chenko LJ, Fedorov IG. i dr. Skrytyj gepatit V: klinicheskoe znachenie i problemy diagnostiki. Arhiv' vnutrennej mediciny. 2012; 4 (6): 39–45. Russian.
12. HEPAHEALTH. Project Report. Risk Factors and the Burden of Liver Disease in Europe and Selected Central Asian Countries. [Electronic resource]. Available from: www.easl.eu (date of the application: 25.11.2021).
13. Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A Novel DNA Virus (TTV) Associated With Elevated Transaminase Levels in Posttransfusion Hepatitis of Unknown Etiology. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 241 (1): 92–7. DOI: 10.1006/bbrc.1997.7765.
14. Virus Taxonomy: 2018b Release. Available from: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy> (date of the application: 25.11.2021).
15. Al-Qahtani AA, Alabsi ES, Abu Odeh R, et al. Prevalence of anelloviruses (TTV, TTMDV, and TTMV) in healthy blood donors and in patients infected with HBV or HCV in Qatar. *J Virology*. 2016; 13 (1): 208–13. DOI: 10.1186/s12985-016-0664-6.
16. Itoh Y, Takahashi M, Fukuda M, et al. Visualization of TT virus particles recovered from the sera and feces of infected humans. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 279 (2): 718–24. DOI: 10.1006/bbrc.2000.4013.
17. Morozov IA, Zverkova EA, Kyuregyan KK, i dr. Virusy roda *Anelloviridae* pri hronicheskoy patologii pecheni. Jeksperimental'naja klinicheskaja gastrojenterologija. 2015; 7 (119): 4–11. Russian.

18. Ilchenko LYu, Morozov IA, Kozhanova TV, i dr. Vyjavljaemost' markerov inficirovanija virusami gepatitov u vysokokvalificirovannyh

sportsmenov. Arhiv" vnutrennej mediciny. 2020; 4: 305–13. DOI: 10.20514/2226-6704-2020-10-4-305-313. Russian.

ФОКАЛЬНАЯ ЛАЗЕРНАЯ КОАГУЛЯЦИЯ ПЕРИПАПИЛЛЯРНОЙ НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ ДИСКА ЗРИТЕЛЬНОГО НЕРВА ПРИ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ

Х. П. Тахчиди, Н. Х. Тахчиди, Т. А. Касмынина, Е. П. Тебина✉

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Диабетическая ретинопатия (ДР) является одним из наиболее частых осложнений сахарного диабета и одной из ведущих причин развития слепоты в развитых странах. Золотой стандарт лечения ДР — лазерная коагуляция сетчатки. Несмотря на высокую эффективность лазерного лечения, данный метод имеет ограничения в использовании. Появление в клинической практике офтальмолога препаратов, направленных на ингибирование роста новообразованных сосудов, позволило изменить тактику лечения пациентов с неоваскуляризацией сетчатки. Однако и этот метод обладает рядом нежелательных побочных явлений. Учитывая ограничения в проведении повторных этапов лазерной коагуляции, а также рисков офтальмологических осложнений после интравитреального введения ингибиторов ангиогенеза, серьезной проблемой в лечении являются нестандартные ситуации, когда имеется отрицательный результат лечения вышеописанными технологиями на одном глазу и прогрессирование процесса на единственно зрячем другом глазу. Представленный клинический случай продемонстрировал возможность поэтапного лазерного лечения пациента с перипапиллярной неоваскуляризацией ДЗН. Результатом лечения явился регресс новообразованных сосудов с сохранением зрительных функций.

Ключевые слова: диабетическая ретинопатия, фокальная лазерная коагуляция, мультиспектральное исследование, ингибиторы ангиогенеза, перипапиллярная неоваскуляризация

Вклад авторов: Х. П. Тахчиди — концепция и дизайн исследования, редактирование текста; Н. Х. Тахчиди — анализ литературных данных; Е. П. Тебина — сбор и обработка материала, написание текста; Т. А. Касмынина — лазерное лечение пациента.

Соблюдение этических стандартов: от пациента получено добровольное информированное согласие на лазерное лечение и обработку персональных данных.

