

МЕДИЦИНА ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ СИТУАЦИЙ

Том 26 № 4 / 2024

EXTREMEMEDICINE.RU



УГРОЗЫ И РИСКИ ЗДОРОВЬЮ ПРИ ЧРЕЗВЫЧАЙНЫХ СИТУАЦИЯХ: МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ, ПРОГНОЗНО-АНАЛИТИЧЕСКИЕ И МАТЕМАТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Влияние комбинаций антибиотиков, фагов
и деполимераз на биопленки лекарственно-
устойчивого штамма *Klebsiella pneumoniae*

Перспективы применения полимерных
систем доставки лекарственных
препаратов

МЕДИЦИНА ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ СИТУАЦИЙ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ ФМБА РОССИИ

Периодичность 4 номера в год. Основан в 1999 году

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Вероника Скворцова, д. м. н., профессор, член-корр. РАН

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Игорь Берзин, д. м. н., профессор; Дарья Крючко, д. м. н., доцент

НАУЧНЫЕ РЕДАКТОРЫ

Всеволод Белоусов, д. б. н., профессор, член-корр. РАН; Антон Кескинов, к. м. н.

ОТВЕТСТВЕННЫЙ РЕДАКТОР Лилия Корсун, к. б. н.

РЕДАКТОРЫ Ольга Лалыменко, к. м. н.; Александр Бирюзов
Ольга Зеленова, к. пед. н.

ПЕРЕВОДЧИКИ Елена Чернова; Александр Бирюзов

ДИЗАЙН ОБЛОЖКИ Елена Кондратьева

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

А. В. Богомолов, д. т. н., профессор (Москва, Россия)
А. Н. Бойко, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. Н. Болехан, д. м. н., доцент (Москва, Россия)
И. В. Борисевич, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
А. Ю. Бушманов, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Р. Валента, PhD, профессор (Вена, Австрия)
С. Э. Восканян, д. м. н., профессор, член-корр. РАН (Москва, Россия)
Н. А. Дайхес, д. м. н., профессор, член-корр. РАН (Москва, Россия)
С. В. Дударенко, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)
К. А. Зыков, д. м. н., профессор РАН, член-корр. РАН (Москва, Россия)
Н. Н. Каркищенко, д. м. н., профессор, член-корр. РАН (Москва, Россия)
Р. Р. Каспрянский, к. м. н. (Москва, Россия)
М. А. Лагарькова, д. б. н., профессор, член-корр. РАН (Москва, Россия)
Ю. В. Лобзин, д. м. н., профессор, академик РАН (Санкт-Петербург, Россия)
В. В. Никифоров, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

В. Н. Олесова, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Р. В. Петров, д. м. н., профессор, академик РАН (Москва, Россия)
Б. А. Поляев, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
А. С. Радилов, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)
В. Л. Рейнук, д. м. н., доцент (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)
С. В. Сидоренко, д. м. н., профессор, член-корр. РАН (Санкт-Петербург, Россия)
С. В. Сидорьевич, д. м. н. (Москва, Россия)
К. К. Стяжкин, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
А. В. Троицкий, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
А. Н. Усков, д. м. н., доцент (Санкт-Петербург, Россия)
И. Б. Ушаков, д. м. н., профессор, академик РАН (Москва, Россия)
М. Р. Хайтов, д. м. н., профессор, член-корр. РАН (Москва, Россия)
С. М. Юдин, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

А. В. Аклеев, д. м. н., профессор (Челябинск, Россия)
С. А. Аракелов, к. б. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)
В. П. Баклаушев, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Н. В. Ефименко, д. м. н., профессор (Петрозаводск, 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)
И. П. Миннулин, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)
И. Г. Мосягин, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)

О. М. Панасенко, д. б. н., профессор, член-корр. РАН (Москва, Россия)
В. А. Рогожников, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
С. А. Сотников, 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. Яковleva д. м. н. (Москва, Россия)

Учредитель: ФМБА России, 123182, Москва, Волоколамское шоссе, д. 30, стр. 1

Тираж: 100 экз. Цена свободная

Издатель: ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, 119121, Москва, Погодинская ул., д. 10, стр. 1

Подписано в печать: 13.12.2024

Адрес редакции: 119121, Москва, Погодинская ул., д. 10, стр. 1
extrememedicine@cspfmba.ru; www.extrememedicine.ru

Дата выхода в свет: 16.12.2024

Исполнитель: ООО «НЭИКОН ИСП»: 115114, Москва, ул. Летниковская, д. 4, стр. 5

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций. Свидетельство ПИ № ФС77-25124 от 27 июля 2006 г.

Типография: ООО «Издательство «Триада»: 170034, Тверь, Чайковского пр., д. 9, оф. 514

Контент доступен по лицензии Creative Commons Attribution International CC BY 4.0.

Журнал включен в Scopus в 2022 г.

Журнал включен в РИНЦ, IF 2021: 0,450

Журнал включен в Перечень 08.10.2024 (№ 1668)

Здесь находится открытый архив журнала



ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (BAK)



EXTREME MEDICINE

SCIENTIFIC AND PRACTICAL JOURNAL OF FMBA OF RUSSIA

Frequency of 4 issues per year. Founded in 1999

EDITOR-IN-CHIEF

Veronika Skvortsova, DSc, professor, member of the RAS

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

Igor Berzin, DSc, professor; Daria Kryuchko, DSc

SCIENTIFIC EDITORS

Vsevolod Belousov, DSc, professor, member of the RAS; Anton Keskinov, PhD

EXECUTIVE EDITOR Lilia Korsun, PhD

EDITORS Olga Lalymenko, PhD; Alexander Biryuzov

Olga Zelenova, PhD

EDITORIAL BOARD

Bogomolov AV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Boyko AN, DSc, professor (Moscow, Russia)

Bolekhany WN, DSc, docent (Moscow, Russia)

Borisevich IV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Bushmanov AY, DSc, professor (Moscow, Russia)

Valenta R, PhD, professor (Vienna, Austria)

Voskanyan S, member of the RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Daikhes NA, member of the RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Dudarenko SV, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)

Zykov KA, member of the RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Karkischenko NN, member of the RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Kaspranskiy RR, PhD (Moscow, Russia)

Lagarkova MA, member of the RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Lobzin YV, member of the RAS, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)

Nikiforov VV, DSc, professor (Moscow, Russia)

TRANSLATORS Elena Chernova; Alexander Biryuzov

COVER DESIGN Elena Kondrateva

Olesova VN, DSc, professor (Moscow, Russia)

Petrov RV, member of the RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Polyaev BA, DSc (Moscow, Russia)

Radilov AS, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)

Rejniuk VL, DSc, docent (Saint-Petersburg, Russia)

Rembovsky VR, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)

Samoilov AS, member of the RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Sidorenko SV, member of the RAS, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)

Sidorcevich SV, DSc (Moscow, Russia)

Styazhkin KK, DSc, professor (Moscow, Russia)

Troitsky AV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Uskov AN, DSc, docent (Saint-Petersburg, Russia)

Ushakov IB, member of the RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Khaitov MR, member of the RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Yudin SM, DSc, professor (Moscow, Russia)

ADVISORY BOARD

Akleet AV, DSc, professor (Chelyabinsk, Russia)

Arakelov SA, PhD, professor (Saint-Petersburg, Russia)

Baklaushev VP, DSc, professor (Moscow, Russia)

Efimenko NV, DSc, professor (Pyatigorsk, Russia)

Kazakevich EV, DSc, professor (Arkhangelsk, Russia)

Katunsev VP, DSc, professor (Moscow, Russia)

Klimanov VA, DSc, professor (Moscow, Russia)

Klinov DV, PhD (Moscow, Russia)

Minnullin IP, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)

Mosyagin IG, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)

Panasenko OM, DSc, member of the RAS, professor (Moscow, Russia)

Rogozhnikov VA, DSc, (Moscow, Russia)

Sotnichenko SA, DSc (Vladivostok, Russia)

Suranova TG, PhD, docent (Moscow, Russia)

Takhaourov RM, DSc, professor (Seversk, Russia)

Shandala NK, DSc, professor (Moscow, Russia)

Shinkarev SM, DSc (Moscow, Russia)

Shipulin GA, PhD (Moscow, Russia)

Yakovleva TV, DSc (Moscow, Russia)

Founder: FMBA of Russia, Volokolamskoe shosse, 30, str. 1, Moscow, 123182, Russia

Publisher: Centre for Strategic Planning, of the Federal medical and biological agency, 10 bld. 1 Pogodinskaya Str., Moscow, 119121, Russia

Postal address of the editorial office: Pogodinskaya ul., d. 10, str. 1, Moskva 119121, extrememedicine@cspfmba.ru; www.extrememedicine.ru

Contract publisher: NEICON ISP LLC: 4/5 Letnikovskaya St., Moscow 115114

Printing office: Triada Publishing House LLC: 9 Tchaikovsky Ave, office 514, Tver 170034

Print run: 100 copies. Free price

Passed for printing: 13 Dec. 2024

Date of publication: 16 Dec. 2024

The journal is registered as a mass medium by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technologies and Mass Communications. Certificate PI No. FS 77-25124 dated 27 July 2006

The content is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International licence (CC BY 4.0).

Indexed in Scopus in 2022

Indexed in RSCI. IF 2021: 0,450

Listed in HAC 08.10.2024 (№ 1668)

Open access to archive



ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (БАК)

CYBERLENINKA

СОДЕРЖАНИЕ

ТОМ 26, № 4, 2024

РАДИОБИОЛОГИЯ

Клональное кроветворение и ионизирующее излучение: риски развития онкогематологической и соматической патологии

А.А. Жернякова, О.Б. Крысюк, Е.О. Куневич

БЕЗОПАСНОСТЬ В ЧРЕЗВЫЧАЙНЫХ СИТУАЦИЯХ

Угрозы и риски здоровью при чрезвычайных ситуациях: медико-биологические, прогнозно-аналитические и математические аспекты

О.А. Мельников, С.А. Краевой, В.Н. Болехан

ИММУНОЛОГИЯ

Субстанция Р и стресс ассоциированы с развитием хронической крапивницы

Н.В. Мицрюкова, Н.М. Калинина

КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

Перспективы применения интраназальных наноразмерных полимерных систем доставки лекарственных препаратов и антидотов в медицине экстремальных ситуаций

Е.В. Федотова, Д.В. Криворотов, А.С. Радилов

Экспериментальная модель судорожного синдрома на основе фенилкарбамата

А.С. Мелехова, А.В. Бельская, В.Н. Зорина, М.В. Мельникова, Л.Г. Кубарская, О.Н. Гайкова

ТОКСИКОЛОГИЯ

Изучение общетоксического действия у крыс при имплантации гемостатического средства на основе хитозана

А.М. Носов, А.А. Бондаренко, Г.Г. Катрецкая, К.П. Головко, А.В. Шульц, М.В. Волкова, Е.А. Золотоверхая, Л.Г. Кубарская, Е.Д. Бажанова, О.Н. Гайкова

МИКРОБИОЛОГИЯ

Влияние комбинаций антибиотиков, фагов и деполимеразы на биопленки лекарственно-устойчивого штамма *Klebsiella pneumoniae*

А.О. Кривуля, Р.Б. Городничев, М.А. Корниенко, Н.К. Абраймова, М.В. Малахова, М.В. Зайчикова, Е.А. Шитиков

ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

Особенности профессиональной заболеваемости работников уранодобывающих производств

Н.А. Даихес, В.Б. Панкова, П.В. Серебряков, Л.М. Сааркоппель, И.Н. Федина, Н.Г. Бомштейн, А.Г. Учuros

Возможные риски профессионального воздействия инновационных биологических лекарственных препаратов: обзор литературы

В.И. Климов, О.С. Лалыменко, Л.В. Корсун

Травма подвешивания в течение продолжительного времени: обзор

К. Камлет, А. Мацейчик, К. Крупа, В. Казмерский, К. Коцур, А. Зиобро, М. Земек, А. Казмироска, А. Лис

CONTENTS

VOL. 26, NO. 4, 2024

RADIOBIOLOGY

- 5 Clonal haematopoiesis and ionizing radiation: risks for hematological malignancies and somatic diseases
A.A. Zherniakova, O.B. Krysiuk, Ye.O. Kunovich

EMERGENCIES SAFETY

- 13 Threats and risks to health in emergency situations: biomedical, predictive analytical, and mathematical aspects
O.A. Melnikov, S.A. Kraevoy, V.N. Bolekhan

IMMUNOLOGY

- 21 Substance P and stress are associated with the development of chronic urticaria
N.V. Mikryukova, N.M. Kalinina

CLINICAL PHARMACOLOGY

- 27 Prospects for the use of intranasal nanoscale polymer delivery systems for drugs and antidotes in extreme medicine
E.V. Fedotova, D.V. Krivorotov, A.S. Radilov

- 38 Experimental model of convulsive syndrome based on phenylcarbamate
A.S. Melekhova, A.V. Belskaya, V.N. Zorina, M.V. Melnikova, L.G. Kubarskaya, O.N. Gaikova

TOXICOLOGY

- 49 General toxic effect of a chitosan-based hemostatic agent implanted in rats
A.M. Nosov, A.A. Bondarenko, G.G. Katretskaya, K.P. Golovko, A.V. Shultz, M.V. Volkova, E.A. Zolotoverkhaja, L.G. Kubarskaya, E.D. Bazhanova, O.N. Gaikova

MICROBIOLOGY

- 58 Effect of combinations of antibiotics, phages, and depolymerase on biofilms of the drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain
A.O. Krivulja, R.B. Gorodnichev, M.A. Kornienko, N.K. Abdraimova, M.V. Malakhova, M.V. Zaychikova, E.A. Shitikov

PREVENTIVE MEDICINE

- 66 Features of occupational morbidity of uranium mining workers
N.A. Daikhes, V.B. Pankova, P.V. Serebryakov, L.M. Saarkoppel, I.N. Fedina, N.G. Bomshteyn, A.G. Uchurov

- 74 Potential risks of occupational exposure to innovative biopharmaceuticals: A review
V.I. Klimov, O.S. Lalymenko, L.V. Korsun

- 82 The long time suspension trauma: A review

K. Camlet, A. Maciejczyk, K. Krupa, W. Kaźmierski, K. Kocur, A. Ziobro, M. Ziomek, A. Kaźmierska, A. Lis

СОДЕРЖАНИЕ

ТОМ 26, № 4, 2024

КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

Иммунотерапия рака легкого: status quo, проблемы и перспективы

Ю.В. Озерская, Г.М. Юсубалиева, О.А. Жукова, К.А. Зыков, В.П. Баклаушев

МОРСКАЯ МЕДИЦИНА

Роль информационного сопровождения в совершенствовании медицинского обеспечения плавсостава

Т.В. Яковлева, О.Ю. Туренко, В.М. Колабутин, В.А. Ратников, Г.М. Орлов, С.С. Москалев, В.П. Горелов

СПОРТИВНАЯ МЕДИЦИНА

Перспективы диагностики и лечения минимальных травм и повреждений крупных суставов у несовершеннолетних спортсменов: современные представления

И.В. Зябкин, И.В. Панкратов, М.А. Петров, М.И. Габаев, Р.А. Кешишян, В.В. Хижникова, А.М. Ковалькова

КОСМИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

Перспективные направления мониторинга состояния здоровья человека в условиях длительного космического полета

В.А. Иванов, Я.Д. Шанский, К.А. Прусаков, Ю.А. Беспятых, Д.В. Басманов

Корреляция параметров протеома крови с количеством некоторых бактерий кишечной микрофлоры у здоровых женщин

Д.В. Комиссарова, Л.Х. Пастушкива, Д.Н. Каширина, В.К. Ильин, И.М. Ларина

ГЕМАТОЛОГИЯ

Микроцистицы как критерии качества концентратата тромбоцитов

Г.В. Гришина, А.Д. Касьянов, Д.В. Ласточкина, И.И. Кробинец, И.С. Голованова, О.Ю. Матвиенко

Использование лактулозы в составе криоконсерванта для сохранения клеток крови

А.А. Власов, С.Ф. Андрусенко, О.И. Анфиногенова, А.Б. Эльканова, А.А. Каданова, У.Е. Сорокина, Э.Е. Рыбчинская, Д.А. Доменюк

CONTENTS

VOL. 26, NO. 4, 2024

CLINICAL MEDICINE

87 Lung cancer immunotherapy: Status quo, problems, and prospects

Iu.V. Ozerskaya, G.M. Yusubalieva, O.A. Zhukova, K.A. Zykov, V.P. Baklaushev

MARINE MEDICINE

98 The role of information support in improving medical support for seafaring personnel

T.V. Yakovleva, O.Yu. Turenko, V.M. Kolabutin, V.A. Ratnikov, G.M. Orlov, S.S. Moskaleva, V.P. Gorelov

SPORTS MEDICINE

104 Prospects for diagnosis and treatment of minimal trauma and injury of large joints in underage athletes: A review

I.V. Zyabkin, I.V. Pankratov, M.A. Petrov, M.I. Gabayev, R.A. Keshishyan, V.V. Khizhnikova, A.M. Kovalkova

SPACE MEDICINE

114 Prospective directions in human health monitoring during long-term spaceflights

V.A. Ivanov, Ya.D. Shansky, K.A. Prusakov, Ju.A. Bespyatykh, D.V. Basmanov

123 Correlation of blood proteome parameters to the number of certain intestinal microflora bacteria in healthy women

D.V. Komissarova, L.Kh. Pastushkova, D.N. Kashirina, V.K. Ilyin, I.M. Larina

HEMATOLOGY

132 Microparticles as quality criteria for platelet concentrate

G.V. Grishina, A.D. Kasyanov, D.V. Lastochkina, I.I. Krobinec, I.S. Golovanova, O.Yu. Matvienko

141 Use of lactulose in the composition of blood cell cryopreservatives

A.A. Vlasov, S.F. Andrusenko, O.I. Anfinogenova, A.B. Elkanova, A.A. Kadanova, U.E. Sorokina, E.E. Rybchinskaya, D.A. Domenyuk

<https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-5-12>

КЛОНАЛЬНОЕ КРОВЕТВОРЕНИЕ И ИОНИЗИРУЮЩЕЕ ИЗЛУЧЕНИЕ: РИСКИ РАЗВИТИЯ ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКОЙ И СОМАТИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ

А.А. Жернякова^{1✉}, О.Б. Крысюк^{1,2}, Е.О. Куневич¹¹ Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия² Санкт-Петербургский государственный университет, Медицинский институт, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Влияние радиационно-индуцированной генетической нестабильности на формирование клональной экспансии актуально для мониторинга здоровья и превентивной диагностики онкогематологической и соматической патологии у лиц, подвергающихся длительному воздействию техногенного облучения в малых дозах (работники атомной промышленности и врачи лучевой диагностики).

Цель. Выявление возможных точек приложения превентивной диагностики маркеров нестабильности генома и клонального кроветворения у групп лиц, подвергающихся длительному воздействию техногенного облучения в малых дозах.

Обсуждение. Генетическая нестабильность в генах эпигенетической регуляции (*DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*), сигнальных путей и клеточной пролиферации (*JAK2*, *FLT3*), регуляторов репарации ДНК (*TP53*, *PPM1D*), факторов сплайсинга РНК (*SF3B1*, *SRSF2*) наиболее часто инициирует клональное кроветворение, реализующееся чаще миелоидными и реже лимфоидными неоплазиями. Влияние клонального кроветворения на развитие соматических заболеваний опосредовано сочетанным действием носительства указанных мутаций и процессами хронического воспаления. Ионизирующее излучение в малых дозах способно инициировать клональную экспансию преимущественно за счет мутаций в генах *DNMT3A* и *TET2*. Исследований по оценке повышения заболеваемости на фоне развития клонального кроветворения в группах профессионального риска воздействия малых доз ионизирующего излучения (работники атомной промышленности и врачи лучевой диагностики) в настоящее время мало, что требует дальнейшего изучения.

Выходы. Исследования по выявлению маркеров риска роста заболеваемости на фоне развития клонального кроветворения в группах работников, подвергающихся длительному техногенному действию ионизирующего излучения в малых дозах, позволят сформировать когортно-ориентированную программу профилактики заболеваний у данных лиц.

Ключевые слова: генетическая нестабильность; клональное кроветворение; клональное кроветворение неустановленного потенциала; малые дозы ионизирующего излучения; соматическая мутация

Для цитирования: Жернякова А.А., Крысюк О.Б., Куневич Е.О. Клональное кроветворение и ионизирующее излучение: риски развития онкогематологической и соматической патологии. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2024;26(4):5–12. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-5-12>

Финансирование: работа выполнена в рамках НИР ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства» № 1023031400087-5-3.2.6-3.2.6.

Потенциальный конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

✉ Жернякова Анастасия Андреевна zhernyakova@niigt.ru

Статья поступила: 05.09.2024 После доработки: 01.11.2024 Принята к публикации: 02.11.2024

CLONAL HAEMATOPOIESIS AND IONIZING RADIATION: RISKS FOR HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES AND SOMATIC DISEASES

Anastasiia A. Zherniakova^{1✉}, Oleg B. Krysiuk^{1,2}, Yevgeny O. Kunovich¹¹ Russian Research Institute of Hematology and Transfusion, St. Petersburg, Russia² Saint-Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

Introduction. The influence of radiation-induced genetic instability on the formation of clonal expansion is a relevant problem in health monitoring and preventive diagnostics of oncohematological and somatic pathology in individuals exposed to long-term low-dose anthropogenic irradiation, such as nuclear industry workers and radiation diagnostics doctors.

Objective. Identification of possible application points of preventive diagnostics of genome instability markers and clonal hematopoiesis in groups of individuals exposed to long-term low-dose anthropogenic irradiation.

Results and discussion. Genetic instability in genes of epigenetic regulation (*DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*), signaling pathways and cell proliferation (*JAK2*, *FLT3*), DNA repair regulators (*TP53*, *PPM1D*), RNA splicing factors (*SF3B1*, *SRSF2*) most often initiates clonal hematopoiesis, which is realized more frequently by myeloid and less frequently by lymphoid neoplasia. The influence of clonal hematopoiesis on the development of somatic diseases is mediated by the combined effect of carrying these mutations and the processes of chronic inflammation. Low-dose ionizing radiation is capable of initiating clonal expansion mainly due to mutations in *DNMT3A* and *TET2* genes. There is a lack of studies on the assessment of increased morbidity against the background of clonal hematopoiesis in groups of occupational risk of low-dose ionizing radiation exposure (workers in the nuclear industry and doctors of radiation diagnostics), which requires further study.

Conclusions. Studies aimed at identifying risk markers of morbidity growth in the setting of clonal hematopoiesis in groups of workers exposed to long-term anthropogenic action of low-dose ionizing radiation form the basis for developing cohort-oriented programs of disease prevention in these individuals.

Keywords: genetic instability; clonal hematopoiesis; clonal hematopoiesis of undetermined potential; low-dose ionizing radiation; somatic mutation

For citation: Zherniakova A.A., Krysiuk O.B., Kunovich Ye.O. Clonal haematopoiesis and ionizing radiation: Risks for haematological malignancies and somatic diseases. *Extreme Medicine*. 2024;26(4):5–12. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-5-12>

Funding: the study was performed as part of the Scientific Project No. 1023031400087-5-3.2.6-3.2.6 provided by Russian Research Institute of Hematology and Transfusion.

Potential conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

✉ Anastasiia Zherniakova zhernyakova@niigt.ru

Received: 5 Sep. 2024 Revised: 1 Nov. 2024 Accepted: 2 Nov. 2024

© А.А. Жернякова, О.Б. Крысюк, Е.О. Куневич, 2024

ВВЕДЕНИЕ

Изучение возникновения радиационно-индуцированной генетической нестабильности и ее взаимосвязи с формированием клональной экспансии является актуальным научным направлением в аспекте мониторинга состояния здоровья работников атомной промышленности и врачей лучевой диагностики. Выявление факторов риска развития неблагоприятных событий у данных категорий лиц, диспансерное наблюдение, а также своевременная профилактика позволят предотвратить развитие патологии [1].

Человек ежедневно подвергается воздействию малых доз ионизирующего излучения (ИИ), испускаемого как естественными источниками (радионуклиды в окружающей среде, находящиеся в атмосфере, в почве и воде), так и получаемого от искусственных или техногенных источников. Совокупность воздействия всех видов естественного излучения определяют как естественный или природный радиоактивный фон. Среднемировые показатели такого излучения в различных регионах мира находятся в диапазоне от 2,4 до 4,0 мЗв/год, для Российской Федерации средний уровень — 3,36 (от 2,10 до 8,60) мЗв/год [1–3].

Воздействие ИИ на человека осуществляется за счет влияния природного радиоактивного фона, профессионального облучения на рабочем месте, а также при получении медицинской помощи (медицинское облучение). Широкое использование ИИ в медицине и различных отраслях промышленности, прежде всего в атомной энергетике, способствует увеличению радиационной нагрузки на работников этих отраслей. Так, для определенного перечня производств, на которых возможно дополнительное техногенное воздействие ИИ, предел допустимой эффективной дозы ИИ составляет 5 мЗв/год для персонала группы Б и 20 мЗв/год для персонала группы А [3].

В настоящее время хорошо изучены и описаны ближайшие и отсроченные последствия воздействия на организм человека ИИ в больших дозах при техногенных катастрофах, характеризующиеся критическими изменениями, приводящими к дефектам функционирования органов и систем. Вместе с тем установлено, что малые дозы ИИ, при воздействии которых отсутствуют клинические проявления радиационного повреждения организма, также индуцируют повреждения на генетическом и эпигенетическом уровнях, а зависимость эффекта от дозы облучения носит немонотонный полимодальный характер. В последнее время появились данные относительно того, что действие малых доз ИИ может приводить к нестабильности генома, модифицируя клеточные и тканевые процессы, что в итоге может способствовать изменению чувствительности организма к действию дополнительных нерадиационных факторов [4–6].

В последнее десятилетие ученые активно изучают клональное кроветворение (КК), рассматривая его в качестве биологического состояния, предрасполагающего к развитию злокачественных заболеваний системы крови (ЗЗСК), солидных опухолей, сердечно-сосудистой патологии, аутоиммунных заболеваний и другой патологии [7–9].

Цель работы — выявление возможных точек приложения превентивной диагностики маркеров нестабильности генома и КК у групп лиц, подвергающихся длительному воздействию техногенного облучения в малых дозах.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общие представления о клональном кроветворении

Гемопоэтические клетки костного мозга (КМ) обладают наиболее высоким пролиферативным потенциалом. Процессы пролиферации и дифференцировки клеток крови в КМ осуществляются непрерывно. Ежедневно образуется около 1 триллиона клеток крови. Основой кроветворения являются гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), обладающие способностью к дифференцировке во все зрелые клетки периферической крови, что было впервые постулировано профессором А.А. Максимовым в 1909 году. Наилучшим подтверждением модели кроветворения, предложенной А.А. Максимовым, стали экспериментальные данные, полученные в эпоху активного изучения последствий воздействия радиации на организм человека [10].

За последние десятилетия наши представления о системе гемопоэза существенно расширились и усложнились [10–13]. Так, в многочисленных исследованиях была предложена идея непрерывных ландшафтов дифференциации с небольшими или отсутствующими дискретными стадиями дифференциации и плавными переходами между состояниями клеток. В этом контексте клетки в гетерогенном пуле предшественников дифференцируются по множеству потенциальных траекторий, которые содержат некие точки ветвления, определяющие судьбу конкретной клетки. Однако неизменным остается представление о том, что потомство одной ГСК представляется собой клон конкретной ГСК. В норме система кроветворения поликлональна, что предполагает продукцию различными ГСК «своих» клонов клеток и поддержание их числа, а также соотношения клеток различных степеней и направлений дифференцировки в КМ в устойчивых пределах. Для кроветворных клеток с высокой пролиферативной активностью характерно накопление генетических «поломок» с нарастанием количества делений [14].

С возрастом у человека в физиологических условиях происходят количественные и качественные изменения кроветворения: снижение общей пролиферативной активности ГСК при относительном увеличении их общего количества, увеличение числа эритроидных предшественников, снижение числа лимфоидных предшественников с возрастными изменениями функции иммунной системы. В целом кроветворение приобретает тенденцию к развитию олигоклональности [15]. В основе возрастных изменений КМ, вероятнее всего, лежат генетические и эпигенетические процессы. Отмечаются возрастное снижение регенеративного потенциала ГСК [16], характерные изменения экспрессии генов — регуляторов транскрипции, накопление соматических мутаций [17], выраженное укорочение теломерных участков хромосом [18]. Кроме того, у пожилых людей выявлена повышенная экспрессия генов, принимающих участие в регуляции апоптоза и воспаления в системе гемопоэза, тогда как у молодых людей высока активность генов, регулирующих процессы пролиферации и метаболической активности кроветворных клеток-предшественниц. Все описанные тенденции являются проявлением закономерных процессов, характеризующих изменения кроветворения в процессе старения организма [19].

Вместе с тем накопление мутаций может привести к такому развитию КК, при котором активируется пролиферация одной ГСК или более дифференцированной

клетки — предшественницы гемопоэза с формированием клона ее потомков, несущих мутации генов. Несмотря на то что КК не является самостоятельной нозологией, оно может выступать в качестве «промежуточного этапа» между нормальным кроветворением и ЗЗСК [20]. Показано, что КК может возникнуть в результате нейтрального дрейфа или направленного отбора. В случае нейтрального дрейфа изначально все клоны клеток имеют равные шансы своего вклада в формирование пула самообновляющихся ГСК, решающее влияние оказывают случайные процессы, такие как истощение пула стволовых клеток. При направленном отборе соматические изменения оказывают влияние на появление преимущества избирательного роста у определенных клонов ГСК относительно других, с последующим развитием клonalной экспансии [21].

В 2014 году двумя независимыми группами были опубликованы результаты крупных исследований с использованием метода секвенирования нового поколения (*new generation sequencing*, NGS). Согласно полученным данным было определено, что развитие КК ассоциировано с соматическими мутациями, наиболее часто возникающими в трех генах эпигенетической регуляции транскрипции (*DNMT3A* — ген, кодирующий белок, осуществляющий *de novo* метилирование; *TET2* кодирует белок, который катализирует превращение модифицированного основания ДНК метилцитозина в 5-гидроксиметилцитозин и участвует в регуляции процесса транскрипции, *ASXL1* кодирует ядерный белок, участвующий в эпигенетической регуляции экспрессии генов и в процессе ремоделирования хроматина). Полученные результаты нашли подтверждение при исследовании групп пациентов с разными типами ЗЗСК и солидными новообразованиями [22, 23]. В работе M. Xie и соавт. было убедительно продемонстрировано, что наиболее часто и практически во всех нозологических подгруппах, которые были проанализированы, возникали мутации в генах *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* и *TP53* [24].

На основании накопленных данных в 2015 году был введен термин «клональное кроветворение неопределенного потенциала» (ККНП) (*clonal haematopoiesis of indeterminate potential*). Так, ККНП определяется при наличии клона кроветворной клетки с мутацией гена, ассоциированного с риском развития ЗЗСК, при отсутствии цитопении и критерии иных гематологических заболеваний, согласно классификации Всемирной организации здравоохранения. Уровень аллельной нагрузки указанного гена должен быть не менее 2% (значение принято в качестве минимального клинически значимого порогового уровня для метода секвенирования нового поколения (*next generation sequencing* — NGS)), а для генов, сцепленных с Х-хромосомой у мужчин, — не менее 4% [25, 26]. Частота детекции мутаций увеличивается с возрастом, а их наличие ассоциировано с повышением риска развития ЗЗСК. Было определено, что у порядка 15–20% людей старше 70 лет без наличия онкогематологического заболевания присутствует носительство соматических мутаций, ассоциированных с повышенным риском развития онкопатологии [27]. Позже для таких изменений был предложен термин «ассоциированное с возрастом клональное кроветворение» (*age-related clonal haematopoiesis*), которое определяется у пожилых пациентов при наличии соматической мутации в генах вне зависимости от ее клинического значения и уровня

аллельной нагрузки, а также при отсутствии изменений в гемограмме и критериях ЗЗСК [23, 27].

Для обозначения состояния носительства мутаций, которые могут выступать в качестве непосредственного драйвера развития ЗЗСК, был введен термин «клональное кроветворение онкогенного потенциала» (ККОП) (*clonal haematopoiesis of oncogenic potential*) [28, 29]. Выделение такой категории и подход к разделению генов по их непосредственной роли в развитии ЗЗСК (то есть их онкогенному потенциальному) в настоящее время носит весьма условный характер, является дискуссионным и требует накопления данных и анализа.

В научной литературе можно встретить также термин «клональная цитопения неустановленного значения» (*clonal cytopenia of undetermined significance*), для которой характерно наличие соматических мутаций в гене/генах, связанных с ЗЗСК, при уровне аллельной нагрузки не менее 2% (или 4% у мужчин в случае наличия мутации в генах, сцепленных с Х-хромосомой); отсутствие критерий ЗЗСК, других причин цитопении и молекулярных аберраций; стойкая цитопения более чем в одном ростке кроветворения (гемоглобин ниже 100 г/л, нейтрофилы менее $1,8 \times 10^9/\text{л}$, тромбоциты менее $100 \times 10^9/\text{л}$) в течение не менее 4 месяцев. Также при наличии стойкой цитопении более чем в одном ростке кроветворения и отсутствии критериев миелоидного новообразования и других заболеваний системы крови предложено использовать термин «идиопатическая цитопения неустановленного значения» (*idiopathic cytopenia of undetermined significance*) [30].

Клональное кроветворение и онкогематологические заболевания

В настоящее время показано, что у лиц с КК чаще выявляются признаки генетической нестабильности, обусловленные соматическими мутациями в генах эпигенетической регуляции (*DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*), генах сплайсинга РНК (*SF3B1*, *SRSF2*, *ZRSR2*), сигнальных путей и клеточной пролиферации (*JAK2*, *FLT3*), генах, связанных с метаболизмом и клеточной дифференцировкой (*IDH1*, *IDH2*), а также в генах регуляции репарации ДНК (*TP53*, *PPM1D*), в сравнении с популяцией они же часто обнаруживаются при диагностике цитопений неясной этиологии. Около 80% случаев ККНП приходится на мутации в генах *DNMT3A*, *TET2* и *ASXL1* [22, 23].

Мутации, характерные для миелодиспластического синдрома (МДС), миелопролиферативных новообразований и острого миелоидного лейкоза, наблюдаются в генах *JAK2*, *PPM1D*, *TP53*, *SRSF2*, *SF3B1* и встречаются реже [26]. Частота обнаружения данных мутаций намного выше, чем заболеваемость ЗЗСК, тем не менее КК можно рассматривать как событие, предшествующее развитию гемобластозов. Признаки КК определяют у 50% больных апластической анемией, у 15% находят характерные для КК мутации генов *DNMT3A* и *ASXL1* [31, 32]. Другим примером развития КК с его трансформацией в патологический процесс является пароксизмальная ночная гемоглобинурия. При данном заболевании клон, возникший из ГСК с дефицитом гликозил-фосфатидилинозитола, менее восприимчив к опосредованному Т-клетками уничтожению по сравнению с нормальными ГСК [30, 33].

Кроме того, КК с точечными мутациями или структурными вариациями, такими как изменение числа копий гена, приводит к 10-кратному увеличению риска развития ЗЗСК. Роль нарушений противоопухолевого звена

иммунной системы в трансформации КК в ЗЗСК требует дальнейшего изучения [22]. При этом наличие ККНП со-пряжено с 13-кратным повышением риска развития гемобластозов, с частотой их возникновения у 0,5–1% пациентов в год [8].

В большинстве случаев ККНП является доброкачественным, особенно при небольших размерах клона, отсутствии множественных и драйверных мутаций [20]. Основные факторы риска развития не только гематологических, но и соматических заболеваний при ККНП включают: значительный размер клона (от 10% и выше) и ускорение его роста, клональные изменения более чем в одной клеточной линии, множественные драйверные мутации, мутации гена *TP53*, хромосомные aberrации [34].

Накопленная информация и расширение спектра детектируемых генетических мутаций до недавнего времени не позволяли отделить мутации, инициирующие возникновение КК, от тех, которые являются ранним событием в развитии ЗЗСК, а также выделить мутации второго порядка, которые вносят наиболее существенный вклад уже при прогрессировании заболевания. Так, было предложено выделение драйверных мутаций, пассажирских мутаций, а также фоновых и кооперирующих мутаций [20, 22]. В публикациях 2024 года указано, что уже разработаны методы для определения драйверных мутаций, например «метод обогащения несинонимичных мутаций по сравнению с нейтральными синонимичными мутациями» или алгоритмы на основе машинного обучения [35, 36].

Таким образом, в соответствии с современными представлениями мутации генов, ассоциированных с ККНП, являются одним из предрасполагающих факторов к развитию ЗЗСК. Появление таких мутаций приводит к трансформации нормальной ГСК в «предлейкозную» неопластическую ГСК. Измененная ГСК дает начало небольшим субклонам и сама практически не отличается от нормальной ГСК. Частота выявления мутаций увеличивается с возрастом, и это закономерный биологический процесс, сопровождающий старение. Однако «предлейкозная» ГСК обладает повышенным риском для трансформации в лейкозную ГСК при приобретении дополнительных молекулярно-генетических повреждений. Факторы такой трансформации требуют дальнейшего изучения. Классификация генетических поломок по их онкогенному потенциалу также является областью интереса для современных научных исследований. Модель КК, представленная на рисунке 1, обобщает наши представления о драйверных, кооперирующих, пассажирских и фоновых мутациях, а также о причинах генетической нестабильности, обусловливающих клональную эволюцию с развитием ЗЗСК.

Клональное кроветворение и соматическая патология

Развитие ККНП является независимым фактором риска не только различных гемобластозов, но и сердечно-сосудистых заболеваний, болезни Альцгеймера, сахарного диабета 2 типа, тромбозов, аутоиммунных процессов и иной патологии [7]. При развитии клональной экспансии ГСК нет анатомических ограничений, и клетки клона циркулируют в кровяном русле в большом количестве [21]. Таким образом, при КК возрастает риск развития не только ЗЗСК (чаще миелоидных и реже лимфоидных), но и развития различной соматической патологии [21, 37].

В ряде публикаций было убедительно продемонстрировано, что ККНП ассоциировано не только с риском развития острых лейкозов, МДС и других гемобластозов, но и с такими формами неблагоприятного течения сердечно-сосудистой патологии, как острое нарушение мозгового кровообращения и острый инфаркт миокарда [38–40]. В двух независимых метаанализах также было показано, что наличие ККНП связано с высоким риском развития атеросклероза и сердечно-сосудистой патологии [40, 41].

Наличие ККНП способствует ускорению процессов атеросклеротического поражения сосудов. Данный факт был подтвержден на животных моделях, схожие выводы были получены в дальнейшем и для человека [41–43]. Мутации, характерные для ККНП, ускоряют атеросклеротический процесс, что отмечали даже при незначительном увеличении их аллельной нагрузки [41]. Путем моделирования ККНП в эксперименте на мышах было показано, что атеросклеротическое поражение аорты было на 60% более выражено по сравнению с контрольной группой животных [43]. Подобное моделирование ККНП показало свою исключительную воспроизводимость и в других экспериментах на животных [43, 44]. Схожие результаты были получены и при моделировании ККНП, сопряженного с мутацией *JAK2V617F*. Наличие данной мутации у животных обусловливало увеличение эритрофагоцитоза в атеросклеротических бляшках, что ускоряло их дестабилизацию [45]. Кроме того, данная мутация была ассоциирована с более высокой частотой тромбообразования в атеросклеротических бляшках [45, 46].

Клональное кроветворение неясного потенциала повышает не только риск острых сердечно-сосудистых событий, но и усугубляет течение сердечной недостаточности (СН) [40, 45]. В исследовании S. Sano, K. Oshima et al. мышам проводили транспланацию 10% Tet2–/– клеток КМ, и при этом была выявлена связь инактивированного драйверного гена с высокой частотой развития СН [43]. Детальный транскриптомный анализ тканей сердца продемонстрировал у животных повышенную экспрессию генов, связанных с NLRP3-инфламмасомой, а также гена *IL1B*. Использование ингибитора NLRP3 снижало частоту ремоделирования сердца и риск развития СН у мышей [44, 47, 48]. Таким образом, было продемонстрировано, что драйверные мутации ККНП также интенсифицируют провоспалительную реакцию, приводящую к развитию сердечно-сосудистой патологии [7, 45, 48].

Вместе с тем уже установлены новые факты, и на данный момент продолжаются исследования относительно роли ККНП в развитии различных вариантов течения сахарного диабета 2-го типа [7], болезни Альцгеймера [7, 49], аутоиммунных заболеваний [7, 50], тромбозов [7, 46] и другой патологии. Решающую роль при соматической патологии отводят сочетанию эффектов соматических мутаций, характерных для ККНП, с хроническим воспалительным процессом, длительной гиперактивацией иммунной системы, сопутствующей патологией и ее терапией, образом жизни, а также воздействием внешних факторов [46].

Ионизирующее излучение как индуктор генетической нестабильности и клонального кроветворения

Действие ИИ приводит к нарушению процессов reparации, интерфазной или митотической репродуктивной гибели клеток и нарастающему дефициту

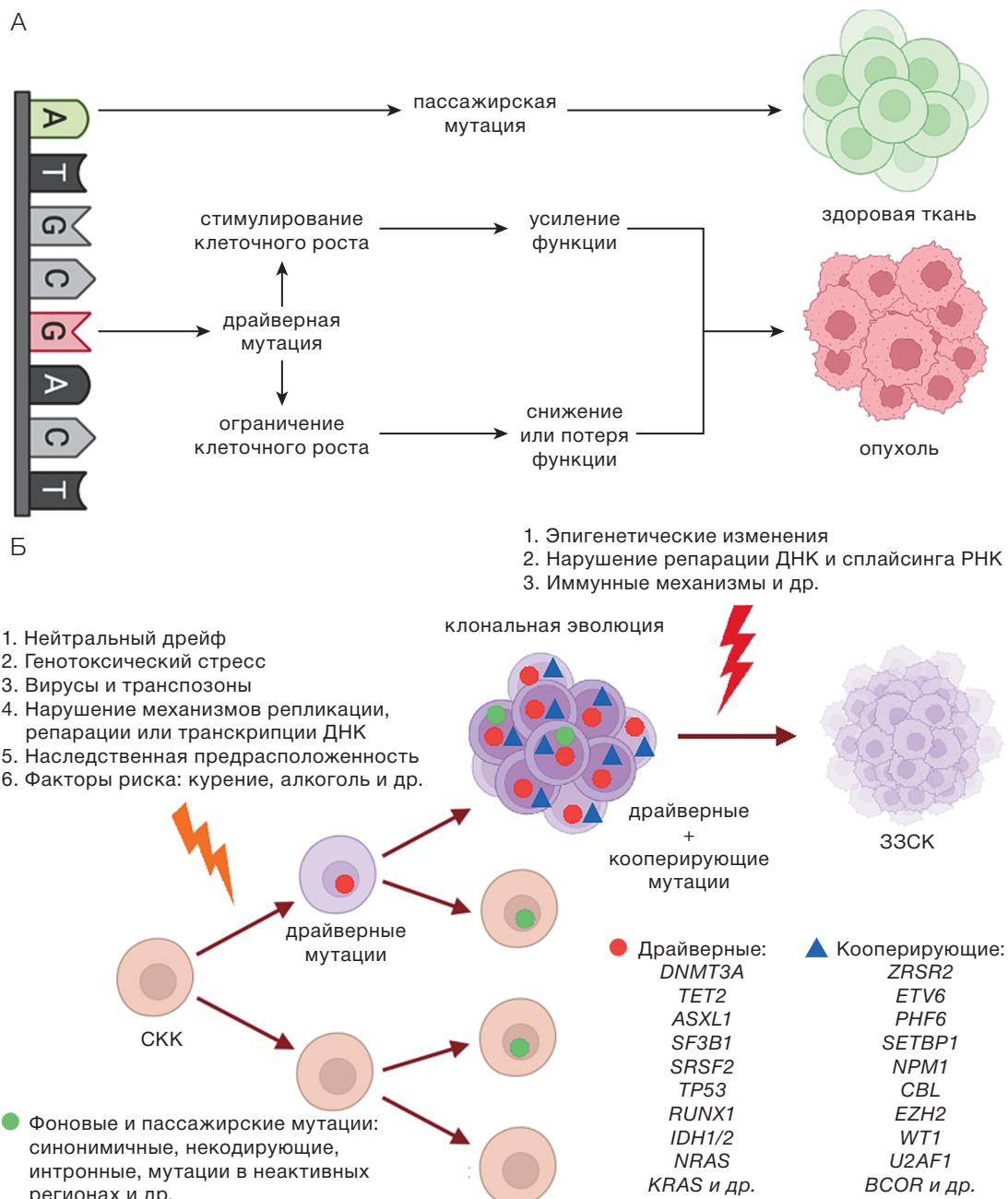


Рисунок подготовлен авторами по данным источника [24]

Рис. 1. Модель клонального кроветворения: реализация действия пассажирских (А) и драйверных (Б) мутаций

дифференцированных клеток с формированием детерминированных эффектов облучения. Они заключаются в прямом повреждающем действии ИИ на клетки и ткани и проявляются только после облучения в дозе, превышающей пороговую, то есть такую, при которой определяются клинически значимые последствия, как детерминированные (тканевые реакции), так и стохастические. Степень выраженности повреждения быстро нарастает по мере накопления дозы облучения [51, 52].

При воздействии малых доз ИИ развиваются стохастические эффекты. Под малыми дозами в таком случае принято понимать следующие: разовая эквивалентная доза до 0,1 Зв или 10 бэр; поглощенная доза до 0,1 Гр или 10 рад; эффективная эквивалентная доза до 0,1 Зв/год, что примерно соответствует экспозиционной дозе 750 мкР/час [1, 6]. В случае такого воздействия, когда

незначительное повреждение клеток под действием ИИ произошло, но было полностью устранено за счет восстановительных процессов, клетки сохраняют жизнеспособность, но приобретают генетические мутации. Вероятность нанесения такого повреждения при единичном воздействии малых доз ИИ минимальна, но резко возрастает при увеличении эффективной эквивалентной дозы и длительности воздействия. Следовательно, для стохастических эффектов характерно отсутствие дозового порога облучения и принимается, что вероятность их возникновения линейно пропорциональна величине воздействующей дозы ИИ. К стохастическим эффектам относят развитие ЗЗСК и солидных опухолей, а также наследственной патологии [4, 6, 51].

Таким образом, основной реакцией организма на хроническое действие малых доз ИИ является нарушение

стабильности генома и регуляторных процессов. На фоне генетической нестабильности возможны различные реакции организма на воздействие внешних факторов, вплоть до гибели. Увеличение количества хромосомных aberrаций может предшествовать развитию вторичного иммунодефицита, преждевременного старения, неоплазий, в том числе ЗЗСК, а также соматической патологии. Малые дозы ИИ являются для организма фактором стресса, а отдаленные последствия его длительного хронического воздействия заключаются в истощении компенсаторных возможностей организма [7, 52].

В настоящее время возросло число публикаций по исследованию эффектов профессионального воздействия, в том числе малых доз ИИ, у определенного профессионального контингента (работники атомной промышленности, врачи лучевой диагностики и др.). Заслуживают внимания данные, опубликованные в 2022 году в исследовании S. Jasra et al., в котором приведен анализ воздействия химических веществ и твердых частиц пыли на 481 спасателя, принимавшего участие в ликвидации последствий катастрофы во Всемирном торговом центре 11 сентября 2001 г. Авторами было обнаружено значительное увеличение рисков развития КК у данных лиц, при этом наиболее часто определяли мутации в генах *DNMT3A* и *TET2*, а частота их выявления увеличивалась с возрастом в сопоставлении с 255 сотрудниками из группы сравнения [53].

По данным другого крупного исследования, проведенного в 2019 году и основанного на результатах наблюдения за лицами, пережившими атомную бомбардировку, не имеющими диагноза ЗЗСК, установлено, что под воздействием радиоактивного излучения наблюдалось ускорение процессов клональной экспансии клеток крови, что приводило к долгосрочному повышению циркулирующих моноцитов в группе лиц старше 60 лет [54]. Также в 2022 году были опубликованы результаты исследования, посвященного анализу наличия мутаций генов-драйверов КК у астронавтов NASA. В ходе исследования были выявлены 34 несинонимичные мутации в 17 драйверных генах, с наибольшей частотой встречаемости в генах *TP53* и *DNMT3A* [55].

В последнее время появляются единичные работы, посвященные изучению производственного влияния ИИ на развитие онкологической и сердечно-сосудистой патологии у сотрудников атомной промышленности и врачей лучевой диагностики. Так, по результатам крупного метаанализа было установлено, что значение поглощенной дозы ИИ, при превышении которого увеличивается смертность от болезней системы кровообращения у данных категорий работников, составляет 0,5 Гр [56].

По результатам метаанализа (данные 15 стран) показателей общей смертности и смертности от всех

злокачественных новообразований для работников ядерной индустрии, а также для работников, имеющих контакт с наиболее токсичными тяжелыми металлами и химическими соединениями, по показателям смертности от всех злокачественных новообразований не было выявлено их явного повышения сравнительно с популяцией [57]. При проведении метаанализа данных по рискам развития сердечно-сосудистой патологии авторами также не были отмечены существенные различия с показателями в популяции [58]. Однако в контексте действия малых доз ИИ на развитие КК у данных категорий лиц в настоящее время в крупных работах по определению мутаций, ассоциированных с КК, сведений не представлено. Большинство отечественных исследований ориентированы на характеристики ИИ и ретроспективный анализ заболеваемости, а также выживаемости сотрудников, подвергающихся длительному воздействию малых доз ИИ. Следовательно, возможность определения мутаций, ассоциированных с КК, представляет наибольший интерес для современных исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время установлена связь КК с естественными процессами старения. Описано влияние ККПН на повышение рисков развития гемобластозов, соматической патологии и увеличение общей летальности. Генетическая нестабильность в генах *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *JAK2*, *TP53*, *PPM1D*, *SF3B1*, *SRSF2*, которые наиболее часто инициируют КК, в сочетании с хроническим воспалением и повышенной активацией иммунной системы приводят к развитию указанных заболеваний.

Вместе с тем на данный момент нет исчерпывающих данных о рисках перехода клинически не выраженного ККП в заболевание. Своевременный скрининг, направленный на выявление факторов, коррелирующих с неблагоприятными исходами, позволит выявлять лиц с повышенным риском развития патологии.

Изучение влияния радиационно-индуцированной генетической нестабильности на формирование клональной экспансии является актуальным для мониторинга здоровья и превентивной диагностики онкогематологической и соматической патологии у лиц с длительным техногенным облучением в малых дозах (работники атомной промышленности и врачи лучевой диагностики).

Дальнейшие исследования позволят не только улучшить понимание роли КК и ККП при различной патологии, но и определить возможности терапевтического воздействия, направленного на профилактику неблагоприятного течения заболевания и увеличения продолжительности жизни.

Литература / References

- Маренний АМ, Киселев СМ, Семенов СЮ. О проблеме обеспечения защиты населения России от природных источников ионизирующего излучения. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2019;21(3):371–82.
Marenny AM, Kiselyev SM, Semenov SYu. On the problem of protection of the russian population from natural sources of ionizing radiation. part 2. the development of approaches and practical activities. *Extreme Medicine*. 2019;21(3):371–82 (In Russ). EDN: [СТУГИХ](#)
- Пучков ВА, ред. Гражданская защита. М.: ФГБУ ВНИИ ГОЧС; 2015
Puchkov VA, ed. Civil protection. Moscow: FSBI VNII GOChS; 2015 (In Russ.).
- Барковский АН, Ахматдинов РР, Ахматдинов РР, Барышков НК, Библин АМ, Братилова АА и др. Дозы облучения населения Российской Федерации в 2020 г. *Радиационная гигиена*. 2021;14(4):103–13.
Barkovsky AN, Akhmatdinov RR, Akhmatdinov RR, Baryshkov NK, Biblin AM, Bratilova AA, et al. Radiation doses to the population of the russian federation in 2020. *Radiation Hygiene*. 2021;14(4):103–13 (In Russ.). <https://doi.org/10.21514/1998-426X-2021-14-4-103-113>
- Кострюкова НК, Карпин ВА. Биологические эффекты малых доз ионизирующего излучения. *БМЖ*. 2005;50(1):17–22.
Kostryukova NK, Karpin VA. Biological effects of low doses of ionizing radiation. *BMJ*. 2005;50(1):17–22 (In Russ.).

5. Кузнецова ЕА, Заичкина СИ, Сирота НП, Абдуллаев СА, Розанова ОМ, Аптикаева ГФ и др. Индукция редко- и плотноионизирующими излучениями повреждений ДНК в лейкоцитах крови и цитогенетических повреждений в полихроматофильных эритроцитах костного мозга мышей и их потомков. *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2014;54(4):341–9.
Kuznetsova EA, Zaichkina SI, Sirota NP, Abdullaev SA, Rozanova OM, Aptikaeva GF, et al. Induction of DNA damage in blood leukocytes and cytogenetic damage in polychromatophilic erythrocytes of the bone marrow of mice and their descendants by rare and dense ionizing radiation. *Radiation Biology. Radioecology.* 2014;54(4):341–9 (In Russ.).
<https://doi.org/10.7868/S0869803114040080>
6. Жижина ГП. Влияние малых доз низкоинтенсивной ионизирующей радиации на структуру и функции ДНК. *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2011;51(2):218–28.
Zhizhina GP. The effects of low doses of low-intensity ionizing radiation on DNA structure and function. *Radiation Biology. Radioecology.* 2011;51(2):218–28.
EDN: NSYSVF
7. Cacic AM, Schulz Fl, Germing U, Dietrich S, Gattermann N. Molecular and clinical aspects relevant for counseling individuals with clonal hematopoiesis of indeterminate potential. *Front. Oncol.* 2023;13:1303785.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1303785>
8. Jaiswal S. Clonal hematopoiesis and nonhematologic disorders. *Blood.* 2020;136(14):1606–14.
<https://doi.org/10.1182/blood.20190009899>
9. Reed SC, Croessmann S, Park BH. CHIP Happens: Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential and Its Relationship to Solid Tumors. *Clin Cancer Res.* 2023;29(8):1403–11.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-22-2598>
10. Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: A human perspective. *Cell Stem Cell.* 2012;10(2):120–36.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.01.006>
11. Watcham S, Kucinski I, Gottgens B. New insights into hematopoietic differentiation landscapes from single-cell RNA sequencing. *Blood.* 2019;133(13):1415–26.
<https://doi.org/10.1182/blood-2018-08-835355>
12. Eaves CJ. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood.* 2015; 125(17): 2605–13.
<https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-570200>
13. Nimmo RA, May GE, Enver T. Primed and ready: understanding lineage commitment through single cell analysis. *Trends. Cell. Biol.* 2015;25(8):459–67.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.04.004>
14. Lee-Six H, Øbro NF, Shepherd MS, Grossmann S, Dawson K, Belmonte M, et al. Population dynamics of normal human blood inferred from somatic mutations. *Nature.* 2018;561(7724):473–8.
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0497-0>
15. Mitchell E, Spencer Chapman M, Williams N, Dawson KJ, Mende N, Calderbank EF, et al. Clonal dynamics of haematopoiesis across the human lifespan. *Nature.* 2022;606(7913):343–50.
<https://doi.org/10.1038/s41586-022-04786-y>
16. Vijg J. From DNA damage to mutations: All roads lead to aging. *Ageing Res Rev.* 2021;68(101316).
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101316>
17. Vijg J. Pathogenic Mechanisms of Somatic Mutation and Genome Mosaicism in Aging. *Cell.* 2020;182(1):12–23.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.024>
18. Holstege H, Pfeiffer W, Sie D, Hulsman M, Nicholas TJ, Lee CC, et al. Somatic mutations found in the healthy blood compartment of a 115-yr-old woman demonstrate oligoclonal hematopoiesis. *Genome Res.* 2014;24(5):733–42.
<https://doi.org/10.1101/gr.162131.13>
19. Ainciburu M, Ezponda T, Berastegui N, Alfonso-Pierola A, Vilas-Zornoza A, San Martin-Uriz P, et al. Uncovering perturbations in human hematopoiesis associated with healthy aging and myeloid malignancies at single-cell resolution. *Elife.* 2023;12:e79363.
<https://doi.org/10.7554/eLife.79363>
20. Кацлакова АИ, Бидерман БВ, Паровичникова ЕН. Клональное кроветворение и острые миелоидные лейкозы. *Онкогематология.* 2023;18(3):92–101.
Kashlakova AI, Biderman BV, Parovichnikova E.N. Clonal hematopoiesis and acute myeloid leukemia. *Oncohematology.* 2023;18(3):92–101 (In Russ.).
<https://doi.org/10.17650/1818-8346-2023-18-3-92-101>
21. Петинати НА, Дризе НИ. Клональное кроветворение и его роль в развитии гематологических заболеваний. *Гематология и трансфузиология.* 2021;66(4):580–92.
Petinati NA, Drize NJ. Clonal hematopoiesis and its role in the development of hematological diseases. *Russian Journal of Hematology and Transfusionology.* 2021;66(4):580–92n (In Russ.).
<https://doi.org/10.35754/0234-5730-2021-66-4-580-592>
22. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N. Engl. J. Med.* 2014;371(26):2477–87.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1409405>
23. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N. Engl. J. Med.* 2014; 371(26):2488–98.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408617>
24. Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendt MC, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat. Med.* 2014;20(12):1472–8.
<https://doi.org/10.1038/nm.3733>
25. Steensma DP. Clinical consequences of clonal hematopoiesis of indeterminate potential. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 2018;2018(1):264–9.
<https://doi.org/10.1182/asheducation-2018.1.264>
26. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, Ebert BL. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2015;126(1):9–16.
<https://doi.org/10.1182/blood-2015-03-631747>
27. Cooper JN, Young NS. Clonality in context: hematopoietic clones in their marrow environment. *Blood.* 2017;130(22):2363–72.
<https://doi.org/10.1182/blood-2017-07-794362>
28. Valent P, Kern W, Hoermann G, Milosevic Feenstra JD, Sotlar K, Pfeilstöcker M, et al. Clonal hematopoiesis with oncogenic potential (CHOP): separation from CHIP and roads to AML. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(3):789.
<https://doi.org/10.3390/ijms20030789>
29. Cappelli LV, Meggendorfer M, Baer C, Nadarajah N, Hutter S, Jeromin S, et al. Indeterminate and oncogenic potential: CHIP vs CHOP mutations in AML with NPM1 alteration. *Leukemia.* 2022;36(2):394–402.
<https://doi.org/10.1038/s41375-021-01368-1>
30. Gondek LP. CHIP: is clonal hematopoiesis a surrogate for aging and other disease? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2021;2021(1):384–9.
<https://doi.org/10.1182/hematology.2021000270>
31. Yoshizato T, Dumitriu B, Hosokawa K, Makishima H, Yoshida K, Townsley D, et al. Somatic mutations and clonal hematopoiesis in aplastic anemia Somatic Mutations and Clonal Hematopoiesis in Aplastic Anemia. *N Engl J Med.* 2015;373(1):35–47.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1414799>
32. Babushok DV. A brief, but comprehensive, guide to clonal evolution in aplastic anemia. *Hematology. Am Soc Hematol Educ Program.* 2018;2018(1):457–66.
<https://doi.org/10.1182/asheducation-2018.1.457>
33. Colden MA, Kumar S, Munkhbileg B, Babushok DV. Insights Into the Emergence of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Front Immunol.* 2022;12:830172.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.830172>
34. Robertson NA, Latorre-Crespo E, Terradas-Terradas M, Lemos-Portela J, Purcell AC, Livesey BJ, et al. Longitudinal dynamics of clonal hematopoiesis identifies gene-specific fitness effects. *Nat Med.* 2022;28(7):1439–46.
<https://doi.org/10.1038/s41591-022-01883-3>
35. Bernstein N, Spencer Chapman M, Nyamondo K, Chen Z, Williams N, Mitchell E, et al. Analysis of somatic mutations in whole blood from 200,618 individuals identifies pervasive positive selection and novel drivers of clonal hematopoiesis. *Nat Genet.* 2024;56(6):1147–55.
<https://doi.org/10.1038/s41588-024-01755-1>
36. Demajo S, Ramis-Zaldivar JE, Muinos F, Grau ML, Andrianova M, Lopez-Bigas N. Identification of Clonal Hematopoiesis Driver Mutations through In Silico Saturation Mutagenesis. *Cancer Discov.* 2024;14(9): 1717–31.
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-23-1416>
37. Luis TC, Wilkinson AC, Beerman I, Jaiswal S, Shluss LI. Biological implications of clonal hematopoiesis. *Exp Hematol.* 2019;77:1–5.
<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2019.08.004>

38. Mooney L, Goodyear CS, Chandra T, Kirschner K, Copland M, Petrie MC, Lang NN. Clonal haematopoiesis of indeterminate potential: intersections between inflammation, vascular disease and heart failure. *Clin Sci (Lond)*. 2021;135(7):991–1007. <https://doi.org/10.1042/CS20200306>
39. Marnell CS, Bick A, Natarajan P. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP): Linking somatic mutations, hematopoiesis, chronic inflammation and cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2021;161:98–105. <https://doi.org/10.1016/j.jmcc.2021.07.004>
40. Dorsheimer L, Assmus B, Rasper T, Ortmann CA, Ecke A, Abou-El-Ardat K, et al. Association of Mutations Contributing to Clonal Hematopoiesis With Prognosis in Chronic Ischemic Heart Failure. *JAMA Cardiol*. 2019; 4(1):25–33. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2018.3965>
41. Jaiswal S, Natarajan P, Silver AJ, Gibson CJ, Bick AG, Shvartz E, et al. Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 2017;377(2):111–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1701719>
42. Heyde A, Rohde D, McAlpine CS, Zhang S, Hoyer FF, Gerold JM, et al. Increased stem cell proliferation in atherosclerosis accelerates clonal hematopoiesis. *Cell*. 2021;184(5):1348–61.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.049>
43. Fuster JJ, Walsh K. Somatic Mutations and Clonal Hematopoiesis: Unexpected Potential New Drivers of Age-Related Cardiovascular Disease. *Circ Res*. 2018;122(3):523–32. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.312115>
44. Sano S, Oshima K, Wang Y, MacLauchlan S, Katanasaka Y, Sano M, et al. Tet2-Mediated Clonal Hematopoiesis Accelerates Heart Failure Through a Mechanism Involving the IL-1 β /NLRP3 Inflammasome. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71(8):875–86. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.12.037>
45. Wang W, Liu W, Fidler T, Wang Y, Tang Y, Woods B, et al. Macrophage Inflammation, Erythrophagocytosis, and Accelerated Atherosclerosis in Jak2 V617F Mice. *Circ Res*. 2018;123(11):e35–e47. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313283>
46. Wolach O, Sellar RS, Martinod K, Cherpokova D, McConkey M, Chappell RJ, et al. Increased neutrophil extracellular trap formation promotes thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Sci Transl Med*. 2018;10(436):eaan8292. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan8292>
47. Fidler TP, Xue C, Yalcinkaya M, Hardaway B, Abramowicz S, Xiao T, et al. The AIM2 inflammasome exacerbates atherosclerosis in clonal haematopoiesis. *Nature*. 2021;592(7853):296–301. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03341-5>
48. Tyrrell DJ, Goldstein DR. Ageing and atherosclerosis: vascular intrinsic and extrinsic factors and potential role of IL-6. *Nat Rev Cardiol*. 2021;18(1):58–68. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0431-7>
49. Bouzid H, Belk JA, Jan M, Qi Y, Sarnowski C, Wirth S, et al. NHLBI Trans-Omics for Precision Medicine (TOPMed) Consortium. Clonal hematopoiesis is associated with protection from Alzheimer's disease. *Nat Med*. 2023;29(7):1662–70. <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02397-2>
50. Arends CM, Weiss M, Christen F, Eulenberg-Gustavus C, Rousselle A, Kettritz R, et al. Clonal hematopoiesis in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Haematologica*. 2020;105(6):e264–e267. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.223305>
51. Hamada N, Fujimichi Y. Classification of radiation effects for dose limitation purposes: history, current situation and future prospects. *J Radiat Res*. 2014;55(4):629–40. <https://doi.org/10.1093/jrr/rru019>
52. Zhang Y, Chen X, Wang X, Chen J, Du C, Wang J, Liao W. Insights into ionizing radiation-induced bone marrow hematopoietic stem cell injury. *Stem Cell Res Ther*. 2024;15(1):222. <https://doi.org/10.1186/s13287-024-03853-7>
53. Jasra S, Giricz O, Zeig-Owens R, Pradhan K, Goldfarb DG, Barreto-Galvez A, et al. High burden of clonal hematopoiesis in first responders exposed to the World Trade Center disaster. *Nat Med*. 2022;28(3):468–71. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01708-3>
54. Yoshida K, French B, Yoshida N, Hida A, Ohishi W, Kusunoki Y. Radiation exposure and longitudinal changes in peripheral monocytes over 50 years: the Adult Health Study of atomic-bomb survivors. *Br J Haematol*. 2019;185(1):107–15. <https://doi.org/10.1111/bjh.15750>
55. Brojakowska A, Kour A, Thel MC, Park E, Bisserier M, Garikipati VNS, et al. Retrospective analysis of somatic mutations and clonal hematopoiesis in astronauts. *Commun Biol*. 2022;5(1):828. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03777-z>
56. Котеров АН. От очень малых до очень больших доз радиации: новые данные по установлению диапазонов и их экспериментально-эпидемиологические обоснования. *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2013; 58(2):5–21.
- Котеров АН. From very low to very large doses of radiation: new data on ranges definitions and its experimental and epidemiological basing. *Medical radiology and radiation safety*. 2013;58(2):5–21 (In Russ.).
- EDN: **QEQHNM**
57. Котеров АН, Ушенкова ЛН, Калинина МВ, Бирюков АП. «Эффект здорового работника» по показателям общей смертности и смертности от злокачественных новообразований у персонала предприятий ядерной и химической индустрии: мета-анализы. *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2023; 68(4):43–50.
- Котеров АН, Ушенкова LN, Kalinina MV, Biryukov AP. “The healthy worker effect” in terms of overall mortality and mortality from malignant neoplasms among personnel of nuclear and chemical industry enterprises: meta-analyses. *Medical radiology and radiation safety*. 2023;68(4):43–50 (In Russ.). <https://doi.org/10.33266/1024-6177-2023-68-4-43-50>
58. Котеров АН. Избыточный относительный риск смертности от болезней системы кровообращения после облучения. Обзор и мета-анализ, декларирующих эффекты малых доз 2023 г. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2023;63(1):3–33.
- Котеров АН. Excess relative risk of mortality from diseases of the circulatory system after irradiation. Review and meta-analyses declaring the effects of low doses 2023. *Medical radiology and radiation safety*. 2023;63(1):3–33 (In Russ.). <https://doi.org/10.31857/S0869803123010095>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: А.А. Жернякова — разработка концепции статьи, обзор литературы, сбор и анализ литературных источников, написание текста; Е.О. Куневич — обзор литературы, сбор и анализ литературных источников, написание текста, рисунок; О.Б. Крысиюк — разработка концепции статьи, сбор и анализ литературных источников, редактирование статьи, окончательное одобрение рукописи.

ОБ АВТОРАХ

Жернякова Анастасия Андреевна, канд. мед. наук
<https://orcid.org/0000-0001-9260-3025>
zhernyakova@niigt.ru

Крысиюк Олег Богданович, д-р мед. наук, профессор
<https://orcid.org/0000-0002-5083-915X>
krysyuk@niigt.ru

Куневич Евгений Олегович, канд. мед. наук
<https://orcid.org/0000-0002-1706-6642>
kunevich17@gmail.com

УГРОЗЫ И РИСКИ ЗДОРОВЬЮ ПРИ ЧРЕЗВЫЧАЙНЫХ СИТУАЦИЯХ: МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ, ПРОГНОЗНО-АНАЛИТИЧЕСКИЕ И МАТЕМАТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

О.А. Мельников[✉], С.А. Краевой, В.Н. Болехан

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

Введение. Методология оценки угроз и рисков здоровью становится все более востребованной в решении задач государственного управления санитарно-эпидемиологическим благополучием населения. Развиваются новые медико-биологические, прогнозно-аналитические и математические подходы к оценке и анализу угроз и рисков здоровью при чрезвычайных ситуациях (ЧС), в том числе в рамках мониторинга биологических рисков. Появляется необходимость научно обоснованного рассмотрения указанной проблематики, используя в едином комплексе знания из различных научных областей, включая медицину, биологию, управление, прогнозирование, социологию, математику (теорию вероятностей, теорию множеств, теорию меры и др.). Для решения этой задачи авторы в процессе исследования основывались на принципе конвергентного подхода, уделяя особое внимание роли эффективного управления угрозами и рисками, которое оказывает существенное влияние на качество жизни людей, попадающих под действие неблагоприятных факторов при ЧС.

Цель. Совершенствование технологии анализа и прогнозирования угроз и рисков здоровью человека при чрезвычайных ситуациях на основе конвергентного мультидисциплинарного подхода.

Материалы и методы. В качестве основы для анализа нормативно-правовых материалов использовалась созданная в ФГБУ «ЦСП» ФМБА России база данных «Нормативные правовые акты радиационного, химического и биологического мониторинга». Информационной платформой для исследовательской работы послужила информационная система Федерального информационно-аналитического центра мониторинга биологических рисков ФМБА России, агрегирующая данные мониторинга биологических рисков, относящихся к компетенции ФМБА России. Для научного обоснования прогнозно-аналитической части исследования использовалась созданная в ФГБУ «ЦСП» ФМБА России база данных «Методы научного прогнозирования», содержащая систематизированную методологическую прогностическую информацию. К методам теоретического уровня, использованным в исследовании, относятся логические методы (анализ и синтез знаний, метод аналогий), математические методы (моделирования, теории вероятностей, теории меры, графов, множеств) и метод теоретического обобщения.

Результаты. В ходе исследования обобщены и систематизированы существующие подходы к оценке угроз и рисков здоровью, возникающие при чрезвычайных ситуациях, рассмотрены их основные характеристики и ключевые параметры. Проанализированы фазы процесса, связанного с возникновением угроз и рисков здоровью, и особенности управления ими. Изложены прогнозно-аналитические и математические аспекты рассматриваемой проблематики на примере алгоритма прогнозно-аналитического расчета показателей, характеризующих ресурсную возможность и готовность системы здравоохранения к адекватному ответу на угрозу биологического характера. Произведен расчет потребности кочевого фонда медицинских организаций и аппаратов искусственной вентиляции легких при эпидемии, вычислены конечные значения. Констатировано, что рассмотрение вышеупомянутых вопросов на основе комплексного конвергентного подхода формирует предпосылки для реализации эффективного управления угрозами и рисками здоровью при чрезвычайных ситуациях.

Выводы. Прогнозно-аналитические подходы базируются на передовых идеях и механизмах, включая риск-ориентированные технологии, цифровую паспортизацию территорий и объектов, активное использование геоинформационных разработок, методики оценки на базе сопряжения расчетных и натуральных данных, ситуационное моделирование при изменяющихся или задаваемых условиях, учет факторов сочетанного воздействия и т. д. Характеризуя риск через меру опасности здоровью, сочетающую вероятность реализации угроз здоровью при ЧС и последствия поражающих воздействий для жизни и здоровья, авторы определяют значение риска как математическое ожидание произведения функции оценки ущерба (последствий) здоровью организма/населения и вероятности совокупного воздействия поражающих факторов ЧС.

Ключевые слова: угрозы и риски здоровью; чрезвычайная ситуация; управление рисками; прогнозирование угроз и рисков; вероятность угроз; эпидемии; аппарат ИВЛ; кочевый фонд

Для цитирования: Мельников О.А., Краевой С.А., Болехан В.Н. Угрозы и риски здоровью при чрезвычайных ситуациях: медико-биологические, прогнозно-аналитические и математические аспекты. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2024;26(4):13–20. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-13-20>

Финансирование: работа выполнена без спонсорской поддержки.

Потенциальный конфликт интересов: В.Н. Болехан — член редакционной коллегии журнала «Медицина экстремальных ситуаций». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

[✉] Мельников Олег Александрович omelnikov@cspfmba.ru

Статья поступила: 06.08.2024 После доработки: 14.11.2024 Принята к публикации: 15.11.2024

THREATS AND RISKS TO HEALTH IN EMERGENCY SITUATIONS: BIOMEDICAL, PREDICTIVE ANALYTICAL, AND MATHEMATICAL ASPECTS

Oleg A. Melnikov[✉], Sergey A. Kraevoy, Vasily N. Bolekhan

Centre for Strategic Planning, Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russia

Introduction. The methodology for assessing health threats and risks is becoming increasingly in demand in the public management of the sanitary and epidemiological welfare of the population. New biomedical, predictive analytical, and mathematical approaches are being developed to assess and analyze health threats and risks in emergencies, including within biological risk monitoring. These issues require a scientifically based comprehensive consideration drawing on various scientific fields, including medicine, biology, management, prediction, sociology, and mathematics (probability theory, set theory, measure theory, etc.). To solve this problem, the authors adopted a convergent approach, paying special attention to the role of effective threat and risk management, which has a significant impact on the quality of life of people exposed to adverse factors in emergency situations.

Objective. To improve the technology for analyzing and predicting threats and risks to human health in emergencies using a convergent multidisciplinary approach.

© О.А. Мельников, С.А. Краевой, В.Н. Болехан, 2024

Materials and methods. The authors searched electronic bibliographic databases in the Russian (eLibrary and CyberLeninka) and English (Web of Science, Scopus, PubMed, Google Scholar, and Cochrane Library) languages. The database "Regulatory Legal Acts on Radiation, Chemical, and Biological Monitoring" created at the Centre for Strategic Planning of the Federal Medical and Biological Agency served as the basis for analyzing regulatory documents. As the information platform in this study, the authors used the information system of the Federal Information and Analytical Center for Monitoring Biological Risks, which aggregates data on the monitoring of biological risks falling within the competence of the Federal Medical and Biological Agency. The predictive and analytical part of the study was scientifically justified using the database "Methods of Scientific Prediction" created at the Centre for Strategic Planning, which contains systematized methodological prognostic information. The theoretical methods used in the study include logical methods (analysis and synthesis of knowledge; analogy method), mathematical methods (modeling, probability theory, measure theory, graph theory, and set theory), and the method of theoretical generalization.

Results. In the study, the existing approaches to assessing health threats and risks arising in emergency situations are summarized and systematized; their main characteristics and key parameters are considered. The phases of the process involving the emergence of threats and risks to health and the specifics of their management are analyzed. The scientific medical and biological point of view on the essence and general characteristics of health threats and risks is presented. The predictive analytical and mathematical aspects of the problem under consideration are outlined. An example algorithm for predictive and analytical calculation of indicators characterizing the resource capability and readiness of the healthcare system to adequately respond to a biological threat is described in detail. The required bed capacity of medical organizations is assessed, as well as the need for artificial lung ventilation devices in case of an epidemic; the final values are calculated. The analysis of the specified issues using a comprehensive convergent approach creates the prerequisites for effective management of health threats and risks in emergency situations.

Conclusions. Predictive and analytical approaches are based on advanced ideas and mechanisms, including risk-based technologies, digital certification of territories and objects, active use of geoinformation developments, assessment procedures drawing on the combination of estimated and field data, situation modeling under changing or specified conditions, consideration of combined impact factors, etc. Characterizing the risk through a health hazard measure that combines the probability of health threats occurring in an emergency and the consequences of adverse effects for life and health, the authors define the value of risk as the mathematical expectation of the product of a function for assessing damage (consequences) to the health of an organism/population and the probability of combined impact of adverse factors in an emergency.

Keywords: health threats and risks; emergency situation; risk management; prediction of threats and risks; threat probability; epidemics; ALV; bed capacity

For citation: Melnikov O.A., Kraevoy S.A., Bolekhan V.N. Threats and risks to health in emergency situations: biomedical, predictive analytical, and mathematical aspects. *Extreme Medicine*. 2024;26(4):13–20. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-13-20>

Funding: no funding support was received for this study.

Potential conflict of interests: Vasily N. Bolekhan is an editorial board member of the journal "Extreme Medicine". The other authors declare no conflict of interest.

✉ Oleg A. Melnikov omelnikov@cspfmba.ru

Received: 6 Aug. 2024 **Revised:** 14 Nov. 2024 **Accepted:** 15 Nov. 2024

ВВЕДЕНИЕ

На современном этапе методология оценки угроз и рисков здоровью становится все более востребованной в решении задач государственного управления санитарно-эпидемиологическим благополучием населения [4]. Актуальность и значимость этой проблематики объясняется прежде всего тем, что здоровье населения России считается основной ценностью страны и одним из наиболее важных критериев национальной безопасности. Такой подход обуславливает важность изучения сущности угроз и рисков здоровью человека.

При этом в рамках общей методологии развиваются новые медико-биологические, прогнозно-аналитические и математические подходы к оценке и анализу угроз и рисков здоровью при чрезвычайных ситуациях (ЧС) как в системе мониторинга биологических рисков ФМБА России, так и в государственной системе социально-гигиенического мониторинга. Появляется необходимость научно обоснованного разностороннего рассмотрения указанной проблематики, используя в едином комплексе знания из различных научных областей, включая медицину, биологию, управление, прогнозирование, социологию, математику (в том числе теорию вероятностей, теорию множеств, теорию меры и др.). Для решения данной задачи авторы в процессе исследования основывались на принципе конвергентного подхода, уделяя особое внимание роли эффективного управления угрозами и рисками, которое оказывает существенное влияние

на качество жизни людей, попадающих под воздействие неблагоприятных факторов при ЧС.

Цель работы — совершенствование технологии анализа и прогнозирования угроз и рисков здоровью человека при чрезвычайных ситуациях на основе конвергентного мультидисциплинарного подхода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве основы для анализа нормативно-правовых материалов использовалась созданная в ФГБУ «ЦСП» ФМБА России база данных «Нормативные правовые акты радиационного, химического и биологического мониторинга» [7]. Информационной платформой для исследовательской работы послужила информационная система Федерального информационно-аналитического центра мониторинга биологических рисков ФМБА России, агрегирующая данные мониторинга биологических рисков, относящихся к компетенции ФМБА России. Для научного обоснования прогнозно-аналитической части исследования использовалась созданная в ФГБУ «ЦСП» ФМБА России база данных «Методы научного прогнозирования», содержащая систематизированную методологическую прогнозистическую информацию [8].

К методам теоретического уровня, использованным в исследовании, относятся логические методы (анализ и синтез знаний, метод аналогий), математические методы (моделирования, теории вероятностей, теории меры, графов, множеств) и метод теоретического обобщения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ АНАЛИЗ

Первоисточник и эволюция понятия риска здоровью

Первоисточником понятия риска считается средневековый труд «Салернский кодекс здоровья» врача-алхимика Арнольда де Вилла Нова (Arnoldus de Villa Nova, жившего в период с 1235 по 1311 г.) из Салернской врачебной школы близ Неаполя, претендующей на звание самого раннегоВысшего научного медицинского учреждения в Европе. В своей работе ученый представил данные о различных обстоятельствах, приводящих к возникновению заболеваний, рассуждая в том числе о сочетанном действии нескольких обстоятельств, закладывая тем самым основы системного подхода к возникновению болезней [17].

В дальнейшем понимание сущности и оценки фактов риска здоровью претерпевали неоднократные эволюционные изменения, опираясь на различные зарубежные (США, Европа) и российские подходы (периода конца XX — начала XXI веков). Долгое время в практических исследованиях использовалась оценки атрибутивного риска, отвечающего на вопрос: «Какая часть текущего бремени болезней обусловлена накопленным эффектом всей предыдущей экспозиции?» [1].

В настоящее время актуальными становятся вопросы, касающиеся вероятности и тяжести медико-биологических последствий, наступающих после формирования и воздействия физических, химических и биологических факторов.

В статье рассмотрены физические, химические и биологические угрозы и риски здоровью граждан при чрезвычайных ситуациях природного или техногенного характера. Понятие чрезвычайной ситуации определено в ГОСТ Р 22.0.02-2016 как обстановка на определенной территории, сложившаяся в результате аварии, опасного природного явления, катастрофы, стихийного или иного бедствия, которые могут повлечь или повлекли за собой человеческие жертвы, ущерб здоровью людей или окружающей среде, значительные материальные потери и нарушение условий жизнедеятельности людей. Риск ЧС формулируется как мера опасности чрезвычайной ситуации, сочетающая вероятность возникновения чрезвычайной ситуации и ее последствия [3].

Дефиниции угроз и рисков: анализ современного законодательства Российской Федерации

Авторами был проведен анализ современного законодательства Российской Федерации, включая основные нормативные правовые акты и стандарты, определяющие понятия угроз и рисков. Среди общего перечня были выделены следующие документы: Закон РФ от 05.03.1992 № 2446-1 «О безопасности»; Федеральный закон (ФЗ) от 30.12.2020 № 492-ФЗ «О биологической безопасности в Российской Федерации»; Указ Президента Российской Федерации от 11.03.2019 № 97 «Об Основах государственной политики РФ в области обеспечения химической и биологической безопасности на период до 2025 года и дальнейшую перспективу»; «Руководство по оценке риска здоровью населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду» (Р 2.1.10.1920-04); ФЗ от 27.12.2002 № 184-ФЗ «О техническом регулировании»; «Руководство по оценке риска здоровью населения при воздействии химических веществ, загрязняющих среду обитания» (Р 2.1.10.3968-23);

ФЗ от 10.01.2002 № 7-ФЗ «Об охране окружающей среды»; ГОСТ Р 22.0.02-2016; ГОСТ Р 70620-2022; ГОСТ ISO 12100-2013 и т.д.

Результаты правового исследования показали, что понятийный аппарат, относящийся к категориям «угроз и рисков», в законодательстве РФ:

- 1) находится в едином информационном пространстве;
- 2) имеет одинаково выстроенные логические смысловые (сущностные) взаимосвязи между указанными понятиями, формирующими риски последствий в зависимости от видов и характера угроз;
- 3) не имеет противоречий;
- 4) логично различается в зависимости от областей применения.

Приведем некоторые определения. В целом «угроза безопасности» сформулирована в Законе РФ «О безопасности» как совокупность условий и факторов, создающих опасность жизненно важным интересам личности, общества и государства [5].

В федеральном законе «О биологической безопасности» биологическая угроза (опасность) — наличие потенциально опасных биологических объектов, а также наличие внутренних (находящихся на территории Российской Федерации) и внешних (находящихся за пределами территории РФ) опасных биологических факторов, способных привести к возникновению и (или) распространению заболеваний с развитием эпидемий, эпизоотий, эпифитотий, массовых отравлений, превышению допустимого уровня биологического риска. Биологический риск определен как вероятность причинения вреда (с учетом его тяжести) здоровью человека, животным, растениям и (или) окружающей среде в результате воздействия опасных биологических факторов [16].

В Руководстве Р 2.1.10.3968-23 опасность — совокупность свойств факторов среди обитания человека (или конкретной ситуации), определяющих способность вызывать неблагоприятные для здоровья эффекты при определенных условиях воздействия. В то же время риск рассматривается как характеристика опасности, зависящей от уровня экспозиции химического фактора и специфики фактического или потенциального его воздействия в конкретных условиях. Риск — вероятность причинения вреда жизни и здоровью граждан, имуществу физических и юридических лиц, государственному или муниципальному имуществу, среде обитания, жизни или здоровью животных и растений с учетом тяжести этого вреда. Риск для здоровья — вероятность нанесения вреда жизни и здоровью человека либо угрозы жизни или здоровью будущих поколений, в том числе с учетом тяжести этого вреда, обусловленная воздействием факторов среды обитания [14]. Другими словами, риск здоровью определяется как сочетание (произведение) вероятности нанесения ущерба и тяжести этого ущерба [9].

При этом в Руководстве Р 2.1.10.1920-04 уточняется, что риск, в отличие от опасности, является результатом фактического или потенциального воздействия химического соединения и зависит от экспозиции и специфики конкретных условий воздействия [13].

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ): опасности и риски здоровью

В практическом руководстве ВОЗ по биологической безопасности в лабораторных условиях опасный фактор

определен как объект или ситуация, которые могут вызвать негативные последствия при воздействии на организм, систему или группу (подгруппу) населения. Понятие риска определяется как сочетание вероятности возникновения инцидента и серьезности вреда (последствий), если этот инцидент возникнет. При этом подчеркивается, что опасный фактор не становится «риском» до тех пор, пока не будут учтены вероятность и последствия этого опасного фактора, вызывающего вред [19].

В четвертом издании руководства ВОЗ представлены результаты исследований того, как вероятность и последствия опасности влияют на риск здоровья [11]. Так, например, вероятность воздействия сигаретного дыма, представляющего собой распространенную опасность, зависит от ситуации. Воздействие будет наибольшим для курящего человека, умеренным — для пассивных курильщиков и наименьшим — для человека, использующего средства защиты органов дыхания или находящегося в зонах, свободных от курения. Последствия воздействия сигаретного дыма могут быть различными: от легкой тошноты и раздражения дыхательных путей до различных сердечных и легочных заболеваний, рака и даже смерти в зависимости от токсичности сигареты, частоты и продолжительности воздействия и других факторов, связанных с чувствительностью человека.

Фазы угроз и рисков здоровью при ЧС

Логика проведения исследования обусловила необходимость выделения трех основных фаз процесса, связанного с возникновением угроз и рисков здоровью и управления ими; соответствующие данные представлены на рисунке 1.

Фаза формирования угроз и потенциальных рисков (I) включает в себя следующие компоненты:

- 1) формирование и развитие ЧС (как источника угроз);
- 2) генерирование поражающих факторов физического (в том числе радиационного), химического и биологического характера и их проявлений;
- 3) наличие обстоятельств и создание условий, при которых возможен контакт химического, физического или биологического опасного агента с организмом человека.

Фаза реализации угроз и формирования реальных рисков (II) характеризуется поражающим воздействием физических, химических и биологических факторов на организм. Понятийный аппарат фазы (например,

при химическом воздействии) включает «экспозицию, дозу/концентрацию, эффект».

Фаза управления реальными рисками и ликвидации последствий ЧС (III) предусматривает медико-санитарную помощь по предотвращению и ликвидации ущерба здоровью. Так, например, при воздействии химических веществ на организм понятийный аппарат фазы включает в себя «ответ, заболевание и исход».

Медико-биологический взгляд на физические, химические и биологические угрозы и риски при ЧС

В зависимости от вида ЧС фазы могут иметь четкие границы либо размытые очертания, поскольку сформированное поражающее воздействие может носить кратковременный (иногда мгновенный) или затяжной временной характер. Краткосрочное воздействие происходит, например, при попадании в стоящую под деревом группу лиц грозовой молнии (грозовых разрядов природного происхождения). При этом поражающие факторы могут проявляться в различных формах: электромагнитного импульса, светового излучения, высокотемпературного эффекта, ударной волны. Воздействие может осуществляться на все системы организма: опорно-двигательную, дыхательную, сердечно-сосудистую, мочеполовую, эндокринную, нервную, систему органов чувств (сенсорную), зрительную и т.п. Это способно вызвать потерю зрения, судороги, паралич, инсульт, инфаркт, а иногда стать причиной хронических головных болей и проблем с памятью.

Принято считать, что прогнозирование природных ЧС вызывает сложности. Однако можно прогнозировать появление поражающих факторов и принимать предупреждающие меры по защите от их воздействия, тем самым снижая вероятность реализации угроз и рисков, а также уровень их воздействия на здоровье, то есть управлять угрозами и рисками здоровью.

Так, например, характерными для Якутии природными ЧС являются весенне-летние половодья. Паводок изменяет структуру и функциональные связи природных очагов и обуславливает широкое распространение возбудителей бактериальных, вирусных и риккетсиозных инфекций, значительно усиливает интенсивность контактов населения с природно-очаговыми территориальными комплексами. В период паводковой ситуации повышается риск возникновения инфекционных заболеваний (вирусного гепатита А, дизентерии, брюшного тифа). В зонах затопления имеют место нарушения водообеспечения,



Рисунок подготовлен авторами

Рис. 1. Фазы угроз и рисков при ЧС

возрастает опасность загрязнения рек нечистотами от скотомогильников и выгребных ям, пестицидами и нефтепродуктами со складов и др. В результате повышается вероятность возникновения эпизоотий и возрастает риск заражения человека инфекционными и паразитарными болезнями (лентоспирозом, туляремией, геморрагической лихорадкой с почечным синдромом, иерсиниозами, псевдотуберкулезом, токсоплазмозом и др.). Увеличивается нагрузка на инфекционные стационары. В связи со скученностью проживания пострадавших активизируется воздушно-капельный путь передачи возбудителей ОРВИ и т. д.

Якутскими специалистами был проведен анализ факторов, влияющих на максимальные уровни воды во время весеннего половодья, взаимодействие которых часто ведет к возникновению катастрофических наводнений. Для принятия эффективных решений с целью минимизации рисков было предложено математическое решение с использованием байесовских сетей. В частности, с помощью сети Байеса анализировали вероятность появления определенных состояний при различных сочетаниях выделенных факторов и объемов инвестиций в виде профилактических мероприятий [15].

Все ЧС, в результате которых происходит химическое загрязнение окружающей среды, сопряжены с длительным характером воздействия: например, горение промышленных отходов на полигоне, сопровождающееся выбросами в атмосферу и распространением токсичных для здоровья продуктов горения в направлении селитебной зоны. Предотвращение угрозы может лежать в границах упреждающих мер: от ликвидации свалки до эвакуации населения из зоны прогнозируемого распространения. По мнению экспертов, несмотря на разработанную в РФ обширную нормативную базу по допустимому содержанию химических веществ в атмосферном воздухе (1300 предельно допустимых концентраций (ПДК) и 450 ориентировочных безопасных уровней веществ (ОБУВ)), при обследовании источников выбросов в атмосферу загрязняющих веществ подавляющая их часть на данный момент не имеет разработанных и законодательно утвержденных гигиенических регламентов [12]. Это осложняет заблаговременное и оперативное планирование и управление медико-санитарными мерами по ликвидации последствий; иными словами — планирование и управление рисками.