✉ **Для корреспонденции:** Екатерина Павловна Тебина
Волоколамское шоссе, д. 30, корп. 2, г. Москва, 123182, Россия; ekaterinatebina@mail.ru

Статья получена: 15.01.2022 **Статья принята к печати:** 01.03.2022 **Опубликована онлайн:** 13.03.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.004

FOCAL LASER PHOTOCOAGULATION OF THE OPTIC DISC PERIPAPILLARY NEOVASCULARIZATION IN PATIENT WITH PROLIFERATIVE DIABETIC RETINOPATHY

Takhchidi KhP, Takhchidi NKH, Kasminina TA, Tebina EP✉

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Diabetic retinopathy (DR) is one of the most common complications of diabetes mellitus and one of the major causes of blindness in the developed world. Retinal laser photocoagulation is a gold standard for the treatment of DR. Despite its high efficiency, laser therapy has a number of limitations. The emergence of drugs, designed to inhibit the growth of the newly formed blood vessels, in ophthalmic practice made it possible to change treatment strategy in patients with retinal neovascularization. However, this method also has some adverse effects. Given the limitations on the repeated sessions of laser photocoagulation and the risks of ophthalmic complications after the intravitreal injection of the angiogenesis inhibitors, extraordinary situations, when there are negative results of treatment with the use of the described above techniques in one eye and disease progression in the single eye with preserved vision, become a serious problem when performing treatment. The clinical case reported has shown the feasibility of staged laser treatment in patient with the optic disc peripapillary neovascularization. Therapy has resulted in the regression of the newly formed blood vessels and visual function preservation.

Keywords: diabetic retinopathy, focal laser photocoagulation, multispectral imaging, angiogenesis inhibitors, peripapillary neovascularization

Author contribution: Takhchidi KhP — study concept and design, manuscript editing; Takhchidi NKH — literature analysis; Tebina EP — data acquisition and processing, manuscript writing; Kasminina TA — laser therapy.

Compliance with ethical standards: the patient submitted the informed consent to laser therapy and personal data processing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina P. Tebina
Volokolamskoe shosse, 30, corp. 2, Moscow, 123182, Russia; ekaterinatebina@mail.ru

Received: 15.01.2022 **Accepted:** 01.03.2022 **Published online:** 13.03.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.004

На сегодняшний день сахарный диабет (СД) является глобальной проблемой мирового масштаба. Микрососудистые осложнения СД, такие как диабетическая ретинопатия, нефропатия, нейропатия, становятся все более важными проявлениями заболевания и смертности населения [1].

Диабетическая ретинопатия (ДР) является одним из наиболее частых осложнений СД и одной из ведущих причин слепоты в развитых странах [2]. Распространенность СД в развитых странах составляет приблизительно 3–4%, при этом доля больных увеличивается в старших возрастных группах. Согласно данным IDF (International Diabetes Federation, Международная федерация диабета) в 2017 г.

во всем мире насчитывалось 425 млн человек, страдающих СД. К 2040 г. ожидается рост данного показателя до 629 млн человек. В 2019 г. в России зарегистрировано 3 029 397 больных СД, в том числе с СД 1-го типа около 294 тыс. человек, с СД 2-го типа — 2 млн 736 тыс. человек [3, 4].

Вне зависимости от типа СД, бесспорен тот факт, что чем больше «стаж» СД, тем больше вероятность развития ДР. В течение двух первых десятилетий течения заболевания почти у всех пациентов с СД 1-го типа и более чем у 60% с СД 2-го типа диагностируют ДР. В эпидемиологическом исследовании диабетической ретинопатии (Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic

Retinopathy — WESDR) у 3,6% пациентов с дебютом СД 1-го типа в молодом возрасте и у 1,6% пациентов с развитием СД 2-го типа во взрослом возрасте была диагностирована слепота. У лиц с началом СД в молодом возрасте у 86% слепота явилась следствием ДР [5].

Пусковые механизмы развития ДР — хроническая гипергликемия, гликирование белков, окисление глюкозы за счет активизации полиолового пути, активация протеинкиназы, повышение уровня свободных радикалов, нарушение микроциркуляции в сосудах сетчатки, эндотелиальная дисфункция, гипоксия, активизация провоспалительных цитокинов сетчатки с выработкой фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), что приводит к отеку и пролиферации [6]. По данным зарубежной и отечественной литературы, оценку эффективности использования панретинальной лазерной коагуляции сетчатки при ДР проводят по степени «подавления» неоваскуляризации, регрессу макулярного отека, стабилизации или улучшения зрительных функций. Согласно перечисленным критериям, эффективность лазерного лечения варьирует от 60 до 99% [7, 8]. Несмотря на высокую эффективность лазерного лечения, использование данного метода ограничено при «высоком» диабетическом макулярном отеке [9], выраженных фиброзных витреоретинальных изменениях, лимите в проведении повторных сеансов лазерной коагуляции.