В последние годы наблюдается рост числа заболеваний, связанных с новыми патогенными вирусами, с утяжелением течения вызванных ими болезней и вовлечением новых регионов, ранее «незнакомых» с этими заболеваниями. Опыт показал, что инфекционные заболевания, вызываемые новыми штаммами вирусов, которые имели высокую вирулентность и способность к многочисленным мутациям, на первых этапах сопровождались довольно тяжелым течением с высоким уровнем летальности к общему числу зараженных, а также трудно поддавались лечению с применением химиопрепаратов [2]. При этом около 20% заболевших нуждались в искусственной вентиляции легких. В этот период планирование и управление рисками объективно находились на недостаточном уровне, что сказывалось на эпидемиологии заболеваемости [10]. По мнению авторов, отсутствие иммунизации врачей и среднего медицинского персонала негативно сказывалось на ситуации, так как резкое сокращение количества действующих квалифицированных сотрудников увеличивало риск тяжелого течения и исхода болезней

у пациентов. Наиболее востребованными способами предотвращения угроз, вызванных эпидемиями и пандемиями, являются научно обоснованные санитарно-противоэпидемические (профилактические) мероприятия: профилактическая вакцинация, экстренная профилактика, дезинфекционные и режимно-ограничительные меры.

Научно-практическая оценка угроз и рисков здоровью и их основные характеристики

Оценка риска здоровью является одним из компонентов анализа риска, который включает в себя оценку риска, управление риском и информирование о риске. С точки зрения науки оценка риска — это последовательное системное рассмотрение всех аспектов воздействия анализируемого фактора на здоровье человека, включая обоснование допустимых уровней воздействия. В научно-практическом приложении обоснование задачи оценки риска состоит:

1) в получении и обобщении информации о возможном влиянии факторов среды обитания человека на состояние его здоровья;

2) в гигиеническом обосновании оптимального управляемого решения по устранению и снижению уровней риска;

3) в оптимизации контроля уровней экспозиции и рисков [14].

Исходя из вышеизложенного, угроза здоровью при ЧС определяется как совокупность явлений, процессов и факторов, способствующих (в условиях возникновения и развития ЧС природного или техногенного характера) формированию поражающих воздействий на организм физических, химических, биологических факторов, способных нанести ущерб здоровью населения. При этом риск здоровью при ЧС характеризуется также как мера опасности здоровью, сочетающая как вероятность реализации угроз здоровью при ЧС, так и последствия поражающих воздействий для жизни и здоровья человека и его будущих поколений.

Прогнозно-аналитические аспекты

Основой информационно-аналитического обеспечения процессов разработки и реализации управляемых решений служит мониторинг физических, химических и биологических рисков, социально-гигиенический мониторинг.

Этапами и компонентами аналитического и практического мониторинга являются: сбор информации, выявление угроз и рисков, их идентификация, верификация и анализ, ситуационное моделирование, прогнозирование развития ситуации в текущий период и на перспективу, разработка соответствующих решений. Результаты анализа и прогнозирования служат надежной основой для выработки медицинских, санитарно-эпидемиологических, гигиенических, социально-экономических и организационно-технических мер для эффективного управления, нацеленного на устранение и локализацию угроз и рисков ЧС.

В современной теории и практике прогнозирования существует значительное число различных методов [8], а также подходов к их применению. Эти подходы не ограничиваются использованием одного-единственного метода. Широко применяется комбинированное использование различных методов прогнозирования: например

метода информационного и компьютерного моделирования в сочетании с вероятностно-статистическими методами и т.п. Комбинированный подход в прогнозировании следует считать наиболее перспективным. Для повышения достоверности и точности прогнозов используется схема сравнения результатов различных методов прогнозирования, подтверждающих и дополняющих друг друга или демонстрирующих какие-либо расхождения в полученных прогнозных оценках для их корректировки.

Сегодня прогнозно-аналитические подходы базируются на передовых идеях и механизмах, включая рискоориентированные технологии, цифровую паспортизацию территорий и объектов, активное использование геоинформационных разработок, методики оценки на базе сопряжения расчетных и натуральных данных, ситуационное моделирование при изменяющихся или задаваемых условиях, учет факторов сочетанного воздействия и т.д. [20].

Математические аспекты оценки и прогнозирования угроз и рисков здоровью при ЧС

Характеризуя риск через меру опасности здоровью, сочетающую вероятность реализации угроз здоровью при ЧС и последствия поражающих воздействий для жизни и здоровья, значение риска можно определить как математическое ожидание произведения функции оценки ущерба (последствий) здоровью организма/населения и вероятности совокупного воздействия поражающих факторов ЧС (рис. 1).

$$R(x) = \int F(x) \times P(x) dx, \quad (1)$$

где R — риск;

X — поражающее воздействие;

$R(x)$ — интегральная мера риска;

$F(x)$ — функция оценки ущерба (последствий) здоровью при воздействии поражающего фактора;

$P(x)$ — вероятность формирования поражающего воздействия при ЧС.

Если для определения меры используется вероятностный подход и, соответственно, вероятностная функция, то в методике расчета следует применять законы теории вероятностей и математической статистики. В этом случае функция $F(x)$ имеет вероятностный характер. Результирующая интегральная функция $R(x)$ также является вероятностной, и ее значения $R(x)$ всегда меньше или равны единице.

Обозначим угрозу как Y , а вероятность угрозы (точнее, вероятность формирования поражающего воздействия) — $P(Y)$. Риск последствий здоровью обозначим как $P\pi$. Тогда вероятность риска последствий — $P(P\pi)$ — выразится через формулу произведения:

$$P(P\pi) = P(Y) \times P(P/Y), \quad (2)$$

где $P(P/Y)$ — условная вероятность наступления последствий (при условии совершившегося вероятностного события — воздействия поражающего фактора).

Из формулы (2) видно, что чем ниже вероятность угрозы, тем меньше риск. При отсутствии угрозы риск равен нулю. Аналогично: чем меньше условная вероятность наступления последствий при поражающем воздействии, тем меньше сам риск последствий. При отсутствии последствий риск равен нулю.

Дополнительная вероятность заболевания, ассоциированного с сочетанным действием климатических и химических факторов, рассчитывается на основе моделирования причинно-следственных связей с использованием множественного регрессионного анализа. При построении математических моделей используются данные о заболеваемости в разрезе классов болезней или нозологических форм, на которые оказывают совместное влияние и климатический фактор, и химические вещества, которые, в свою очередь, подвержены влиянию климатических факторов [9, 18].

В гигиенических подходах и расчетах различают априорный (прогностический) риск, базирующийся на дозоэффективных гигиенически-нормируемых воздействиях, и апостериорный (реальный) риск, опирающийся на статистическую оценку фактически свершившихся событий.

Пример алгоритма прогнозно-аналитического расчета показателей, характеризующих ресурсную возможность системы здравоохранения к адекватному ответу на угрозу биологического характера

Рассмотрим конкретный пример и рассчитаем конечные значения. Условия задачи: В городе Z с населением 10 тыс. человек за период (T) от инфекционного заболевания «Х» в ходе эпидемии заболело 1000 чел. — (M), госпитализировано 200 чел. — (A), из-за тяжелого состояния на ИВЛ переведено 20 чел. — (E). При этом в тот же период T от традиционно характерных для данного города и времени года заболеваний (далее — «традицион. забол.») зафиксировано 100 больных (N), госпитализировано — 10 (C), ИВЛ потребовался для 2 заболевших (F). Необходимо произвести прогнозный расчет резерва госпитальных мест и аппаратов ИВЛ для города R с населением 12 тыс. человек в условиях предстоящей эпидемии «Х» за аналогичный период (T), если известно, что социально-экономические и санитарно-гигиенические характеристики в городах схожи. Все события, связанные с заболеванием разными болезнями, несовместны.

Для решения поставленной задачи воспользуемся методом построения прогнозного графа — дерева элементарных событий группы логических и класса formalизованных методов прогнозирования [6]. Первоначально проведем расчет апостериорных оценок для города Z с помощью графа, в котором элементарные события изображаются вершинами цепочек, идущими от начальной вершины Z к конечным вершинам; соответствующие данные представлены на рисунке 2.

Вероятность распространения заболевания в городе Z при эпидемии вычисляется по формуле: $P_{ZM} = M/Z = 1000/10\ 000 = 0,1$. По аналогии: вероятность заболевания традиционной нозологией равна $P_{ZN} = 0,01$; вероятность госпитализации при эпидемии $P_{MA} = 0,2$; вероятность госпитализации при традиционных болезнях $P_{NC} = 0,1$; вероятность применения аппарата ИВЛ в медорганизации при эпидемии $P_{AE} = 0,1$; вероятность использования ИВЛ при традиционных заболеваниях $P_{CF} = 0,2$.

Преобразуем дерево событий в вероятностный граф, где ребрами дерева являются вероятности совершения событий цепочки (рис. 3).

Чтобы найти вероятность элементарного события, то есть цепочки, необходимо перемножить условные вероятности вдоль этой цепочки. Так, вероятность госпитализации от инфекционного заболевания «Х» равна

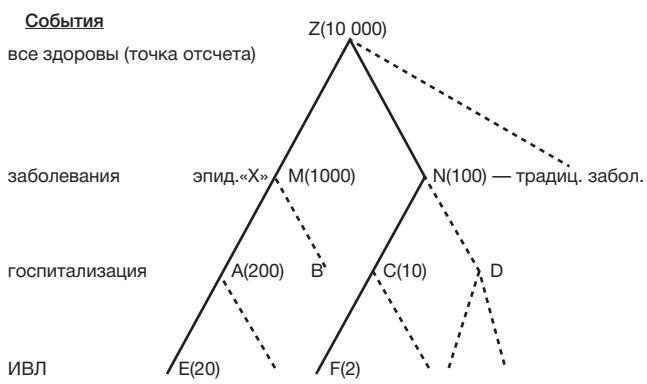


Рисунок подготовлен авторами

Рис. 2. Граф дерева элементарных событий

Примечание: значение в скобках — указано количество лиц, вовлеченных в элементарные события: заболевших, госпитализированных, находящихся на ИВЛ; прерывистая линия — пути перехода к альтернативным и/или незначимым для рассмотрения событиям.

$P_{ZMA} = P_{ZM} \times P_{MA} = 0,1 \times 0,2 = 0,02$, где P_{ZM} — вероятность заболевания от эпидемии, P_{MA} — условная вероятность госпитализации при условии заболевания болезнью «Х».

При этом вероятность госпитализации по городу Z равна суммарной вероятности элементарных событий $P_{\text{госп}} = P_{ZMA} + P_{ZNC} = P_{ZM} \times P_{MA} + P_{ZN} \times P_{NC} = 0,021$. По аналогии вероятность применения ИВЛ по городу Z равна $P_{\text{ивл}} = P_{ZMAE} + P_{ZNCF} = 0,0022$.

Прогнозный априорный расчет резерва госпитальных мест и аппаратов ИВЛ для города R с населением 12 тыс. человек в условиях предстоящей эпидемии «Х» за период T производится по следующим формулам:

- коекочный резерв госпитализируемых: $R \times P_{\text{госп}} = 12000 \times 0,021 = 252$.
- резерв аппаратов ИВЛ: $R \times P_{\text{ивл}} = 12000 \times 0,0022 = 26,4$; то есть не менее 27 аппаратов.

Еще одним методом прогнозирования, приемлемым для расчета в условиях эпидемии, является моделирование с использованием компартментных моделей (в частности, SIR-моделей), описывающих распространение заболевания и делящих население на группы, называемые компартментами. Модели SIR (Susceptible — Infected —

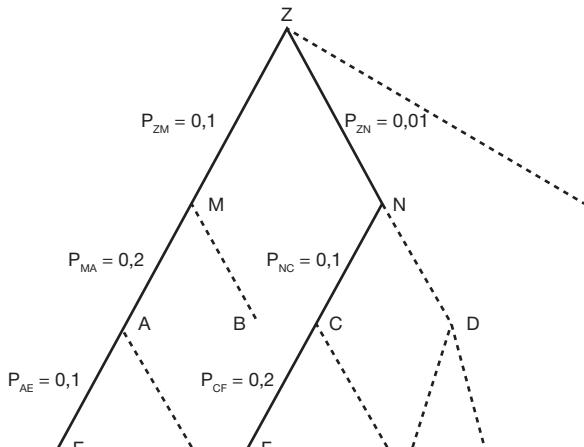


Рисунок подготовлен авторами

Рис. 3. Граф дерева вероятностей

Примечание: прерывистая линия — пути перехода к альтернативным и/или незначимым для рассмотрения событиям.

Recovered) основаны на системе дифференциальных уравнений, которые выражают динамику между различными эпидемиологическими состояниями населения, где выздоровление обеспечивает относительно длительную резистентность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение необходимо констатировать, что рассмотрение изложенных вопросов на основе комплексного подхода формирует благоприятные предпосылки для выработки решений по эффективному управлению угрозами и рисками здоровью при чрезвычайных ситуациях. В процессе исследования авторы опирались на знания из различных научных областей, основываясь при этом на принципе конвергентного подхода. Реализация этого принципа позволит создать условия для выработки мер по снижению и ликвидации угроз и рисков здоровью для обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения России и ее будущих поколений.

Литература / References

- Арtyухов ИП, Сульдин СА, Протасова НП. Методические подходы к оценке факторов риска здоровью населения. *Сибирское медицинское обозрение*. 2012;6:80–5.
Artyukhov IP, Suldin SA, Protasova NP. Methodological approaches to the assessment of public health risk factors. *Siberian Medical Review*. 2012;6:80–5 (In Russ.).
EDN: [PUMKOP](https://doi.org/10.15686/07ECOR420)
- Воробьев АЕ. Особенности борьбы с вирусной эпидемией на современном этапе развития человечества. *Отходы и ресурсы*. 2020(4):7:1–11.
Vorobyov AE. Features of the fight against the viral epidemic at the present stage of human development. *Waste and resources*. 2020(4):7:1–11 (In Russ.).
<https://doi.org/10.15862/07ECOR420>
- ГОСТ Р 22.0.02-2016. Национальный стандарт Российской Федерации. Безопасность в чрезвычайных ситуациях. Термины и определения. GOST R 22.0.02-2016. The national standard of the Russian Federation. Safety in emergency situations. Terms and definitions. (In Russ.)
- Зайцева НВ, Онищенко ГГ, Май ИВ, Шур ПЗ. Развитие методологии анализа риска здоровью в задачах государственного управления санитарно-эпидемиологическим благопо-
- лучием населения. *Анализ риска здоровью*. 2022;3:4–20.
Zaitseva NV, Onishchenko GG, May IV, Shur PZ. Development of the methodology of health risk analysis in the tasks of state management of sanitary and epidemiological welfare of the population. *Health risk analysis*. 2022;3:4-20 (In Russ.).
<https://doi.org/10.21668/health.risk/2022.3.01>
- Закон Российской Федерации 2446-1 «О безопасности». Москва: Верховный Совет Российской Федерации; 05.03.1992.
The Law of the Russian Federation 2446-1 “On Security”. Moscow: Supreme Council of the Russian Federation; 05.03.1992 (In Russ.).
- Мельников О.А. Научное прогнозирование: понятие и классификация методов. *Наукосфера*. 2023;11(2):159–68.
Melnikov OA. Scientific forecasting: the concept and classification of methods. *Nauko-sfera.ru*. 2023;11(2):159–68 (In Russ.).
<https://doi.org/10.5281/zenodo.10203777>
- Мельников ОА, Савостикова ОН, Краевой СА, Болехан ВН. Нормативные правовые акты радиационного, химического и биологического мониторинга. Свидетельство о регистрации базы данных № 2024624158; 2024.
Melnikov OA, Savostikova ON, Kraevoy SA, Bolekhan VN. Regulatory legal acts of radiation, chemical and biological moni-

- toring. Database registration certificate No. 2024624158; 2024 (In Russ.).
8. Мельников ОА, Савостикова ОН, Юдин СМ, Краевой СА, Слободян ВГ, Болехан ВН. Методы научного прогнозирования. Свидетельство о регистрации базы данных № 2024621983; 2024. Melnikov OA, Savostikova ON, Yudin SM, Kraevoy SA, Slobodyan VG, Bolekhan VN. Methods of scientific forecasting. Database registration certificate No. 2024621983; 2024 (In Russ.). EDN: [QURYDF](#)
 9. Онищенко ГГ. Актуальные проблемы и перспективы развития методологии анализа риска в условиях современных вызовов безопасности для здоровья населения Российской Федерации. *Анализ риска здоровью*. 2023;4:4–18. Onishchenko GG. Actual problems and prospects for the development of risk analysis methodology in the context of modern safety challenges for the health of the population of the Russian Federation. *Health risk analysis*. 2023;4:4–18 (In Russ.). <https://doi.org/10.21668/health.risk/2023.4.01>
 10. Орлов СА, Александрова ОЮ. Современные проблемы оценки готовности национальных систем здравоохранения к биологическим угрозам (литературный обзор). *Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях*. 2024;1:108–17. Orlov SA, Alexandrova OY. Modern problems of assessing the readiness of national health systems to biological threats (literary review). Biomedical and socio-psychological problems of safety in emergency situations. 2024;1:108–17 (In Russ.). <https://doi.org/10.25016/2541-7487-2024-0-1-108-117>
 11. Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях, четвертое издание, и тематические монографии. Всемирная организация здравоохранения. 2022. Laboratory biosafety manual, fourth edition and associated monographs. World Health Organization. 2022 <https://www.who.int/publications/i/item/9789240011311>
 12. Рахманин ЮА, Додина НС, Алексеева АВ. Современные методические подходы к оценке риска здоровью населения от воздействия химических веществ. *Анализ риска здоровью*. 2023;4:33–41. Rakhmanin YA, Dodina NC, Alekseeva AV. Modern methodological approaches to assessing the risk to public health from exposure to chemicals. *Health risk analysis*. 2023;4:33–41 (In Russ.). <https://doi.org/10.21668/health.risk/2023.4.03>
 13. Руководство по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду 2.1.10.1920-04. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. Guidelines for assessing the risk to public health from exposure to chemicals that pollute the environment 2.1.10.1920-04. Moscow: Federal Center for State Sanitary and Epidemiological Supervision of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2004 (In Russ.).
 14. Руководство по оценке риска здоровью населения при воздействии химических веществ, загрязняющих среду обитания 2.1.10.3968-23. М.: Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения, 2023. Guidelines for assessing the risk to public health from exposure to chemicals that pollute the environment 2.1.10.3968-23. Moscow: Federal Service for Supervision of Healthcare, 2023 (In Russ.).
 15. Стручкова ГП, Капитонова ТА, Слепцов ОИ. Использование байесовских сетей для анализа рисков наводнений во время весеннего половодья на участке р. Лена возле п. Табага. *Проблемы безопасности и чрезвычайных ситуаций*. 2022;5:33–44. Struchkova GP, Kapitonova TA, Sleptsov OI. Using Bayesian networks to analyze flood risks during the spring flood in the Lena River section near Tabaga. *Security and emergency issues*. 2022;5:33–44. <https://doi.org/10.36535/0869-4176-2022-05-3>
 16. Федеральный закон Российской Федерации 492-ФЗ «О биологической безопасности в Российской Федерации». Москва: Совет Федерации Федерального Собрания Российской Федерации; 25.12.2020. Federal Law of the Russian Federation 492-FZ "On biological safety in the Russian Federation". Moscow: Federation Council of the Federal Assembly of the Russian Federation; 25.12.2020 (In Russ.)
 17. Шиган ЕЕ. История возникновения понятия «риск здоровью» и его место в развитии профилактической медицины. *Анализ риска здоровью*. 2016;2:4–9. Shigan EE. The history of the concept of "health risk" and its place in the development of preventive medicine. *Health risk analysis*. 2016;2:4–9 (In Russ.). EDN: [XFBDHP](#)
 18. Шур ПЗ, Хасанова АА, Цинкер МЮ, Зайцева НВ. Методические подходы к оценке риска здоровью населения в условиях сочетанного воздействия климатических факторов и обусловленного ими химического загрязнения атмосферы. *Анализ риска здоровью*. 2023;2:58–68. Shur PZ, Khasanova AA, Tsinker MYu, Zaitseva NV. Methodological approaches to assessing the risk to public health in conditions of combined exposure to climatic factors and chemical pollution of the atmosphere caused by them. *Health risk analysis*. 2023;2:58–68 (In Russ.). <https://doi.org/10.21668/health.risk/2023.2.05>
 19. Laboratory biosecurity guidance. Geneva: World Health Organization; 2024.
 20. Yang J, Huang W, Huang Q, Hu H. An investigation on the coupling of data-driven computing and model-driven computing. *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering*. 2022; 393(6):114–9. <https://doi.org/10.1016/j.cma.2022.114798>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: О.А. Мельников — поиск и сбор первичных данных, обобщение прогнозно-аналитических результатов исследований и их математическая интерпретация, сбор и анализ нормативной правовой базы, систематизация данных, разработка дизайна исследования, подготовка расчетов, иллюстративного материала и черновика рукописи; С.А. Краевой — разработка концепции исследования, обобщение результатов анализа законодательной базы, организационно-методическое сопровождение, редактирование статьи; В.Н. Болехан — разработка концепции исследования, анализ медико-биологических результатов, научно-методическое сопровождение, редактирование статьи.

ОБ АВТОРАХ

Мельников Олег Александрович
omelnikov@cspfmba.ru

Краевой Сергей Александрович, канд. мед. наук,
<https://orcid.org/0000-0003-1775-9235>
skraevoy@cspfmba.ru

Болехан Василий Николаевич, д-р мед. наук
<https://orcid.org/0000-0002-2627-5534>
vbolekhan@cspfmba.ru

<https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-21-26>

СУБСТАНЦИЯ Р И СТРЕСС АССОЦИРОВАНЫ С РАЗВИТИЕМ ХРОНИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЫ

Н.В. Микрюкова^{1✉}, Н.М. Калинина^{1,2}

¹ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Аллергические заболевания являются актуальной проблемой практического здравоохранения и в последнее десятилетие привлекают все более пристальное внимание врачей различных специальностей. Ведущим звеном в патогенезе стресс-индуцированной крапивницы является нейрогенное иммунное воспаление, сопровождающееся повышением уровня нейропептида субстанции Р (SP).

Цель. Анализ взаимосвязи между стрессорным фактором и уровнем субстанции Р с последующим обоснованием показателя в качестве биомаркера для оценки клинического течения и прогноза заболевания у пациентов с хронической крапивницей.

Материалы и методы. Исследование проведено с участием 165 взрослых в возрасте от 18 до 68 лет. В основную группу были включены 97 пациентов с подтвержденным диагнозом хронической крапивницы (ХК), проходивших лечение в клинике в период с 2018 по 2023 г. Группу сравнения составили 68 практически здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту с исследуемой группой пациентов. Уровень субстанции Р в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа (Infinite F50 Tecan, Австрия) с использованием тест-системы CEA393Hu. Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием программного комплекса STATA 18 (StataCorp LLC).

Результаты. Отмечалось повышение продукции субстанции Р у пациентов с ХК 220,62 pg/ml по отношению к группе сравнения — 96,57 pg/ml, $p < 0,001$. При анализе логистической регрессии выявлена ассоциация между стрессом, уровнем субстанции Р у пациентов с ХК и установлено, что при увеличении концентрации субстанции Р на 1 pg/ml шанс возникновения ХК увеличивался в 1,02 раза, при наличии стрессовой ситуации в качестве триггера риск развития ХК повышался в 3 раза.

Выводы. С помощью построения мультивариантной модели логистической регрессии получены положительные значения параметров модели (с уровнем значимости $p \leq 0,01$), указывающие на то, что именно воздействие стресс-фактора и повышение концентрации субстанции Р в крови ассоциировано с увеличением шанса возникновения хронической крапивницы. На основании полученных данных концентрация субстанции Р в крови пациентов с ХК может рассматриваться в качестве потенциального диагностического биомаркера, который можно рекомендовать для расширения панели скрининговых тестов, уточняющих патогенез возникновения заболевания, что позволит улучшить дифференциальную диагностику нозологии и обеспечить раннее выявление пациентов со стресс-индуцированной крапивницей.

Ключевые слова: субстанция Р; стресс; хроническая крапивница; тучная клетка

Для цитирования: Микрюкова Н.В., Калинина Н.М. Субстанция Р и стресс ассоциированы с развитием хронической крапивницы. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2024;26(4):21–26. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-21-26>

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России в рамках НИР «Клинико-лабораторная диагностика хронической крапивницы у взрослых».

Соответствие принципам этики: исследование одобрено на заседании независимого этического комитета ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России (протокол № 6/21 от 24.06.2021). Все пациенты и здоровые добровольцы подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Потенциальный конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

✉ Микрюкова Наталья Васильевна natalya@mikryukov.info

Статья поступила: 06.08.2024. После доработки: 18.11.2024. Принята к публикации: 19.11.2024.

SUBSTANCE P AND STRESS ARE ASSOCIATED WITH THE DEVELOPMENT OF CHRONIC URTICARIA

Natalya V. Mikryukova^{1✉}, Natalia M. Kalinina^{1,2}

¹ Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russia

² First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, St. Petersburg, Russia

Introduction. Allergic diseases are a pressing challenge in practical healthcare, attracting increased attention of various medical specialists. The pathogenesis of stress-induced urticaria is driven by neurogenic immune inflammation, accompanied by an increase in the level of neuropeptide substance P (SP).

Objective. Assessment of the relationship between stress factors and substance P levels with the purpose of justifying the use of SP as a biomarker for assessing the clinical course and prognosis of the disease in patients with chronic urticaria.

Materials and methods. The study involved 165 adults aged 18–68 years. The main group included 97 patients with the confirmed diagnosis of chronic urticaria (CU) who were treated in a hospital setting in the period from 2018 to 2023. The comparison group included 68 practically healthy individuals, comparable in gender and age with the study group of patients. The level of substance P in the blood serum was estimated by immunoenzymatic techniques (Infinite F50 Tecan, Austria), using a CEA393Hu test system. Statistical processing of the results was performed using the STATA 18 software package (StataCorp LLC).

Results. An increase in the production of substance P to 220.62 pg/mL in CU patients, compared to 96.57 pg/mL in the reference group ($p < 0.001$), was observed. The logistic regression revealed an association between stress and substance P levels in CU patients. Thus, an increase in the concentration of substance P by 1 pg/mL led to a 1.02-fold increase in the CU risk. The CU risk increased by 3 times in the presence of a stress situation as a trigger.

Conclusions. The constructed multivariate logistic regression model produced positive values of the model parameters ($p \leq 0.01$). This indicates the correlation between the increased blood levels of substance P under the impact of stress factors and the risk of chronic urticaria development. The data obtained suggests that the concentration of substance P in the blood of CU patients can be considered as a potential diagnostic biomarker. This biomarker can be recommended for extending panel screening tests to clarify the pathogenesis of the disease, thus improving the differential diagnosis of the disease and facilitating early detection of patients with stress-induced urticaria.

Keywords: substance P; stress; chronic urticaria; mast cell

© Н.В. Микрюкова, Н.М. Калинина, 2024

For citation: Mikryukova N.V., Kalinina N.M. Substance P and stress are associated with the development of chronic urticaria. *Extreme Medicine.* 2024;26(4):21–26. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-21-26>

Funding: the study was carried out within the framework of the research project “Clinical and laboratory diagnostics of chronic urticaria in adults” of Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine.

Compliance with the principles of ethics: the study was approved by the Ethics Committee of the Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine (Protocol No. 6/21 06/24/2021). All participants signed a voluntary informed consent to participate in the study.

Potential conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

✉ Natalya V. Mikryukova natalya@mikryukov.info

Article received: 6 Aug. 2024. **Revised:** 18 Nov. 2024. **Accepted:** 19 Nov. 2024.

ВВЕДЕНИЕ

Аллергические заболевания являются актуальной проблемой практического здравоохранения и в последнее десятилетие привлекают все более пристальное внимание врачей различных специальностей. В настоящее время именно взаимосвязь иммунологического и нейрогенного звеньев рассматривается в качестве ведущего механизма в формировании воспалительной реакции при аллергических заболеваниях.

В современной аллергологии крапивница представляет серьезную проблему, занимая по частоте встречаемости третье место после аллергического ринита и бронхиальной астмы [1].

Стресс — собирательный термин, обозначающий ряд физиологических реакций организма в ответ на воздействие неблагоприятных факторов внешней среды [2], охватывающий три взаимосвязанных понятия: стимулы (как внутренние, так и внешние), которые вызывают стресс; физиологические и поведенческие реакции, активируемые в ответ на эти стимулы; и патологические последствия чрезмерной стимуляции. Психогенные воздействия выступают в качестве звена в череде последовательных иммунологических событий и приводят к обострению заболевания, находясь в тесной связи с основными факторами патогенеза [3].

В настоящее время иммунологи придерживаются концепции нейрогенного воспаления как основного звена в формировании/обострении хронической крапивницы (ХК), которое обусловлено чрезмерным высвобождением гипotalамических нейропептидов, сопряженных с нейропептидами кожи, продукирующими в кератиноцитах, эндотелиальных клетках и др. Большинство исследователей не исключают того, что именно психические факторы могут потенцировать течение аллергических заболеваний. Некоторыми авторами подчеркивается также факт обострения течения крапивницы на фоне напряжения психоэмоциональной сферы под влиянием отрицательных эмоций [4]. При этом активация корковых областей вследствие стресса приводит к изменению производства SP надпочечниками и нисходящими вегетативными волокнами [5].

Исследования последних лет подтверждают значимость стресса в развитии ХК [6, 7]; были изучены тревожность и беспокойство, а также выявлена высокая частота посттравматического стрессового расстройства среди пациентов с данной нозологией [8, 9]. У значительной части пациентов с хронической крапивницей (ХК) в анамнезе наблюдали стрессовые ситуации задолго до появления симптомов и признаков данного заболевания [10]. Психогенные воздействия приводят к стимуляции оси

«гипоталамус — гипофиз», сопряженной с активацией центров вегетативной нервной системы и высвобождением нейротрансмиттеров (нейропептидов и гормонов), действующих на эффекторные системы организма (иммунную, сердечно-сосудистую, а также на кожные покровы) [5, 11]. Хронические стрессорные факторы приводят к увеличению плотности кожных нервных волокон, повышению продукции тучных клеток, фактора роста нервов (NGF) и отдельных нейропептидов [12].

F. Wang, T.B. Yang, B.S. Kim в экспериментах на животных продемонстрировали активацию тучных клеток (ТК) как мозга, так и кожи в условиях воздействия стрессовых факторов [13].

Тучные клетки экспрессируют множество рецепторов, которые позволяют распознавать и реагировать на широкий спектр инфекционных патогенов и эндогенных молекул, вырабатываемых поврежденными тканями. Так, на ТК экспрессируется высокоаффинный рецептор иммуноглобулина Е (Fc ϵ RI) и рецептор тирозинкиназы (KIT), играющие важную роль в развитии аллергических реакций и в иммунном ответе при глистной инвазии [14]. Вместе с тем тучные клетки экспрессируют микробные рецепторы распознавания образов: Toll-подобный рецептор (TLR) и NOD-подобный рецептор [14]. Аларминовые рецепторы семейства интерлейкинов, например для IL-33 и рецептор для тимического стромального лимфопоэтина (TSLP), посредством которого ТК участвует в иммунном воспалении Th2-типа [15]. Mas-связанный с G-белком рецептор X2 (MRGPRX2) распознает нейропептиды, антимикробные пептиды и пептиды яда насекомых. Кроме того, эти рецепторы присутствуют и на других эффекторных клетках иммунной системы — базофилах и эозинофилах [16].

Мембранный белок группы адгезивных рецепторов, сопряженных с G-белком (adhesion G protein-coupled receptor E2, ADGRE2), является механическим сенсором в тучных клетках. Он вызывает дегрануляцию в ответ на воздействие вибрации у людей, страдающих от вибрационной крапивницы, и может сигнализировать о проникновении и миграции гельминтов через кожу [17]. Таким образом, тучные клетки играют важную роль в защите человека от гельминтов, бактерий, ядов животных и насекомых. Высвобождение кортикотропин-рилизинг-фактора из эозинофилов и сенсорных нейронов (при стрессе) приводит к дегрануляции ТК через рецепторы кортикотропин-рилизинг-гормона [12].

Часто встречается крапивница, причиной развития/обострения которой выступает стрессовый фактор, при этом ведущим звеном патогенеза является нейрогенное иммунное воспаление, сопровождающееся повышением уровня нейропептида субстанции Р (SP) [12].

Субстанция Р — нейропептид периферических окончаний чувствительных С-волокон кожи, который обладает широким спектром прямых и непрямых биологических эффектов, приводящих к таким патофизиологическим реакциям, как отек, вазодилатация и судороги [17].

Субстанция Р экспрессируется в центральной и периферической нервной системе, иммунных клетках и является нейропептидом, биологическая активность которого проявляется через два рецептора на клеточной мембране: нейрокининовый receptor, связанный с G-белком (NKR), и MRGPRX2. Известно, что у пациентов с хронической крапивницей ТК экспрессируют MRGPRX2 в большем количестве [18], а нейромедиатор SP является наиболее информативным диагностическим маркером у пациентов с ХК [19].

Активация NKR опосредует нейронные сигнальные пути, связанные с возникновением ощущений и различных эмоциональных реакций.

Субстанция Р (SP) играет важную роль в ощущении боли, поскольку передает информацию о повреждении тканей от периферических рецепторов в центральную нервную систему, где она преобразуется в болевые ощущения. Пока болевые сигналы передаются по аксонам соматосенсорной области мозга, сенсорные нейроны также выделяют SP в области поврежденной ткани [20]. В дальнейшем это приводит к дегрануляции тучных клеток, расширению сосудов за счет расслабления гладкой мускулатуры сосудов и хемотаксису клеток иммунной системы. Такое взаимодействие между иммунной и нервной системами называется нейрогенным воспалением [21]. Кроме того, исследования показали, что SP увеличивает экспрессию молекул адгезии эндотелия и лейкоцитов на микрососудистых эндотелиальных клетках, что приводит к диапедезу лейкоцитов [22]. Существуют примеры синергетического действия различных триггеров тучных клеток. Так, А. Тараканова и соавт. показали, что SP увеличивает экспрессию рецептора IL-33 ST2, а IL-33 увеличивает экспрессию NKR на тучных клетках человека [23], что приводит к увеличению секреции IL-1 β — ключевого провоспалительного цитокина.

Тем не менее на данный момент нет единого гармонизированного представления развития нейрогенного воспаления при ХК. В современных клинических протоколах по ведению пациентов с ХК данному звену патогенеза отводится второстепенная роль.

Цель работы: анализ взаимосвязи между стрессорным фактором и уровнем субстанции Р с последующим обоснованием показателя в качестве биомаркера для оценки клинического течения и прогноза заболевания у пациентов с хронической крапивницей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проведена на базе ФГБУ ВЦЭРМ имени А.М. Никифорова МЧС России. В исследование были включены 165 взрослых в возрасте от 18 до 68 лет, из них 89 мужчин и 76 женщин. В основную группу было включено 97 пациентов (мужчин — 45, женщин — 52) с подтвержденным диагнозом хронической крапивницы, получавшими лечение в клинике в период с 2018 по 2023 г. Группу сравнения составили 68 практически здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту с основной группой, без симптомов крапивницы и иной аллергической/соматической патологии [24].

Критерием включения пациентов в основную группу было наличие рецидивирующих уртикарных высыпаний и/или ангиоотеков в течение более 6 недель. Диагноз хронической крапивницы устанавливался в соответствии с Федеральными клиническими рекомендациями по диагностике и лечению крапивницы [25].

В ходе исследования у пациентов был собран анамнез заболевания и жизни. При опросе уточнялись вопросы, составившие основу для формирования группы факторов риска развития/обострения хронической крапивницы, отдельное внимание уделено стрессовым факторам как потенциальным триггерам возникновения/обострения ХК.

У пациентов с хронической крапивницей и лиц из группы сравнения определяли уровень субстанции Р в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа (Infinite F50 Tecan, Австрия) с использованием тест-системы CEA393Hu (Cloud-Clone Corp., Китай). Образцы крови для получения сыворотки отбирали в вакутейнер с активатором свертывания, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут. Образцы сыворотки хранились в пробирках типа Эппendorф при температуре -80 °C. Перед исследованием все компоненты набора и образцы сыворотки находились при комнатной температуре +22 °C.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием программного комплекса STATA 18 (StataCorp LLC). Сравнение выборок данных проводили с использованием U-критерия Манна — Уитни. За критический уровень значимости принимали $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При характеристике пациентов с ХК установлено, что все пациенты в момент проведения исследования находились в стадии обострения заболевания. В исследовании обе группы были сопоставимы по описательным характеристикам (полу и возрасту).

В ходе исследования получены статистически значимые различия в содержании субстанции Р в сыворотке крови у пациентов с ХК. Так, уровень субстанции Р более чем на 56% превышал аналогичный показатель у лиц из группы сравнения. Соответствующие данные описательных характеристик пациентов и концентрации нейропептида субстанции Р представлены в таблице 1.

Для независимой оценки биомаркеров и вероятности развития хронической крапивницы была построена мультивариантная регрессионная модель с прямым последовательным включением статистически значимых переменных прогностических факторов (концентрация субстанции Р в сыворотке крови, наличие стрессовой ситуации, возраст, пол). Характеристика множественной логистической регрессии представлена в таблице 2.

Положительные значения параметров модели (с уровнем значимости $p \leq 0,01$) указывают на то, что воздействие стресс-фактора и повышение концентрации субстанции Р в крови ассоциировано с увеличением шанса возникновения хронической крапивницы. Влияние остальных факторов не было значимо.

Согласно данным регрессионного анализа, представленным в таблице 2, установлено, что при увеличении концентрации субстанции Р на 1 пг/мл шанс возникновения ХК увеличивался в 1,02 раза, при наличии стрессовой ситуации в качестве триггера риск развития ХК повышался в 2,873 раза. Данные о повышении концентрации

Таблица 1. Описательные характеристики, концентрация субстанции Р у пациентов с хронической крапивницей и в группе сравнения

Показатель/признак	Группа сравнения, <i>n</i> = 68	Пациенты с хронической крапивницей, <i>n</i> = 97
Возраст, лет	41,10 ± 12,52	38,59 ± 8,96
Пол М/Ж	44/24	45/52
Субстанция Р, пг/мл	96,57 [78,04–138,16]	220,62 [127,30–302,65]*

Таблица подготовлена авторами по собственным данным

Примечание: данные представлены в формате $M_e [Q_1–Q_3]$.

* статистическая значимость различий основной группы и группы сравнения, $p < 0,05$.

Таблица 2. Параметры мультивариантной модели логистической регрессии

Хроническая крапивница	Отношение шансов	<i>p</i> -value	95% доверительный интервал
Стресс	2,873	0,014	0,15–0,81
Субстанция Р	1,015	0,000	1,01–1,02
Пол	0,611	0,210	1,01–1,02
Возраст	1,0309	0,100	0,99–1,07

Таблица подготовлена авторами по собственным данным

SP у пациентов с обострением крапивницы в результате стрессовой ситуации свидетельствовали о возможности использования количественного уровня нейротрансмиттера субстанции Р в качестве биомаркера для выявления триггера ХК.

Для определения эффективности и качества модели расчета риска возникновения ХК была построена ROC-кривая (Receiver Operator Characteristic) и рассчитан показатель качества модели AUC (площадь под кривой). Соответствующие данные представлены на рисунке 1.

С помощью построения мультивариантной модели логистической регрессии можно прогнозировать вероятность наличия взаимосвязи развития хронической крапивницы с воздействием факторов риска (стресса, пола, возраста, повышения концентрации субстанции Р). В логистической регрессионной модели точка отсечения позволяет сделать заключение о связи/отсутствии возникновения заболевания: если прогнозируемая вероятность превосходит порог отсечения — вывод о наличии

заболевания, в противном случае — о его отсутствии. Качество правильной диагностики наличия/отсутствия заболевания оценивается чувствительностью модели Se (долей верно спрогнозированных случаев наличия заболевания) и специфичностью Sp (долей верно спрогнозированных случаев отсутствия заболевания).

Общую чувствительность модели оценивали с помощью ROC-кривой, демонстрирующей зависимость чувствительности от величины 1 — специфичности. Общую чувствительность модели определяли как площадь фигуры AUC под графиком ROC-кривой (ее величина составила 0,8326). Данное значение превышает 0,8, что позволяет сделать вывод о высокой прогностической силе построенной модели. Оптимальный порог отсечения определялся как точка баланса между чувствительностью и специфичностью модели. Наиболее оптимальным являлся критерий отсечения 0,7, так как при нем отмечали наилучшее соотношение специфичности и чувствительности модели риска развития ХК в зависимости от прогностических факторов риска.

Наибольшее значение для диагностики крапивницы выявлено для стресс-фактора и концентрации субстанции Р. Данные о повышении концентрации SP у пациентов с обострением крапивницы в результате стрессовой ситуации свидетельствуют о возможности использования нейротрансмиттера субстанции Р в качестве биомаркера для выявления триггера ХК. Наличие клинической симптоматики и повышения в кровотоке субстанции Р свидетельствуют о заболевании, что делает возможным коррекцию терапии для достижения более устойчивого эффекта.

Субстанция Р представляет собой провоспалительный нейропептид, связанный со стрессом, высвобождаемый из сенсорных нервных окончаний и являющийся ключевым медиатором в связи ЦНС с кожей. Она вызывает дегрануляцию тучных клеток и появление волдырей и/или ангиоотеков при ХК. SP является одним из ключевых нейромедиаторов, который первым реагирует на стрессорный фактор и вносит вклад в протекающее в коже воспаление с нейрогенным компонентом [19].

Повышение уровня субстанции Р у пациентов, страдающих ХК, по отношению к группе сравнения было статистически значимым, что согласуется с данными других исследований [19, 26–28]. В некоторых исследованиях [29,

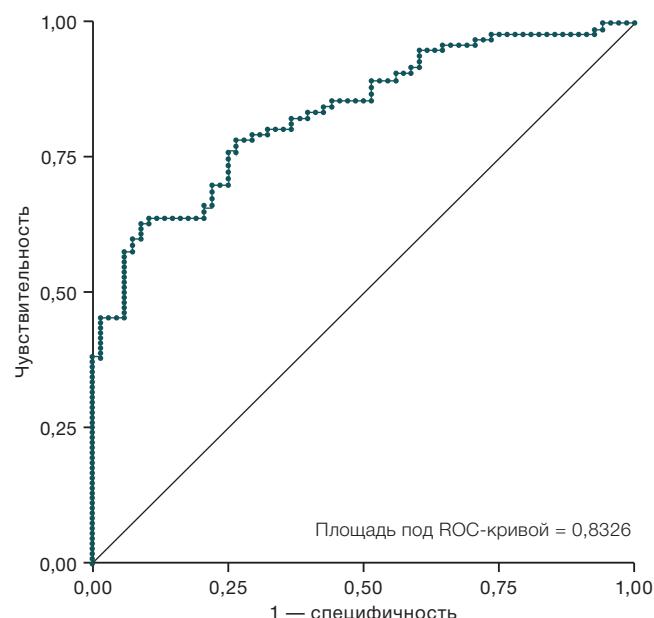


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 1. ROC-кривая для оценки четырехфакторной модели риска возникновения хронической крапивницы

30] изучалась взаимосвязь между уровнем субстанции Р и тяжестью депрессии у пациентов с ХК, на основании этих данных исследователями была подтверждена причинно-следственная связь между развитием ХК и депрессией, однако выявленные взаимосвязи требуют более углубленного изучения.

В нашем исследовании согласно статистической модели прогностическими факторами риска развития хронической крапивницы являлись повышенный уровень в крови субстанции Р и стрессовое воздействие. Стресс-индуцированность может сопутствовать многим соматическим заболеваниям и ухудшать их течение. Возможно, анализ уровней субстанции Р при другой патологии приведет к пониманию взаимосвязи между стрессом и болезнью с точки зрения иммунных взаимодействий и обеспечит комплексную основу для целенаправленных вмешательств и нового понимания диагностики и лечения заболеваний.

Следует отметить необходимость оценки влияния стресса у пациентов с ХК для своевременного направления их на консультацию к психотерапевту для назначения психологического или психофармакологического лечения для уменьшения проявлений крапивницы.