Появление в клинической практике офтальмолога препаратов, направленных на ингибирование VEGF, позволило изменить тактику лечения пациентов с неоваскуляризацией сетчатки. Данный вид лечения непосредственно направлен на основную патофизиологическую мишень в развитии ДР. Однако, несмотря на высокую эффективность использования ингибиторов ангиогенеза, в ряде клинических наблюдений были выявлены нежелательные побочные явления невоспалительного характера (развитие катаракты, повышение внутриглазного давления, окклюзия артерии сетчатки, кровоизлияние в стекловидное тело, регматогенная отслойка сетчатки) и воспалительные осложнения (стерильное интравитреальное воспаление, бролюцизумаб-ассоциированный васкулит сетчатки, инфекционный эндофтальмит) [10]. К отрицательным моментам этой методики лечения относят также краткосрочность действия препарата (в среднем до трех месяцев) и необходимость повторных инъекций со всеми вышеперечисленными рисками.

По литературным данным известно, что в различные сроки после проведения панретинальной лазерной коагуляции сетчатки нередко возникают новые очаги неоваскуляризации и пролиферации. Учитывая ограничения в проведении повторных этапов лазерной коагуляции, а также рисков возникновения офтальмологических осложнений после интравитреального введения ингибиторов ангиогенеза, серьезной проблемой в лечении оказываются нестандартные ситуации, когда имеется отрицательный результат лечения вышеописанными технологиями на одном глазу и прогрессирование процесса на единственно зрячем другом глазу. Целью работы было оценить эффективность и безопасность фокальной лазерной коагуляции перипапиллярной неоваскуляризации ДЗН при пролиферативной диабетической ретинопатии.

Описание клинического случая

В апреле 2017 г. в Научно-исследовательский центр Офтальмологии РНИМУ им. Н. И. Пирогова обратился пациент М., 30 лет, для планового осмотра глазного дна.

Из анамнеза известно, что пациент страдает сахарным диабетом 1-го типа с 9 лет; заболевания сердечно-сосудистой системы не выявлены. В 2007 г. пациенту был поставлен диагноз «пролиферативная диабетическая ретинопатия на оба глаза», в связи с чем проведена панретинальная лазерная коагуляция сетчатки. В 2008 г. в связи с наличием пролиферативных ретинальных изменений на правом глазу пациенту было проведено интравитреальное введение ингибитора ангиогенеза, осложнившееся окклюзией центральной артерии сетчатки с резкой потерей зрения.

При поступлении в Научно-исследовательский центр офтальмологии РНИМУ им. Н. И. Пирогова пациенту было проведено комплексное офтальмологическое обследование, включающее стандартные методы исследования: визометрию с определением некорригированной остроты зрения (НКОЗ), максимально корригированной остроты зрения (МКОЗ), непрямую офтальмоскопию с помощью бесконтактной линзы MaxField (Ocular Inc.; США) и специальные методы исследования: мультиспектральное исследование с использованием различных фильтров (Blue-, Green-, Infrared Reflectance, MultiColor) на приборе «Spectralis HRA+OCT» Module — OCT2 85 000 Hz («Spectralis HRA+OCT», Heidelberg Engineering, Inc.; Германия). Максимальный срок наблюдения пациента — 4 года.

Для выполнения лазерной коагуляции использовали офтальмологическую лазерную установку модели «VISULAS Trion», 532 нм (Carl Zeiss; Германия).

При первичном обследовании пациента было выявлено: острота зрения правого глаза (OD) — движение руки у лица (эксцентрично); левого глаза (OS) НКОЗ — 0,03, МКОЗ 0,7 н/к. При офтальмоскопии OS ДЗН имел бледно-розовый цвет, четкие границы; перипапиллярно преимущественно в верхне-назальном, нижне-назальном и нижне-темпоральном секторах визуализируется «кружевная сеть» новообразованных сосудов, идущих от ДЗН к периферии и «рассыпающихся» веером в указанных квадрантах перипапиллярной зоны. Ретинальные сосуды: соотношение а : в = 2 : 3, ход сосудов не изменен, паравазально по ходу нижней и верхней сосудистых аркад визуализируются пигментированные лазерные коагуляты. В макулярной зоне «целлофановый блеск», слабопигментированные лазерные коагуляты (кроме аваскулярной зоны). На средней и крайней периферии обнаружены пигментированные лазерные коагуляты, достигающие до края ДЗН на расстоянии до 1800 мкм (рис. 1А, Б).

После анализа данных анамнеза и комплексного офтальмологического обследования пациенту был поставлен диагноз: OS Проллиферативная диабетическая ретинопатия, состояние после панретинальной лазерной коагуляции сетчатки. Эпиретинальный фиброз. Перипапиллярная неоваскуляризация диска зрительного нерва.

Учитывая наличие в анамнезе пациента осложнение на правом глазу, возникшее после интравитреального введения ингибитора ангиогенеза и приведшее к потере зрения (которое исключило возможность применения анти-VEGF-препаратов), было принято решение провести нестандартное лазерное лечение, включающее поэтапную лазерную коагуляцию: в начале — коагуляцию оставшейся интактной перипапиллярной зоны сетчатки от границы старых лазерных коагулятов до зоны 500 мкм от края ДЗН, через неделю — оценку эффекта коагуляции сетчатки и

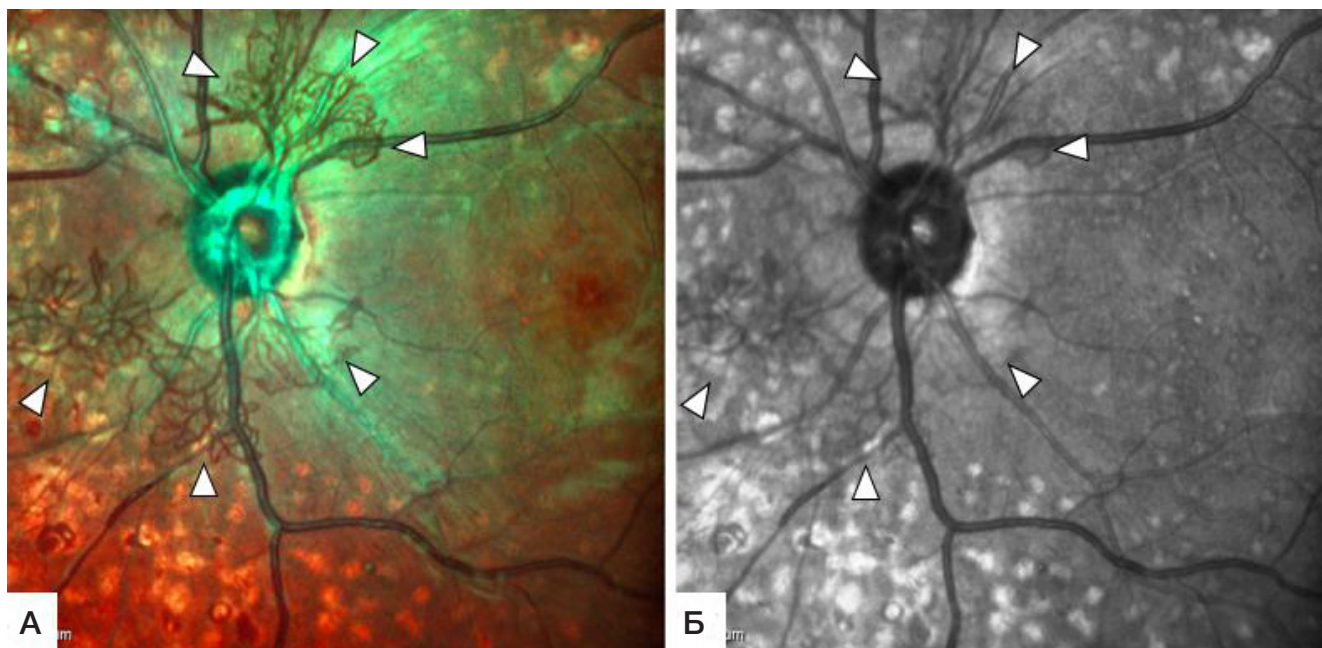


Рис. 1. До проведения лазерного лечения. **А.** Мультиспектральное сканирование; **Б.** Инфракрасное изображение: перипапиллярно преимущественно в верхне-назальном, нижне-назальном и нижне-темпоральном секторах визуализируется сеть новообразованных сосудов (белые стрелки)

показателей зрительных функций, с последующим принятием решения о необходимости проведения следующего этапа фокальной лазерной коагуляции новообразованных сосудов.

На первом этапе наносили почти круговую (за исключением зоны папилломакулярного пучка) фокальную перипапиллярную лазерную коагуляцию сетчатки в пределах от старых коагулятов и до 500 мкм от края ДЗН. Лазерные аппликации наносили в «шахматном порядке» со следующими энергетическими параметрами: длина волны — 532 нм, мощность — 60–80 мВт (до получения лазерного аппликата 1-й степени на минимально возможных параметрах), длительность импульса — 0,08–0,1 с, диаметр пятна — 100 мкм. Через неделю после

проведения первого этапа лазерной коагуляции сетчатки показатели остроты зрения остались стабильными. Результаты офтальмоскопии OS: перипапиллярно (до 500 мкм от края ДЗН) визуализируются пигментированные лазерные коагуляты, сеть «кружевных» новообразованных сосудов сохраняет активность (рис. 2А, Б).