Литература / References

1. Колхир П.В. Разработка эндотипической классификации хронической спонтанной крапивницы на основании изучения комплекса биомаркеров с персонифицированным подходом к терапии: автореф. дис. д-р. мед. наук. М., 2016. Kolkhir PV. Development of the endotypic classification of chronic spontaneous urticaria based on the study of a complex of biomarkers with a personalized approach to therapy: abst. dis. Doc. Sci.(Med.). M., 2016 (In Russ.). EDN: [ZPXVPZ](#)
2. Selye H. A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature*. 1936;138(3479):32. <https://doi.org/10.1176/jnp.10.2.230a>
3. McEwen BS. Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1032:1–7. <https://doi.org/10.1196/annals.1314.001>
4. Staubach P, Dechene M, Metz M, Magerl M, Siebenhaar F, Weller K, et al. High Prevalence of Mental Disorders and Emotional Distress in Patients with Chronic Spontaneous Urticaria. *Acta Derm Venereol*. 2011;91(5):557–61. <https://doi.org/10.2340/00015555-1109>
5. Pondeljak N, Lugović-Mihić L. Stress-induced Interaction of Skin Immune Cells, Hormones, and Neurotransmitters. *Clin Ther*. 2020;42(5):757–70. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2020.03.008>
6. Lindsay K, Gouling J, Solomon M, Broom B. Treating chronic spontaneous urticaria using a brief ‘whole person’ treatment approach: a proof-of-concept study. *Clin Transl Allergy*. 2015;5:40. <https://doi.org/10.1186/s13601-015-0082-7>
7. Schut C, Magerl M, Hawro T, et al. Disease activity and stress are linked in a subpopulation of chronic spontaneous urticaria patients. *Allergy*. 2020;75(1):224–6. <https://doi.org/10.1111/all.14015>
8. Donnelly J, Ridge K, O'Donovan R, Conlon N, Dunne PJ. Psychosocial factors and chronic spontaneous urticaria: a systematic review. *BMC Psychol*. 2023;11(1):239. <https://doi.org/10.1186/s40359-023-01284-2>
9. Gupta MA, Gupta AK. Chronic idiopathic urticaria and post-traumatic stress disorder (PTSD): an under-recognized comorbidity. *Clin Dermatol*. 2012;30(3):351–4. <https://doi.org/10.1016/j.cldermatol.2012.01.012>
10. Ridge K, Conlon N, Hennessy M, Dunne PJ. Feasibility assessment of an 8-week attention-based training programme in the management of chronic spontaneous urticaria. *Pilot and Feasibility Studies*. 2021;7(1):103. <https://doi.org/10.1186/s40814-021-00841-z>
11. Deussing JM, Chen A. The Corticotropin-Releasing Factor Family: Physiology of the Stress Response. *Physiol Rev*. 2018;98(4):2225–86. <https://doi.org/doi:10.1152/physrev.00042.2017>
12. Keller JJ. Cutaneous neuropeptides: the missing link between psychological stress and chronic inflammatory skin disease?. *Arch Dermatol Res*. 2023;315(7):1875–81. <https://doi.org/10.1007/s00403-023-02542-4>
13. Wang F, Yang TB, Kim BS. The Return of the Mast Cell: New Roles in Neuroimmune Itch Biology. *J Invest Dermatol*. 2020;140(5):945–51. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.12.011>
14. Haidl ID, Marshall JS. Human mast cell activation with viruses and pathogen products. *Methods Mol Biol*. 2015;1220:179–201. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1568-2_12
15. Tsuzuki H, Arinobu Y, Miyawaki K, et al. Functional interleukin-33 receptors are expressed in early progenitor stages of allergy-related granulocytes. *Immunology*. 2017;150(1):64–73. <https://doi.org/10.1111/imm.12667>
16. Wedi B, Gehring M, Kapp A. The pseudoallergen receptor MRGPRX2 on peripheral blood basophils and eosinophils: Expression and function. *Allergy*. 2020; 75(9): 2229–42. <https://doi.org/10.1111/all.14213>
17. Olivera A, Beaven MA, Metcalfe DD. Mast cells signal their importance in health and disease. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2018;142:381–93. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.01.034>
18. Fujisawa D, Kashiwakura J, Kita H, et al. Expression of Mast-related gene X2 on mast cells is upregulated in the skin of patients with severe chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. 2014; 134(3): 622–33. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.05.004>
19. Basak PY, Erturan I, Yuksel O, Kazanoglu OO, Vural H. Evaluation of serum neuropeptide levels in patients with chronic urticarial. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2014;80(5):483. <https://doi.org/10.4103/0378-6323.140345>
20. Gouin O, L'Herondelle K, Lebonvallet N, et al. TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization. *Protein Cell*. 2017;8(9):644–61. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0395-5>

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе исследования выявлено статистически значимое повышение нейропептида субстанции Р в сыворотке крови у пациентов с ХК. С помощью построения мультивариантной модели логистической регрессии получены положительные значения параметров модели (с уровнем значимости $p \leq 0,01$), указывающие на то, что именно воздействие стресс-фактора и повышение концентрации субстанции Р в крови ассоциировано с увеличением шанса возникновения хронической крапивницы. Построенная логистическая модель имела высокую общую чувствительность, что позволяет сделать вывод о ее высокой прогностической силе. На основании полученных данных концентрация субстанции Р в крови пациентов с ХК может рассматриваться в качестве потенциального диагностического биомаркера, который можно рекомендовать для расширения панели скрининговых тестов, уточняющих патогенез возникновения ХК, что позволит улучшить дифференциальную диагностику нозологии и обеспечить раннее выявление пациентов со стресс-индуцированной крапивницей для назначения патогенетической терапии.

21. Choi JE, Di NardoA. Skin neurogenic inflammation. *SeminImmunopathol.* 2018;40(3):249–59.
<https://doi.org/10.1007/s00281-018-0675-z>
22. Takashima A. Harnessing DCs by substance P. *Blood.* 2013;121(15):2815–16.
<https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-483354>
23. Taracanova A, Tsilioni I, Conti P, Norwitz ER, Leeman SE, Theoharides TC. Substance P and IL-33 administered together stimulate a marked secretion of IL-1 β from human mast cells, inhibited by methoxyluteolin. *ProcNatlAcadSciUSA.* 2018;115(40):9381–90.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1810133115>
24. Микрюкова НВ, Калинина НМ Иммунопатогенез хронической крапивницы у взрослых (научный обзор). *Профилактическая и клиническая медицина.* 2020; 3(76):77–85.
Mikryukova NV, Kalinina NM Immunopathogenesis of chronic urticaria in adults (scientific review). Preventive and clinical medicine. 2020; 3(76):77–85 (In Russ.).
EDN: [DTDBOG](#)
25. Федеральные клинические рекомендации. Крапивница. Данилычева ИВ, Ильина НИ, Лусс ЛВ. *Российский аллергологический журнал.* 2018;15(5):47–62.
Federal clinical guidelines. Urticaria. Danilycheva IV, Il'ina NI, Luss LV, et al. Russian Allergological Journal. 2018;15 (5):47–62 (In Russ.).
26. Metz M, Krull C, Hawro T, Saluja R, Groffik A, Stanger C, et al. Substance P is upregulated in the serum of patients with chronic spontaneous urticaria. *J Invest Dermatol.* 2014;134:2833–36.
<https://doi.org/10.1038/jid.2014.226>
27. Zheng W, Wang J, Zhu W, Xu C, He S. Upregulated expression of substance P in basophils of the patients with chronic spontaneous urticaria: induction of histamine release and basophil accumulation by substance P. *Cell BiolToxicol.* 2016;32:217–28.
<https://doi.org/10.1007/s10565-016-9330-4>
28. Fadaee J, Khoshkhui M, Emadzadeh M, Hashemy SI, FaridHosseini R, JabbariAzad F, et al. Evaluation of Serum Substance P Level in Chronic Urticaria and Correlation with Disease Severity. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2020;19(1):18–26.
<https://doi.org/10.18502/ijaa.v19i1.2414>
29. Tedeschi A, Lorini M, Asero R. No evidence of increased serum substance P levels in chronic urticaria patients with and without demonstrable circulating vasoactive factors. *Clin Exp Dermatol.* 2005;30(2):171–5.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2005.01732.x>
30. Memet B, Vurgun E, Barlas F, Metz M, Maurer M, Kocatürk E. In Chronic Spontaneous Urticaria, Comorbid Depression Linked to Higher Disease Activity, and Substance P Levels. *Front Psychiatry.* 2021;26(12):667978.
<https://doi.org/10.3389/fpsyg.2021.667978>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Н.В. Микрюкова — сбор, анализ данных, написание текста; Н.М. Калинина — редактирование, внесение принципиальных изменений, окончательное утверждение версии статьи.

ОБ АВТОРАХ

Микрюкова Наталья Васильевна
<https://orcid.org/0000-0002-3196-8300>
natalya@mikryukov.info

Калинина Наталия Михайловна, д-р мед. наук, профессор
<https://orcid.org/0000-0001-8444-9662>
doctkalin@mail.ru

<https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-27-37>

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ИНTRANАЗАЛЬНЫХ НАНОРАЗМЕРНЫХ ПОЛИМЕРНЫХ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И АНТИДОТОВ В МЕДИЦИНЕ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ СИТУАЦИЙ

Е.В. Федотова^{1,2✉}, Д.В. Криворотов¹, А.С. Радилов¹

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

²Центр химической инженерии, Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Создание усовершенствованных лекарственных форм антидотов и средств терапии, применение которых возможно не только квалифицированным медицинским персоналом, но и в порядке само- и взаимопомощи, является актуальной задачей медицины экстремальных ситуаций.

Цель. Оценка возможности применения наноразмерных полимерных систем доставки лекарственных средств и антидотов, предназначенных для введения в носовую полость (интраназально), в медицине экстремальных ситуаций.

Обсуждение. В ходе исследования были выделены основные полимерные носители субмикронного размера, которые являются перспективными для дальнейшего возможного создания интраназальной формы антидотов. На биодоступность доставляемого вещества влияют физико-химические характеристики самого носителя, условия его получения, а также физиологические и анатомические факторы. Представлены данные о возможных способах коррекции указанных факторов с целью повышения биодоступности. Вторая часть работы посвящена примерам применения полимерных наносителей в терапии отравлений тяжелыми металлами, компонентами ракетного топлива и поражений, вызванных радиоактивными веществами. Показано, что в некоторых случаях носители (дендримеры, циклодекстрины) могут сами выступать в качестве антидотов. В исследовании представлен перечень антидотов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации, для которых возможна с учетом их физико-химических и фармакокинетических свойств разработка интраназальных форм.

Выводы. На основании анализа данных литературы предложены наиболее перспективные полимерные носители субмикронного размера для интенсификации назальной доставки лекарственных средств и антидотов: дендримеры, липосомы, нанокапсулы, наночастицы и циклодекстрины. На примере перечня антидотов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации, предложен список препаратов, для которых применение данных носителей является перспективным.

Ключевые слова: антидот; дендрипер; нанокапсула; липосома; система доставки; интраназальная доставка

Для цитирования: Федотова Е.В., Криворотов Д.В., Радилов А.С. Перспективы применения полимерных систем доставки лекарственных препаратов в медицине экстремальных ситуаций. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2024;26(4):27–37. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-27-37>

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Потенциальный конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соответствие принципам этики: исследование не требует представления заключения о биомедицинской этике.

✉ Е.В. Федотова Елена Викторовна arabka2008@mail.ru

Статья поступила: 08.07.2024 **После доработки:** 26.10.2024 **Принята к публикации:** 29.10.2024

PROSPECTS FOR THE USE OF INTRANASAL NANOSCALE POLYMER DELIVERY SYSTEMS FOR DRUGS AND ANTIDOTES IN EXTREME MEDICINE

Elena V. Fedotova^{1,2✉}, Denis V. Krivorotov¹, Andrey S. Radilov¹

¹Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Leningrad region, Russia

²Chemical Engineering Center ITMO University, St. Petersburg, Russia

Introduction. The development of improved formulations of antidotes and remedies, which can be used not only by qualified medical personnel, but also in self- and mutual assistance, is an urgent task for extreme medicine.

Objective. Evaluation of the possibility of using nanoscale polymer delivery systems for medicines and antidotes intended for intranasal administration (into the nasal cavity) in extreme medicine.

Discussion. The main submicron-sized polymer carriers which are promising as the basis for the creation of an intranasal form of antidotes are identified. The bioavailability of the substance delivered is dependent on the physico-chemical properties of the carrier, the conditions for its production, as well as physiological and anatomical factors. Data is presented regarding possible ways of correcting these factors in order to increase bioavailability. Examples of the use of polymer nanocarriers in the treatment of poisoning with heavy metals and rocket fuel components, as well as lesions caused by radioactive substances, are presented. It is shown that carriers (dendrimers, cyclodextrins) can act as antidotes in certain cases. The study presents a list of antidotes approved for use within the territory of the Russian Federation, for which the development of intranasal forms is possible, taking their physico-chemical and pharmacokinetic properties into account.

Conclusions. Following a review of literature sources, the most promising submicron-sized polymer carriers for the intensification of intranasal delivery of drugs and antidotes are herein proposed: dendrimers, liposomes, nanocapsules, nanoparticles, and cyclodextrins. Using the list of antidotes approved for use in the Russian Federation as an example, promising drugs that can be potentially developed on the basis of these carriers are proposed.

Keywords: antidote; dendrimer; nanocapsule; liposome; delivery system; intranasal delivery

For citation: Fedotova E.V., Krivorotov D.V., Radilov A.S. Prospects for the use of intranasal nanoscale polymer delivery systems for drugs and antidotes in extreme medicine. *Extreme Medicine*. 2024;26(4):27–37. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-27-37>

Founding: the work was performed without sponsorship.

Potential conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Compliance with ethical principles: the study does not require a conclusion on biomedical ethics.

✉ Е.В. Федотова Елена Викторовна arabka2008@mail.ru

Received: 8 July 2024 **Revised:** 26 Oct. 2024 **Accepted:** 29 Oct. 2024

© Е.В. Федотова, Д.В. Криворотов, А.С. Радилов, 2024

ВВЕДЕНИЕ

В фармакологии/токсикологии антидотом принято называть любое лекарственное средство, способное обезвреживать токсикант и устранять вызываемый им патологический эффект. Для быстроты действия такие препараты, как правило, разрабатываются и производятся в лекарственной форме растворов для инъекций. Несмотря на успехи и достижения современной фармацевтической промышленности, по объективным фармакоэкономическим причинам в настоящее время как на мировом фармацевтическом рынке, так и в России как никогда наблюдается тенденция нехватки целого ряда лекарственных препаратов, применяемых в терапии острых и хронических отравлений тяжелыми металлами, наркотическими и фосфорогенными соединениями (ФОС), цианидами и гидразином.

Антидотная терапия входит в состав комплексного лечения острых отравлений как бытового, так и техногенного характера и применяется врачами токсикологических бригад на догоспитальном этапе, врачами медицинских учреждений на госпитальном этапе, а также в порядке само- и взаимопомощи в мирное и военное время.

Растущая потребность в удобных и эффективных лекарственных препаратах (ЛП) для лечения и купирования последствий интоксикаций привела к существенному прогрессу фармацевтических технологий за последнее десятилетие [1]. Значительно возросло количество усовершенствованных лекарственных форм антидотов и средств терапии, применение которых возможно не только квалифицированным медицинским персоналом, но и в порядке само- и взаимопомощи. Также растет тенденция применения современных систем доставки для модификации детоксикационных свойств антидотов. При разработке новых лекарственных форм известных антидотов необходимо учитывать различия фармакокинетических показателей относительно их традиционных, преимущественно инъекционных лекарственных форм. Наибольший интерес в данном аспекте вызывают интраназальные формы ЛП, которые позволяют нивелировать различия в быстродействии между инвазивными и неинвазивными лекарственными формами введения, но не во всех случаях обеспечивают должную биодоступность и терапевтическое действие. Одним из возможных решений для разработки интраназальных ЛП является использование полимерных микро- и нанокапсул в качестве носителей для доставки антидотов, что является одной из актуальных тенденций в лечении отравлений металлами, предотвращении тяжелых отравлений наркотическими веществами и алкоголем [2, 3].

Разработка неинвазивных лекарственных форм антидотов, в частности интраназальных форм с использованием полимерных наносителей, может не только повысить эффективность известных препаратов, но и расширить сферы их медицинского применения. Однако следует учитывать, что система доставки ЛП, в том числе наноразмерная, не должна изменять исходные свойства антидота / лекарственного вещества или приводить к появлению побочных эффектов при их применении [4], например таких, как дыхательная депрессия, вызванная нежелательной доставкой лоперамида в центральную нервную систему (ЦНС) в случае его совместного приема с ингибиторами Р-гликопротеина [5]. Наоборот, наиболее

перспективно применение интраназальной формы введения лекарственных препаратов в терапии острых отравлений нейротоксикантами в связи с возможностью интенсификации транспорта действующего вещества в ткани головного мозга, минуя гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и фазу метаболизма во внутренних органах. Например, при отравлении фосфорогенными соединениями (ФОС) пралидоксим с низкой способностью проникновения через ГЭБ как антидот слабо влияет на центрально-опосредованное угнетение дыхания, вызываемое действием ФОС, но при интраназальном введении в форме катионных липосом хлорида пралидоксима (2-PAM) в качестве носителей способен снижать повреждение головного мозга и смертность у крыс при их отравлении параоксоном [6].

Отмечено, что интраназальные формы антидотов могут быть перспективными при выборе терапии отравлений, вызванных пульмонотоксикантами, везикантами и нервно-паралитическими отравляющими веществами, а также при острых радиационных поражениях [7, 8]. Так, для купирования синдрома тошноты и рвоты назальная форма антиэметика существенно упрощает оказание помощи пострадавшему, тогда как прием традиционных средств в форме диспергируемых таблеток или буккальных пленок будет невозможен.

Современные наносители, предлагаемые для модификации лекарственных препаратов, включают: наночастицы, такие как углеродные наночастицы (нанотрубки, графены), неуглеродные наночастицы (частицы железа, золота), наночастицы из биополимеров (капсулы, липосомы), нанороботы и наночипы [9–12]; дендримеры — трехмерные разветвленные монодисперсные полимеры; клатраты — комплексы бета-циклодекстрина; липосомы — биосовместимые и биодеградируемые двухслойные липидные везикулы размером до 0,5 мкм, способные инкапсулировать как полярные, так и неполярные соединения [13, 14].

Основной отличительной характеристикой данных наноматериалов является их размер и состав. Именно они изначально определяют первичные физические и химические свойства будущего носителя: растворимость в воде и биологических жидкостях, поверхностный заряд, сорбционную, агрегационную и адгезионную способности, межмолекулярные взаимодействия, взаимодействие с клеточными мембранами и белками, цитотоксичность [15].

Лекарственные препараты на основе полимерных микро- и наносителей могут быть введены различными путями: перорально, буккально, трансдермально, назально, парентерально и т.д.

При интраназальном пути введения всасывание веществ происходит главным образом в носовой полости [16, 17] и зависит от различных факторов, приведенных на рисунке 1, особенности которых и способы их коррекции будут рассмотрены далее.

Интраназальный путь введения характеризуется отсутствием эффекта первого прохождения через печень. Ввиду анатомической особенности слизистой носа вещества попадают непосредственно в артериальный кровоток. Высокая биодоступность, удобство применения и высокая скорость развития эффекта позволяют рассматривать данный путь введения как перспективный для доставки лекарственных препаратов на основе полимерных микро- и наносителей.

Цель работы — оценка возможности применения на-
норазмерных полимерных систем доставки лекарствен-
ных средств и антидотов, предназначенных для введения
в носовую полость (интраназально), в медицине экстремаль-
ных ситуаций.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Физико-химические факторы всасывания веществ при интраназальном пути введения и способы их коррекции

На биодоступность веществ при интраназальном пути введения влияют физико-химические свойства наноносителей, такие как отношение поверхности к массе, прочность, проводимость, растворимость, стабильность и реакционная способность [17].

Разработка синтетических носителей, способных захватывать биомакромолекулы-мишени, — одно из направлений создания антидотов нового поколения. В природе взаимодействия между биомакромолекулами реализуются за счет слабых электростатических, гидрофобных, водородных и вандерваальсовых сил. При создании носителей-антидотов, способных захватывать молекулы-мишени, имитируются многоточечные электростатические взаимодействия путем включения функциональных мономеров (хелатирующих лигандов). Например, в качестве антидотов при отравлениях медью могут применяться наночастицы из поли(этиленко-глицидилметакрилата), функционализированные три-этилентетрамином, N,N-ди(2-пиридилметил)амином, 8-гидроксихинолином или 8-гидроксихинолин-2-сульфоновой кислотой [18].

Полимерные капсулы могут включать гидрофильные и гидрофобные антидоты, образуя с ними как ко-валентные, так и нековалентные связи. Полимерные нанокапсулы способны защищать антидот от его деградации, вызванной белками крови или ферментами (пептидазы, фосфолипазы) гематоэнцефалического барьера. Высвобождение антидота из микро- и нанокапсул зависит от физико-химических характеристик лекарственного средства (размер частиц, концентрация и растворимость) и самого полимера (структура, молекулярная масса, пористость и механическая прочность).

Анатомические и физиологические факторы всасывания веществ при интраназальном пути введения и способы их коррекции

Физико-химические характеристики оказывают существо-
ненное влияние на дальнейшую судьбу препарата
после интраназального введения. Если он имеет раз-
мер более 1 кДа, не растворяется в слизистой оболочке носа или обладает выраженным отрицательным зарядом (будет отталкиваться от отрицательно заряженной слизистой оболочки), то он не сможет проникать через слизистую оболочку носовых пазух. Проникновение веществ через слизистую оболочку может происходить несколькими путями, например транс-клеточным проникновением и парацеллюлярно (между клетками). Липофильные вещества осуществляют трансцитоз путем пассивной диффузии и с помощью везикулярных транспортных механизмов, быстро аб-сорбируются. Поэтому применение липофильных си-
стем доставки для нелипофильных антидотов может существенно повысить их эффективность. Полярные системы доставки антидота проходят через эпите-
лий парацеллюлярно. Последний менее эффективен для крупных молекул (более 1000 Да) [16].

Возможность аксонального транспорта, который по-
зволяет миновать ГЭБ, имеет значение, например, при ин-
траназальной доставке многих анальгетиков и спазмоли-
тиков, а также для купирования различных синдромов,
вызваных действием токсикантов. Однако при данном
пути носитель должен быть способен к ретроградному и антероградному перемещению в аксонах и дендритах [19]. Важными физико-химическими характеристи-
ками наноносителей при данном пути проникновения являются их размер и химический состав поверхности.
Наночастицы размером 20–50 нм способны проникать
напрямую в центральную нервную систему путем аксо-
нального транспорта и могут усиливать биодоступность [20]. Отрицательно заряженные наноносители притягиваются мембранными и синаптическими щелями нейронов.
Следовательно, такие носители могут быть применимы для интраневральной доставки лекарственных веществ.
Для положительно и нейтрально заряженных наноно-
сителей характерен медленный перенос по аксонам,
а для отрицательно заряженных носителей характерен быстрый перенос [21].

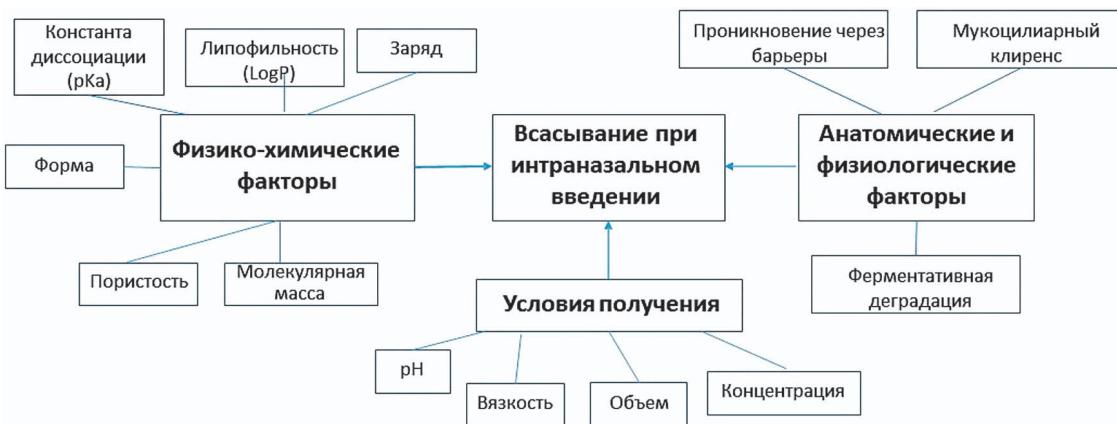


Рисунок подготовлен авторами по данным работы [15]

Рис. 1. Факторы, влияющие на всасывание систем доставки лекарств при интраназальном введении лекарственных препаратов

Влияние условий производства лекарственных форм на всасывание веществ при интраназальном пути введения

На всасывание вещества при интраназальном пути введения оказывают влияние условия производства наноразмерной системы доставки. Разработка каждой отдельно выбранной системы также требует индивидуального подхода и исследования ее токсичности. Применение токсичных органических растворителей (как в случае применения этиленгликоля при формировании некоторых нанокапсул) может позволить добиться желаемого уменьшения размера. Однако в некоторых случаях может привести к повышению токсичности при неполном его удалении. Способ получения наноносителя подбирается исходя из физико-химических свойств включаемого ЛП. Выбранный способ получения не должен негативно влиять на включаемое вещество (способствовать его разрушению или модифицировать его свойства).

Грамотный выбор полимера, из которого формируется наноноситель, включает в себя выполнение следующих условий: полимеры не должны быть токсичными, не должны вызывать канцерогенное или мутагенное действие, должны быть биосовместимыми. Известно, что некоторые разветвленные полимеры (дендримеры полипропилениминовые (PPI), полиамидаминовые (PAMAM) и полилизиновые (PLL)) обладают значительной цитотоксичностью вследствие большого содержания концевых аминогрупп [22]. Поэтому наиболее часто применяют носители не выше 4-го поколения. В большинстве случаев токсические эффекты, вызванные полимерными наноносителями, связаны с увеличением их цитотоксичности, а именно: снижением жизнеспособности клетки, ростом апоптоза, разрушением ДНК, разрывом клеточной мембранны и активацией перекисного окисления липидов [23].

Одним из существенных недостатков интраназального введения большинства ЛП является относительно низкая проницаемость слизистой полости носа для крупных макромолекул и интенсивный мукоцилиарный клиренс. Использование биоадгезивных полимеров (таких, как хитозан, карбопол, циклодекстрин и плюроник), входящих в состав наноносителя, позволит увеличить время пребывания препарата в полости носа, тем самым улучшая всасывание. Природа полимера влияет на его биоадгезивные качества, к тому же биоадгезивный полимер должен быть полярным и обладать достаточной вязкостью. На мукоадгезию полимеров существенно влияют гибкость полимерной цепи (жесткая сшивка цепей полимеров существенно ограничивает их диффузию через мембранны и взаимодействие с мукопризматом), молекулярная масса (чем ниже молекулярная масса, тем легче проницаемость через слизистую), степень набухания, способность к образованию водородных связей.

Поскольку слизистая оболочка носа липофильна, можно предположить, что степень абсорбции липофильных носителей будет более эффективной. Для обеспечения адекватной фармакокинетики полимера, необходимой для реализации лечебного эффекта при интраназальном введении, используют специальные растворители и вещества-перенетранты, повышающие способность проникновения через биологические мембранны, и разнообразные системы частиц-носителей различной природы, формы, размера. Например, добавка хитозана способна увеличивать парацеллюлярный транспорт веществ при интраназальном введении капель 0,5% хитозана и 1% атропина

сульфата в терапии отравлений фосфорорганическими соединениями [24]. В качестве носителя также может быть интересен циклодекстрин (диметил-бета-циклодекстрин) ввиду его способности не только переносить лекарственные вещества, но и, подобно хитозану, увеличивать их парацеллюлярный транспорт [25].

Несмотря на ряд существенных отличий фармакокинетики парентерального и интраназального способов введения, последний обладает существенным преимуществом: неинвазивность процедуры введения антитота, возможность снижения дозы за счет лучшей биодоступности, упрощение технологии производства, возможность самостоятельного введения [18, 20].

При этом перспективные носители могут одновременно доставлять различные группы лекарственных средств (например, антиэметики и анальгетики). Применение носителей для лекарственных средств позволяет модифицировать их физико-химические свойства (увеличить гидрофильность, проницаемость биологических барьеров), повысить биологическую доступность и тем самым оптимизировать фармакокинетические показатели.

Из всего многообразия нами были выбраны четыре наиболее перспективных, на наш взгляд, субмикронных носителя для назального пути введения: липосомы, дендримеры, нанокапсулы и циклодекстрины.

Применение наноносителей для интенсификации проникновения ЛС и антитотов через гематоэнцефалический барьер

Многие опасные для человека вещества (наркотические вещества, фосфорорганические пестициды, нервно-паралитические отравляющие вещества и др.) легко преодолевают гематоэнцефалический барьер и проникают в ткани центральной нервной системы. При этом лишь небольшая часть используемых в медицине лекарственных препаратов способна эффективно преодолевать ГЭБ, что затрудняет разработку антитотов ЦНС-активных веществ. В большинстве случаев лишь гидрофильные соединения с молекулярной массой менее 150 Да и гидрофобные соединения с массой менее 600 Да способны проникать через ГЭБ путем пассивной диффузии [26–28]. Таким образом, многие из используемых ЛС не способны обеспечить эффективную защиту центральной нервной системы при интоксикациях различного генеза.

Скорость проникновения ЛС через ГЭБ определяет адекватность, своевременность и эффективность терапевтического действия [28]. Например, экспериментально установленная скорость поступления наркотика в головной мозг в 8–10 раз превышает скорость поступления морфина [29], что позволяет ему оказывать выраженное антитотное действие. Но в случае отравлений быстро проникающими через ГЭБ центрально-активными токсикантами антитотная активность наркотика существенно снижается [30]. При этом сочетание эффективных систем доставки и назального способа введения может существенно усилить действие традиционных антитотов и обеспечить их применение не только квалифицированным медицинским персоналом, но и в порядке самовоздействия [28].

Системы доставки на основе наноносителей могут обеспечить ЛС лучшую эффективность проникновения через ГЭБ четырьмя путями: посредством накопления на стенках кровеносных капилляров головного мозга, повышая градиент концентрации антитота между

кровотоком и тканями ЦНС; путем прохождения в свободной форме или вместе с носителем за счет раскрытия плотных соединений между эндотелиальными клетками головного мозга; с помощью эндоцитоза эндотелиальными клетками и последующим высвобождением антидота в эндотелиальном слое и диффузии в ткани головного мозга; посредством трансцитоза через слой эндотелиальных клеток в головной мозг [31]. Наиболее часто для доставки лекарственных препаратов в головной мозг используют в качестве носителей наночастицы из биоразлагаемых полимеров, таких как полилактидгликолид (PLGA), человеческий сывороточный альбумин (HSA) и хитозан [32]. Например, применяемый как антидот мышьяка кверцетин, инкапсулированный в наночастицы PLGA, способен пересекать ГЭБ, что позволяет нивелировать истощение клеток головного мозга при отравлениях [33].

Как перспективные полимерные наноносители для антидотов нейротоксикантов хорошо показали себя дендримеры (трехмерные разветвленные монодисперсные полимеры), способные проходить через гематоэнцефалический барьер [32]. Так, конъюгаты низкомолекулярного антидота фосфороганического соединения (ФОС) пиридин-альдоксима с полиамидаминовым дендримером (PAMAM) 5-го поколения показали свою эффективность в модели интоксикации параксоном на мышах [34]. Полиэфирные дендримеры 2,2-бис(гидроксиметил)пропановой кислоты (bis-MPA) способны связывать фосфороганические соединения, в частности дихлофос, что позволило рассматривать такой полимерный наноноситель как самостоятельный антидот ФОС [35].

Применение полимерных наноносителей при отравлениях тяжелыми металлами

К группе тяжелых металлов относятся ртуть, свинец, кадмий, мышьяк, хром, кобальт, молибден, никель, сурьма, цинк, скандий, марганец, ванадий, стронций, барий, вольфрам. Их органические и неорганические соединения встречаются во многих отраслях промышленности, активно применяются в сельском хозяйстве и быту. Механизм действия многих тяжелых металлов основан на блокировании сульфидильных, аминных и карбоксильных групп белков-ферментов и структурных белков. В результате этого нарушается белковый, углеводный и жировой обмен в организме. Разработка новых антидотов и хелатов для лечения интоксикаций тяжелыми металлами остается важной и актуальной задачей [36].

Хелатотерапия — один из способов лечения отравлений тяжелыми металлами; она основана на формировании нерастворимого, менее токсичного комплекса металлов, который легко выводится из организма. Поэтому перспективным направлением в лечении отравлений тяжелыми металлами является использование полимерных наночастиц как в качестве носителей для доставки, так и самостоятельно, принимая во внимание наличие у данных соединений хелатирующих свойств.

Циклодекстрины — природные полимерные системы доставки, представители отдельного класса макроциклических лигандов в супрамолекулярной химии [36], характеризуемые как нетоксичные вещества, способные образовывать комплексы со многими токсикантами (рис. 2).

Впервые об использовании циклодекстрина в качестве самостоятельного антидота стало известно в 2002 году, когда была продемонстрирована его способность

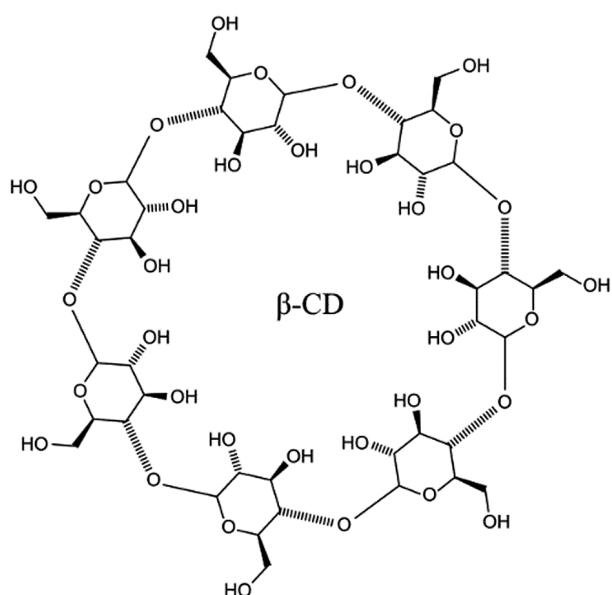


Рисунок подготовлен авторами по материалам PubChem [37]

Рис. 2. Структурная формула бета-циклодекстрина

нивелировать эффекты, вызванные куареподобными миорелаксантами [38], что позволило разработать лекарственный препарат для реверсии нейромышечной блокады на основе модифицированного гамма-циклодекстрина, вводимого внутривенно в дозах от 1 до 16 мг/кг. Такой путь введения и дозы позволяют рассматривать возможность интраназального пути введения циклодекстрина как альтернативу, особенно с учетом того, что данные соединения обладают способностью к связыванию со многими ксенобиотиками, в частности опиоидными анальгетиками, и, следовательно, могут найти применение как детоксицирующие вещества при отравлениях такими длительно действующими опиатами, как метадон, для которых не существует доступных антидотов [39]. Поскольку внешняя поверхность природных циклодекстринов содержит первичные и вторичные гидроксильные группы, которые могут ковалентно связываться с ионами тяжелых металлов, они могут выступать и как перспективные антидоты при отравлениях тяжелыми металлами, такими как медь, свинец (наиболее сильное средство) и кадмий [40]. Так как некоторые циклодекстрины разрешены и для применения в пищевой промышленности при производстве продуктов специализированного питания, они могут быть рекомендованы в качестве лечебно-профилактического питания для сотрудников предприятий, контактирующих с тяжелыми металлами.

Для лечения хронических отравлений тяжелыми металлами (в частности свинцом) предлагается хелатная терапия димеркарбонянтарной кислотой (DMSA), динатрий-этилендиаминтетрауксусной кислотой кальция (EDTA), 2,3-димеркарбонопропанолом (BAL) и D-пеницилламином. Однако к основным их недостаткам следует отнести слабую растворимость в воде, низкую биодоступность при приеме внутрь (перорально) и короткий период полуыведения, что значительно ограничивает их клиническое применение [41]. При этом адсорбенты тяжелых металлов, используемые в промышленности, такие как мезопористые кремниевые наночастицы (MSN) [10], потенциально могут применяться и в качестве адсорбента ЛС

в организме, например для лечения случаев отравления тиоловыми ядами. Например, наночастицы MSN, модифицированные хелатором ЭДТА, показали хороший эффект при интоксикации железом [42]. Также для лечения отравлений тяжелыми металлами рассматривается куркумин, инкапсулированный в хитозановые нанокапсулы диаметром 50 нм. Хитозановая оболочка защищает соединение от поглощения ретикулоэндотелиальной системой (RES), повышает его биодоступность и позволяет более длительно циркулировать в крови. Такой подход дает возможность существенно снизить дозу куркумина при пероральном введении для эффективного выведения тяжелых металлов из организма [43]. Аналогично инкапсуляция селено-метионина в PLGA-нанокапсулы приводила к 7-кратному повышению его детоксицирующей эффективности по отношению к ртутьсодержащим веществам по сравнению с традиционным способом введения [44].

Применение в качестве носителей дендримеров и дендрографтов позволяет делать гидрофильными некоторые гидрофобные вещества. Их использование при комплексообразовании с водорастворимыми хелаторами, такими как DMSA, дает возможность получить гидрофильные комплексы с оптимальными показателями биодоступности [41], а водорастворимые комплексы дендримеров с полифенолом кверцетином обеспечивают способность к проникновению через ГЭБ и могут быть использованы для борьбы с окислительным стрессом при отравлениях мышьяком [33, 45].

Применение полимерных наноносителей для доставки антидотов и радиопротекторов

Единственным эффективным антидотом при отравлении несимметричным диметилгидразином (НДМГ) считается пиридоксин (витамин В₆) [46]. Данный препарат купирует судорожный синдром и уменьшает токсическое действие НДМГ и его метаболитов на ЦНС. Нейротокическое действие несимметричного диметилгидразина проявляется в снижении содержания пиридоксальфосфата в результате его взаимодействия с пиридоксалем, содержащимся в клетках тканей головного мозга. В результате образуются токсичные пиридоксальгидразоны, угнетающие активность пиридоксалькиназы и блокирующие тем самым синтез в клетке пиридоксальфосфата [46].

Структура витамина В₆ содержит гидроксильную группу, что предполагает возможность электростатического взаимодействия с полимерными носителями, имеющими положительно заряженные функциональные группы, например дендримеры. Полифенол куркумин, заключенный в нанолипосомальную форму (NLC), также проявил себя в качестве средства терапии отравления диметилгидразином у мышей. Введение нанолипосомального куркумина в дозе 150 мг/кг позволило значительно снизить показатели сывороточной аланинаминотрансферазы (АлАТ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ), которые повышались под действием диметилгидразина, а также заметно повысить уровень γ-аминомасляной кислоты (ГАМК) в гиппокампе [47].

Высокую опасность для человека проявляют соли синильной кислоты. При этом липосомальный метгемоглобин (MetHb@Lipo) показал свою эффективность в качестве нового антидота при отравлении цианидами [48], существенно увеличивая выживаемость животных после контакта с сероводородом за счет сохранения

активности цитохром-С-оксидазы и подавления метаболического ацидоза [13].

Поражение радиоактивными веществами может происходить только при нештатных чрезвычайных ситуациях (транспортировка отходов, испытания и работа на установках с радиоактивными элементами). Разработка неинвазивной формы радиопротекторов также является важной задачей. Например, наиболее известный и эффективный радиопротектор Амифостин в настоящее время может быть введен только парентерально, но при таком способе введения он быстро выводится из организма. В связи с этим исследователи всего мира активно занимаются разработкой новой формы антидота, которая могла бы обеспечить более эффективное дозирование препарата и снизить его токсичность. Т.К. Mandal et al. разработали гибридные микрокапсулы из PLGA и хитозана, которые позволили эффективно инкапсулировать Амифостин. Такой состав микрокапсулы обеспечивал сокращение скорости высвобождения препарата на 45%. Кроме того, имеется предположение, что введение в оболочку хитозана позволит увеличить всасывание препарата и увеличить его биодоступность [49].

Применение полимерных наноносителей для разработки средств симптоматической терапии

Многие химические вещества вызывают при отравлении целый спектр патофизиологических процессов, которые представляют угрозу для жизни человека. В таких случаях требуется одновременное применение как средств этиотропной терапии, так и патогенетической, симптоматической терапии для устранения отдельных симптомов интоксикации. Совершенствование терапевтических препаратов для симптоматической терапии за счет разработки систем доставки предположительно может не только существенно облегчить процедуру их введения, но и повысить эффективность лечения. Например, модифицированные противорвотные препараты могут найти свое применение для купирования рвотного рефлекса при острый радиационных поражениях и отравлениях ФОВ. В настоящее время классическими путями введения данной группы препаратов является пероральный и парентеральный. Интраназальное введение противорвотных средств может существенно упростить процедуру введения препарата и нивелировать эффект первого прохождения через печень [50]. В исследовании Y. Ozsoy, S. Güngör назальное введение метоклопрамида *in situ* в виде гелей из полоксамера 405 позволяло повысить его биодоступность на 19% по сравнению с пероральным введением [51]. Высокая эффективность при интраназальном введении ондасетрона и гранистерона была получена благодаря их включению в микрочастицы из хитозана, сшитые глутаровым альдегидом [52]. Высокую антиэмическую активность при интраназальном введении показали препарат гранисетрона, инкапсулированный в микрочастицы на основе циклодекстрина и карбоксиметилцеллюлозы [53].

При отравлениях раздражающими веществами, ожогах, в стоматологической и хирургической практике для лечения боли используют анальгетики (опиоидные и неопиоидные анальгетики центрального действия, адьювантные анальгетики, нестероидные

противовоспалительные препараты). Однако многие анальгетики имеют короткий период действия, что приводит к увеличению частоты его введения пациенту. В этом случае использование системы доставки может позволить обеспечить постепенное низкодозное контролируемое поступление препарата в организм пострадавшего при сохранении эффективности и снижении побочных эффектов. Например, включение бензокайна[®] в полимерные наночастицы (PLGA, PLA, PCL) позволяет пролонгировать обезболивающий эффект по сравнению с обычным препаратом [54].

Не менее важным при острых отравлениях многими токсикантами является купирование судорожного синдрома. Применение противосудорожных препаратов, таких как карбамазепин, в виде наночастиц из карбоксиметилхитозана, при интраназальном введении дает возможность обеспечить необходимую концентрацию препарата в мозге и, соответственно, повысить эффективность лечения [55].

Предложения по модификации антидотных средств, разрешенных к применению в Российской Федерации

На основании анализа отечественной и зарубежной литературы, а также исходя из структурных и физико-химических особенностей препаратов, рекомендованных для применения в качестве антидотов, нами предложены возможные полимерные носители для модификации некоторых антидотных средств, разрешенных в настоящее время к применению на территории Российской Федерации (табл. 1).

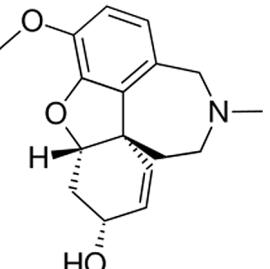
Очевидно, что далеко не все антидоты нуждаются в разработке интраназальной формы. Например, из нашего анализа были изначально исключены такие препараты, как этиловый спирт или глюконат кальция. Так же разработка интраназальных форм для некоторых антидотов изначально нежелательна, поскольку может усилить эффект препарата и привести к возможным опасным побочным эффектам. Например, в случае применения антихолинэстеразного препарата прозерина

нежелательно усиление его влияния на ЦНС. Некоторые из применяемых в медицине антидотов (такие, как атропина сульфат, купренил[®] и пиридоксина гидрохлорид) с хорошей биодоступностью и эффективностью в традиционных формах не нуждаются в существенных модификациях, кроме как из соображений удобства применения. Тем не менее разработка интраназальной формы пиридоксина может, например, оказаться перспективной в качестве возможного профилактического антидота для работников, имеющих профессиональный контакт с компонентами ракетного топлива. Структура как пиридоксина, так и атропина технически позволяет им электростатически связываться с концевыми группами дендримера, и, по нашим предположениям, такая система доставки может демонстрировать большую эффективность за счет интенсификации всасывания и проникновения через ГЭБ, что позволит при аварийных ситуациях оказывать введение антидота в порядке само- и взаимопомощи.

В некоторых случаях менее инвазивная интраназальная форма может являться альтернативой парентеральному и пероральному введению и найти свое применение, например, в педиатрии. Такой известный антидот, как Викасол, применяется при передозировке препаратами — антагонистами витамина K (варфарин, фениндион, аценокумарол). Разработка интраназальных лекарственных форм синтетического витамина K может иметь перспективу в педиатрии для профилактики витамин K-зависимого геморрагического синдрома у новорожденных. Парентеральное введение антидота детям с таким синдромом приводит к излишней травматизации, при этом липосомальная интраназальная форма витамина K позволит не только решить проблему упрощения введения лекарственного средства пациентам, но и обеспечить эффективную его доставку в организм.

Целесообразность разработки неинвазивных лекарственных форм, разрешенных в настоящее время к применению на территории Российской Федерации [56], с учетом их физико-химических и фармакокинетических свойств рассмотрена в таблице 1.