После оценки (через неделю) состояния левого глаза и регистрации стабильности зрительных функций вторым этапом проводили фокальную лазерную коагуляцию новообразованных сосудов, преимущественно, среднего калибра со следующими энергетическими параметрами: мощность — 50–80 мВт, длительность импульса — 0,06–0,1 с, диаметр пятна — 100 мкм. Второй этап проводили пролонгированно избирательно с минимизацией

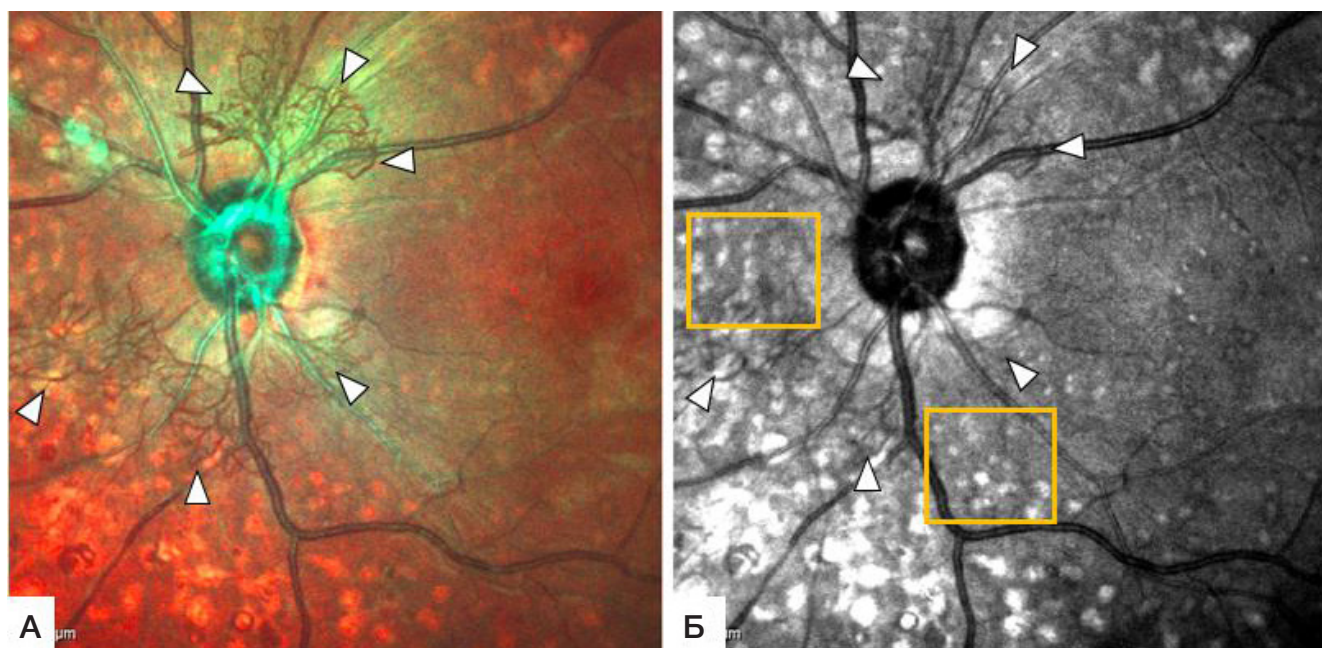


Рис. 2. Результаты через неделю после первого этапа лазерной коагуляции. **А.** Мультиспектральное сканирование: перипапиллярно сохраняется активность сети новообразованных сосудов (белые стрелки). **Б.** Инфракрасное изображение: перипапиллярно сохраняется активность сети новообразованных сосудов (белые стрелки), перипапиллярно визуализируются свежие лазерные коагуляты (желтый квадрат)

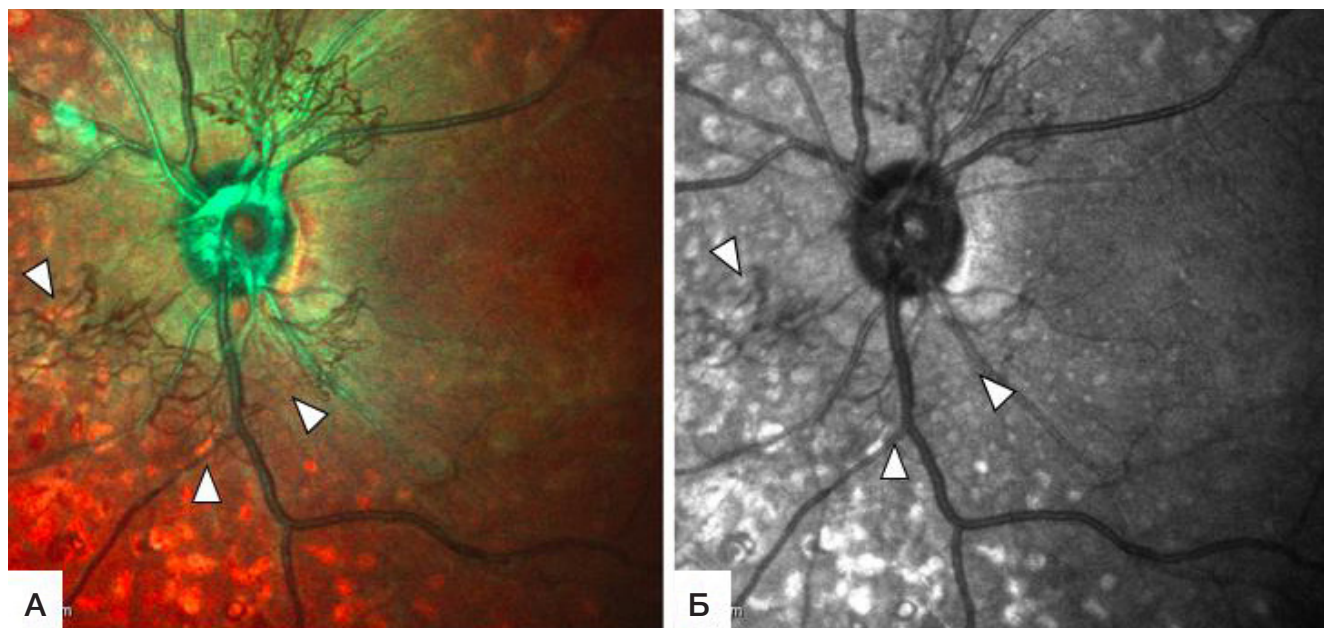


Рис. 3. Результаты через 4 месяца после второго этапа лазерной коагуляции новообразованных сосудов. **А.** Мультиспектральное сканирование. **Б.** Инфракрасное изображение: перипапиллярно визуализируется «запустевание» новообразованных сосудов (белая стрелка)

рисков кровотечения и оценкой эффективности за четыре сеанса с интервалом 3–4 недели.

На осмотре через 4 месяца после проведения второго этапа фокальной лазерной коагуляции новообразованных сосудов (четыре сеанса) показатели остроты зрения ОС оставались стабильными: НКОЗ — 0,03, МКОЗ — 0,7. При офтальмоскопии ОС перипапиллярно визуализировалось «запустевание» новообразованных сосудов (рис. 3А, Б).

На контрольном осмотре через 4 года показатели остроты зрения оставались без изменений. Результаты офтальмоскопии ОС: перипапиллярно отмечен полный регресс сети новообразованных сосудов ДЗН (рис. 4А, Б).

Обсуждение клинического случая

Диабетическая ретинопатия остается основной причиной нарушения зрения и слепоты в мире. Более одной трети из

285 млн человек в мире с сахарным диабетом имеют ДР, и одна треть из них (приблизительно 31,7 млн) страдает угрожающей зрению пролиферативной диабетической ретинопатией [11]. На сегодняшний день основными методами лечения пролиферативной диабетической ретинопатии являются: лазерная коагуляция сетчатки, интравитреальное введение ингибиторов ангиогенеза, использование кортикостероидов и витреоретинальная хирургия. В клинической практике существует возможность применения каждого из перечисленных методов лечения как в качестве монотерапии, так и в комбинированном варианте.

Представленный клинический случай продемонстрировал ресурсные возможности предложенной технологии лазерной коагуляции перипапиллярной зоны в ситуации отсутствия возможности использования ингибиторов ангиогенеза, связанного с осложнением от их применения на парном глазу, приведшим к потере зрения.