Таблица 1. Оценка перспективности разработки неинвазивных лекарственных форм отдельных разрешенных к применению на территории Российской Федерации антидотов с учетом их физико-химических и фармакокинетических свойств

Наименование антидота и показания к применению	Форма выпуска, доза препарата	Физико-химические свойства	Абсорбция	Целесообразность разработки неинвазивных лекарственных форм
Галантамин  Отравление холинолитиками	P-r для в/в и п/к введения 1 мг/мл	MM = 368,27 г/моль Слаборастворим в воде и спирте Растворим в хлороформе pKa 8,32	Галантамин купирует церебральный холинергический синдром. Абсолютная биодоступность при пероральном приеме составляет около 90%. Период полувыведения: 7 ч	Учитывая, что липосомы и дендримеры с размером частиц 3–5 мкм эффективно доставляют лекарственные вещества в головной мозг. На основании физико-химических свойств препарата перспективна разработка его липосомальной формы методом гидратации/регидратации тонкой пленки ввиду слабой растворимости в воде и спирте, но хорошей растворимости в хлороформе. Реакционная гидроксильная группа галантамина может электростатически связываться с дендримерами, имеющими положительно заряженные аминогруппы, в частности с полилизиновым дендримером третьего поколения, способным проникать через ГЭБ. Возникающая электростатическая связь достаточно непрочная и позволит обеспечить плавное высвобождение препарата из молекулы носителя. Ожидается эффективная доставка препарата в ЦНС при интраназальном применении, что может позволить обеспечить необходимую терапевтическую дозу галантамина

Продолжение таблицы 1

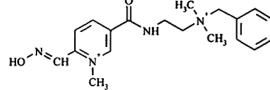
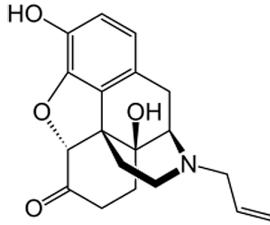
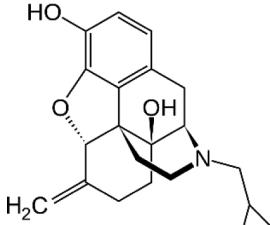
Наименование антидота и показания к применению	Форма выпуска, доза препарата	Физико-химические свойства	Абсорбция	Целесообразность разработки неинвазивных лекарственных форм
Глюкагон [*] NH ₂ -His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-COOH Передозировка блокаторами кальциевых каналов	Лиофилизат д/пригот. р-ра д/инъекц. 1 мг	ММ = 3485 г/моль Гидрофобный Растворы препарата стабильны в течение 48 ч при хранении при температуре 5 °C рKa 7,1	При внутривенном введении глюкагона в дозе 1 мг/мл максимальная концентрация в крови на уровне 7,9 нг/мл достигается спустя 20 мин. При внутримышечном введении максимальная концентрация составляет 6,9 нг/мл через 13 мин. При интраназальном введении в дозе 3 мг максимальная концентрация составляет 6130 пг/мл через 15 мин	Рассмотрение строения и физико-химических свойств глюкагона позволяет ожидать включение данного пептида в гидрофобную часть липосомы, что может обеспечить его защиту от воздействия ферментов и деструкции. Заряженные реакционные концевые группы пептида (NH ₂ и COOH) позволяют предложить возможность образования электростатических взаимодействий с заряженными дендримерами. При интерназальном введении такие препараты на основе липосом или дендримеров могут обеспечить требуемую концентрацию глюкагона, необходимую для обеспечения терапевтического действия
Карбоксим [*]  Поражение ФОВ	Р-р для в/м введения 15% — 1 мл (150 мг)	ММ = 413,35 г/моль Гидрофильный	Является реактиватором холинэстераз центральной нервной системы. Восстанавливает нервно-мышечную проводимость	Ввиду своего строения карбоксим плохо проходит через ГЭБ. Для внутримышечной доставки данного препарата требуется большая доза. Применение правильно подобранных носителей для препарата может позволить существенно снизить его высокую дозу при сохранении терапевтического эффекта. В то же время обеспечение оптимальной биодоступности при интраназальном введении карбоксими может позволить создать антидот, удобный для применения в рамках само- и взаимопомощи. Некоторые функционализированные циклодекстрины стехиометрически способны поглощать ФОС. Интраназальная система доставки «реактиватор ацетилхолинэстеразы — циклодекстрин» позволит обеспечить парациеллюлярный транспорт препарата и, вероятно, даст возможность увеличить его эффективность. Поскольку карбоксим и другие реактиваторы ацетилхолинэстеразы — гидрофильные препараты, их можно включать и в нанокапсулы, и в липосомы. Однако наиболее перспективным решением является формирование комплекса дендример-карбоксим за счет заряженных фрагментов молекулы, что может повысить эффективность прохождения карбоксими через ГЭБ. Кроме того, дендример способен самостоятельно реагировать с некоторыми ФОС, что также позволит увеличить эффективность антидота
Налоксон  Отравление наркотическими анальгетиками	Р-р для инъекций, 0,4 мг/мл, 1 мл, ампулы	ММ = 327,4 г/моль Гидрофильный рKa 7,9	Является антагонистом μ -опиоидных рецепторов. Период полувыведения: 1–1,5 ч Биодоступность при приеме внутрь до 20%	Липосомальные и дендримерные формы антагонистов опиоидных рецепторов при интраназальном введении позволяют максимально увеличить биодоступность действующих веществ за счет увеличения их абсорбции путем простой диффузии, необходимой для надежного терапевтического эффекта при отравлениях наркотическими анальгетиками. При этом недостаток биодоступности при таком способе введения компенсируется прямым поступлением антагонистов в ткани ЦНС, что обеспечивает терапевтическое действие не хуже, чем у их инъекционных препаратов. Наоборот, при лечении социально значимых заболеваний (различные виды зависимостей) наиболее перспективно микрокапсулирование в биоразлагаемые полимеры, такие как PLGA или хитозан, что, как правило, обеспечивает медленное пролонгированное действие таких препаратов при введении депо-формы и обеспечивает их защиту от воздействия РЭС
Налмефен  Лечение алкогольной зависимости	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 18 мг	ММ = 339,4 г/моль Гидрофильный рKa 7,6	Опиоидный антагонист длительного действия с сродством к κ -опиоидному рецептору и μ -опиоидному рецептору. Не подвергается пресистемному метаболизму	

Таблица составлена авторами по материалам PubChem [37]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ результатов проведенного исследования позволяет заключить, что наиболее перспективными наноразмерными полимерными системами доставки лекарственных средств и антидотов, предназначенных для интраназального введения, являются дендримеры, липосомы, циклодекстрины и нанокапсулы.

На всасывание системы доставки лекарственного вещества и антидота при интраназальной доставке влияют физико-химические характеристики самого носителя (отношение поверхности к массе, прочность, проводимость, растворимость, стабильность и реакционная способность), физиологические и анатомические факторы (способность проникать через ГЭБ), а также условия получения носителей (наличие или отсутствие примесей в виде растворителей и веществ-пенетрантов).

Показано, что некоторые носители могут сами являться антидотами: дендримеры способны реагировать с ФОС (как в случае с полиэфирным дендримером bis-MPA и дихлофосом), циклодекстрины являются антидотами для куареподобных миорелоксантов.

При отравлениях тяжелыми металлами высокую эффективность на данный момент показали не только модифицированные хелатирующие вещества (такие как мезопористые кремниевые наночастицы, модифицированные ЭДТА), но и наночастицы хитозана, содержащие куркумин и инкапсулированный в PLGA-нанокапсулы селенометионин.

Интраназальный способ введения может быть удобен при радиационных поражениях, когда затруднен

пероральный прием антидота (вследствие рвоты). Повышение эффективности известных радиопротекторов и снижение токсичности при одновременном их неинвазивном введении также перспективное и по сей день не решенное направление в данной области.

Оценена возможность применения полимерных наносителей в целях совершенствования терапевтических препаратов для симптоматической терапии (антиэметики, противоспазмогенные, обезболивающие и антигистаминные препараты). На примере включения бензокайна в наночастицы PLGA продемонстрирована возможность пролонгирования обезболивающего эффекта препарата.

В обзоре даны предложения по модификации резерва антидотов, применяемых на территории Российской Федерации. Показано, что для многих из них интраназальная форма введения является наиболее перспективной ввиду ее неинвазивности (парентеральное введение вызывает дополнительную травматизацию пораженных тканей и может служить входными воротами для вторичной инфекции), простоты употребления, а также быстрой скорости доставки лекарственного препарата. В данной работе отмечено, что микрокапсулирование позволяет при необходимости добиться программируемого высвобождения препарата. Большинство наносителей имеют как неоспоримые достоинства, так и ограничения. В связи с этим вопросы поиска наиболее эффективных интраназальных носителей на сегодняшний день остаются открытыми.

Литература / References

- Pitschmann V, Hon Z. Drugs as Chemical Weapons: Past and Perspectives. *Toxics*. 2023;11(1):52. <https://doi.org/10.3390/toxics11010052>
- Manek E, Petroianu GA. Brain delivery of antidotes by polymeric nanoparticles. *Journal of Applied Toxicology*. 2021;41(1):20–32. <https://doi.org/10.1002/jat.4029>
- Britch SC, Walsh SL. Treatment of opioid overdose: current approaches and recent advances. *Psychopharmacology*. 2022;239(7):2063–81. <https://doi.org/10.1007/s00213-022-06125-5>
- Wunnapuk K. Toxicology and Safety of Nanoparticles in Drug Delivery System. *Fundamentals of Drug Delivery*. 2021;329–48. <https://doi.org/10.1002/9781119769644.ch13>
- Kharasch ED, Hoffer C, Whittington D. The effect of quinidine, used as a probe for the involvement of P-glycoprotein, on the intestinal absorption and pharmacodynamics of methadone. *British journal of clinical pharmacology*. 2004;57(5):600–10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2003.02053.x>
- Pashirova TN, Zueva IV, Petrov KA, Lukashenko SS, Nizameev IR, et al. Mixed cationic liposomes for brain delivery of drugs by the intranasal route: The acetylcholinesterase reactivator 2-PAM as encapsulated drug model. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2018;171:358–67. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.07.049>
- Иванов ИМ, Ивченко ЕВ, Юдин МА, Венгерович НГ, Никифоров АС. и др. Аспекты применения лекарственных препаратов для ингаляций на догоспитальном этапе медицинской эвакуации. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2021;23(4):247–55. Ivanov IM, Ivchenko EV, Yudin MA, Vengerovich NG, Nikiforov AS, et al. Application aspects of medications for inhalation at the prehospital stage of medical evacuation. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2021;23(4):247–55 (In Russ.). <https://doi.org/10.17816/brrmma58989>
- Ивницкий ЮЮ, Краснов КА, Иванов МБ, Рейнук ВЛ, Головко АИ. Перспективы назального спрея в арсенале средств первой помощи при острых отравлениях. *Токсикологический вестник*. 2020;2(161):4–10. Ivnitskiy YuYu, Krasnov KA, Ivanov MB, Reinyuk VL, Golovko AI. Prospects of nasal spray in the arsenal of first aid in acute poisoning. *Toxicological bulletin*. 2020;2(161): 4–10 (In Russ.). <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2020-2-3-9>
- Osman NS, Sabri MA, Sapawe N. Synthesis of Mesoporous Silica Nanoparticles from Oil Palm Frond Based Silica to Enhanced Removal of Heavy Metal. *Trans Tech Publications Ltd*. 2022;1076: 221–27. <https://doi.org/10.4028/p-29dk6k>
- Laffleur F., Bauer B. Progress in nasal drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;607:120994. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120994>
- Jain KK. An overview of drug delivery systems. *Drug Delivery Systems*. 2020;1:54. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9798-5_1
- Aneebuddin MK, Kumar P. Recent Trends in the Chemistry of Polymers used in Oral Drug Delivery Systems. *Chemistry Research Journal*. 2022;7(6):97–106. <https://doi.org/10.1186/s40824-020-00190-7>
- Suzuki Y, Taguchi K, Kure T, Enoki Y, Otagiri M, et al. Liposomal methemoglobin as a potent antidote for hydrogen sulfide poisoning. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2022;450:116159. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2022.116159>
- Suzuki Y, Taguchi K, Kure T, Sakai H, Enoki Y, et al. Liposome-encapsulated methemoglobin as an antidote against cyanide poisoning. *Journal of Controlled Release*. 2021;337:59–70. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.07.015>
- Ilium L. Nasal drug delivery: new developments and strategies. *Drug discovery today*. 2002;7(23):1184–9. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(02\)02529-1](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(02)02529-1)
- Rawal SU, Patel BM, Patel MM. New drug delivery systems developed for brain targeting. *Drugs*. 2022;82(7):749–92. <https://doi.org/10.1007/s40265-022-01717-z>

17. Pawar B, Vasdev N, Gupta T, Mhatre M, More A, et al. Current Update on Transcellular Brain Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2022;14(12):2719.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122719>
18. Weisman A, Chou B, O'Brien J, Shea KJ. Polymer antidotes for toxin sequestration. *Advanced drug delivery reviews*. 2015;90:81–100.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.05.011>
19. Oberdörster G, Elder A, Rinderknecht A. Nanoparticles and the brain: cause for concern? *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2009;9(8):4996–5007.
<https://doi.org/10.1166/jnn.2009.GR02>
20. Wang W, Hassan MM, Mao G. Colloidal Perspective on Targeted Drug Delivery to the Central Nervous System. *Langmuir*. 2023;39(9):3235–45.
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c02949>
21. Romashchenko AV, Petrovskii DV, Trotsky SY, et al. Quantitative tracking of trans-synaptic nose-to-brain transport of nanoparticles and its modulation by odor, aging, and Parkinson's disease. *Nano Res.* 2023;16:7119–33.
<https://doi.org/10.1007/s12274-022-5302-6>
22. Madaan K, Kumar S, Poonia N, Lather V, Pandita D. Dendrimers in drug delivery and targeting: Drug-dendrimer interactions and toxicity issues. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 2014;6(3):139–50.
<https://doi.org/10.4103/0975-7406.130965>
23. Sairam AB, Sanmugam A, Pushparaj A, Mahesh Kumar G. Toxicity of polymeric nanodrugs as drug carriers. *ACS Chemical Health & Safety*. 2023;30(5):236–50.
<https://doi.org/10.1021/acs.chas.3c00008>
24. Rajpal S, Mittal G, Sachdeva R, Chhillar M, Ali R, et al. Development of atropine sulphate nasal drops and its pharmacokinetic and safety evaluation in healthy human volunteers. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2009;27(2):206–11.
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2008.10.007>
25. Haimhofer Á, Rusznyák Á, Réti-Nagy K, Vasvári G, Váradi J, et al. Cyclodextrins in drug delivery systems and their effects on biological barriers. *Scientia Pharmaceutica*. 2019; 7(4):33.
<https://doi.org/10.3390/scipharm87040033>
26. Praphawatvet T, Peters JL, Williams RO. Inhaled nanoparticles—An updated review. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;587:119671.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119671>
27. Veronesi MC, Alhamami M, Miedema SB, Yun Y, Ruiz-Cardozo M, et al. Imaging of intranasal drug delivery to the brain. *American journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2020;10(1):1–31. PMCID: PMC7076302
28. Pajouhesh H, Lenz GR. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *NeuroRx*. 2005;2:541–53.
<https://doi.org/10.1602/neurorx.2.4.541>
29. Уйба ВВ, Криворотов ДВ, Забелин МВ, Радилов АС, Рембовский ВР. и соавт. Антагонисты опиоидных рецепторов. От настоящего к будущему. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2018;20(3):356–70.
Uiba VV, Krivorotov DV, Zabelin MV, Radilov AS, Rembovsky VR. Opioid receptor antagonists. From the present to the future. *Emergency medicine*. 2018;20(3):356–370
30. Fishman J, Hahn EF, Norton BI. Comparative in vivo distribution of opiate agonists and antagonists by means of double isotope techniques. *Life Sciences*. 1975;17(7):1119–25.
[https://doi.org/10.1016/0024-3205\(75\)90333-1](https://doi.org/10.1016/0024-3205(75)90333-1)
31. Skolnick P. Treatment of overdose in the synthetic opioid era. *Pharmacology & therapeutics*. 2022;233:108019.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.108019>
32. Türker S, Onur E, Özer Y. Nasal route and drug delivery systems. *Pharmacy world and Science*. 2004;26:137–42.
<https://doi.org/10.1023/B:PHAR.0000026823.82950.f>
33. Ghosh A, Mandal AK, Sarkar S, Panda S, Das N. Nano-encapsulation of quercetin enhances its dietary efficacy in combating arsenic-induced oxidative damage in liver and brain of rats. *Life sciences*. 2009;84(3-4):75–80.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2008.11.001>
34. Bharathi S, Wong PT, Desai A, Lykhtska O, Choe V, et al. Design and mechanistic investigation of oxime-conjugated PAMAM dendrimers as the catalytic scavenger of reactive organophosphate. *Journal of Materials Chemistry B*. 2014;2(8):1068–78.
<https://doi.org/10.1039/C3TB21267J>
35. Durán-Lara EF, Marple JL, Giesen JA, Fang Y, Jordan JH, et al. Investigation of lysine-functionalized dendrimers as dichlorvos detoxification agents. *Biomacromolecules*. 2015;16(11):3434–44.
<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00657>
36. Yin H, Zhang X, Wei J, Lu S, Bardelang D, et al. Recent advances in supramolecular antidotes. *Theranostics*. 2021;11(3):1513.
<https://doi.org/10.7150/thno.53459>
37. [Электронный ресурс]. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (дата обращения: 26.04.2024)
38. Puskás I, Szente L, Szöcs L, Fenyesi É. Recent List of Cyclodextrin-Containing Drug Products. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*. 2023;67(1):11–7.
<https://doi.org/10.3311/PPch.21222>
39. Mayer BP, Kennedy DJ, Lau EY, Valdez CA. Evaluation of poly-anionic cyclodextrins as high affinity binding scaffolds for fentanyl. *Scientific Reports*. 2023;13(1):2680.
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-29662-1>
40. He J, Li Y, Wang C, Zhang K, Lin D, et al. Rapid adsorption of Pb, Cu and Cd from aqueous solutions by β-cyclodextrin polymers. *Applied Surface Science*. 2017;426:29–39.
<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.07.103>
41. Wang H, Yao Q, Zhu W, Yang Y, Gao C, et al. Biomimetic antidote nanoparticles: a novel strategy for chronic heavy metal poisoning. *Aaps Pharmscitech*. 2022;24(1):12.
<https://doi.org/10.1208/s12249-022-02466-8>
42. Farjadian F, et al. In vitro and in vivo assessment of EDTA-modified silica nano-spheres with supreme capacity of iron capture as a novel antidote agent. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2017; 13(2): 745–53.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2016.10.012>
43. Yadav N, Mudgal D, Anand R, Jindal S, Mishra V, et al. Recent development in nanoencapsulation and delivery of natural bioactives through chitosan scaffolds for various biological applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022;1(220):537–72.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.08.098>
44. Hu X, Tulsieram KL, Zhou Q, Mu L, Wen J. Polymeric nanoparticle-aptamer biocomjugates can diminish the toxicity of mercury in vivo. *Toxicology Letters*. 2012;208(1): 69–74.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.10.006>
45. Yousefi M, Narmani A, Jafari SM. Dendrimers as efficient nanocarriers for the protection and delivery of bioactive phytochemicals. *Advances in colloid and interface science*. 2020;278: 102125.
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102125>
46. Антушевич АЕ, Башарин ВА, Рейнюк ВЛ, Бугаев ПА. Эффективность инозина глицил-цистеинил-глутамата динатрия и пиридоксина гидрохлорида при остром отравлении несимметричным диметилгидразином. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2018;1:164–67. Antushevich AE, Basharin VA, Reinyuk VL, Bugaev PA. Effectiveness of inosine glycyl-cysteinyl-glutamate disodium and pyridoxine hydrochloride in acute poisoning with asymmetric dimethylhydrazine. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2018;1:164–67
<https://doi.org/10.17816/brmma12289>
47. Kulabhusan PK., Agrawa IS, Jeevanandam J, Danquah MK. Nanoformulated Herbal Drug Delivery as Efficient Antidotes Against Systemic Poisons. *Poisonous Plants and Phytochemicals in Drug Discovery*. 2020;269–94.
<https://doi.org/10.1002/9781119650034.ch13>
48. Fan N, Li Q, Liu Y, Ma B, Li M, et al. Preparation of an HI-6-loaded brain-targeted liposomes based on the nasal delivery route and the evaluation of its reactivation of central toxic acetyl-cholinesterase. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2023;184:106406.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2023.106406>

49. Pamujula S, Graves RA, Moiseyev R, Bostanian LA, Kishore V, Mandal TK. Preparation of polylactide-co-glycolide and chitosan hybrid microcapsules of amifostine using coaxial ultrasonic atomizer with solvent evaporation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2008; 60(3):283–89.
<https://doi.org/10.1211/jpp.60.3.0002>
50. Chavda VP, Jogi G, Shah N, Athalye MN, Bamaniya N, et al. Advanced particulate carrier-mediated technologies for nasal drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2022;74:19.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103569>
51. Ozsoy Y, Güngör S. Nasal route: an alternative approach for antiemetic drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2011;8(11):1439–53.
<https://doi.org/10.1517/17425247.2011.607437>
52. Pandey J, Shankar R, Kumar M, Shukla K, Kumari B. Development of nasal mucoadhesive microspheres of granisetron: A potential drug. *Drug Research*. 2020;70(8):367.
<https://doi.org/10.1055/a-1193-4781>
53. Ruby JJ, Pandey VP. Antiemetic drugs as a nasal drug delivery—A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2014;(5):1624.
[https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5\(5\).1624-29](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5(5).1624-29)
54. Wang B, Wang S, Zhang Q, Deng Y, Li X. Recent advances in polymer-based drug delivery systems for local anesthetics. *Acta biomaterialia*. 2019;96:55–67.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.044>
55. Liu S, Yang S, Ho PC. Intranasal administration of carbamazepine-loaded carboxymethyl chitosan nanoparticles for drug delivery to the brain. *Asian journal of pharmaceutical sciences*. 2018;13(1):72–81.
<https://doi.org/10.1016/j.apjs.2017.09.001>
56. Гладких ВД. и соавт. Нормативно-правовые и научно-производственные аспекты состояния и перспектив развития системы антидотной терапии в Российской Федерации. *Вестник войск РХБ защиты*. 2023;2(4):10–21.
Gladkikh VD, et al. Regulatory, legal, scientific and industrial aspects of the state and prospects of development of the antidote therapy system in the Russian Federation. *Bulletin of the RCB Protection troops*. 2023;2(4):10–21
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2018-2-4-10-27>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Федотова Е.В. — сбор и анализ данных для работы, составление проекта работы; Криворотов Д.В. — сбор и интерпретация данных для работы, критический анализ работы на предмет научной новизны; Радилов А.С. — интерпретация данных, дизайн исследования, окончательное утверждение версии для публикации.

ОБ АВТОРАХ

Федотова (Попова) Елена Викторовна, канд. хим. наук
<https://orcid.org/0000-0001-6056-1983>
arabka2008@mail.ru

Криворотов Денис Викторович, канд. хим. наук
<https://orcid.org/0000-0002-6077-2534>
denhome@bk.ru

Радилов Андрей Станиславович, д-р. мед. наук, профессор
<https://orcid.org/0000-0003-0776-7434>
a.radilov@icloud.com



ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ СУДОРОЖНОГО СИНДРОМА НА ОСНОВЕ ФЕНИЛКАРБАМАТА

А.С. Мелехова, А.В. Бельская, В.Н. Зорина[✉], М.В. Мельникова, Л.Г. Кубарская, О.Н. Гайкова

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

Введение. Карbamаты широко используются в фармацевтической промышленности, сельском хозяйстве и бытовой химии. Являясь обратимыми ингибиторами холинэстераз, карbamаты могут вызывать развитие генерализованного судорожного синдрома. Несвоевременное лечение способствует формированию стойких неврологических нарушений. Для разработки и адекватной оценки специфической активности в доклинических исследованиях новых средств купирования судорожного синдрома при острых интоксикациях данной группой веществ необходима легко воспроизводимая экспериментальная модель судорожного синдрома на основе карбаматов.

Цель. Разработка экспериментальной модели генерализованного судорожного синдрома на крысах с применением фенилкарбамата как модельного токсиканта для тестирования в доклинических исследованиях средств терапии при отравлении ингибиторами холинэстераз.

Материалы и методы. Исследование проведено на беспородных половозрелых крысах-самцах возрастом 3 месяца (80 животных), распределенных на 4 группы (3 опытные и 1 контрольная). На первом этапе сравнивали параметры судорожного синдрома, вызываемого модельными токсикантами: фенилкарбаматом в дозе 1 мг/кг м.т., коразолом в дозе 65 мг/кг м.т. и тиосемикарбазидом в дозе 8 мг/кг м.т. Изучены: двигательная активность (в teste «Открытое поле», нейромоторные функции (тест на силу хваты), когнитивные функции (по условной реакции пассивного избегания болевого раздражения — УРПИ) и показатели сердечно-сосудистой системы (оценка ЭКГ и ритмограммы сердца). Выраженность судорожного синдрома определяли по шкале Racine. Дополнительно оценивали структуру тканей мозга гистологическими методами. На втором этапе изучали биохимические показатели в 3-х опытных (с токсикантами) и контрольной группах. В сыворотке крови изучены некоторые биохимические показатели, оценивающие функцию печени, почек, прооксидантной и антиоксидантной систем. На третьем этапе изучали активность холинэстеразы в крови и головном мозге у 30 контрольных и 30 опытных крыс после воздействия фенилкарбамата. Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью Statistica v.10.

Результаты. При моделировании судорожного синдрома у крыс по времени наступления латентного периода, продолжительности и интенсивности судорог фенилкарбамат сопоставим с коразолом. При реализации модели зафиксировано достоверное снижение частоты сердечных сокращений через 48 ч после введения. В teste УРПИ установлено, что введение увеличивает время первого захода в темный отсек до обучения. Достоверные изменения маркеров функции печени (АЛТ, билирубин, холестерин, триглицериды), перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы (МДА, ГП) подтверждают наличие комплексных механизмов развития судорог и неврологических нарушений. Результаты гистологического исследования тканей мозга свидетельствуют, что фенилкарбамат провоцирует выраженные нарушения структуры мозга в эксперименте на крысах.

Выводы. Разработанная экспериментальная модель судорожного синдрома на крысах на основе фенилкарбамата проста в воспроизведении и может эффективно применяться в доклинических исследованиях новых средств купирования судорожного синдрома при отравлении ингибиторами холинэстераз.

Ключевые слова: карбамат; судорожный синдром; ингибитор холинэстеразы; экспериментальная модель; доклинические исследования

Для цитирования: Мелехова А.С., Бельская А.В., Зорина В.Н., Мельникова М.В., Кубарская Л.Г., Гайкова О.Н. Новая экспериментальная модель судорожного синдрома на основе фенилкарбамата. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2024;26(4):38–48.
<https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-38-48>

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания Федерального медико-биологического агентства по теме НИР «Изучение эффективности и безопасности субстанции аминоэфира валпроевой кислоты как лекарственного препарата фармакотерапии токсического судорожного синдрома» (шифр «Антистатус», рег. № 121041500281-1), по теме «Разработка оригинальных фармацевтических субстанций — антигонистов ингибиторов холинэстеразы» (шифр «Проводник», рег. № 124022400179-8).

Соответствие принципам этики: исследование выполнено с соблюдением правил биоэтики, утвержденных Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей. Проведение исследований одобрено на заседании биоэтического комитета ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России (протокол № 2/23 от 06.04.2023).

Благодарности: заслуженному врачу Российской Федерации, д-ру мед. наук, профессору Петрову А.Н. за определение направления исследований и канд. мед. наук Верведе А.Б. за статистическую обработку данных.

Потенциальный конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Зорина Вероника Николаевна nilimmun@yandex.ru

Статья поступила: 10.09.2024 **После доработки:** 01.11.2024 **Принята к публикации:** 04.11.2024

EXPERIMENTAL MODEL OF CONVULSIVE SYNDROME BASED ON PHENYLCARBAMATE

Aleksandra S. Melekhova, Alisa V. Belskaya, Veronika N. Zorina[✉], Margarita V. Melnikova, Larisa G. Kubarskaya, Olga N. Gaikova

Golikov Research Center of Toxicology, Saint-Petersburg, Russia

Introduction. Carbamates are widely used in the pharmaceutical industry, agriculture, and household chemicals. Being reversible cholinesterase inhibitors, carbamates can cause the development of generalized convulsive syndrome. Untimely treatment contributes to the emergence of persistent neurological disorders. In order to develop and adequately assess in preclinical studies the specific activity of new drugs for the relief of convulsive syndrome in acute intoxication with this group of substances, an easily reproducible experimental model of convulsive carbamate-induced syndrome is required.

Objective. Development of an experimental model of generalized convulsive syndrome in rats using phenylcarbamate as a model toxicant for testing in pre-clinical studies of therapies for poisoning with cholinesterase inhibitors.

Materials and methods. The study was performed using mongrel sexually mature male rats, aged 3 months (80 animals), divided into 4 groups (3 experimental and 1 control). At the first stage, the parameters of convulsive syndrome caused by model toxicants were compared: phenylcarbamate 1 mg/kg bw, corazol 65 mg/kg bw, and thiosemicarbazide 8 mg/kg bw. The following parameters were studied: motor activity (open field test), neuromotor functions (grip strength test), cognitive functions (conditioned avoidance responses, CAR), and cardiovascular indicators (ECG and cardiac rhythmogram assessment). The severity of the convulsive syndrome was identified by Racine stages. Additionally, the structure of brain tissues was evaluated by histological methods. second

© А.С. Мелехова, А.В. Бельская, В.Н. Зорина, М.В. Мельникова, Л.Г. Кубарская, О.Н. Гайкова, 2024

stage, biochemical parameters were studied in three experimental (with toxicants) and control groups. Some biochemical parameters were studied in the blood serum, assessing the function of the liver, kidneys, prooxidant and antioxidant systems. At the third stage, the activity of cholinesterase in the blood and brain was studied in 30 control and 30 experimental rats after phenylcarbamate exposure. Statistical processing of the results was carried out using Statistica v.10.

Results. When modeling convulsive syndrome in rats, phenylcarbamate is comparable to corazol in terms of the onset of the latency period, duration and intensity of seizures. When implementing the model, a significant decrease in heart rate was recorded 48 h after administration. The CAR test found that the introduced substance increases the time of the first entry into the dark compartment before training. Significant changes in markers of liver function (ALT, bilirubin, cholesterol, triglycerides), lipid peroxidation and the antioxidant system (MDA, GPx) confirm the complexity of mechanisms responsible for the development of seizures and neurological disorders. The results of histological examination of brain tissues indicate that phenylcarbamate induces pronounced disorders of the brain structure in an experiment on rats.

Conclusions. The developed experimental model of phenylcarbamate-based convulsive syndrome in rats is easy to reproduce, thus being recommended for preclinical studies of new drugs for the relief of convulsive syndrome in poisoning with cholinesterase inhibitors.

Keywords: carbamate; convulsive syndrome; cholinesterase inhibitor; experimental model; preclinical studies

For citation: Melekhova A.S., Belskaya A.V., Zorina V.N., Melnikova M.V., Kubarskaya L.G., Gaikova O.N. Experimental model of convulsive syndrome based on phenylcarbamate. *Extreme Medicine*. 2024;26(4):38–48. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-38-48>

Funding: the work was performed within the framework of the state assignment of the FMBA on the research topic "Study of the effectiveness and safety of the valproic acid aminoester substance as a drug for pharmacotherapy of toxic convulsive syndrome" (cipher Antistatus, reg. No. 121041500281-1), on the topic "Development of original pharmaceutical substances antagonists of cholinesterase inhibitors" (cipher Conductor, reg. No. 124022400179-8).

Compliance with ethical principles: the study was carried out in compliance with the rules of bioethics approved by the European Convention for the Protection of Vertebrates Used for Experimental and Other Purposes. The research was approved at a meeting of the Bioethical Committee of the Golikov Research Center of Toxicology (Protocol No. 2/23 dated 6 Apr. 2023).

Acknowledgments: the authors express their gratitude to Prof. A.N. Petrov, Honored Physician of the Russian Federation, Dr. Sci. (Med.), for determining the research direction and to A.B. Verveda, Cand. Sci. (Med.), for statistical data processing.

Potential conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

✉ Veronika N. Zorina niliimmun@yandex.ru

Received: 10 Sep. 2024 **Revised:** 1 Nov. 2024 **Accepted:** 4 Nov. 2024

ВВЕДЕНИЕ

Карбаматы являются производными карбаминовой кислоты, амино- и карбоксильные окончания которой замещены структурно разнообразными алкильными, арильными или алкил-арильными группами [1]. Карбаматы структурно сходны с амидами и эфирами, их химическая и конформационная стабильность, устойчивость к протеолизу, а также способность многих представителей группы проходить через клеточную мембрану и гематоэнцефалический барьер обусловливают все более широкое применение карбаматов в фармацевтической промышленности как в качестве активного компонента лекарственных форм, так и в качестве носителей, заменяющих пептиды в готовых лекарственных формах [2]. Помимо фармацевтической промышленности, карбаматы активно применяются в сельском хозяйстве и в составе бытовой химии, что нередко служит причиной случайных или преднамеренных отравлений.

Ряд производных карбаминовой кислоты относится к высокотоксичным соединениям, обратимым (в отличие от фосфорорганических соединений — ФОС) ингибиторам холинэстераз, приводящим к формированию так называемого «холинergicкого кризиса», сопряженного с развитием генерализованного судорожного синдрома, в тяжелых случаях заканчивающегося комой и летальным исходом. При действии карбаматов во время острой интоксикации за счет быстрого гидролиза связи C=O (декарбомилирования фермента) активность холинэстераз у выживших восстанавливается в течение нескольких часов, полное восстановление функции холинэстераз наблюдается через 24–48 ч [3]. Вместе с тем при отравлениях ингибиторами холинэстеразы наблюдаются

воспалительные реакции в тканях нервной системы, апоптоз нервных клеток и нейродегенеративные изменения, потенцирующие развитие стойких неврологических нарушений у выживших.

Необходимо отметить, что смертность и инвалидизация при остром отравлении карбаматами достаточно высоки. Так, согласно данным ВОЗ от 2019 года, только в результате преднамеренного суицида с применением карбаматов в мире умерло более 1600 человек, количество несмертельных отравлений составляло от нескольких сотен тысяч до нескольких миллионов в год (по статистике разных стран). При неэффективном или несвоевременном лечении у значительной части выживших впоследствии часто наблюдались трепмор, головокружения, головные боли, частичная потеря памяти, эмоциональная лабильность, спутанность сознания, когнитивные нарушения, периферическая нейропатия и вегетативная дисфункция [4].

Следует отметить, что при лечении острого отравления карбаматами применяются те же методы, что и при отравлении ФОС (атропинизация, введение препаратов бензодиазепинового ряда для купирования судорожного синдрома в первые 10–20 мин после воздействия) и методы лечения острых приступов истинной эпилепсии при развитии рефрактерных к бензодиазепинам судорог (введение барбитуратов, анестетиков) [5]. Эффективность антидотов высока только при их применении на самых ранних стадиях отравления [6].

В последнее время появляется все больше подтверждений тому, что патогенез отравлений карбаматами и ФОС включает в том числе проявления нехолинергической токсичности посредством индукции активных форм кислорода (АФК) и образования карбонилированных

белков. ФОС и карbamаты также взаимодействуют с митохондриальными транслокационными белками, с рецепторами андрогенов, эстрогенов и глюкокортикоидов, участвующими в метаболизме холестерина, негативно влияя на их функции, при этом особенности механизмов и выраженность воздействия на организм у ФОС и карbamатов различаются [7, 8]. Это обосновывает необходимость разработки новых средств терапии отравлений карbamатами. Однако она невозможна без применения адекватных экспериментальных моделей для оценки специфической активности новых средств в доклинических исследованиях. На сегодняшний день создание противосудорожных средств осуществляется преимущественно для терапии истинной эпилепсии; в качестве экспериментальных моделей используется максимальный электрошок, введение коразола и др. [9]. Для моделирования генерализованного судорожного синдрома на животных в эксперименте в качестве токсиантов-пестицидов, влияющих на активность холинэстеразы, обычно используют фосфорорганические соединения (диазинон, малаоксон, хлорфенвинфос и дихлофос) [10]. Экспериментальные модели генерализованного судорожного синдрома с применением карbamатов, предъявляющие значительно меньшие требования к обеспечению безопасности при проведении доклинических исследований, не описаны в научных публикациях.

Таким образом, цель работы — разработка экспериментальной модели генерализованного судорожного синдрома на крысях с применением фенилкарбамата как модельного токсианта для тестирования в доклинических исследованиях средств терапии при отравлении ингибиторами холинэстераз.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на белых беспородных 3-месячных крысях-самцах массой 150–250 г, полученных из ФГУП «ПЛЖ «Рапполово» национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Ленинградская область. Животные содержались в стандартных условиях вивария [11]. Поддерживался 12-часовой цикл освещения, корм и вода выдавались *ad libitum*.

В серии предварительных экспериментов определялась среднесмертельная доза (LD_{50}) фенилкарбамата (ФК) при внутрибрюшинном и внутрижелудочном путях введения крысам, составляющая $1,43 \pm 0,12$ и $10,0 \pm 0,77$ мг/кг массы тела соответственно [12]. Для лучшей воспроизводимости экспериментальной модели судорожного синдрома в доклинических исследованиях был выбран внутрибрюшный путь введения фенилкарбамата, так как данный путь является альтернативным внутривенному пути введения и обеспечивает 100% биодоступность препарата. В наших предыдущих работах также была экспериментально подобрана судорожная доза фенилкарбамата 1 мг/кг м.т., обеспечивающая индукцию судорожного синдрома у 100% животных при минимальном проценте смертности.

Эксперимент состоял из трех последовательных этапов.

На первом этапе проводили оценку характера судорожного синдрома. Для этого лабораторные животные в зависимости от применяемого судорожного агента были распределены на 4 группы и контрольную группу с введением 0,9% раствора натрия хлорида, по 20 голов в каждой группе. Моделирование судорожного синдрома в первой группе проведено с помощью обратимого

ингибитора ацетилхолинэстеразы из группы карbamатов, а именно фенилового эфира карбаминовой кислоты (далее фенилкарбамат) 1 мг/кг м.т. Оригинальное соединение синтезировано в ФГБУ «НКЦТ им. С.Н. Голикова» ФМБА России под руководством Беспалова А.Я. и защищено патентом Российской Федерации на изобретение [13]. Во второй и третьей группах в качестве модельных токсиантов использовали, соответственно: Коразол (Пентилентетразол, 6,7,8,9-тетрагидро-5Н-тетразоло(1,5-а)азепина, $C_6H_{10}N_4$), производитель Sigma-Aldrich, в дозе 65 мг/кг м.т. и Тиосемикарбазид (амид гидразинотионкарбоновой кислоты, CH_5N_3S) в дозе 8 мг/кг м.т., синтезирован в лаборатории синтеза ФГБУ «НКЦТ им. С.Н. Голикова» ФМБА России [14]. В каждой экспериментальной группе 10 животных было задействовано для изучения двигательной активности, нейромоторных функций, сердечно-сосудистой системы и 10 — для оценки когнитивных функций.

Выраженность судорожного синдрома после введения токсиантов определяли визуально по модернизированной шкале Racine [15].

Оценку двигательной активности, тревожности проводили с помощью компьютеризированного теста «Открытое поле», разработанного C.S. Hall (1936) [16] с помощью системы VideoMot2, TSE (Германия). Оценку поведения проводили через 24, 48 ч. Регистрировали 7 компонентов поведения в течение 2-х мин наблюдения: горизонтальную и вертикальную (стойки) активность, груминг, скорость движения животных и расстояние, пройденное животным в течение эксперимента, общую двигательную активность, количество движений в центре площадки и на периферии.

Изучение нейромоторных функций, клинически выражающихся общей слабостью, астенией, в экспериментальных условиях проводили через 24, 48 ч с помощью анализатора системы хватки «Bioseb GS3», позволяющего автоматически регистрировать силу захвата решетки передними лапами крысы и точный момент отпускания.

Когнитивные функции оценивали с помощью регистрации параметров условной реакции пассивного избегания болевого раздражения (УРПИ) через 2, 24 и 48 ч после обучения в двухкамерной установке PACS-30 (Columbus Instruments, США). Регистрировали следующие параметры: время первого посещения темной камеры (до обучения для оценки наличия у животного норкового рефлекса), латентный период захода в темную наказуемую камеру, время пребывания в светлой и темной камерах. Общее время эксперимента для каждого животного — 120 с. Наряду с временными параметрами УРПИ в каждой группе при повторных тестированиях регистрировали количество обучившихся животных, у которых латентный период захода в темную камеру был более 120 с (продолжительность наблюдения за животными).

Для оценки деятельности сердечно-сосудистой системы проводили электрокардиографическое исследование (ЭКГ) во II отведении на приборе электрокардиограф ветеринарный «Поли-Спектр-8В» («Нейрософт», Россия) через 24, 48 ч. Измеряемые показатели: частота сердечных сокращений (ЧСС), величина зубца R, интервалы PQ и QT, рассчитываемые по II стандартному отведению. На этом же приборе осуществляли оценку ритмограммы сердца с помощью кардиоинтервалографии по Баевскому (КИГ) [17].

У животных, подвергнутых запланированной эвтаназии и некропсии, на первом этапе эксперимента был

выполнен гистологический анализ головного мозга. Срезы органов были обезвожены, прогитаны парафином и окрашены гематоксилином и эозином, с последующим исследованием методом световой микроскопии на микроскопе Leica DM1000, Leica Microsystems Wetzlar GmbH (Германия) при 400-кратном увеличении. Для эвтаназии применяли ингаляцию CO_2 с использованием оборудования Open Science (Россия).

На втором этапе эксперимента проводили оценку некоторых биохимических показателей, а также ионного состава крови животных. В группе «фенилкарбамат» дополнительно оценивали антиоксидантный статус в сравнении с интактной группой. Для этого была сформирована новая выборка, в которой судорожный синдром моделировали фенилкарбаматом в дозе 1 мг/кг м.т., коразолом в дозе 65 мг/кг м.т., тиосемикарбазидом в дозе 8 мг/кг м.т. В зависимости от времени забора крови (24, 48 ч; 7 и 14 сут) лабораторные животные для контроля исследуемых показателей были разделены на 4 группы, включая интактную группу, по 24 головы в каждой.

Кровь от животных для биохимического анализа забирали в сухой вакутейнер через 24, 48 ч, на 7 и 14 сут. Далее отобранный биологический материал центрифугировали (центрифуга Z 326 K, производства Германии, серия 66110159) при 3000 об/мин, при 4 °C 10 мин. Для дальнейших исследований отбирали надосадочную жидкость — сыворотку. Исследовали прозрачную сыворотку без признаков гемолиза. Определение биохимических показателей (триглицеридов, аспартатаминонтррансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), щелочной фосфатазы (ЩФ), общего холестерина, мочевины, общего билирубина) проводили на биохимическом анализаторе A-25 фирмы «BioSystems» (Испания) с использованием наборов АО «Вектор-Бест» (Россия). Калибровку анализатора и внутренний контроль качества исследований производили на калибровочных и контрольных материалах АО «Вектор-Бест» (Россия).

Для изучения антиоксидантной системы использовали плазму крови и эритроцитарную взвесь, получаемую центрифугированием цельной крови при 3000 г на протяжении 3 мин с последующей трехкратной отмыvkой эритроцитов физиологическим раствором и поэтапным центрифугированием при указанных параметрах. Из отмытых эритроцитов готовили гемолизат соответствующим для каждой методики образом. В гемолизате эритроцитов по методу W.H. Habig и W.B. Jakoby [19] определяли показатели системы антиоксидантной защиты: супероксиддисмутазы (СОД) [18]; глутатионпероксидазы (ГП), глутатионредуктазы (ГР). Для оценки процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли концентрацию восстановленного глутатиона (ВГ) [20], а также стабильного конечного продукта ПОЛ — малонового диальдегида (МДА) [21]. Исследование проведено на биохимическом анализаторе «A-25» (BioSystems SA).

Таблица 1. Сравнительная оценка латентного периода и продолжительности судорожного синдрома исследуемых конвульсантов

№	Показатель	ФК, 1мг/кг м.т. n = 20	Коразол, 65 мг/кг м.т. n = 20	ТСК, 8 мг/кг м.т. n = 20
1	Латентный период проявления судорог, мин	5,33 ± 0,33	8,11 ± 0,6	106,8 ± 7,34
2	Продолжительность судорожного синдрома при 5-м уровне по Racine, мин	30 ± 0,6	35 ± 1,9	129 ± 9,0
3	Продолжительность судорожного синдрома при 6-м уровне по Racine, мин	13 ± 1,5	12 ± 1,0	150 ± 7,1

Таблица подготовлена авторами по собственным данным

Примечание: данные представлены в формате среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$).

Для изучения механизма действия фенилкарбамата на третьем этапе оценивали активность холинэстеразы в крови и головном мозге. Активность ацетилхолинэстеразы определяли по методу Эллмана [22]. Экспериментальные животные были разделены на две группы: контрольная 30 голов и опытная 30 голов. Крысам-самцам из опытной группы внутрибрюшинно вводили фенилкарбамат в дозе 1 мг/кг м.т. Животным из группы контроля вводили внутрибрюшинно 0,9% раствор натрия хлорида. После декапитации у исследуемых групп проводили забор крови и тканей головного мозга через определенные интервалы времени: 10, 30, 60 мин, 6 и 24 ч. На одну временную точку задействовали 6 животных.

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных осуществляли с помощью программного обеспечения для статистического анализа Statistica v.10. Для оценки достоверности различий между группами в функциональных и биохимических исследованиях применяли параметрический дисперсионный анализ (ANOVA). Для оценки достоверности различий в динамике изменения активности ацетилхолинэстеразы в головном мозге и в крови крыс использовали непараметрический критерий Манна — Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Основные характеристики судорожного синдрома, наблюдавшиеся при введении фенилкарбамата внутрибрюшинно в дозе 1 мг/кг м.т., по сравнению с эффектами, наблюдавшимися при введении коразола и тиосемикарбазида (ТСК), представлены в таблице 1.