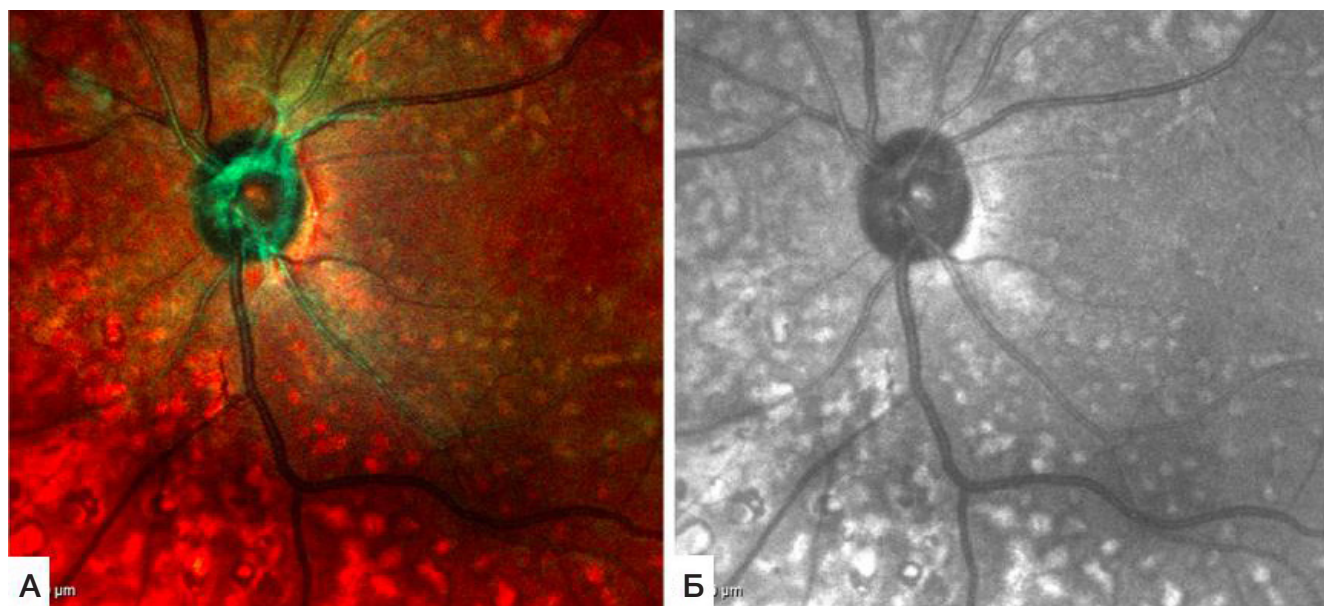


Рис. 4. Результаты через 4 года после второго этапа лазерной коагуляции новообразованных сосудов. **А.** Мультиспектральное сканирование. **Б.** Инфракрасное изображение: перипапиллярно наблюдается полный регресс сети новообразованных сосудов ДЗН

Выбор количества коагулятов, диаметра пятна и энергии лазерного воздействия на сетчатку должен быть индивидуальным для каждого пациента и ориентирован на минимально возможное энергетическое воздействие. Лазерное воздействие максимально прилежащих к ДЗН отделов сетчатки снижает «гипоксию» этих зон и как следствие активность новообразования сосудов из наиболее реактивной зоны пролиферации — диска зрительного нерва. Подготовка таким образом (на первом этапе лечения) зоны перипапиллярной сетчатки, на фоне которой развелась «кружевная сеть» новообразованных сосудов, ведет к снижению активности их кровотока, что позволяет более эффективно проводить второй этап лечения — фокальную коагуляцию новообразованных сосудов. Для минимизации рисков кровотечения начинать нужно с сосудов максимум среднего диаметра, пошагово в несколько сеансов, что позволяет предыдущим коагулятам приводить к «запустеванию» сосудов, уменьшению кровотока и соответственно снижению рисков осложнений при последующей коагуляции.

В предложенной технологии лазерного лечения нами были использованы минимально возможные энергетические параметры, которые позволили получить высокий морфофункциональный результат, заключающийся в регрессе перипапиллярной неоваскуляризации ДЗН с сохранением исходных зрительных функций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что использование предложенной фокальной лазерной коагуляции в лечении перипапиллярной неоваскуляризации ДЗН обеспечило регресс новообразованных сосудов и при этом остались неизменными исходные зрительные функции. Использование фокальной лазерной коагуляции в предложенной перипапиллярной зоне расширяет возможности в лечении неоваскуляризации ДЗН. Полученный практический результат показывает результаты расширения лазерного микрохирургического вмешательства в прилежащих зонах ДЗН с сохранением зрительных функций.

Литература

1. Stewart MW. Treatment of diabetic retinopathy: Recent advances and unresolved challenges. *World J Diabetes*. 2016; 7 (16): 333–341.
2. Klein R, Knudtson MD, Lee KE, Gangnon R, Klein BE. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy XXIII: the twenty-five-year incidence of macular edema in persons with type 1 diabetes. *Ophthalmology*. 2009; 116 (3): 497–503.
3. Сергушев С. Г., Хомякова Е. Н. Анти-VEGF препараты в терапии пациентов с диабетическим макулярным отеком. *Клиническая офтальмология*. 2019; 25 (4): 238–44.
4. Федеральный регистр сахарного диабета РФ, реализуемый ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России. Доступно по ссылке: https://www.endocrincentr.ru/sites/default/files/all/EVENTS2019/NEWS%20SUM/13.03.19%20Prof.komissia/VIK_Exp_13.03.19.pdf.
5. Смирнова О. М. Диабетическая ретинопатия. Результаты международных многоцентровых исследований. *Сахарный диабет*. 2010; 13 (1): 80–87.
6. Bosma EK, van Noorden CJF, Klaassen I, Schlingemann RO. *Diabetic Nephropathy*. Springer, 2019. DOI: 10.1007/978-3-319-93521-8_19.
7. Буряков Д. А., Качалина Г. Ф., Педанова Е. К., Крыль Л. А. Оценка безопасности повторных сеансов субпорогового микроимпульсного лазерного воздействия при лечении диабетического макулярного отека. *Современные технологии в офтальмологии*. 2015; 3: 19–21.
8. Зайка В. А., Щуко А. Г., Архипов Е. В., Букина В. В. Оценка долгосрочной эффективности панретинальной лазерной коагуляции при сахарном диабете 2-го типа. *Современные технологии в офтальмологии*. 2020; (1): 34–36.
9. Гацу М. В., Байбородов Я. В. Клинико-топографическая классификация диабетических макулопатий. *Сахарный диабет*. 2008; 11 (3): 20–22.
10. Jacob T. Cox, Dean Elliott, and Lucia Sobrin. Inflammatory Complications of Intravitreal Anti-VEGF Injections. *J Clin Med*. 2021; 10 (5): 981.
11. Yau JW, et al. Meta-Analysis for Eye Disease (META-EYE) Study Group. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2012; (35): 556–64.

References

1. Stewart MW. Treatment of diabetic retinopathy: Recent advances and unresolved challenges. *World J Diabetes*. 2016; 7 (16): 333–341.
2. Klein R, Knudtson MD, Lee KE, Gangnon R, Klein BE. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy XXIII: the twenty-five-year incidence of macular edema in persons with type 1 diabetes. *Ophthalmology*. 2009; 116 (3): 497–503.
3. Sergushev SG, Homjakova EN. Anti-VEGF preparaty v terapii pacientov s diabeticeskim makuljarnym otekom. *Klinicheskaja oftal'mologija*. 2019; 25 (4): 238–44. Russian.
4. Federal'nyj registr saharnogo diabeta RF, realizuemyy FGBU «NMIЦ jendokrinologii» Minzdrava Rossii. Dostupno po ssylke: https://www.endocrincentr.ru/sites/default/files/all/EVENTS2019/NEWS%20SUM/13.03.19%20Prof.komissia/VIK_Exp_13.03.19.pdf.
5. Smirnova OM. Diabeticeskaja retinopatija. Rezul'taty mezhdunarodnyh mnogocentrovyyh issledovanij. *Saharnyj diabet*. 2010; 13 (1): 80–87. Russian.
6. Bosma EK, van Noorden CJF, Klaassen I, Schlingemann RO. *Diabetic Nephropathy*. Springer, 2019. DOI: 10.1007/978-3-319-93521-8_19.
7. Burjakov DA, Kachalina GF, Pedanova EK, Kryl LA. Ocenka bezopasnosti povtornyh seansov subporogovogo mikroimpul'snogo lazernogo vozdeystvija pri lechenii diabeticeskogo makuljarnogo oteka. *Sovremennye tehnologii v oftal'mologii*. 2015; 3: 19–21. Russian.
8. Zajka VA, Shhuko AG, Arhipov EV, Bukina VV. Ocenka dolgosrochnoj jeffektivnosti panretinal'noj lazernoj koaguljacji pri saharnom diabete 2-go tipa. *Sovremennye tehnologii v oftal'mologii*. 2020; (1): 34–36. Russian.
9. Gacu MV, Bajborodov YaV. Kliniko-topograficheskaja klassifikacija diabeticeskikh makulopatij. *Saharnyj diabet*. 2008; 11 (3): 20–22. Russian.
10. Jacob T. Cox, Dean Elliott, and Lucia Sobrin. Inflammatory Complications of Intravitreal Anti-VEGF Injections. *J Clin Med*. 2021; 10 (5): 981.
11. Yau JW, et al. Meta-Analysis for Eye Disease (META-EYE) Study Group. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2012; (35): 556–64.