Время наступления латентного периода судорог у животных из группы, получавшей фенилкарбамат в дозе 1 мг/кг м.т., сопоставимо с аналогичным параметром у крыс-самцов, получавших коразол в дозе 65 мг/кг м.т. (табл. 1). Длительный латентный период появления судорог, проявляющихся не только в виде клонических, но и в виде тонических судорог, а также экстензий, отмечен только у животных из группы, получившей тиосемикарбазид. В группе животных при использовании фенилкарбамата интенсивность судорожного синдрома 5-го уровня по Racine регистрировали у 60% животных, что сопоставимо с животными из групп сравнения (применение коразола и тиосемикарбазида). В то же время интенсивность судорожного синдрома 6-го уровня по Racine регистрировали в большей степени у животных из групп с коразоловой и тиосемикарбазидной моделями. Необходимо отметить, что продолжительность судорожного синдрома при 5-м и 6-м уровне по Racine у животных из группы с фенилкарбаматной моделью была сопоставима с данными у животных из группы с коразоловой моделью судорожного синдрома. При этом у животных из группы с тиосемикарбазидной моделью продолжительность судорожного синдрома как при 5-м, так и 6-м уровне

по Racine была гораздо длительнее. При этом летальность в группах «фенилкарбамат» и «коразол» составляла 20%, а в группе тиосемикарбазид — 33%.

При оценке поведения и двигательной активности с помощью многоцелевой системы открытого поля установлено, что у животных, получавших фенилкарбамат, через 24 ч после введения наблюдалось статистически значимое угнетение параметров двигательной активности в 2 раза по сравнению с контрольной группой животных. Кроме того, при введении коразола наблюдалось статистически значимое увеличение общей двигательной активности в 2,4 раза, количества горизонтальных перемещений в 4,3 раза и актов груминга в 2 раза по сравнению с контролем. У крыс, получавших тиосемикарбазид, выявлено статистически значимое возрастание общей двигательной активности в 1,2 раза, количества горизонтальных перемещений в 1,9 раза, количества стоек в 3,1 раза, актов груминга в 1,9 раза, среднего расстояния в 2,5 раза и средней скорости в 2,6 раза, двигательной активности на периферии в 6,6 раза.

Статистически значимых различий между показателями силы хвата у животных, получавших судорожные дозы фенилкарбамата или других токсикантов, по сравнению с контрольной группой не обнаружено.

При оценке когнитивных нарушений в тесте УРПИ установлено, что у животных, получивших фенилкарбамат в судорожной дозе, зарегистрировано увеличение времени первого захода в темный отсек до обучения. Тиосемикарбазид не оказывал статистически достоверного влияния на обучение ни при введении токсиканта за сутки до обучения, ни при введении за сутки после обучения. Коразол, введенный за 24 ч до обучения, согласно полученным результатам, вызывал дозозависимое нарушение краткосрочной памяти по механизму влияния на процессы фиксации информации (след памяти).

При изучении функции сердечно-сосудистой системы зафиксировано достоверное снижение частоты сердечных сокращений (ЧСС) через 48 ч после введения фенилкарбамата ($403,0 \pm 18,8$ против $484,5 \pm 8,7$ уд. мин в контрольной группе). При оценке индекса напряженности по данным кардиоинтервалографии через 24 ч отмечены достоверные отличия от значений в группе, получавшей фенилкарбамат ($47\ 715,2 \pm 10\ 714,0$ против $13\ 889,6 \pm 4623,0$ у.е.) и в группе, получавшей тиосемикарбазид ($14\ 814,5 \pm 6278,8$ против $73\ 743 \pm 16\ 103,0$ у.е.).

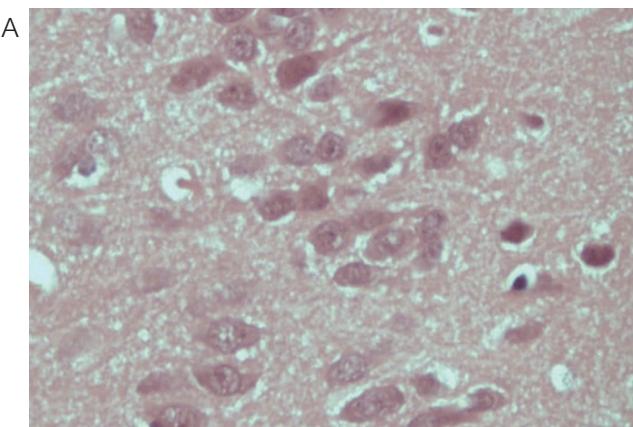


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 1. Кора лобной доли головного мозга крысы (увеличение $\times 400$): А — контрольное животное; Б — через 24 часа после введения фенилкарбамата
Примечание: стрелкой указан темный нейрон вытянутой формы без четкой границы ядра.

При гистологическом исследовании образцов тканей головного мозга у животных, получивших фенилкарбамат, через 24 ч после введения выявлено большое количество темных нейронов коры вытянутой формы без четкой границы ядра, ядро не визуализируется по сравнению с группой контроля (рис. 1).

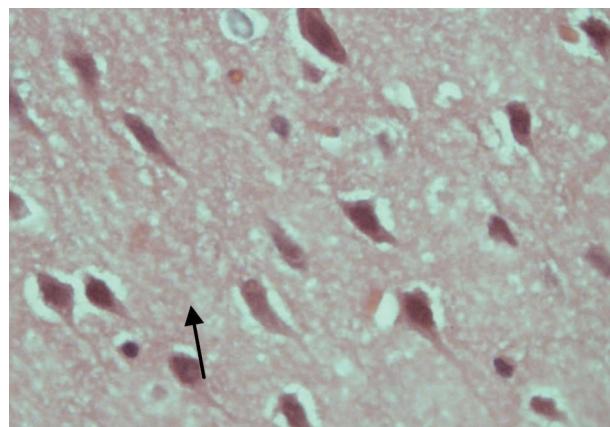
В белом веществе наблюдали очаговое разрежение нейропиля, преимущественно за счет отростков клеток (астроцитов, олигодендроцитов или нейронов). Вены в белом веществе растянуты, заполнены эритроцитами, плохо воспринимающими эозин, без четких границ. Большинство нейронов ствола темные, сморщеные, но на этом фоне встречаются отдельные клетки в состоянии острого набухания (рис. 2). В тканях мозжечка клетки Пуркинье темные, ядро и ядрышко не определяются, наблюдаются очаги паренхиматозного кровоизлияния, «выпадения» клеток, очаги элективного некроза; соответствующие данные представлены на рисунке 3.

Обращает на себя внимание, что фенилкарбамат, не приводящий к развитию выраженных нарушений двигательной активности и когнитивных функций в первые 24 ч после введения (в отличие токсикантов групп сравнения: коразола и тиосемикарбазида), при оценке в тестах «открытое поле» и «УРПИ» также негативно влияет на целый ряд биохимических показателей по прошествии двух недель после воздействия. При этом после воздействия коразола наблюдали единичные и менее выраженные сходные изменения.

Данные биохимического состава крови экспериментальных животных в течение 24 часов и более длительный период представлены в таблице 2.

После воздействия фенилкарбамата в первые сутки фиксировали повышение триглицеридов, которое нормализовалось к концу экспериментального периода наблюдений. Часть изменений происходила по типу декомпенсации: избыточное повышение концентрации биохимического показателя и последующее его резкое снижение в ответ на воздействие токсиканта. В тоже время на 14-е сутки выявлено снижение средних значений по таким показателям, как АЛТ, ЛДГ. Также на 14-е сутки наблюдали повышение ЩФ, мочевины, билирубина и снижение уровней холестерина.

При оценке ионного состава крови (табл. 3), характеризующего, помимо прочего, функцию почек, установлено, что изменения, вызываемые фенилкарбаматом в первые сутки (снижение концентрации ионов натрия



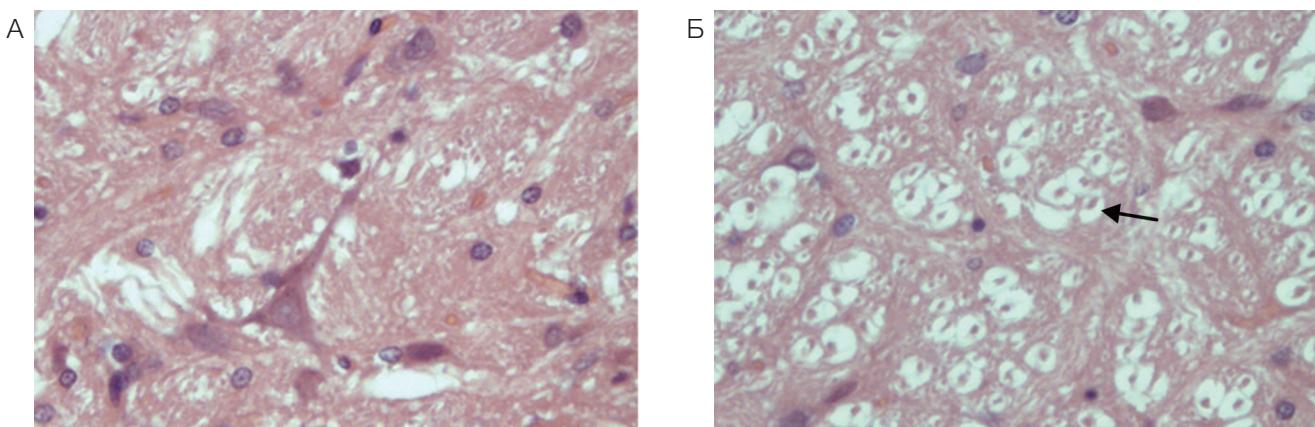


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 2. Ствол головного мозга крысы (увеличение $\times 400$): А — контрольное животное; Б — через 24 часа после введения фенилкарбамата
Примечание: стрелкой указаны клетки в состоянии острого набухания.

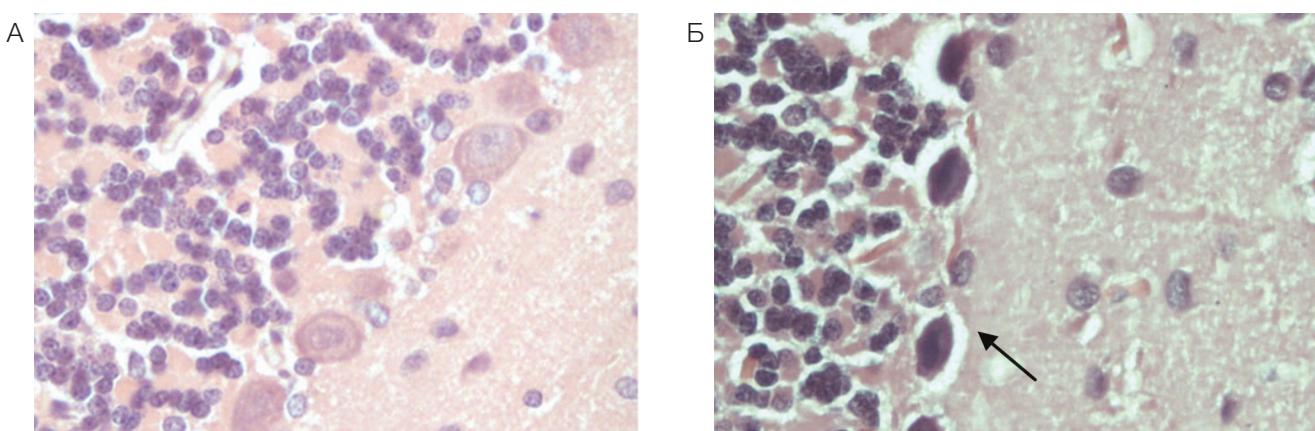


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 3. Мозжечок крысы (увеличение $\times 400$): А — контрольное животное; Б — через 24 часа после введения фенилкарбамата
Примечание: стрелкой указаны клетки Пуркинье темные, ядро и ядрышко не определяются.

и магния), аналогичны эффектам после воздействия тиосемикарбазида, что может свидетельствовать об избыточной затрате ионов в момент судорожного синдрома.

Поскольку фенилкарбамат является ингибитором ацетилхолинэстеразы (АХЭ), необходимо было оценить степень его влияния на активность АХЭ в разработанной модели судорожного синдрома. В таблице 4 приведены результаты определения уровня АХЭ в цельной крови и процентное соотношение ингибиции АХЭ в крови и головном мозге после введения фенилкарбамата в судорожной дозе.

При анализе данных, представленных в таблице 4, выявлено достоверное угнетение АХЭ в головном мозге и в цельной крови белых крыс в течение 6 часов после введения фенилкарбамата. Через 24 ч происходит полное восстановление активности фермента. Важно отметить, что через 6 часов после введения фенилкарбамата при сохраняющейся ингибиции АХЭ на 42,3 и 30,5% в центральной нервной системе и в периферической крови соответственно судороги у крыс полностью прекращались.

Дополнительно изучено состояние отдельных компонентов антиоксидантной системы и маркеров перекисного окисления липидов в разные временные периоды после воздействия фенилкарбамата в дозе 1 мг/кг м.т.

Установлено, что в первые сутки после введения животным фенилкарбамата достоверно изменяются три из четырех изученных показателей. При этом уровень

малонового диальдегида в группе «фенилкарбамат» в первые сутки наблюдения снижен по сравнению с контрольной группой почти в 2 раза, но к 14 сут наблюдений его уровень значительно превышал контрольные показатели, в то же время активность глутатионпероксидазы демонстрирует противоположную направленность изменений по сравнению с контролем (табл. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Модели с применением ингибиторов холинэстеразы на основе ФОС имеют свои особенности, и при разработке антидотов их использование предпочтительнее, чем моделей для тестирования противоэпилептических препаратов [10]. Наши исследования продемонстрировали, что воздействие фенилкарбамата на организм экспериментальных животных также имеет особенности, которые должны учитываться как при изучении патогенеза отравлений, так и при разработке средств лечения. Изучение ключевых характеристик судорожного синдрома при остром отравлении в течение 2 часов продемонстрировало, что в целом модель на основе фенилкарбамата (внутрибрюшинное введение) сопоставима с распространенной в практике доклинических исследований скрининговой судорожной моделью на основе коразола. При использовании фенилкарбамата в качестве модельного токсиканта интенсивность судорог была

Таблица 2. Влияние изучаемых судорожных токсикантов на биохимические показатели в крови животных в различные временные периоды

Изучаемые показатели	Период наблюдения	Интактная группа n = 24	ФК, 1 мг/кг м.т n = 24	Коразол, 65 мг/кг м.т. n = 24	ТСК, 8 мг/кг м.т. n = 24
Триглицериды, ммоль/л	24 ч	0,32 ± 0,03	0,52 ± 0,05*	0,45 ± 0,06	0,62 ± 0,04*
	48 ч	1,07 ± 0,16	1,24 ± 0,17	0,68 ± 0,06*	0,96 ± 0,08
	7 сут	1,43 ± 0,26	0,87 ± 0,08	1,12 ± 0,10	1,32 ± 0,20
	14 сут	0,83 ± 0,07	1,09 ± 0,14	1,32 ± 0,13*	0,76 ± 0,09
ЛДГ, Ед/л	24 ч	1001,3 ± 114,9	916,4 ± 112,6	870,8 ± 89	754,6 ± 32,3
	48 ч	909,2 ± 78,6	894,2 ± 55,2	792,4 ± 52,5	867 ± 62,4
	7 сут	894,4 ± 61,2	816,1 ± 83,3	1046,9 ± 79,9	929,9 ± 71,5
	14 сут	935,7 ± 67,3	686,8 ± 63,2*	759,4 ± 81,3	783,7 ± 67,4
АЛТ, ЕД/л	24 ч	52,8 ± 2,2	56,4 ± 5,4	56,4 ± 2,3	62,5 ± 5,4
	48 ч	60,7 ± 3,1	62,1 ± 2,7	65,0 ± 4,4	58,4 ± 2,7
	7 сут	71,4 ± 2,5	69,2 ± 3,9	79,4 ± 7,1	70,8 ± 4,1
	14 сут	55,5 ± 3,2	43,6 ± 2,1*	48,3 ± 1,6	53,3 ± 6,2
АСТ, ЕД/л	24 ч	132,8 ± 7,6	156,6 ± 12,7	146,0 ± 5,1	146,5 ± 7,7
	48 ч	143,5 ± 8,3	153,4 ± 5,2	150,7 ± 7,9	155,2 ± 7,4
	7 сут	169,7 ± 7,9	160,9 ± 12,2	169,1 ± 10,9	170,9 ± 10,7
	14 сут	140,3 ± 7,4	142,7 ± 6,7	125,7 ± 6,9	150,3 ± 14,4
ЩФ, ЕД/л	24 ч	215,8 ± 12,5	179,6 ± 11*	198,1 ± 15,3	277,3 ± 20,4*
	48 ч	292,0 ± 22,8	328,1 ± 15,9	256,2 ± 25,4	258 ± 29,3
	7 сут	302,7 ± 27,9	269,7 ± 23,2	305,3 ± 34,3	343 ± 25,8
	14 сут	210,4 ± 18,7	306,5 ± 24,7*	301,9 ± 22*	295 ± 46,1
Холестерин, ммоль/л	24 ч	1,61 ± 0,05	1,40 ± 0,08*	1,22 ± 0,08*	1,48 ± 0,08
	48 ч	1,14 ± 0,05	1,15 ± 0,06	1,15 ± 0,05	1,24 ± 0,05
	7 сут	1,10 ± 0,08	1,03 ± 0,04	1,24 ± 0,07	1,30 ± 0,08
	14 сут	1,61 ± 0,07	1,41 ± 0,08*	1,30 ± 0,07*	1,45 ± 0,08
Билирубин общий, мкмоль/л	24 ч	10,2 ± 0,4	12,0 ± 1,0	12,1 ± 1,3	14,1 ± 1,5*
	48 ч	18,2 ± 2,8	20,2 ± 1,8	10,5 ± 1,6*	17,6 ± 1,3
	7 сут	13,8 ± 2,8	14,4 ± 2,3	19,6 ± 2,1	17,9 ± 2,0
	14 сут	12,2 ± 1	17,6 ± 1,8*	18,2 ± 2,7*	14,3 ± 1,3
Мочевина, ммоль/л	24 ч	4,4 ± 0,2	3,6 ± 0,3*	4,0 ± 0,3	4,7 ± 0,3
	48 ч	4,5 ± 0,3	5,9 ± 0,3*	4,7 ± 0,6	4,2 ± 0,1
	7 сут	5,2 ± 0,5	5,4 ± 0,2	5,4 ± 0,2	6,4 ± 0,4
	14 сут	4,2 ± 0,2	5,6 ± 0,3*	4,9 ± 0,2*	3,9 ± 0,3

Таблица составлена авторами на основании собственных данных

Примечание: данные представлены в формате среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$). * доверительная вероятность различий относительно контрольной группы ($p < 0,05$).

выражена немногом меньше (5-й уровень у >60 % животных), чем в группах сравнения (интенсивность 6-го уровня при введении коразола и тиосемикарбазида). Важно отметить, что степень выраженности судорог 5-го уровня по шкале Racine соответствует генерализованному судорожному синдрому у человека, что позволяет рекомендовать фенилкарбамат в качестве эффективного токсиканта для моделирования тяжелого судорожного синдрома при разработке средств лечения.

Выявленные изменения в частоте сердечных сокращений свидетельствуют о том, что при разработке средств лечения отравлений карbamатами целесообразно уделять внимание препаратам, влияющим на функции сердца и сосудов. При этом модель на основе введения фенилкарбамата может послужить основой для тестирования соответствующих подходов к лечению. В целом зафиксированные изменения показателей ЭКГ совпадают

с данными научной литературы, где описано выраженное влияние карbamатов и ФОС на показатели сердечно-сосудистой деятельности [23].

Поскольку стандартные тесты для оценки двигательной активности и когнитивных нарушений низкоинформационны при применении в первые сутки после воздействия фенилкарбаматом, можно предположить, что развивающиеся после подобных отравлений нарушения функции нервной системы имеют длительный и сложный патогенез и требуют либо более продолжительных наблюдений, либо применения альтернативных тестов при экспериментальном моделировании отравлений соединениями группы карbamатов.

Результаты гистологического исследования тканей мозга подтверждают, что, несмотря на отсутствие выраженных отклонений в тестах для оценки когнитивных нарушений у экспериментальных животных в первые

Таблица 3. Влияние изучаемых судорожных токсикантов на ионный состав крови животных в различные временные периоды судорожного синдрома

Изучаемые показатели	Период наблюдения	Интактная группа n = 24	Коразол, 65 мг/кг м.т. n = 24	ТСК, 8 мг/кг м.т. n = 24	ФК, 1 мг/кг м.т n = 24
K ⁺ , (ммоль/л)	24 ч	4,7 ± 0,1	4,5 ± 0,1	4,6 ± 0,1	4,9 ± 0,1
	48 ч	4,6 ± 0,2	4,6 ± 0,1	4,6 ± 0,1	4,8 ± 0,1
	7 сут	4,2 ± 0,1	4,1 ± 0,1	4,0 ± 0,1	4,2 ± 0,1
	14 сут	5,2 ± 0,2	5,1 ± 0,1	5,1 ± 0,2	5,7 ± 0,2
Na ⁺ , (ммоль/л)	24 ч	160 ± 0,9	153,6 ± 1,5*	157,6 ± 1,4	155,4 ± 1,2*
	48 ч	155,3 ± 1,3	157,7 ± 1,7	158,6 ± 1,2	159,0 ± 1,0*
	7 сут	162,1 ± 1,3	161,1 ± 1,5	163,5 ± 1,0	162,7 ± 1,2
	14 сут	145,2 ± 1,6	142,9 ± 1,9	143 ± 1,7	142,9 ± 1,9
Cl ⁻ , (ммоль/л)	24 ч	96,6 ± 1,5	95,1 ± 1,1	99 ± 1,6	99,2 ± 1,1
	48 ч	96,9 ± 1,0	94,8 ± 1,7	96,6 ± 0,7	99,2 ± 1,2
	7 сут	93,6 ± 1,5	92,6 ± 1,6	92,9 ± 1,2	94,4 ± 1,1
	14 сут	93,8 ± 0,7	92,5 ± 1,4	92,3 ± 1,7	96,5 ± 1,1*
Фосфор (P), ммоль/л	24 ч	2,89 ± 0,07	2,82 ± 0,08	2,64 ± 0,07*	2,85 ± 0,08
	48 ч	2,65 ± 0,05	2,69 ± 0,10	2,49 ± 0,03*	2,94 ± 0,06*
	7 сут	2,14 ± 0,07	2,12 ± 0,05	2,14 ± 0,06	2,29 ± 0,07
	14 сут	2,85 ± 0,08	2,68 ± 0,06	2,65 ± 0,11	2,63 ± 0,04*
Магний (Mg), ммоль/л	24 ч	1,37 ± 0,25	0,35 ± 0,07*	0,94 ± 0,01	0,27 ± 0,02*
	48 ч	1,23 ± 0,19	0,89 ± 0,02	0,96 ± 0,02	0,90 ± 0,02
	7 сут	1,27 ± 0,19	0,88 ± 0,03	1,19 ± 0,18	0,90 ± 0,02
	14 сут	0,56 ± 0,03	0,63 ± 0,02	0,57 ± 0,05	0,67 ± 0,02*

Таблица составлена авторами на основании собственных данных

Примечание: данные представлены в формате среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$). * доверительная вероятность различий относительно контрольной группы ($p < 0,05$).

Таблица 4. Динамика изменений активности ацетилхолинэстеразы в головном мозге и в крови белых крыс после введения фенилкарбамата

Время	ФК (n = 6)		Контроль (n = 6)		% ингибиования, кровь	% ингибиования, мозг
	АХЭ, Е/мл крови	АХЭ, Е/мг мозга	АХЭ, Е/мл крови	АХЭ, Е/мг мозга		
10 мин	463,1 [365,4; 480,5]*	35,1 [32,7; 38,5]*	757,4 [606,4; 796,4]	78 [70,7; 80,4]	38,9 [36,6; 51,8]	54,9 [50,6; 58,1]
30 мин	370,9 [328,8; 396,2]*	66,3 [59,9; 79,7]*	563,7 [556,9; 634,9]	88,4 [87; 92,7]	34,2 [29,7; 41,7]	25,1 [9,9; 32,3]
60 мин	441,1 [292,1; 494,7]	63,4 [51,3; 70,6]*	690,1 [469,2; 700,0]	92 [90,6; 104,5]	36,1 [28,3; 57,7]	31,0 [23,2; 44,2]
6 ч	492,4 [418,8; 543,8]	68,1 [55,0; 86,2]	698,7 [686,8; 777,6]	120,3 [108; 144,6]	29,5 [22,2; 56,9]	43,4 [28,3; 54,3]
24 ч	946,3 [398,6; 996,6]	123,9 [111,8; 134,6]	763,6 [629,8; 798,3]	117,3 [109,9; 126,3]	-23,9 [-30,5; 47,8]	-5,6 [-14,7; 4,8]

Таблица составлена авторами на основании собственных данных

Примечание: данные представлены в формате медиана (Me), верхний (UQ) и нижний (LQ) квартили. * доверительная вероятность различий относительно контрольной группы ($p < 0,05$).

Таблица 5. Влияние фенилкарбамата на уровень малонового диальдегида и показателей антиоксидантной системы в крови лабораторных животных

Экспериментальные группы	Период наблюдения	Изучаемые показатели			
		ВГ, мкмоль/л	МДА, нмоль/мл	СОД, ЕД/г Нв	ГП, Ед/ г Нв
Контроль	24 ч	0,28 ± 0,02	142,3 ± 8,3	1131,0 ± 51,3	34,7 ± 1,3
		0,36 ± 0,02*	79,6 ± 10,9*	1331,1 ± 70,8	42,5 ± 2,7*
ФК	48 ч	0,13 ± 0,04	188,3 ± 11,8	1274,9 ± 141,2	27,7 ± 2,4
		0,21 ± 0,03	151,3 ± 4,2*	1494,5 ± 194,1	33,7 ± 3,9
Контроль	7 сут	0,41 ± 0,06	122,6 ± 3,9	1297,9 ± 76,6	35,8 ± 1,0
		0,40 ± 0,04	153,1 ± 9,7*	1096,7 ± 81,0	32,3 ± 1,6
ФК	14 сут	0,39 ± 0,03	164,0 ± 12,2	1702,8 ± 66,9	35,6 ± 1,1
		0,34 ± 0,07	197,6 ± 8,2*	1504,8 ± 59,7	31,6 ± 1,3*

Таблица составлена авторами на основании собственных данных

Примечание: данные представлены в формате среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$); * доверительная вероятность различий относительно контрольной группы ($p < 0,05$).

Таблица 6. Схема для формирования экспериментальной модели судорожного синдрома обратимым ингибитором ацетилхолинэстеразы

Тип животных	Белые беспородные крысы-самцы возрастом 3 месяца, весом 150–250 г
Количество животных в группе	Не менее 6
Модельный токсикант	Фениловый эфир карбаминовой кислоты [13]
Минимальная судорожная доза	1 мг/кг (в качестве растворителя — 0,9% раствор натрия хлорида)
Способ введения токсиканта в организм	Внутрибрюшно
Значимые характеристики судорожного синдрома	Клонические судороги в 100% случаев; латентный период проявления судорог 5–6 мин; интенсивность судорог не менее 5 баллов по шкале Racine в течение 30 мин
При изучении эффективности средств терапии судорожного синдрома (до 24 ч) дополнительно могут учитываться показатели	Повышенные уровни: триглицеридов, восстановленного глутатиона, активности глутатионпероксидазы. Сниженные концентрации: холестерина, щелочной фосфатазы, мочевины, Na^+ , Mg^{2+} , малонового диальдегида; Снижение частоты сердечных сокращений
При изучении эффективности средств терапии отдаленных последствий судорожного синдрома (до 14 сут) дополнительно могут учитываться показатели	Повышение: щелочной фосфатазы, мочевины, билирубина, малонового диальдегида. Снижение: холестерина, лактатдегидрогеназы, АЛТ, глутатионпероксидазы

Таблица составлена авторами на основании собственных данных

24 ч после воздействия, введение карbamатов приводило к возникновению нарушений в структуре мозга, что также может быть использовано при изучении патогенеза отравлений и в практике доклинических исследований при разработке подходов к лечению отравлений.

Некоторая часть выявленных изменений биохимических показателей может быть связана не только с комплексом патогенетических преобразований при интоксикации, но и с индивидуальной чувствительностью отдельных особей, что (при малом количестве животных в группах) повлияло на среднестатистические значения показателей. Однако результаты нашего исследования подтверждаются научными данными, полученными при оценке влияния на человека иных ингибиторов холинэстераз. Так, в исследовании R. Senarathne et al. предлагалось использовать АСТ и АЛТ в качестве альтернативных маркеров отравлений карбаматами и ФОС [24]. Выявленные изменения активности ферментов печени, холестерина и триглицеридов через 14 сут после воздействия фенилкарбамата свидетельствуют о нарушении функций печени. Повышение концентрации мочевины в крови может быть связано как с нарушениями функции печени, так и с повреждением мышечных тканей, кроме того, в процессе массированного распада белка, сопровождающегося гипераммонием, токсичный аммиак может стать причиной развития ряда неврологических нарушений.

При воздействии фенилкарбамата, помимо дефицита магния, изменялась частота сердечных сокращений. Можно предположить, что данные изменения вносят свой вклад в не зависящую от взаимодействия с АХЭ судорожную активность, учитывая, что гипомагниемия часто ассоциирована с гипервозбудимостью миокарда, трепетом, фасцикуляциями.

Результаты изучения содержания и функции АХЭ при введении фенилкарбамата вполне ожидаемы и подтверждают эффективность использования данного соединения в качестве модельного токсиканта при экспериментальном моделировании судорожного синдрома на фоне отравления ингибиторами холинэстераз.

Результаты исследования маркеров перекисного окисления липидов и системы антиоксидантной защиты подтвердили данные о комплексном механизме развития судорог и последующих неврологических нарушений после отравлений карбаматами. Выявленное ранее изменение уровня малонового диальдегида, об разующегося в процессе перекисного окисления липидов и ассоциируемого с изменениями липидограммы [25], соотносится с установленными нами изменениями в концентрациях триглицеридов и холестерина. Были зафиксированы отличия уровня МДА на 1 сут в группе «фенилкарбамат» по сравнению с контрольной группой, но начиная со второго дня и до 14 дня наблюдалось увеличение данного показателя по сравнению с контрольной группой. Повышение уровня содержания ГП и ВГ на 1 и 2 сут экспериментального периода в группе животных, получивших фенилкарбамат, по сравнению с контрольной группой подтверждает нарушение функции печени, сердечно-сосудистой системы и развитие воспалительной реакции на фоне отравления карбаматами, сопровождающегося активацией антиоксидантных механизмов.

Обобщая результаты проведенной разработки экспериментальной модели судорожного синдрома на основе введения фенилкарбамата в организм, можно предложить следующий алгоритм использования модели, представленный в таблице 6.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная экспериментальная модель судорожного синдрома на основе фенилкарбамата в дозе 1 мг/кг м.т. обладает приемлемыми характеристиками по сравнению с существующими моделями и может эффективно применяться в доклинических исследованиях при изучении особенностей патогенеза отравлений карбаматами, при разработке средств купирования судорожного синдрома при остром отравлении и при создании средств профилактики и лечения отдаленных последствий отравлений у выживших.

Литература / References

1. Ghosh AK, Brindisi M. Urea derivatives in modern drug discovery and medicinal chemistry. *J. Med. Chem.* 2020;63:2751–88. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01541>
2. Matosevic A, Bosak A. Carbamate Group as Structural Motif in Drugs: a review of carbamate derivatives used as therapeutic agents. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju.* 2020;71(4):285–99. <https://doi.org/10.2478/aiht-2020-71-3466>
3. King AM, Aaron CK. Organophosphate and carbamate poisoning. *Emerg Med Clin North Am.* 2015;33(1):133–51. <https://doi.org/10.1016/j.emc.2014.09.010>
4. Mangaly AJ, Radhakrishnan C. Alternate Biochemical Markers in Organophosphate Poisoning. *J Assoc Physicians India.* 2023;71(8):11–2. <https://doi.org/10.59556/japi.71.0325>
5. Morgan JE, Wilson SC, Travis BJ, Bagri KH, Pagarigan KT, Beliski HM, et al. Refractory and Super-Refractory Status Epilepticus in Nerve Agent-Poisoned Rats Following Application of Standard Clinical Treatment Guidelines. *Front Neurosci.* 2021;15:732213. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.732213>
6. Alozi M, Rawas-Qalaji M. Treating organophosphates poisoning: management challenges and potential solutions. *Crit Rev Toxicol.* 2020;50(9):764–79. <https://doi.org/10.1080/10408444.2020.1837069>
7. Leung MCK, Meyer JN. Mitochondria as a target of organophosphate and carbamate pesticides: Revisiting common mechanisms of action with new approach methodologies. *Reprod Toxicol.* 2019;89:83–92. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.07.007>
8. Mudyanselage AW, Wijamunige BC, Kocon A, Carter WG. Differentiated Neurons Are More Vulnerable to Organophosphate and Carbamate Neurotoxicity than Undifferentiated Neurons Due to the Induction of Redox Stress and Accumulate Oxidatively-Damaged Proteins. *Brain Sci.* 2023;13(5):728. <https://doi.org/10.3390/brainsci1305072>
9. Löscher W. Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. *Neurochem Res.* 2017;42(7):1873–88. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2222-z>
10. McCarren HS, McDonough JH Jr. Anticonvulsant discovery through animal models of status epilepticus induced by organophosphorus nerve agents and pesticides. *Ann N Y Acad Sci.* 2016;1374(1):144–50. <https://doi.org/10.1111/nyas.13092>
11. СанПиН 3.3686-21 Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней. СанПиН 3.3686-21 Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней.
12. Обоснование и разработка порядка применения наиболее эффективных препаратов, предлагаемых в качестве средств фармакологической коррекции последствий отравлений веществами судорожного действия. Отчет о НИР (заключительный). ФГБУН ИТ ФМБА России, рук. Петров А.Н., исполн.: Войцехович К.О. и др.СПб.; 2017 г. № 115021340031. Обоснование и разработка порядка применения наиболее эффективных препаратов, предлагаемых в качестве средств фармакологической коррекции последствий отравлений веществами судорожного действия. Отчет о НИР (заключительный). ФГБУН ИТ ФМБА России, рук. Петров А.Н., исполн.: Войцехович К.О. и др.СПб.;2017 г. № 115021340031.
13. Беспалов АЯ, Прокопенко ЛИ, Горчакова ТЛ, Козлов ВК, Петров АН, Зайцева МА и др. Гидрохлориды замещенных 2-[(диметиламино)метил] арилдиметилкарбоматов, обладающие антихолинэстеразной активностью. Патент Российской Федерации № 2754133; 2021. Bespalov AY, Prokopenko LI, Gorchakova TL, Kozlov VK, Petrov AN, Zaitseva MA, et al. Hydrochlorides of substituted 2-[(dimethylamino)methyl] aryldimethyl carbomates with anticholinesterase activity. Patent of the Russian Federation. No. 2754133; 2021 (In Russ.).
14. Миронов АН. ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К; 2012.
15. Mironov AN, ed. Guidelines for conducting preclinical studies of medicinal products. Moscow: Grif i K; 2012 (In Russ.).
16. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1972;32(3):281–94. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(72\)90177-0](https://doi.org/10.1016/0013-4694(72)90177-0)
17. Hall CS Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. *J. comp. physiol. Psychol.* 1936;22:345–52. <https://doi.org/10.1037/h0059253>
18. Струтынский АВ. Электрокардиограмма. Анализ и интерпретация. М.: МЕДпресс-информ; 2013. Strutynskij AV. Electrocardiogram. Analysis and interpretation. Moscow: MEDpress- inform; 2013 (In Russ.).
19. Батоцыренова ЕГ, Кашуро ВА, Шарабанов АВ. Фармакологическая коррекция отдаленных последствий острого тяжелого отравления тиопенталом натрия в условиях хронического светового десинхроноза. *Биомедицина.* 2021;17(3):23–8. Batotsyrenova EG, Kashuro VA, Sharabanov AV. Pharmacological correction of longterm effects of acute severe poisoning with sodium thiopental under chronic light desynchronization. *Journal Biomed.* 2021;17(3):23–8 (In Russ.). <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-3-23-28>
20. Habig WH. Assay for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods in Enzymology.* 1981;77:398–405. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(81\)77053-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(81)77053-8)
21. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1959;82(1):70–7. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
22. Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry.* 1978;86(1):271–8. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90342-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90342-1)
23. Yadav I. Study of Sick Euthyroid Syndrome in Organophosphate Poisoning. *J Assoc Physicians India.* 2022; 70(4):11–2.
24. Senaratne R, Hettiaratchi U, Athiththan L, Peiris H, Sarathchandra C, Senanayake H, Weerawansa P, Siribaddana S. Selected Liver Markers in Predicting the Severity of Organophosphate and Carbamate Poisoning. *J Environ Public Health.* 2022;7826396. <https://doi.org/10.1155/2022/7826396>
25. Булатова ИА, Щекотова АП, Карлышева КН. Особенности окислительного стресса при метаболическом синдроме с жировым поражением печени. *Современные проблемы науки и образования.* 2014:2. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=12473> (дата обращения: 26.04.2024). Bulatova IA, SHCHekotova AP, Karlysheva KN. Features of oxidative stress in metabolic syndrome with fatty liver disease. *Modern problems of science and education.* 2014:2. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=12473> (In Russ.).

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: А.С. Мелехова — разработка и тестирование экспериментальной модели, написание разделов статьи; А.В. Бельская — разработка и тестирование экспериментальной модели, написание разделов статьи; В.Н. Зорина — анализ научной литературы, трактовка результатов биохимического анализа, написание статьи; М.В. Мельникова — тестирование экспериментальной модели; Л.Г. Кубарская — определение ацетилхолинэстеразы; О.Н. Гайкова — гистологическое исследование.

ОБ АВТОРАХ

Мелехова Александра Сергеевна
<https://orcid.org/0000-0003-1803-3815>
melehovaalexandra@gmail.com

Бельская Алиса Владимировна
<https://orcid.org/0000-0002-9343-4144>
belskayaalisa@gmail.com

Зорина Вероника Николаевна, д-р биол. наук
<https://orcid.org/0000-0001-9183-7663>
nilimmun@yandex.ru

Мельникова Маргарита Викторовна
<https://orcid.org/0000-0002-2996-5151>
margarita10108@mail.ru

Кубарская Лариса Георгиевна, канд. бiol. наук
<https://orcid.org/0000-0001-7622-0390>
larkub@yandex.ru

Гайкова Ольга Николаевна, д-р биол. наук
<https://orcid.org/0000-0002-9942-2742>
olga-gaykova@yandex.ru

<https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-49-57>

ИЗУЧЕНИЕ ОБЩЕТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ У КРЫС ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ ГЕМОСТАТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА

А.М. Носов¹, А.А. Бондаренко^{2✉}, Г.Г. Катрецкая², К.П. Головко¹, А.В. Шульц², М.В. Волкова³, Е.А. Золотоверхая², Л.Г. Кубарская², Е.Д. Бажанова², О.Н. Гайкова²

¹ Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

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

³ Химическая компания «Орион», Санкт-Петербург, Россия

Введение. Остановка продолжающегося кровотечения при выполнении полостных оперативных вмешательств является актуальной проблемой хирургии как гражданского, так и военного здравоохранения. Разработка и внедрение в клиническую практику нового эффективного и доступного средства для остановки внутреннего кровотечения будет способствовать повышению выживания пострадавших.

Цель. Изучение общетоксического и местного токсического действия местного гемостатического средства (МГС) для внутриполостного применения.

Материалы и методы. Исследование проведено на 20 беспородных крысах (10 самцов и 10 самок) массой 180–220 г. Опытной группе животных местное гемостатическое средство имплантировали в брюшную полость в дозе 512 мг/кг массы тела (м.т.). Животным контрольной группы проводили операцию без имплантации МГС. Анализ данных осуществляли с помощью программ Microsoft Excel 2013 и Statistica 10.0.

Результаты. Результаты оценки состояния опытных животных, их массы тела, кормо- и водопотребления и массовые коэффициенты внутренних органов не отличались от результатов контрольных групп. Оценка гематологических и биохимических показателей крови крыс показала отсутствие выхода значений за пределы референтной нормы. При макро- и микроскопическом изучении внутренних органов животных зафиксировано наличие местнораздражающего действия изучаемого образца.

Заключение. Таким образом, лабораторные животные хорошо перенесли внутрибрюшинную имплантацию МГС в дозе 512 мг/кг м.т.; соответственно дальнейшее изучение его токсических свойств и эффективности является перспективным.

Ключевые слова: местное гемостатическое средство; безопасность; общетоксическое действие; хитозан; имплантация

Для цитирования: Носов А.М., Бондаренко А.А., Катрецкая Г.Г., Головко К.П., Шульц А.В., Волкова М.В., Золотоверхая Е.А., Кубарская Л.Г., Бажанова Е.Д., Гайкова О.Н. Изучение общетоксического действия у крыс при имплантации гемостатического средства на основе хитозана. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2024;26(4):49–57. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-49-57>

Финансирование: исследование выполнено в рамках реализации программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030».

Соответствие принципам этики: исследование одобрено биоэтической комиссией ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии им. С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства» (протокол № 4/23 от 16.08.2023). Условия содержания и уход за животными соответствовали требованиям ГОСТ 33215-2014 от 01.07.2016 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур».

Потенциальный конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

✉ Бондаренко Анастасия Александровна bondarenko-nastua@yandex.ru

Статья поступила: 02.09.2024 **После доработки:** 21.10.2024 **Принята к публикации:** 22.10.2024

GENERAL TOXIC EFFECT OF A CHITOSAN-BASED HEMOSTATIC AGENT IMPLANTED IN RATS

Artem M. Nosov¹, Anastasiya A. Bondarenko^{2✉}, Galina G. Katretskaya², Konstantin P. Golovko¹, Alena V. Shultz², Marina V. Volkova³, Ekaterina A. Zolotoverkhaja², Larisa G. Kubarskaya², Elena D. Bazhanova², Olga N. Gaikova²

¹ Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

² Golikov Research Clinical Center of Toxicology, Saint Petersburg, Russia

³ Orion Chemicals Ltd, Saint Petersburg, Russia

Introduction. Hemostasis of ongoing bleeding during cavitary surgical interventions is an urgent problem both in civil and military healthcare. The development of new effective and affordable agents for hemostasis of internal bleeding and their introduction into clinical practice may contribute to increasing the survival of injured patients.

Objective. Study of general and local toxic effects of a local hemostatic agent (LHA) for intracavitary application.

Materials and methods. The study was performed on 20 mongrel rats (10 males and 10 females) weighing 180–220 g. The experimental group of animals was implanted with the LHA into the abdominal cavity at a dose of 512 mg/kg body weight (bw). The animals of the control group underwent surgery without LHA implantation. Data analysis was performed using the Microsoft Excel 2013 and Statistica 10.0 software applications.

Results. The health status, body weight, food and water consumption, and mass coefficients of internal organs in the experimental animals did not differ from those in the control group. The hematological and biochemical blood parameters showed values within the reference norm. The macro- and microscopic examination of the internal organs revealed a local irritant effect of the agent under study.

Conclusion. The laboratory animals tolerated the intraperitoneal implantation of the tested local hemostatic agent at a dose of 512 mg/kg bw well. A further study of its toxic properties and effectiveness is validated.

Keywords: local hemostatic agent; safety; general toxic effects; chitosan; implantation

For citation: Nosov A.M., Bondarenko A.A., Katretskaya G.G., Golovko K.P., Shultz A.V., Volkova M.V., Zolotoverkhaya E.A., Kubarskaya L.G., Bazhanova E.D., Gaykova O.N. General toxic effect of a chitosan-based hemostatic agent implanted in rats. *Extreme Medicine*. 2024;26(4):49–57. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-49-57>

Funding: the research was carried out as part of the Priority–2030 strategic academic leadership program.

© А.М. Носов, А.А. Бондаренко, Г.Г. Катрецкая, К.П. Головко, А.В. Шульц, М.В. Волкова, Е.А. Золотоверхая, Л.Г. Кубарская, Е.Д. Бажанова, О.Н. Гайкова, 2024

Compliance with ethical principles: the study was approved by the Bioethical Committee of the Golikov Research Clinical Center of Toxicology (conclusion No. 4/23 as of 16.08.2023). The conditions of keeping and care of animals met the requirements of GOST 33215-2014 from 01.07.2016 Guidelines for keeping and care of laboratory animals. Rules for equipment of premises and organization of procedures.

Potential conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

✉ Anastasiya A. Bondarenko bondarenko-nastua@yandex.ru

Received: 2 Sep. 2024 Revised: 21 Oct. 2024 Accepted: 22 Oct. 2024

ВВЕДЕНИЕ

Достижение гемостаза во время выполнения оперативных вмешательств остается актуальной проблемой хирургии XXI века. Наиболее значимой данная проблема является для раненых и пострадавших с политравмой, у которых своевременная остановка кровотечения не только влияет на сроки лечения, но зачастую определяет исход лечения.

Дорожно-транспортные происшествия, неблагоприятная криминогенная обстановка, террористические акты и военные конфликты вносят свой неутешительный вклад в статистику этого вида травм. Так, в исследовании А.П. Трухана и соавт. было установлено, что в результате террористических актов в Санкт-Петербурге и Минске несовместимые с жизнью повреждения как непосредственная причина смерти были зарегистрированы лишь в 33,3% случаев, в то же время необратимая кровопотеря была непосредственной причиной смерти у 66,7% погибших [1]. Наиболее частой (практически в 87,5% случаев) причиной летального исхода пострадавших являлось внутреннее кровотечение. В структуре причин летальных исходов при ранениях, полученных во время вооруженных конфликтов, в 78,1 % случаев именно продолжающаяся геморрагия становилась причиной смерти, при этом более половины из них составляли внутренние кровотечения [2–6].

Несмотря на то что внутреннее кровоизлияние практически невозможно остановить на догоспитальном этапе оказания помощи, даже своевременная доставка пострадавшего в операционную требует немедленного контроля кровотечения. На фоне травматического шока и геморрагии развивается каскад патофизиологических реакций, включающих гипотермию, гипокоагуляцию и ацидоз (летальная триада). Ранняя остановка кровотечения является необходимым условием для успешного лечения раненого не только в остром периоде травматического шока, но и в III периоде травматической болезни (развития инфекционных осложнений) [1].

При этом технические трудности при интраоперационной остановке кровотечений возникают не только в ургентной хирургии (травмы, ранения), но и в плановой хирургии, особенно у пациентов с сопутствующей коагулопатией или на фоне приема дезагрегантов и антикоагулянтов [7–10].

В настоящее время для остановки кровоизлияний, возникающих во время полостных операций, используются различные методы: прошивание раны, тугая тампонада, различные виды электрокоагуляции, в ряде случаев требуется применение местных гемостатических средств (МГС) [11]. Для внутриполостного использования, как правило, применяются МГС на основе фибриногена,

целлюлозы, коллагена, фиброна, тромбина, экстрактов растений, мукополисахаридов (крахмалы) и т.д. [12].

Хитозан благодаря его широкой доступности и биосовместимости является одним из перспективных веществ для получения МГС. Было установлено, что материалы на основе хитозана и/или модифицированного хитозана (сuspension, губки, бинты и т.п.) эффективны для остановки кровотечений *in vitro* и способствуют свертыванию путем активации тромбоцитов и/или агглютинации эритроцитов [13–17].

Ранее в ходе экспериментальных работ нами была продемонстрирована высокая эффективность МГС на основе хитозана в модели интенсивного внутрибрюшного кровотечения у крупных биообъектов [18].

Однако, несмотря на то что хитозан и его производные хорошо изучены, следует учесть, что из-за широкой вариабельности рецептурных составляющих каждый вновь разрабатываемый полимер перед использованием в клинической практике необходимо изучать не только с точки зрения эффективности, но и в отношении его безопасности для потенциального пациента. Под безопасностью мы подразумеваем как биосовместимость с морфологическими структурами, которые находятся в зоне непосредственного контакта, так и общую токсичность для организма. Данные исследования необходимо проводить в том числе в связи с возможным оставлением материала в организме человека.

Цель нашего исследования — изучение общетоксического и местного токсического действия гемостатического средства для внутриполостного применения на следующей основе: хитозан молочнокислый 90%, глицерин 5%, кальция хлорид 5%.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на базе лабораторий ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России.

Исследование проведено на 20 беспородных крысах (10 самцов и 10 самок) массой 180–220 г, полученных из ФГУП ПЛЖ «Раполово» — НИЦ «Курчатовский институт», распределенных на группы: опытная (самцы и самки) — животным вводили местное гемостатическое средство (МГС) и контрольная (самцы и самки) — ложно оперированные животные. Животные были распределены по группам по полу и с использованием в качестве основного критерия массы тела таким образом, чтобы индивидуальное значение массы тела не отклонялось от среднего значения в пределах одного пола более чем на 10%. До начала исследования всех животных адаптировали к условиям содержания в течение 5 сут. Во время этого периода ежедневно контролировали общее состояние крыс путем визуального осмотра.

Дозу МГС для введения животным рассчитывали исходя из дозы, которая применялась в исследовании эффективности, — 90 мг/кг (по готовой лекарственной форме (ГЛФ)) [18]. С учетом метаболического коэффициента величина дозы МГС для крыс составила: 90×37 (метаболический коэффициент для человека массой 60 кг)/6,5 (метаболический коэффициент для крысы массой 200 г) \approx 512 мг/кг [19]. Таким образом, исследуемая доза изучаемого образца, вводимого крысам, составила 512 мг/кг массы тела. Масса имплантируемого МГС и соответственно доза препарата для каждого животного рассчитывалась исходя из значения его веса. В ходе исследования использовали стерильные образцы (радиационная стерилизация) МГС. МГС имплантировали в брюшную полость крыс в нативном виде. МГС представляют собой пластины светло-желтого цвета с рельефной поверхностью и пористой структурой, толщиной от 4 до 6 мм. Внешний вид изделия представлен на рисунке 1.

Животным контрольных групп было проведено оперативное вмешательство без имплантации исследуемого образца (ложно оперированные животные).

Для введения животных в наркоз при проведении имплантации МГС использовали инъекционный анестетик общего действия тильтетамин/золазепам (Золетил® 100). Данный препарат обладает хорошим анальгетическим и седативным эффектом. Препарат вводили внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг м.т., полное расслабление и отсутствие болевой чувствительности наступало через 10–15 мин после введения препарата. Средняя продолжительность анестезии составляла 60–90 мин.

Операционное поле подготавливали по общепринятой методике с соблюдением правил асептики и антисептики. В область разреза для обезболивания под кожу вводили Лидокаин раствор для инъекций 20 мг/мл в объеме 0,2 мл. Во время анестезии глаза животных оставались открытыми, и для профилактики развития сухого кератоконъюнктивита наносили глазной гель Видисик®.

Ход операции. Для выполнения срединной лапаротомии животное находилось в дорсальном положении. Разрез кожи выполнялся по средней линии от пупка в каудальном направлении длиной около 1 см, затем тупым способом осуществлялось препарирование тканей до визуализации белой линии живота, брюшину рассекали скальпелем, края брюшной стенки захватывали пинцетом и приподнимали вверх для удобства визуализации



Рисунок подготовлен авторами

Рис. 1. Внешний вид местного гемостатического средства

органов брюшной полости крысы. Следует отметить, что аппликация МГС производилась в сухом виде, исследуемый материал свободно располагали в брюшной полости (рис. 2).

Затем брюшную полость послойно ушивали (рис. 3). Экспериментальных животных для восстановления после наркоза помещали в обогреваемую клетку с теплым полом. Полное пробуждение животных наступало спустя 2–3 ч после введения в наркоз.

В ходе исследования оценивали выживаемость животных, клиническую картину интоксикации, динамику массы тела, водо- и кормопотребление, проводили оценку гематологических и биохимических показателей, макро- и микроскопическое изучение внутренних органов, рассчитывали массовые коэффициенты органов и оценивали местные реакции после имплантации МГС [20].

Ежедневно оценивали общее состояние крыс, отмечали отклонения в потреблении корма и воды животными в отдельных клетках. Массу тела контролировали за день перед имплантацией МГС, а затем еженедельно после введения в эксперимент. Масса тела голодного животного непосредственно перед некропсией была взята для расчета процентного отношения массы внутренних органов к массе тела животного. Животные лишались корма в ночь перед некропсией. Доступ к воде при этом не ограничивался.

Забор крови для изучения гематологических и биохимических показателей осуществляли на 29-е сут исследования путем обескровливания животных после ингаляции углекислого газа (CO_2).

Забор биологического материала у животных осуществлялся после 14–15-часового голодания. Кровь крыс в количестве 0,5 мл отбиралась в пробирки для отбора крови с этилендиаминететрауксусной кислотой (ЭДТА). Проба крови тщательно перемешивалась и помещалась в холодильник. Анализ пробы производился через 120 мин после забора биологического материала. Для общеклинического анализа крови использовали автоматический гематологический анализатор Advia 2120 фирмы Siemens (Германия). Гематологический анализатор



Рисунок подготовлен авторами

Рис. 2. Имплантация местного гемостатического средства в брюшную полость крысы

полностью автоматизирован для подсчета клеток крови и эритроцитарных индексов [21].

Для оценки биохимических показателей забор крови производили в сухой вакутейнер. Для получения сыворотки крови пробы цельной крови центрифугировали при 3000 об/мин, при 4°C в течение 10 мин, после чего отбирали надосадочную жидкость — сыворотку. Определение биохимических показателей (общий белок, мочевина, креатинин, глюкоза, холестерин, общий билирубин, аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминонтррансфераза (АСТ), щелочная фосфатаза (ЩФ)) производили на биохимическом анализаторе А-25 фирмы «BioSystems» (Испания) с использованием наборов АО «Вектор-Бест» (Россия). Внутренний контроль качества исследований производился на контрольных материалах АО «Вектор-Бест» (Россия) [22].

В качестве метода эвтаназии использовали ингаляцию CO₂ с последующим обескровливанием. Для эвтаназии использовали установку для эвтаназии фирмы Open Science (Россия) [23].

На 29-е сут исследования животные были подвергнуты полной некропсии, которая включала осмотр внешней поверхности тела, всех проходов, черепной, грудной, брюшной полостей и их содержимого. При запланированной некропсии у всех исследуемых животных были взвешены головной мозг, сердце, легкие (пара), печень, надпочечники (пара), почки (пара), селезенка, яичники/семенники (пара), тимус. Парные органы были взвешены вместе. Кроме абсолютного веса органов, рассчитывали отношение веса органа к массе тела животного, представленное в процентах (%). У животных был выполнен гистологический анализ выделенных органов и тканей с дополнительной оценкой местного действия МГС после его имплантации (гистология брюшины). Проведен забор образцов ткани, которые были обезвожены, пропитаны парафином; подготовленные срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Гистологические препараты были исследованы методом световой микроскопии с помощью микроскопа Leica DM1000 (Германия) под 100-кратным увеличением.



Рисунок подготовлен авторами

Рис. 3. Ушивание брюшины крысы после имплантации местного гемостатического средства

Математико-статистический анализ результатов осуществляли с использованием пакетов программного обеспечения Microsoft Excel 2013 и Statistica 10.0. Для оценки различий между двумя группами был использован *U*-тест Манна — Уитни (Mann–Whitney test) [24]. Описательную статистику представляли в виде меры центральной тенденции и показателей разброса. Рассчитывали следующие описательные статистики количественных показателей: медиана (Me), верхняя (UQ) и нижняя (LQ) квартили. Статистически значимыми считали различия в показателях у животных опытных групп по отношению к контролю при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

После внутрибрюшинной имплантации исследуемого образца МГС крысам в дозе 512 мг/кг м.т. не зарегистрированы летальные исходы, животные по внешнему виду и поведению не отличались от животных из контрольной группы. Зарегистрирована гибель одного самца в контрольной группе ложно оперированных животных вследствие послеоперационных осложнений. Клиническое состояние экспериментальных животных было удовлетворительным в течение всего периода наблюдения. Признаков интоксикации не отмечено ни у одного животного. Потребление воды и корма у крыс из опытной и контрольной групп не отличалось.

Изучение воздействия исследуемого образца на массу тела половозрелых животных проводили на основании сравнительной оценки массы тела крыс после имплантации исследуемого образца и ложно оперированных животных на нескольких этапах исследования: фон (за день до имплантации МГС), 1-я, 2-я, 3-я и 4-я недели эксперимента.

Данные о массе тела крыс исследуемых групп представлены на рисунках 4 и 5. Важно отметить, что исходные (фоновые) уровни массы тела животных, как самок, так и самцов, значимо не различались в группах с имплантацией образца МГС и контрольной группе.

При сравнительной оценке массы тела самцов крыс после имплантации исследуемого образца и массы животных из контрольной группы в срок наблюдения: фон (за день до имплантации), 1-я, 2-я, 3-я и 4-я недели с использованием Mann–Whitney test значимых различий между исследуемыми группами не выявлено. В то же время выявлены статистически значимые различия в массе тела самок крыс из опытной группы на 2-й неделе наблюдения ($p = 0,022$), 3-й неделе ($p = 0,034$) и 4-й неделе ($p = 0,012$) по сравнению с контролем. Анализ данных, представленных на рисунке 5, показал, что значения массы тела самок крыс из опытной группы были статистически значимо ниже контрольных на 2-й неделе на 7,4%, на 3-й неделе на 5,2%, на 4-й неделе на 9,9%, хотя значения и не выходили за пределы референсных показателей для данного вида животных.

В таблице 1 приведены данные гематологических показателей у животных контрольной и экспериментальной групп. Анализ значений гематологических параметров у крыс самцов опытной группы выявил статистически достоверное увеличение доли моноцитов на 18% и абсолютного количества моноцитов на 42% по сравнению с контрольной группой животных. В то время как в результате исследования и последующей оценки значений гематологических параметров у самок из экспериментальной группы по сравнению с контролем выявлено

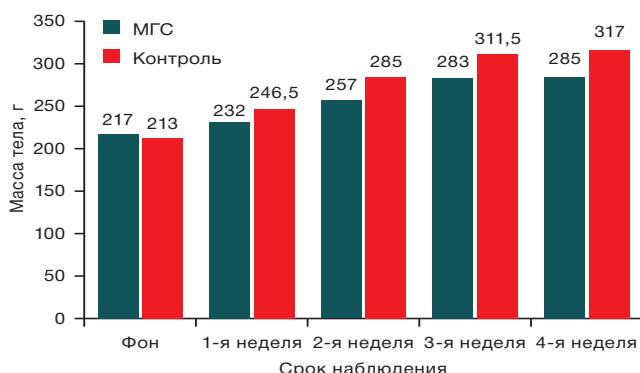


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 4. Динамика массы тела крыс самцов на различных сроках наблюдения

Примечание: данные представлены в виде медианных значений.

статистически достоверное снижение концентрации гемоглобина и среднего объема эритроцита на 5 и 7% соответственно [25].

Биохимические показатели исследовались через 29 сут после начала эксперимента у контрольных животных (самцов и самок), а также у животных опытной группы с имплантированным МГС (табл. 2).

Установлено, что в группе крыс-самцов после имплантации МГС отмечалось достоверное повышение активности аспартатаминотрансферазы на 18% по сравнению с контрольной группой.

При проведении макроскопического осмотра шерсть животных имела опрятный вид, была блестящей, без очагов облысения. При осмотре грудной и брюшной полостей

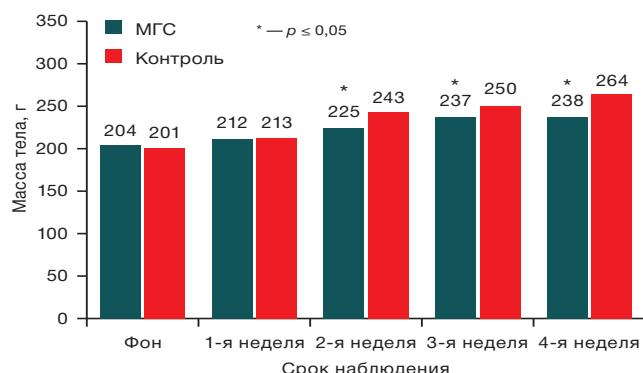


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 5. Динамика массы тела крыс самок на различных сроках наблюдения

Примечание: данные представлены в виде медианных значений.

нарушений в расположении внутренних органов не отмечалось. На поверхности брюшины и в брыжейке у животных экспериментальных групп наблюдали фрагменты МГС, которые образовывали плотный конгломерат (рис. 6).

В контрольной группе животных изменений на поверхности брюшины не было отмечено. В опытной группе в одном случае имело место образование свища передней брюшной стенки, формирование которого обусловлено реакцией отторжения инородного тела.

При осмотре внутренних органов тимус имел треугольную форму, беловатый цвет и умеренно плотную консистенцию. Величина и форма сердца не изменены. Поверхность легких имела бледно-розовую окраску, легкие спадались при вскрытии грудной клетки. Селезенка

Таблица 1. Сравнительная оценка гематологических показателей крыс самцов и самок опытной и контрольной групп через 29 сут после начала эксперимента

Показатель	Контроль (♂)	МГС, 512 мг/кг м.т. (♂)	Контроль (♀)	МГС, 512 мг/кг м.т. (♀)
Число животных в группе	4	5	5	5
Количество лейкоцитов, 10 ³ /мкл	9,68 [8,17; 11,70]	10,84 [10,19; 12,71]	7,51 [7,43; 8,16]	7,99 [7,09; 8,94]
Количество эритроцитов, 10 ⁶ /мкл	7,58 [7,52; 8,20]	7,58 [7,55; 7,91]	7,36 [7,31; 7,37]	7,42 [7,31; 7,63]
Концентрация гемоглобина, г/дл	14,95 [14,20; 15,95]	14,80 [14,80; 15,00]	14,30 [14,10; 14,50]	13,60* [13,00; 13,80]
Гематокрит, %	42,25 [41,25; 46,00]	42,50 [42,40; 43,20]	41,90 [41,40; 42,20]	40,30 [39,00; 41,20]
Средний объем эритроцита, фл	55,20 [54,50; 56,65]	55,90 [54,60; 56,40]	57,20 [57,00; 57,30]	53,40* [52,60; 55,60]
Количество тромбоцитов, 10 ³ /мкл	787,00 [686,00; 928,00]	826,00 [601,00; 978,00]	983,00 [962,00; 1022,00]	970,00 [946,00; 1092,00]
Средний объем тромбоцита, фл	6,85 [6,55; 7,75]	6,90 [6,70; 7,10]	7,10 [7,00; 7,20]	7,20 [7,10; 7,30]
Доля нейтрофилов, %	28,20 [20,75; 38,25]	25,80 [23,20; 25,90]	21,10 [20,50; 32,40]	35,50 [28,80; 47,40]
Доля лимфоцитов, %	66,95 [56,00; 72,85]	66,60 [65,30; 68,20]	70,70 [61,40; 74,90]	59,40 [46,40; 65,10]
Доля моноцитов, %	3,45 [2,70; 3,65]	4,20* [4,10; 4,50]	2,80 [2,70; 3,00]	2,70 [2,10; 2,70]
Доля эозинофилов, %	0,85 [0,75; 1,60]	0,80 [0,80; 1,10]	1,20 [1,20; 1,50]	1,10 [0,90; 2,10]
Доля базофилов, %	0,90 [0,75; 1,20]	1,00 [0,80; 1,20]	0,70 [0,60; 1,80]	0,40 [0,40; 0,50]
Доля неидентифицированных клеток, %	0,75 [0,60; 1,00]	1,10 [1,00; 2,00]	0,90 [0,90; 1,10]	0,90 [0,60; 0,90]
Количество нейтрофилов, 10 ³ /мкл	3,22 [2,01; 3,86]	2,64 [2,33; 2,80]	2,06 [1,50; 2,54]	3,25 [2,30; 3,55]
Количество лимфоцитов, 10 ³ /мкл	6,82 [5,02; 7,80]	7,08 [6,78; 7,28]	5,48 [5,01; 5,74]	4,15 [3,18; 5,35]
Количество моноцитов, 10 ³ /мкл	0,30 [0,28; 0,33]	0,52* [0,40; 0,55]	0,21 [0,20; 0,24]	0,19 [0,17; 0,25]
Количество эозинофилов, 10 ³ /мкл	0,09 [0,08; 0,15]	0,09 [0,07; 0,14]	0,09 [0,09; 0,11]	0,08 [0,08; 0,09]
Количество базофилов, 10 ³ /мкл	0,10 [0,08; 0,11]	0,11 [0,10; 0,11]	0,05 [0,05; 0,18]	0,03 [0,02; 0,05]
Количество неидентифицированных клеток, 10 ³ /мкл	0,07 [0,07; 0,09]	0,14 [0,10; 0,19]	0,08 [0,07; 0,09]	0,06 [0,05; 0,07]

Таблица составлена авторами по собственным данным

Примечание: данные представлены в виде Me [LQ; UQ]. * статистическая значимость различий контрольной и экспериментальной групп, $p < 0,05$.

Таблица 2. Сравнительная оценка биохимических показателей крыс самцов и самок опытной и контрольной групп через 29 сут после начала эксперимента

Показатель	Контроль (♂)	МГС, 512 мг/кг м.т. (♂)	Контроль (♀)	МГС, 512 мг/кг м.т. (♀)
Число животных в группе	4	5	5	5
Общий белок, г/л	81,4 [75,9; 87,5]	74,5 [71,9; 77,0]	77,8 [77,6; 85,9]	80,4 [79,0; 81,0]
Мочевина, ммоль/л	6,0 [5,3; 7,3]	8,7 [7,6; 9,0]	7,5 [7,0; 8,9]	10,0 [8,1; 10,8]
Креатинин, мкмоль/л	54,0 [50,5; 62,5]	55,0 [55,0; 55,0]	50,0 [49,0; 52,0]	64,0 [63,0; 70,0]
Глюкоза, ммоль/л	8,8 [8,2; 9,9]	9,2 [9,0; 9,4]	10,5 [9,8; 10,7]	9,8 [9,5; 9,9]
Холестерин, ммоль/л	2,5 [2,2; 3,0]	2,6 [2,1; 2,8]	2,8 [2,4; 3,1]	2,3 [2,2; 2,7]
Билирубин общий, мкмоль/л	1,7 [1,4; 1,7]	1,5 [1,3; 2,2]	1,2 [0,9; 1,4]	0,6 [0,2; 1,1]
АСТ, ЕД/л	166,0 [148,6; 171,3]	196,5* [195,9; 200,6]	73,7 [54,4; 74,6]	102,0 [73,3; 114,4]
АЛТ, ЕД/л	76,0 [66,5; 86,0]	81,0 [79,0; 90,0]	70,0 [69,0; 77,0]	69,0 [65,0; 71,0]
Щелочная фосфатаза, ЕД/л	349,0 [265,5; 428,5]	297,0 [275,0; 315,0]	188,0 [182,0; 224,0]	236,0 [210,0; 283,0]

Таблица составлена авторами по собственным данным

Примечание: данные представлены в виде Me [LQ; UQ]. * статистическая значимость различий контрольной и экспериментальной групп, $p < 0,05$.

имела темно-вишневый цвет, гладкую поверхность и плотноватую консистенцию. Желудок имел обычную форму и размеры, просвет был заполнен плотным пищевым содержимым. Слизистая тонкой и толстой кишки была блестящей, гладкой. Поджелудочная железа имела бледно-розовой цвет, дольчатое строение. Величина и форма печени, почек, надпочечников, семенников и яичников не изменились. Вещество головного мозга имело умеренную плотность, расширения желудочеков не наблюдалось.

При оценке массовых коэффициентов внутренних органов крыс самцов и самок после имплантации МГС в дозе 512 мг/кг м.т. и контрольных животных с использованием Mann–Whitney test не установлено статистически значимых различий между всеми исследуемыми группами.

При гистологическом исследовании препаратов головного мозга, сердца, легких, почек, тимуса, семенников, яичников, надпочечников и селезенки контрольных животных и животных с имплантацией МГС в брюшную

полость через 29 сут после начала исследования существенных различий между группами не выявлено. В печени животных обеих групп регистрировали умеренно или резко выраженную жировую дистрофию гепатоцитов: в 7 случаях в опытной группе с имплантацией МГС и в 6 случаях у контрольных животных. При этом у одного животного из опытной группы и у одного из контрольной регистрировали мелкие некрозы с умеренно выраженной лимфо-макрофагальной инфильтрацией. Данные изменения могли быть вызваны послеоперационным стрессом [26].

При гистологическом исследовании на поверхности брюшины в опытной группе животных были видны фрагменты МГС, окруженные слоем лимфоцитов и лейкоцитов и молодой волокнистой соединительной тканью, была также отмечена лейко-лимфоцитарная инфильтрация (рис. 7), являющиеся признаками местнораздражающего действия. В контрольной группе регистрировали незначительное скопление лимфоцитов и макрофагов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенного исследования было установлено, что внутрибрюшинная имплантация исследуемого образца в дозе 512 мг/кг м.т. не приводила к гибели животных или к развитию каких-либо признаков интоксикации.

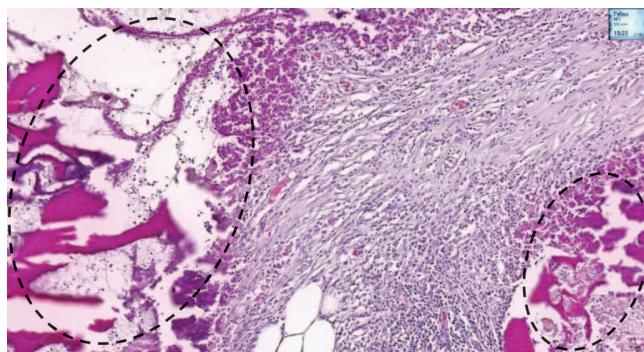


Рисунок подготовлен авторами

Рис. 6. Фрагменты местного гемостатического средства в брюшной полости крысы

Примечание: фрагменты обозначены стрелками.

Рисунок подготовлен авторами

Рис. 7. Гистологический срез брюшины крысы после имплантации местного гемостатического средства

Примечание: пунктирной линией выделены фрагменты МГС, окруженные слоем лимфоцитов и лейкоцитов и молодой волокнистой соединительной тканью. Окраска гематоксилином и эозином, 100-кратное увеличение

Животные опытной группы по внешнему виду и поведению не отличались от животных контрольной группы. Общее состояние подопытных животных было удовлетворительным на протяжении всего эксперимента, показатели водо- и кормопотребления не отличались от контроля. Показатели массы тела крыс-самцов не отличались от контроля, тогда как показатели массы тела самок были статистически значимо ниже по сравнению с контролем на нескольких этапах обследования, но при этом масса тела животных внутри своей группы не снижалась на протяжении всего исследования. Различия массы тела самок опытной и контрольной групп могли быть связаны с послеоперационным стрессом.

При анализе гематологических показателей у животных в ходе эксперимента установлено статистически достоверное увеличение доли моноцитов и абсолютного количества моноцитов у крыс-самцов опытной группы по сравнению с контрольной группой животных, вероятно, связанное с воспалительной реакцией, протекающей в брюшной полости крыс.

У крыс-самок с имплантированным МГС отмечали статистически значимое снижение концентрации гемоглобина и среднего объема эритроцитов по сравнению с контролем, вызванное, по всей видимости, местнораздражающей реакцией брюшины.

Установленное повышение активности аспартатаминонтррансферазы в группе крыс-самцов после имплантации МГС по сравнению с контрольной группой, вероятно, связано с повреждением печени животных из-за послеоперационного стресса [26].

Необходимо отметить, что колебания гематологических и биохимических показателей у животных не выходили за пределы референсных интервалов, установленных для данного вида животных [25].

Оценка массовых коэффициентов внутренних органов крыс после имплантации МГС в дозе 512 мг/кг м.т. показала отсутствие статистически значимых различий между исследуемыми группами. Морфологические макроскопические исследования не выявили у экспериментальных животных изменений структуры внутренних органов, через 29 суток после начала эксперимента в брюшине и в брыжейке наблюдали фрагменты МГС, которые формировали плотный конгломерат. По резуль-

татам гистологической оценки местного действия после имплантации МГС выявлены признаки местнораздражающего действия (по сравнению с контрольной группой животных). Формирование свища передней брюшной стенки у одного из самцов группы контроля позволяет предположить, что представленные образцы МГС необходимо удалять по достижении гемостаза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование показало, что внутрибрюшинная имплантация образца в дозе 512 мг/кг м.т. не вызвала гибели животных или признаков интоксикации. Масса тела крыс-самок была статистически значимо ниже контрольных на 2, 3, 4-й неделе наблюдения, но значения не выходили за пределы референсных показателей для данного вида животных.

При внутрибрюшинной имплантации образца в дозе 512 мг/кг м.т. у крыс-самцов по сравнению с контролем отмечено увеличение доли абсолютного количества моноцитов, а также повышение активности АсАт, не выходящих за пределы референсных значений, что могло быть связано с местнораздражающим действием образца и/или послеоперационным стрессом.

Патоморфологические исследования не выявили изменений в структуре внутренних органов животных. На брюшине и в брыжейке крыс были обнаружены фрагменты МГС, которые сформировали плотный конгломерат. Гистологическая оценка тканей показала признаки местнораздражающего действия.

Полученные в результате проведенного исследования данные свидетельствуют о нормальной переносимости животными (крысами) имплантации местного гемостатического средства в брюшную полость в дозе 512 мг/кг м.т. и позволяют рекомендовать его для дальнейших исследований токсичности, а также специфических видов активности.

Для оценки биосовместимости и возможного срока биодеградации местного гемостатического средства необходимо проведение дополнительных исследований. Исследование биосовместимости и биодеградации МГС на основе хитозана целесообразно провести на крупных лабораторных животных (свиньях) с целью последующей экстраполяции полученных результатов на человека.

Литература / References

- Трухан АП, Самохвалов ИМ, Толмачев ИА, Исаков ВД, Головко КП, Скакунова ТЮ и др. Роль кровопотери в структуре факторов танатогенеза при взрывной травме мирного времени. *Вестник Российской Военно-медицинской академии*. 2020;2(70):66-9.
- Trukhan AP, Samokhvalov IM, Tolmachev IA, Isakov VD, Golovko KP, Skakunova TYu, et al. The role of blood loss in the structure of thanatogenesis factors in explosive injury during peacetime. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2020;2(70):66-9 (In Russ.). <https://doi.org/10.17816;brmma50048>
- Самохвалов ИМ, Гончаров АВ, Чирский ВС, Носов АМ, Головко КП, Бадмаев ВБ и др. Потенциально спасаемые раненые — резерв снижения догоспитальной летальности при ранениях и травмах. *Скорая медицинская помощь*. 2019;20(3):10-7.
- Samokhvalov IM, Goncharov AV, Chirskiy VS, Nosov AM, Golovko KP, Badmaev VB, et al. Potentially survivable casualties — reserve to reduce pre-hospital lethality in injuries and traumas. *Emergency medical care*. 2019;20(3):10-7 (In Russ.). <https://doi.org/10.24884/2072-6716-2019-0-3-10-17>
- Янбарисова ЭВ, Бадретдинова ЮА, Хасанов АГ. Диагностика и хирургическая тактика при повреждениях паренхиматозных органов брюшной полости. *Успехи современного естествознания*. 2014;6:73-6.
- Yanbarisova EV, Badretdinova YuA, Khasanov AG. Diagnosis and surgical tactics in injuries of parenchymatous organs of the abdominal cavity. *Advanced in current natural sciences*. 2014;6:73-6 (In Russ.). EDN: RYHWZJ
- Чумаков АА, Малашенко ВН, Хореев АН, Козлов СВ. Показания к лечебнодинамическим видеолапароскопиям при проникающих ранениях брюшной полости. Мат-лы второй науч.-практич. конф. хирургов Северо-Запада и 23 Республики Карелия совместно с Санкт-Петербургским НИИ скорой помощи. Петрозаводск; Республика Карелия; 2000.
- Chumakov AA, Malashenko VN, Khoreev AN, Kozlov SV. Indications for therapeutic dynamic videolaparoscopy for penetrating wounds of the abdominal cavity. Proceedings of the second scientific and practical conference of surgeons of the North-West and 23 Republic of Karelia together with St. Petersburg

- Research Institute of Emergency Aid. Prof. I.I. Dzhanelidze; Petrozavodsk; Republic of Karelia. 2000 (In Russ.).
5. Schoenfeld AJ. The combat experience of military surgical assets in Iraq and Afghanistan: a historical review. *American journal of surgery*. 2012;204(3):377–83.
<https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2011.09.028>
 6. Hoencamp R, Vermetten E, Tan E. Systematic review of the prevalence and characteristics of battle casualties from NATO coalition forces in Iraq and Afghanistan. *Injury*. 2014;45(7):1028–34.
<https://doi.org/10.1016/j.injury.2014.02.012>
 7. Атаджанов ШК. Анализ осложнений лапароскопических холецистэктомий и пути их профилактики. *Журн. теорет. и клин. мед.* 2005;2:89–93.
Atadzhany Sh.K. Complications of laparoscopic cholecystectomy and its prevention. *Journal of Theoretical and Clinical Medicine*. 2005;2:89–93 (In Russ.).
EDN: [QEAGCB](#)
 8. Хаджибаев АМ, Маликов ЮР, Атаджанов ШК, Эрметов АТ, Самеддинов НЮ. Лапароскопические вмешательства в диагностике и лечении послеоперационных внутрибрюшных осложнений в ургентной абдоминальной хирургии. *Анналы хир. гепатол.* 2005;10(2):230.
Khadzhibaev AM, Malikov YuR, Atadzhany ShK, Ermetov AT, Sametdinov NYu. Laparoscopic interventions in the diagnosis and treatment of postoperative intra-abdominal complications in urgent abdominal surgery. *Annals of Surgical Hepatology*. 2005;10(2):230 (In Russ.).
EDN: [HTZYQN](#)
 9. Шинкевич ДС, Магилевец МВ. Сравнительная оценка различных методов хирургического гемостаза, применяемых при удалении зубов у гематологических пациентов. Мат-лы национ. конгресса с междунар. участием «Паринские чтения 2020»: Актуальные вопросы диагностики, лечения и диспансеризации пациентов с хирургической патологией челюстно-лицевой области и шеи; 7-8 мая 2020; Минск, Республика Беларусь. Минск: Белорусский государственный университет; 2020. С. 272–7.
Shinkevich DS, Magilevets MV. Comparative evaluation of different methods of surgical hemostasis used during tooth extraction in hematologic patients. Materials of the national congress with international participation Parinsky Readings 2020. Topical issues of diagnostics, treatment and dispensary of patients with surgical pathology of maxillofacial region and neck; 2020 May 7–8; Minsk, Republic of Belarus. Minsk: Belarusian State University; 2020. p. 272–7 (In Russ.).
EDN: [MLCPRO](#)
 10. Kim JC, Choi SS, Wang SJ, Kim SG. Minor complications after mandibular third molar surgery: type, incidence, and possible prevention. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2006;102(2):4–11.
<https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.10.050>
 11. Rago AP, Marini J, Duggan MJ, et al. Diagnosis and deployment of a self-expanding foam for abdominal exsanguination: Translational questions for human use. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2015;78(3):607–13.
<https://doi.org/10.1097/TA.0000000000000558>
 12. Белозерская ГГ, Макаров ВА, Жидков ЕА, Малыхина ЛС, Сергеева ОА, Тер-Арутюнянц АА и др. Гемостатические средства местного действия (обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2006;40(7):9–15.
Belozereskaya GG, Makarov VA, Zhidkov EA, Malykhina LS., Sergeeva O.A., Ter-Arutunyan A.A., Makarova L.V. Topical hemostatic agents (review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2006;40(7):9–15 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30906/0023-1134-2006-40-7-9-15>
 13. Muxika A, Etxabide A, Uranga J, Guerrero P, de la Caba K. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017;105:1358–68.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.087>
 14. Dowling MB, Kumar R, Keibler MA, Hess JR, Bochicchio GV, Raghavan SR. A self-assembling hydrophobically modified chi-
 - tosan capable of reversible hemostatic action. *Biomaterials*. 2011;32(13):3351–7.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.12.033>
 15. Okamoto Y, Yano R, Miyatake K, Tomohiro I, Shigemasa Y, Minami S. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. *Carbohydr. Polym.* 2003;(53):337–42.
[https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(01\)00324-6](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(01)00324-6)
 16. Paneva D, Manolova N, Rashkov I, Danchev D. Gel beads composed of chitosan and polyacids and their blood compatibility. *J. Bioact. Compat. Polym.* 2005;(20):133–51.
<https://doi.org/10.1177/0883911505051855>
 17. Wang X, Yan Y, Zhang R. A comparison of chitosan and collagen sponges as hemostatic dressings. *J. Bioact. Compat. Polym.* 2006;(21):39–54.
<https://doi.org/10.1177/0883911506060201>
 18. Самохвалов ИМ, Головко КП, Гришин МС, Носов АМ, Лябах ДД, Ковалевский АЯ. Экспериментальное исследование эффективности местного гемостатического средства на основе хитозана и внешней компрессии живота для временной остановки внутрибрюшного кровотечения. *Журнал Неотложная хирургия им. И.И. Джанелидзе*. 2023;1:66–72.
Samokhvalov IM, Golovko KP, Grishin MS, Nosov AM, Lyabakh DD, Kovalevskiy AYa. Experimental study of a local hemostatic agent based on chitosan and external abdominal compression for the temporary control of intra-abdominal bleeding. *Journal of Emergency Surgery named after I.I. Janelidze*. 2023;1:66–72 (In Russ.).
https://doi.org/10.54866/27129632_2023_1_66
 19. Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К; 2012.
Mironov AN, ed. Guidelines for conducting preclinical studies of medicinal products. Moscow: Grif & K; 2012. (In Russ.).
 20. ГОСТ ISO 10993-11-2021 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 11. Исследования общетоксического действия.
ГОСТ ISO 10993-11-2021 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 11. Исследования общетоксического действия.
 21. Меньшиков ВВ, Делекторская ЛН, Золотницкая РП. Лабораторные методы исследования в клинике. М.: Медицина; 1987.
Men'shikov VV, Delektorskaya LN, Zolotnitskaya RP. Laboratory methods of research in the clinic. Moscow: Medicine; 1987 (In Russ.).
 22. Lifshits VM, Sidel'nikova VI. Биохимические анализы в клинике: справочник. М.: МИА; 1998.
Lifshits VM, Sidel'nikova VI. Biochemical tests in the clinic: a handbook. Moscow: MIA; 1998 (In Russ.).
 23. Рыбакова АВ, Макарова МН. Методы эвтаназии лабораторных животных в соответствии с Европейской директивой 2010/63. Международный вестник ветеринарии. 2015;2:96-107.
Rybalkova AV, Makarova MN. Methods of euthanasia of laboratory animals, in accordance with European directive 2010/63. *International Journal of Veterinary Medicine*. 2015;2:96-107 (In Russ.).
EDN: [ULGMCX](#)
 24. Юнкеров ВИ. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований. СПб.: ВМедА; 2002.
Yunkerov VI. Mathematical and statistical processing of medical research data. St.Petersburg: VMedA; 2002 (In Russ.).
 25. Формирование пополняемого реестра ассоциированных со здоровьем референсных интервалов биометрических признаков лабораторных животных. Отчет о НИР (промежуточный). ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России, рук. Верведа АБ, исполн.: Бажанова ЕД, Генералова КР, Кубарская ЛГ, Бельская АВ и др. СПб.; 2021. 180 с. № ГР НИР АААА-А20-120041690023-2. Деп. в ЦТИС 09.12.2021, № ИКРБС 221121300357-3.
Formation of a replenishable register of health-associated reference intervals of biometric traits of laboratory animals. Research report (interim). Institution Golikov Research Clinical Center

of Toxicology under the Federal Medical Biological Agency, supervised by Verveda AB, executed by: Bazhanova ED, Generalova KR, Kubarskaya LG, Belskaya AB, et al. SPb.; 2021. 180 c. № GR NIR AAAA-A20-120041690023-2. Dep. in CITIS 09.12.2021, № ICRBS 221121300357-3 (In Russ.).
 26. Иванова ЕА, Дзюман АН, Дворниченко МВ. Местная биосовместимость и биохимические маркеры цитолиза гепато-

цитов при подкожной имплантации полилактидных матриц. *Бюллетень сибирской медицины.* 2022;21(4):63–71.
 Ivanova EA, Dzyuman AN, Dvornichenko MV. Local biocompatibility and biochemical profile of hepatic cytolysis in subcutaneous implantation of polylactide matrices. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2022;21(4):63–71 (In Russ.).
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-63-71>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: А.А. Бондаренко — разработка протокола исследования, выполнение экспериментальной части работы, статистическая обработка полученных экспериментальных данных; А.В. Шульц — выполнение экспериментальной части работы; Г.Г. Катрецкая — научное руководство, написание раздела введение; Е.А. Золотоверхая, Л.Г. Кубарская — проведение биохимических и гематологических исследований крови; Е.Д. Бажанова, О.Н. Гайкова — проведение гистологического исследования органов; А.М. Носов, К.П. Головко, М.В. Волкова — разработка образцов местного гемостатического средства, разработка протокола исследования.

ОБ АВТОРАХ

Носов Артем Михайлович, канд. мед. наук
<https://orcid.org/0000-0001-9977-6543>
artem_svu06@mail.ru

Бондаренко Анастасия Александровна
<https://orcid.org/0000-0002-9754-1537>
bondarenko-nastua@yandex.ru

Катрецкая Галина Геннадьевна, канд. мед. наук
<https://orcid.org/0009-0001-8289-504X>
dr.katretskaia@yandex.ru

Головко Константин Петрович, д-р мед. наук, доцент
<https://orcid.org/0000-0002-1584-1748>
labws@mail.ru

Шульц Алена Викторовна
<https://orcid.org/0000-0002-9809-0678>
shults.alena24@yandex.ru

Волкова Марина Викторовна, канд. биол. наук
<https://orcid.org/0000-0001-5966-3026>
biotech.volkova@list.ru

Золотоверхая Екатерина Андреевна, канд. биол. наук
<https://orcid.org/0000-0002-9708-2596>
e.zolotoverkhaja@yandex.ru

Кубарская Лариса Георгиевна, канд. мед. наук
<https://orcid.org/0000-0001-7622-0390>
larkub@yandex.ru

Бажанова Елена Давыдовна, д-р биол. наук
<https://orcid.org/0000-0002-9763-504X>
bazhanovae@mail.ru

Гайкова Ольга Николаевна, д-р мед. наук, проф.
<https://orcid.org/0000-0002-9942-2742>
olga-gaykova@yandex.ru

<https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-58-65>

ВЛИЯНИЕ КОМБИНАЦИЙ АНТИБИОТИКОВ, ФАГОВ И ДЕПОЛИМЕРАЗЫ НА БИОПЛЕНКИ ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВОГО ШТАММА *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

А.О. Кривуля[✉], Р.Б. Городничев, М.А. Корниенко, Н.К. Абдраймова, М.В. Малахова, М.В. Зайчикова, Е.А. Шитиков

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. академика Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва, Россия

Введение. *Klebsiella pneumoniae* представляет серьезную угрозу глобальному здравоохранению из-за высокой доли изолятов с множественной лекарственной устойчивостью. Более того, формирование бактериальной биопленки значительно усложняет лечение инфекций.

Цель. Оценка эффективности индивидуального и комбинированного действия антибиотиков и бактериофагов или полисахарид-деполимеразы на биопленки клинически значимого штамма *K. pneumoniae*.

Материалы и методы. В работе использовали штамм *K. pneumoniae* с множественной лекарственной устойчивостью 9faiz, 4 антибиотика различных классов (гентамицин, левофлоксацин, меропенем и хлорамфеникол), 3 бактериофага различных родов (Dlv622, Seu621 и FRZ284) и 1 полисахарид-деполимеразу (Dep622). Эксперименты проводили на сформированных биопленках путем обработки 24-часовых пленок *K. pneumoniae* antimicrobными агентами индивидуально или в комбинациях. Способность штамма образовывать биопленки оценивали окрашиванием кристаллическим фиолетовым. Сравнение между средними значениями оптической плотности проводилось с помощью *t*-теста и считалось значимым при $p \leq 0,05$.

Результаты. Индивидуальное применение антибиотиков в пиковых концентрациях (C_{max}) или деполимеразы в концентрации 100 МДК (минимальная действующая концентрация) не приводило к значимому снижению биомассы биопленки, тогда как бактериофаги в титре 5×10^9 БОЕ/мл статистически значимо снижали ее биомассу на 27–31% ($p \leq 0,05$). Большинство комбинаций фагов и антибиотиков не приводило к значимому повышению эффективности разрушения биопленок; лишь сочетание фага FRZ284 с гентамицином статистически значимо показало дополнительное снижение биомассы биопленки на 27% ($p \leq 0,05$). Комбинации деполимеразы со всеми антибиотиками, кроме меропенема, приводили к значимому увеличению биомассы биопленки на 27–39% ($p \leq 0,05$).

Выводы. Результаты показывают необходимость индивидуального подбора antimicrobных комбинаций для борьбы с биопленками *K. pneumoniae* из-за возможного влияния эффектов синергии и antagonизма на исход терапии.

Ключевые слова: вирулентные бактериофаги; *Klebsiella pneumoniae*; синергия; биопленки; деполимераза; антибиотики

Для цитирования: Кривуля А.О., Городничев Р.Б., Корниенко М.А., Абдраймова Н.К., Малахова М.В., Зайчикова М.В., Шитиков Е.А. Влияние комбинаций антибиотиков, фагов и деполимеразы на биопленки лекарственно-устойчивого штамма *Klebsiella pneumoniae*. Медицина экстремальных ситуаций. 2024;26(4):58–65. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-58-65>

Финансирование: исследование выполнено в рамках государственного задания ФМБА России по теме «Бактериофаг-2», государственный учет ЕГИСУ НИОКР № 122022800139-0

Потенциальный конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Кривуля Анастасия Олеговна kimnimka@gmail.com

Статья поступила: 29.08.2024 После доработки: 19.11.2024 Принята к публикации: 20.11.2024

EFFECT OF COMBINATIONS OF ANTIBIOTICS, PHAGES, AND DEPOLYMERASE ON BIOFILMS OF THE DRUG-RESISTANT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* STRAIN

Anastasiia O. Krivulja[✉], Roman B. Gorodnichev, Maria A. Kornienko, Narina K. Abdraimova, Maja V. Malakhova, Marina V. Zaychikova, Egor A. Shitikov

Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

Introduction. *Klebsiella pneumoniae* poses a serious threat to global healthcare due to the high proportion of multidrug-resistant isolates. Moreover, the formation of biofilms by bacteria significantly complicates the treatment of infections.

Objective. To evaluate the effectiveness of the individual and combined action of antibiotics and bacteriophages or polysaccharide depolymerase on biofilms of a clinically significant strain *K. pneumoniae*.

Materials and methods. The work used the *K. pneumoniae* strain with multidrug resistance (9faiz), 4 antibiotics of various classes (gentamicin, levofloxacin, meropenem and chloramphenicol), 3 bacteriophages of various genera (Dlv622, Seu621 and FRZ284), and 1 polysaccharide depolymerase (Dep622). Experiments were carried out on the formed biofilms by treating 24-hour *K. pneumoniae* films with antimicrobial agents individually or in combinations. The ability of the strain to form biofilms was evaluated by staining with crystalline violet. The comparison between the average optical density values was carried out using a *t*-test and was considered significant at $p \leq 0,05$.

Results. The individual use of antibiotics peak concentrations (C_{max}) or depolymerase concentration of 100 MED (minimum effective dose — MED) did not lead to a significant decrease in biofilm biomass, whereas bacteriophages in a titer of 5×10^9 PFU/mL (plaque-forming unit per mL) statistically significantly reduced its biomass by 27–31% ($p < 0,05$). Most combinations of phages and antibiotics did not lead to a significant increase in the efficiency of biofilm destruction. Only the combination of phage FRZ284 with gentamicin statistically significantly showed an additional decrease in biofilm biomass by 27% ($p < 0,05$). Combinations of depolymerase with all antibiotics except meropenem resulted in a significant increase in biofilm biomass by 27–39% ($p < 0,05$).

Conclusions. The results show the need for individual selection of antimicrobial combinations to combat *K. pneumoniae* biofilms due to the possible effect of synergy and antagonism effects on the outcome of therapy.

Keywords: virulent bacteriophages; *Klebsiella pneumoniae*; synergy; biofilms; depolymerase; antibiotics

For citation: Krivulja A.O., Gorodnichev R.B., Kornienko M.A., Abdraimova N.K., Malakhova M.V., Zaychikova M.V., Shitikov E.A. Effect of combinations of antibiotics, phages, and depolymerase on biofilms of the drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain. Extreme Medicine. 2024;26(4):58–65. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-58-65>

Funding: The study was carried out within the framework of a state assignment of Federal Medical-Biological Agency (theme No. 122022800139-0)

Potential conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Anastasiia O. Krivulja kimnimka@gmail.com

Received: 29 Aug. 2024 Revised: 19 Nov. 2024 Accepted: 20 Nov. 2024

© А.О. Кривуля, Р.Б. Городничев, М.А. Корниенко, Н.К. Абдраймова, М.В. Малахова, М.В. Зайчикова, Е.А. Шитиков, 2024

ВВЕДЕНИЕ

Klebsiella pneumoniae — условно патогенная грамотрицательная бактерия, представляющая серьезную угрозу для глобального здравоохранения из-за стремительного распространения штаммов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). Резистентные штаммы вызывают значительное число нозокомиальных инфекций, таких как пневмония, инфекции мочевыводящих путей и кровотока, характеризующихся высоким уровнем смертности, достигающим 50% [1].

Терапия инфекций, вызванных *K. pneumoniae*, затруднена в связи со способностью патогена образовывать биопленки. Биопленки представляют собой организованные сообщества микроорганизмов, прикрепленные к различным биотическим и абиотическим субстратам посредством экзополимерной матрицы, состоящей из белков, полисахаридов и внеклеточной ДНК. По данным исследований, около 60–80% хронических инфекций связано с образованием биопленок [2]. Кроме того, биопленки часто формируются на инвазивных медицинских изделиях, что увеличивает риск развития острых инфекций у пациентов, находящихся на стационарном лечении [3].

Клетки внутри биопленок характеризуются замедленным метаболизмом и сниженной скоростью роста, а также повышенной частотой горизонтального переноса мобильных генетических элементов. Последние часто содержат гены вирулентности и устойчивости к антибиотикам, что позволяет клеткам биопленки эффективнее противостоять антимикробным препаратам и избегать иммунного ответа организма хозяина. В совокупности такие особенности увеличивают устойчивость биопленок к антибиотикам в 100–1000 раз по сравнению с планктонными формами микроорганизмов [2, 4]. Вследствие этого стандартные схемы антибиотикотерапии демонстрируют недостаточную эффективность в отношении инфекций, ассоциированных с биопленками, что обуславливает необходимость разработки новых терапевтических подходов.

Одним из перспективных подходов для борьбы с биопленками является применение бактериофагов или их производных, таких как полисахарид-деполимеразы. Бактериофаги способны деградировать внеклеточный матрикс биопленок за счет действия полисахарид-деполимераз, что нарушает целостность структуры биопленки и повышает чувствительность бактерий к антимикробным препаратам и факторам окружающей среды [5]. Это открывает возможности для использования бактериофагов как самостоятельных терапевтических агентов, а также в комбинации с клинически применямыми антибиотиками.

Совместное использование антимикробных агентов может приводить к различным типам взаимодействия, включая синергизм, аддитивный эффект или антагонизм. Синергизм наблюдается в тех случаях, когда совокупный эффект от применения нескольких антимикробных агентов превосходит сумму их индивидуальных воздействий. Аддитивный эффект подразумевает, что суммарное действие агентов равно сумме их отдельных эффектов, то есть они не влияют на эффективность друг друга. Антагонизм характеризуется тем, что общий эффект комбинации антимикробных агентов меньше суммы их индивидуальных воздействий, и свидетельствует о том, что действие одного из них каким-то образом препятствует действию другого [6].

На планкtonных клетках было показано, что фаги или полисахарид-деполимеразы в сочетании с антибиотиками демонстрируют преимущественно синергизм, приводящий к более эффективной элиминации бактерий по сравнению с монотерапией антимикробными препаратами [4, 7–9]. Однако в ряде публикаций также сообщается, что некоторые комбинации антибактериальных препаратов демонстрируют антагонистическое взаимодействие [7, 10]. Тем не менее влияние таких комбинаций на биопленки остается недостаточно изученным, что подчеркивает необходимость углубленного исследования возможных эффектов, возникающих при сочетанном действии фагов и их ферментов с антибиотиками.

Цель исследования: оценка эффективности индивидуального и комбинированного действия антибиотиков и бактериофагов или полисахарид-деполимеразы на биопленки клинически значимого штамма *K. pneumoniae*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы

Исследование проведено на штамме *K. pneumoniae* 9faiz из коллекции лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины им. академика Ю.М. Лопухина ФМБА России. Штамм, высевенный из биологического материала в 2019 году, принадлежал к капсульному типу KL23 и клинически значимому сиквенс-типу ST39, что было определено ранее согласно стандартным методам типирования [11, 12].

Бактериальную культуру выращивали на лизогенном бульоне (LB, от англ. lysogeny broth) в модификации Lennox («Диа-М», Россия). Культуру бактерий инкубировали в течение 18 ч при температуре 37 °C.

Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) антибиотиков определялась методом микроразведений в соответствии с российскими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» [13], согласно которым микроорганизмы классифицируются как чувствительные при стандартном режиме дозирования (S: МИК ≤ пороговое значение чувствительности), чувствительные при увеличенной экспозиции антимикробного препарата промежуточные (I: пороговое значение < МИК ≤ пороговое значение) или устойчивые (R: МИК > пороговое значение) (табл. 1). Ингибирующее действие антибиотиков оценивалось с помощью планшетного спектрофотометра FlexA-200 (Allsheng, КНР) на основании оптической плотности (OD, от англ. optical density) бактериальной культуры при длине волны 620 нм. Для работы использовались антибактериальные препараты четырех классов: аминогликозиды — гентамицин (GEN), фторхинолоны III поколения — левофлоксацин (LVX), карбапенемы — меропенем (MEM) и амфениколы — хлорамфеникол (CMP), набор реагентов HiMedia (Индия).

Штаммы *K. pneumoniae* Kp9068 и *K. pneumoniae* Kp284 использовались в качестве штаммов-хозяев для наращивания фаговых лизатов [14, 15].

Бактериофаги

В работе использовали три ранее описанных бактериофага *K. pneumoniae*: Dlv622, Seu621 и FRZ284 (GenBank MT939252, MT939253 и MZ602148), относящихся к родам

Таблица 1. Границы чувствительности *K. pneumoniae* к антибиотикам и максимально допустимые концентрации этих препаратов в сыворотке крови

Антибактериальный препарат	Границы чувствительности, мкг/мл			Пиковая концентрация антибиотика в сыворотке (C_{\max}), мкг/мл
	$\leq S$	I	$R \geq$	
Гентамицин	4	8	16	16 [16]
Левофлоксацин	2	4	8	6 [17]
Меропенем	1	2	4	28 [18]
Хлорамфеникол	8	16	32	25 [19]

Таблица подготовлена авторами по собственным данным

Drulisvirus, *Mydovirus* и *Jiaodavirus* соответственно [14, 15]. Фаги Dlv622 и Seu621 обладают капсулной специфичностью, а FRZ284 характеризуется широким спектром хозяев и не связан с капсулным типом. Для постановки экспериментов использовались фаговые лизаты в бульоне LB, стерилизованные фильтрацией через шприцевой фильтр 0,22 мкм (Merk, Millipor). Готовые стерильные лизаты хранились в холодильнике при температуре +4 °C.

Титр фагов определяли методом спот-тестирования [20]. Способность фагов заражать и лизировать исследуемый штамм анализировали на основании расчета эффективности посева (EOP, от англ. efficiency of plating) в соответствии со стандартной методикой [21]. Величину EOP вычисляли как отношение титра бактериофага на исследуемом штамме к титру фага на штамме-хозяине. Если фаг не образовывал единичных бляшек, а вызывал появление ореола на поверхности чашек Петри, который исчезал при уменьшении концентрации фага, это явление мы называли лизисом извне. Литическую активность фагов измеряли с помощью титрования по Аппельману согласно классической методике с модификациями [22]. Суспензию бактериофагов последовательно разводили десятикратно в бульоне LB. Затем по 190 мкл каждого разведения добавляли в лунки плоскодонного вентилируемого 96-луночного планшета (Thermo Scientific, Дания) и инокулировали 10 мкл (5×10^5 КОЕ/мл) бактериальной культуры на логарифмической стадии роста ($OD_{600} = 0,3$), дополнительно разведенной в 100 раз свежим бульоном LB. После 24-часовой инкубации планшета при 37 °C измеряли оптическую плотность при длине волны 620 нм с использованием планшетного спектрофотометра FlexA200. Титр по Аппельману определяли как наибольшее разведение фагового лизата, при котором оптическая плотность не увеличивалась по сравнению с отрицательным контролем, что указывало на отсутствие видимого роста бактерий.

Полисахарид-деполимераза

В работе использовали рекомбинантную полисахарид-деполимеразу Dep622 хвостовой фибриллы бактериофага Dlv622, полученную в виде очищенного белка, как описано ранее [14]. Способность Dep622 к деградации капсулных полисахаридов штамма 9faiz оценивали по методике, аналогичной титрованию бактериофагов. Для этого суспензию рекомбинантной полисахарид-деполимеразы серийно разводили в среде LB с шагом 2 (1392,64–0,085 мкг/мл). Полужидкий LB-агар (LB-бульон с добавлением 0,7% agarозы), содержащий 100 мкл ночной культуры исследуемого штамма, распределяли по поверхности чашки Петри. Аликвоты (5 мкл) каждого разведения наносили на поверхность агара и оставляли до высыхания капель. Чашки Петри инкубировали при температуре 37 °C в течение 24 ч. На сформированном бактериальном газоне

в местах нанесения ферmenta определяли появление полупрозрачных пятен, увеличивающихся в диаметре после 48 ч инкубации, что свидетельствовало о ферментативной активности деполимеразы. Минимальная действующая концентрация (МДК) определялась как концентрация последнего разведения, при которой еще наблюдалось действие ферmenta.

Метод оценки эффективности биопленкообразования

Биопленки штамма 9faiz выращивали в 96-луночном планшете. Для этого в каждую лунку вносили по 190 мкл питательной среды LB и инокулировали 10 мкл (5×10^5 КОЕ/мл) бактериальной культуры на логарифмической стадии роста ($OD_{600} = 0,3$), дополнительно разведенной в 100 раз свежим бульоном LB. В качестве отрицательного контроля для оценки отсутствия роста бактериальной культуры использовали чистую среду LB. Планшет инкубировали в термостате в течение 24 часов при 37 °C. По завершении инкубации среду удаляли, а биопленки отмывали от остатков планктонных клеток, трижды промывая стерильным физиологическим раствором (0,9%). Полученные биопленки окрашивали раствором кристаллического фиолетового в соответствии со стандартной методикой [23]. Биопленку инкубировали с 0,1% водно-спиртовым раствором кристаллического фиолетового («Химмед», Россия) в течение 30 мин при комнатной температуре. После инкубации несвязанный краситель удаляли тройным промыванием дистиллированной водой. Для последующего анализа связанный краситель в каждой лунке элюировали добавлением 200 мкл 96% этанола и измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре FlexA200 при длине волны 575 нм. По результатам измерения оптической плотности оценивали и классифицировали способность штамма образовывать биопленки следующим образом: не образующие биопленки ($OD \leq OD_c$), слабо ($OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$), умеренно ($2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$) или обильно ($OD > 4 \times OD_c$) образующие биопленки. Порог оптической плотности (OD_c , от англ. optical density cut-off) определялся как среднее арифметическое значение оптической плотности отрицательного контроля плюс три стандартных отклонения [23].

Изучение индивидуального и комбинированного воздействия антибиотиков и бактериофагов/полисахарид-деполимераз

Биопленки штамма 9faiz выращивали и отмывали по ранее описанному алгоритму, после чего среду меняли на свежую среду LB, содержащую исследуемые антибиотики, фаги или деполимеразу, как по отдельности, так и в комбинациях. Концентрации антибиотиков соответствовали пиковой концентрации (C_{\max}), достигаемой в сыворотке крови после введения стандартной

терапевтической дозы (табл. 1). Фаговый лизат добавляли в концентрации 5×10^9 БОЕ/мл, а рекомбинантную полисахарид-деполимеразу — в дозировке 100 МДК (68 мг/мл). Количества антимикробных агентов подбирались из расчета на объем лунки 200 мкл.

Для положительного контроля роста бактериальной культуры в условиях отсутствия антимикробного воздействия использовали среду LB без добавок. В случае индивидуального воздействия добавляли один антибактериальный агент, а для комбинированного — попарно антибиотик и бактериофаг или деполимеразу (всего 16 сочетаний). Инкубация биопленок с антимикробными агентами проводилась 24 ч, после чего биопленки промывали и окрашивали кристаллическим фиолетовым, как описано выше.

Оптическую плотность окрашенных биопленок измеряли при на спектрофотометре FlexA200 при длине волн 575 нм. Все эксперименты проводились в трех биологических повторностях, каждая из которых включала пять технических повторов для каждой комбинации.

Нормальность распределения проверяли тестом Шапиро — Уилка. Статистическая значимость и достоверность различий определялись *t*-критерием Стьюдента. Различие между средними считалось значимым при $p \leq 0,05$. Анализ и визуализация данных выполнялись с использованием программного пакета GraphPad Prism 8.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика штамма и его устойчивости к антимикробным агентам

Планктонные клетки штамма 9faiz демонстрировали устойчивость ко всем исследуемым антибиотикам. Значения МИК для гентамицина составили 128 мкг/мл, для левофлоксацина — 128 мкг/мл, для меропенема — 32 мкг/мл, и для хлорамфеникола — 128 мкг/мл. Также 9faiz был охарактеризован как штамм, обильно образующий биопленки.

Бактериофаги Dlv622 и Seu621 показали низкую эффективность посева на штамме 9faiz ($EOP = 0,01$). При титровании по Аппельману Dlv622 и Seu621 в концентрациях 5×10^9 БОЕ/мл также проявляли слабую активность, не подавляя полностью рост планктонных клеток. FRZ284 при определении эффективности посева показывал лизис извне, однако при титровании по Аппельману в концентрации 5×10^9 БОЕ/мл на 80% подавлял бактериальный рост.

Рекомбинантная деполимераза Dep622, нанесенная на бактериальный газон штамма 9faiz, образовывала полупрозрачные зоны, напоминающие ореол фаговой бляшки, что свидетельствовало о ферментативной активности. На основании результатов МДК Dep622 была определена как 0,68 мкг/мл.

Индивидуальное и комбинированное действие антимикробных агентов на биопленки

При индивидуальном применении бактериофагов Dlv622, Seu621 или FRZ284 в концентрации 5×10^9 БОЕ/мл биомасса биопленки статистически значимо снижалась на 27–30% по сравнению с контролем (рис. 1). В то же время применение антибиотиков в C_{max} концентрациях или деполимеразы Dep622 в 100 МДК не приводило к значимому разрушению биопленки.

Комбинированное применение бактериофага Dlv622 с исследуемыми антибиотиками не приводило к статистически значимому снижению биомассы биопленки по сравнению с контролем (рис. 2А). Однако сочетание Dlv622 с левофлоксацином или меропенемом показало статистически значимые отличия от индивидуального действия фага, снижая его эффективность на 30 и 34% соответственно, что свидетельствовало о возможном антагонистическом взаимодействии этих антимикробных агентов.

Использование бактериофага Seu621 с исследуемыми антибиотиками не приводило к изменению биомассы биопленки: результаты статистически значимо не отличались ни от индивидуального действия фага, ни от контроля ($p = 0,05$) (рис. 2Б).

Комбинированное использование FRZ284 с левофлоксацином, меропенемом или хлорамфениколом статистически значимо снижало биомассу биопленки по сравнению с контролем, однако эти результаты не отличались от индивидуального действия фага (рис. 2В). В сочетании с гентамицином FRZ284 показал значительное снижение биомассы биопленки на 58% относительно контроля и на 39% по сравнению с индивидуальным действием фага, что свидетельствует о синергетическом (предположительно) потенцировании между фагом и антибиотиком.

Деполимераза Dep622 в сочетании с гентамицином, левофлоксацином и хлорамфениколом значимо увеличивала биомассы биопленок на 27, 28 и 39% соответственно по сравнению с контролем и индивидуальным действием фермента, что указывает на потенциальный антагонизм между исследуемыми антимикробными агентами (рис. 2Г). Комбинация Dep622 с меропенемом статистически значимо не повлияла на биомассу биопленки по сравнению с контролем и индивидуальным действием фермента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование проводилось на штамме *K. pneumoniae* 9faiz, относящемся к капсульному типу KL23, часто ассоциируемому с устойчивостью к карбапенемам. Среди изолятов, производящих карбапенемазы, доля KL23 может достигать 9–17% [24]. Кроме того, штамм принадлежал к сиквенс-типу ST39, который характеризовался высокой устойчивостью к карбапенемам и был связан с несколькими вспышками карбапенем-резистентных

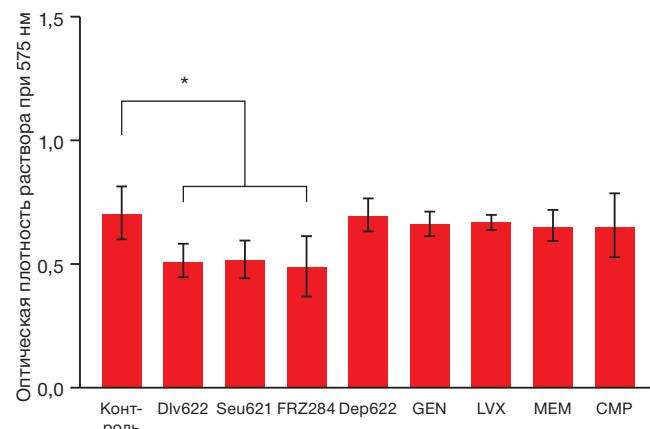


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 1. Изменение биомассы биопленки штамма *K. pneumoniae* при индивидуальном действии различных антибактериальных агентов. * $p \leq 0,05$

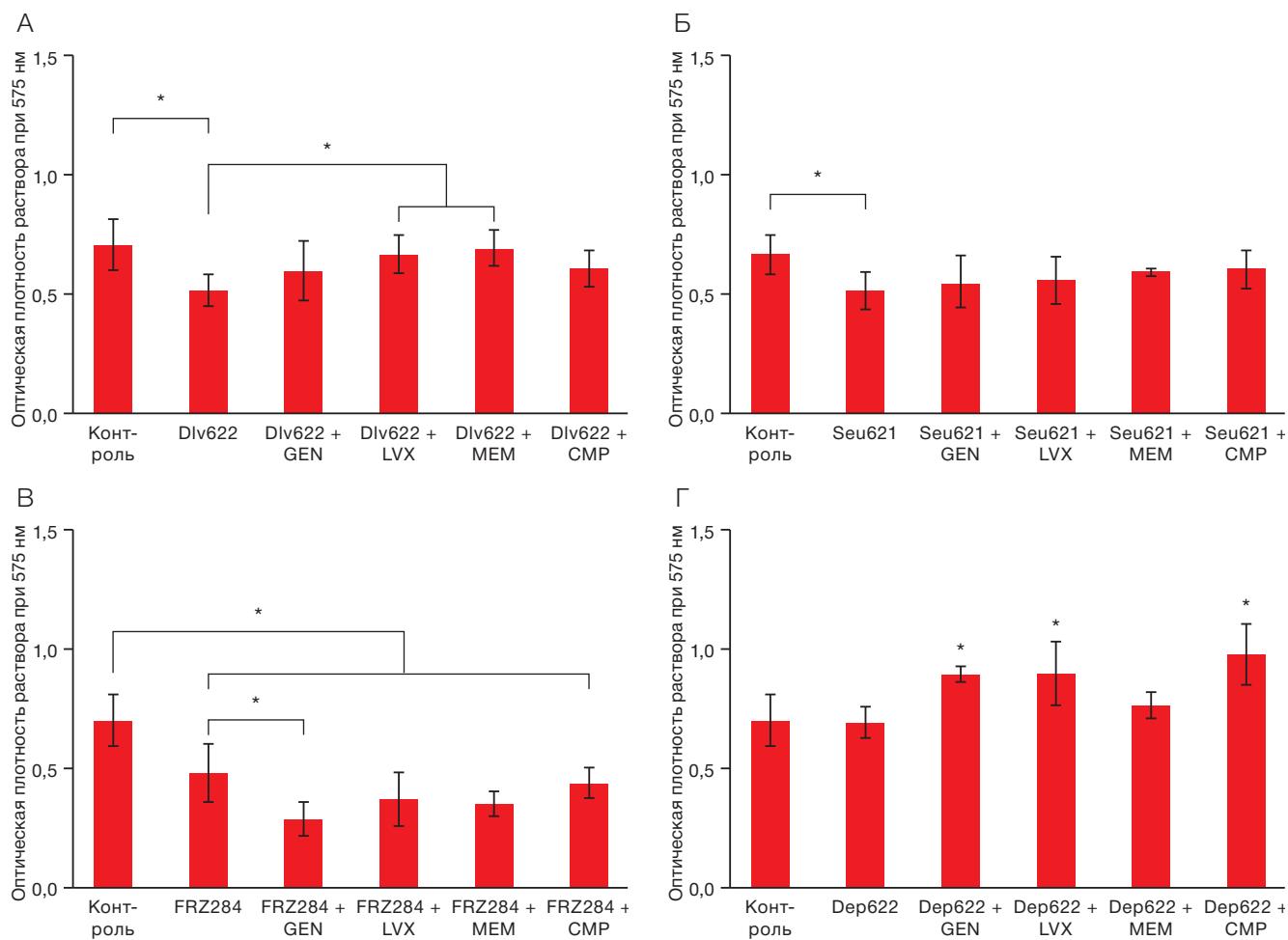


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 2. Изменение биомассы биопленки *K. pneumoniae* 9faiz при комбинированном действии различных антибактериальных агентов. * $p \leq 0,05$

штаммов *K. pneumoniae* в России и Греции [25]. Тесты на антибиотикорезистентность продемонстрировали устойчивость *K. pneumoniae* 9faiz к четырем основным классам антибиотиков, применяемых для лечения клебсиеллезной инфекции: аминогликозидам, фторхинолонам, карбапенемам и хлорамфениколам. Также штамм обладал выраженной способностью к формированию биопленок, что дополнительно подчеркивает его патогенность и устойчивость к терапевтическому воздействию стандартными дозами антибиотиков.

С целью выявления широкого спектра эффектов для исследования использовались бактериофаги, принадлежащие к различным таксономическим группам: Dlv622 (*Autographiviridae*, *Slopekvirinae*, *Drulisvirus*), Seu621 (*Vequintavirinae*, *Mydovirus*) и FRZ284 (*Straboviridae*, *Tevenvirinae*, *Jiaodavirus*). Бактериофаги Dlv622 и Seu621 имеют гомологичные рецептор-связывающие белки, представленные полисахарид-деполимеразами, специальными в отношении штаммов *K. pneumoniae* с капсульным типом KL23 [14]. Напротив, бактериофаг FRZ284 лизирует штаммы *K. pneumoniae* независимо от капсульного типа и имеет рецептор-связывающий белок неизвестной специфичности [15]. Для исследования чувствительности штамма 9faiz бактериофаги использовались в концентрации 5×10^9 БОЕ/мл, которая считается стандартной терапевтической дозой [26]. Результаты титрования по Аппельману показали, что данной дозы недостаточно для полного подавления роста планктонных

клеток. Кроме того, оценка эффективности посева выявила, что фаги Dlv622 и Seu621 размножаются на штамме 9faiz в 100 раз хуже, чем на штамме-хозяине, в то время как фаг FRZ284 демонстрирует исключительно лизис извне.

Ввиду устойчивости штамма 9faiz к исследуемым антибиотикам и недостаточной чувствительности к бактериофагам монотерапия antimикробными агентами оказалась малоэффективной для разрушения биопленок, что было подтверждено в ходе настоящего исследования. Индивидуальное воздействие бактериофагов уменьшало биомассу биопленок, но не приводило к их полному разрушению (рис. 1). Антибиотики статистически значимо не изменяли биомассу биопленки, что объясняется использованием низких концентраций antimикробных агентов. Для эксперимента были выбраны концентрации антибиотиков значительно ниже МИК, но соответствующие пиковым концентрациям антибиотика в сыворотке крови человека (табл. 1). Несмотря на высокую устойчивость биопленок к антибиотикам, превышение концентрации C_{\max} является неприемлемым в рамках практической терапии из-за потенциального токсического действия. Это подчеркивает необходимость учитывать данный фактор при подборе соответствующих концентраций антибиотиков для исследований *in vitro*.

Недостаточная эффективность индивидуального применения antimикробных агентов подчеркивает необходимость их комбинированного использования.

В существующих на данный момент исследованиях установлено, что комбинация антибиотиков и бактериофагов против биопленок демонстрирует более высокую эффективность по сравнению с монотерапией. Так, в нескольких работах было показано, что сочетание бактериофагов с ципрофлоксацином [27], амоксициллином или фосфомицином [9] проявляет синергетический эффект при разрушении биопленок *K. pneumoniae*. Результаты настоящего исследования также выявили один случай потенциального синергизма. Комбинированное применение бактериофага FRZ284 с гентамицином статистически значимо снижало биомассу биопленки штамма 9faiz по сравнению с индивидуальным использованием бактериофага (рис. 2В). Для антибиотиков класса аминогликозидов, к которым относится гентамицин, ранее были предложены механизмы подавления репликации бактериофагов [10], что может приводить к антагонизму. Согласно нашим результатам, действие гентамицина, вероятно, не нарушило репликативный цикл фага, что может объяснять наблюдаемую синергию и выявленные расхождения с ранее описанными исследованиями. Хотя в литературе отсутствуют данные о синergии антибиотиков и T4-подобных бактериофагов *K. pneumoniae*, к числу которых относится FRZ284, подобные случаи были описаны для комбинаций меропенема, ципрофлоксацина и колистина с T4-подобными фагами *Acinetobacter baumannii* [28].

Кроме того, в рамках проведенных экспериментов были выявлены два случая антагонизма при комбинированном применении бактериофага Dlv622 с левофлоксацином или меропенемом (рис. 2А). Несмотря на наличие в литературе данных о синергетическом взаимодействии антибиотиков и бактериофагов, антагонистические эффекты, выявленные для использованных в данной работе комбинаций antimикробных препаратов против биопленок *K. pneumoniae*, ранее не описывались. Поскольку левофлоксацин ингибирует ДНК-гиразу и топоизомеразу IV, полученные результаты могут свидетельствовать о снижении скорости репликации ДНК бактериофага Dlv622. Левофлоксацин также способен стимулировать образование более толстой биопленки у *K. pneumoniae* [2], что может затруднять проникновение бактериофага и снижать эффективность его действия. При этом ингибирование литической активности бактериофага меропенемом, блокирующим синтез клеточной стенки, остается трудным для объяснения из-за недостаточного понимания механизма этого эффекта.

Для остальных сочетаний антибиотиков и бактериофагов статистическая значимость не позволила судить об эффекте, однако, ориентируясь на средние значения, можно отметить, что комбинации с бактериофагами Dlv622 и Seu621 приводили скорее к снижению эффективности разрушения биопленок. Напротив, сочетания антибиотиков с бактериофагом FRZ284 просто

не привели к повышению эффективности. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости более тщательного подхода к подбору антибиотиков и бактериофагов для целей терапии.

В работе также была оценена эффективность разрушения биопленок посредством индивидуального воздействия полисахарид-деполимеразы и в сочетании с антибиотиками. Для этого использовался рекомбинантный белок Dep622, рецептор-связывающий белок фага Dlv622, который эффективно разрушал капсульные полисахариды штамма *K. pneumoniae* 9faiz в тестах *in vitro*. Ввиду применения рекомбинантных полисахарид-деполимераз исключительно в лабораторных исследованиях на сегодняшний день в литературе отсутствуют стандартизованные терапевтические дозировки для ферментов данной группы. Тем не менее эксперименты на животных моделях не выявили токсических эффектов при использовании деполимераз в различных концентрациях [4]. В связи с этим в настоящем исследовании применялась максимальная кратная доза (100 МДК), которую можно было достичь в лунке планшета без значительного разбавления среды.

В литературе данные относительно комбинации полисахарид-деполимеразы с антибиотиками показывали как эффекты синергии, так и отсутствие каких-либо эффектов [29, 30]. Полученные в ходе работы результаты продемонстрировали, что индивидуального действия Dep622 недостаточно для разрушения биопленок штамма 9faiz. Более того, сочетание полисахарид-деполимеразы с гентамицином, левофлоксацином и хлорамфениколом достоверно значимо увеличивало биомассу биопленок (рис. 2Г), что указывает на возможный антагонизм между antimикробными агентами. Подобные эффекты антагонизма между деполимеразами и антибиотиками ранее не были описаны и требуют дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования продемонстрировали неэффективность монокомпонентных подходов и выявили разнообразие эффектов, возникающих при комбинированном применении антибиотиков и бактериофагов или полисахарид-деполимеразы против биопленок. В частности, был выявлен один случай синергии и несколько случаев потенциального антагонизма между antimикробными агентами, который недостаточно освещен в существующей литературе.

Принимая во внимание, что в настоящее время терапия бактериофагами не подразумевает отмены курса антибиотиков, потенциальный антагонизм между двумя antimикробными агентами может стать существенной проблемой в терапии инфекций, ассоциированных с биопленками, что подчеркивает необходимость дальнейших исследований в этом направлении.

Литература / References

1. Han YL, Wen XH, Zhao W, Cao XS, Wen JX, Wang JR, et al. Epidemiological characteristics and molecular evolution mechanisms of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Front Microbiol*. 2022;13:1003783. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1003783>
2. Li L, Gao X, Li M, Liu Y, Ma J, Wang X, et al. Relationship between biofilm formation and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* and updates on antibiofilm therapeutic strategies. *Front Cell Infect Microbiol*. 2024;14:1324895.
3. Mishra SK, Basukala P, Basukala O, Parajuli K, Pokhrel BM, Rijal BP. Detection of Biofilm Production and Antibiotic Resistance Pattern in Clinical Isolates from Indwelling Medical Devices. *Curr Microbiol*. 2015;70(1):128–34. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0694-5>
4. Guo Z, Liu M, Zhang D. Potential of phage depolymerase for the treatment of bacterial biofilms. *Virulence*. 2023;14(1):2273567. <https://doi.org/10.1080/21505594.2023.2273567>

5. Chang C, Yu X, Guo W, Guo C, Guo X, Li Q, et al. Bacteriophage-Mediated Control of Biofilm: A Promising New Dawn for the Future. *Front Microbiol.* 2022;13:825828. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.825828>
6. Gu Liu C, Green SI, Min L, Clark JR, Salazar KC, Terwilliger AL, et al. Phage-Antibiotic Synergy Is Driven by a Unique Combination of Antibacterial Mechanism of Action and Stoichiometry. *mBio.* 2020;11(4):e01462-20. <https://doi.org/10.1128/mbio.01462-20>
7. Li X, He Y, Wang Z, Wei J, Hu T, Si J, et al. A combination therapy of Phages and Antibiotics: Two is better than one. *Int J Biol Sci.* 2021;17(13):3573–82. <https://doi.org/10.7150/ijbs.60551>
8. Xu W, Zhao Y, Qian C, Yao Z, Chen T, Wang L, et al. The identification of phage vB_1086 of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and its synergistic effects with ceftriaxone. *Microb Pathog.* 2022;171:105722. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105722>
9. Lew BYX, Njondimackal NL, Ravisankar V, Norman NA. Enhanced Antibacterial Activity of a Novel Phage-Antibiotic Combination Against *Klebsiella pneumoniae* Isolates. In: Lu J, Guo H, McLoughlin I, Chekole EG, Lakshmanan U, Meng W, et al., editors. Proceedings of the 9th IRC Conference on Science, Engineering, and Technology. Singapore:2023.
10. Kever L, Hardy A, Luthe T, Hünnefeld M, Gätgens C, Milke L, et al. Aminoglycoside Antibiotics Inhibit Phage Infection by Blocking an Early Step of the Infection Cycle. *mBio.* 2022;13(3):e0078322. <https://doi.org/10.1128/mbio.00783-22>
11. Brisse S, Passet V, Haugaard AB, Babosan A, Kassis-Chikhani N, Struve C, et al. wzi Gene sequencing, a rapid method for determination of capsular type for *Klebsiella* strains. *J Clin Microbiol.* 2013 Dec;51(12):4073–8. <https://doi.org/10.1128/jcm.01924-13>
12. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol.* 2005 Aug;43(8):4178–82. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.8.4178-4182.2005>
13. Клинические рекомендации МАКМАХ. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Clinical recommendations of the MCMAH. Determination of the sensitivity of microorganisms to antimicrobial drugs. <https://www.antibiotic.ru/minzdrav/category/clinical-recommendations/>
14. Gorodnichev RB, Volozhantsev NV, Krasilnikova VM, Bodoev IN, Kornienko MA, Kuptsov NS, et al. Novel *Klebsiella pneumoniae* K23-Specific Bacteriophages From Different Families: Similarity of Depolymerases and Their Therapeutic Potential. *Front Microbiol.* 2021;12:669618. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.669618>
15. Gorodnichev RB, Kornienko MA, Kuptsov NS, Malakhova MV, Bespiatykh DA, Veselovsky VA, et al. Molecular genetic characterization of three new *Klebsiella pneumoniae* bacteriophages suitable for phage therapy. *Extreme medicine.* 2021;23(3):90–7 (In Russ.). <https://doi.org/10.47183/mes.2021.035>
16. Gonçalves-Pereira J, Martins A, Póvoa P. Pharmacokinetics of gentamicin in critically ill patients: pilot study evaluating the first dose. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2010;16(8):1258–63. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0961.2009.03074.x>
17. Wagenlehner FME, Kinzig-Schippers M, Sörgel F, Weidner W, Naber KG. Concentrations in plasma, urinary excretion and bactericidal activity of levofloxacin (500 mg) versus ciprofloxacin (500 mg) in healthy volunteers receiving a single oral dose. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;28(6):551–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.07.026>
18. Thalhammer F, Schenck P, Burgmann H, El Menyawi I, Hollenstein UM, Rosenkranz AR, et al. Single-Dose Pharmacokinetics of Meropenem during Continuous Venovenous Hemofiltration. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(9):2417–20. <https://doi.org/10.1128/aac.42.9.2417>
19. Wenk M, Vozeh S, Follath F. Serum level monitoring of antibacterial drugs. A review. *Clin Pharmacokinet.* 1984;9(6):475–92. <https://doi.org/10.2165/00003088-198409060-00001>
20. Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of bacteriophages using the small drop plaque assay system. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2009;501:81–5. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_9
21. Kutter E. Phage host range and efficiency of plating. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2009; 501:141–9. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_14
22. Burrowes BH, Molineux IJ, Fralick JA. Directed in Vitro Evolution of Therapeutic Bacteriophages: The Appelmans Protocol. *Viruses.* 2019;11(3):241. <https://doi.org/10.3390/v11030241>
23. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* 2007;115(8):891–9. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
24. Satlin MJ, Chen L, Patel G, Gomez-Simmonds A, Weston G, Kim AC, et al. Multicenter Clinical and Molecular Epidemiological Analysis of Bacteremia Due to Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae (CRE) in the CRE Epicenter of the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(4):e02349-16. <https://doi.org/10.1128/aac.02349-16>
25. Chatzidimitriou M, Tsolakidou P, Panagiota C, Mylona E, Mitka S. KPC-2 and VIM-1 producing *Klebsiella pneumoniae* ST39 high-risk clone isolated from a clinical sample in Volos, Greece. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2024;71(1):43–51. <https://doi.org/10.1556/030.2024.02226>
26. Petrovic Fabijan A, Khalid A, Maddocks S, Ho J, Gilbey T, Sandaradura I, et al. Phage therapy for severe bacterial infections: a narrative review. *Med J Aust.* 2020;212(6):279–85. <https://doi.org/10.5694/mja2.50355>
27. Verma V, Harjai K, Chhibber S. Restricting ciprofloxacin-induced resistant variant formation in biofilm of *Klebsiella pneumoniae* B5055 by complementary bacteriophage treatment. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(6):1212–8. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp360>
28. Jansen M, Wahida A, Latz S, Krüttgen A, Häfner H, Buhl EM, et al. Enhanced antibacterial effect of the novel T4-like bacteriophage KARL-1 in combination with antibiotics against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Sci Rep.* 2018;8(1):14140. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32344-y>
29. Wu Y, Wang R, Xu M, Liu Y, Zhu X, Qiu J, et al. A Novel Polysaccharide Depolymerase Encoded by the Phage SH-KP152226 Confers Specific Activity Against Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* via Biofilm Degradation. *Front Microbiol.* 2019;10:2768. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02768>
30. Latka A, Drulis-Kawa Z. Advantages and limitations of microtiter biofilm assays in the model of antibiofilm activity of *Klebsiella* phage KP34 and its depolymerase. *Sci Rep.* 2020;10(1):20338. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77198-5>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: А.О. Кривуля — разработка концепции исследования, обработка и визуализация данных, написание текста статьи; Р.Б. Городничев — методологическое обеспечение, обработка экспериментальных данных, участие в подготовке статьи; М.А. Корниенко — планирование экспериментальной части, сбор и участие в анализе данных; Н.К. Абдраймова — проведение экспериментов, обработка данных; М.В. Малахова — сбор данных для исследования; М.В. Зайчикова — участие в сборе данных; Е.А. Шитиков — управление процессом исследования, выполнение аналитической части, редактирование текста статьи.

ОБ АВТОРАХ

Кривуля Анастасия Олеговна
<https://orcid.org/0009-0007-7117-1519>
kimnimka@gmail.com

Городничев Роман Борисович
<https://orcid.org/0000-0002-1685-1307>
gorodnichev.r.b@gmail.com

Корниенко Мария Андреевна, канд. биол. наук
<https://orcid.org/0000-0002-1966-8452>
kornienkomariya@gmail.com

Абдраймова Нарина Казбековна
<https://orcid.org/0000-0002-8187-0272>
abdraimovanarina@gmail.com

Малахова Майя Владимировна, канд. биол. наук
<https://orcid.org/0000-0001-7510-163X>
maja_m@mail.ru

Зайчикова Марина Викторовна, канд. биол. наук
<https://orcid.org/0000-0002-5016-2089>
marinaz15@yandex.ru

Шитиков Егор Александрович, д-р биол. наук
<https://orcid.org/0000-0002-4865-6004>
eshitikov@mail.ru



ОСОБЕННОСТИ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЙ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ РАБОТНИКОВ УРАНОДОБЫВАЮЩИХ ПРОИЗВОДСТВ

Н.А. Дайхес¹, В.Б. Панкова^{1,2,3}, П.В. Серебряков^{1,3,4}, Л.М. Сааркоппель^{1,3,4}, И.Н. Федина^{1,4,5}, Н.Г. Бомштейн¹, А.Г. Учиров¹

¹ Национальный медицинский исследовательский центр оториноларингологии Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² Всероссийский научно-исследовательский институт гигиены транспорта Роспотребнадзора, Москва, Россия

³ Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

⁴ Научно-исследовательский институт медицины труда имени академика Н.Ф. Измерова, Москва, Россия

⁵ Российский университет медицины Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Введение. Одной из приоритетных задач здравоохранения Российской Федерации является сохранение здоровья и профессионального долголетия лиц трудоспособного возраста. В связи с этим крайне актуально изучение структуры и динамики профессиональной патологии для научного обоснования и разработки мероприятий по управлению рисками для здоровья работников предприятий с особо опасными условиями труда и профилактике развития профессиональных заболеваний.

Цель. Изучение особенностей структуры профессиональной заболеваемости работников уранодобывающего предприятия за 50-летний период.

Материалы и методы. Работа выполнена на модели крупного уранодобывающего предприятия России с особо опасными условиями труда ГК «Росатом».

Проведен анализ случаев профессиональных заболеваний, выявляемых у работников от начала работы предприятия за период с 1970 по 2019 гг. Охарактеризована структура профессиональных заболеваний, в динамике по 5-летним периодам проанализирован долевой вклад основных нозологических форм.

Результаты. Выявлены приоритетные нозологические формы профессиональных заболеваний у подземных горнорабочих предприятия по добыче урановых руд. Отмечена устойчивая тенденция к увеличению общего числа случаев заболеваний с постепенным увеличением доли заболеваний опорно-двигательного аппарата и периферической нервной системы, снижению доли «пылевой» патологии, росту и последующему снижению доли нейросенсорной тугоухости; стабильный вклад в структуру профессиональной патологии злокачественных новообразований.

Заключение. Показатели априорного профессионального риска работников уранодобывающего предприятия отражают уровни их профессиональной заболеваемости. В структуре профессиональных заболеваний преобладают заболевания костно-мышечной системы и профессиональные злокачественные новообразования, многократно превышающие среднероссийские показатели.

Ключевые слова: структура профессиональной патологии; профессиональный риск; заболевания костно-мышечной системы; профессиональные злокачественные новообразования

Для цитирования: Дайхес Н.А., Панкова В.Б., Серебряков П.В., Сааркоппель Л.М., Федина И.Н., Бомштейн Н.Г., Учиров А.Г. Особенности профессиональной заболеваемости работников уранодобывающих производств. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2024;26(4):66–73.
<https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-66-73>

Финансирование: исследование выполнено без спонсорской поддержки.

Потенциальный конфликт интересов: Н.А. Дайхес — член редакционного совета журнала «Медицина экстремальных ситуаций». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Панкова Вера Борисовна pankova@vniiq.ru

Статья поступила: 29.07.2024 **После доработки:** 10.10.2024 **Принята к публикации:** 15.10.2024

FEATURES OF OCCUPATIONAL MORBIDITY OF URANIUM MINING WORKERS

Nikolay A. Daikhes¹, Vera B. Pankova^{1,2,3}, Pavel V. Serebryakov^{1,3,4}, Lyudmila M. Saarkoppele^{1,3,4}, Irina N. Fedina^{1,4,5}, Natalya G. Bomshteyn¹, Alexander G. Uchurov¹

¹ Federal Research Center of Otorhinolaryngology, Moscow, Russia

² All-Russian Research Institute of Transport Hygiene, Moscow, Russia

³ Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

⁴ Izmerov Research Institute of Occupational Health, Moscow, Russia

⁵ Russian University of Medicine, Moscow, Russia

Introduction. Preservation of the health and professional longevity of people of working age is a priority task of the Russian healthcare system. In this regard, it is extremely important to study the structure and dynamics of occupational pathology for the scientific justification and development of measures aimed at managing the risks to the health of workers in enterprises with extremely dangerous working conditions and to prevent the development of occupational diseases.

Objective. To study specific features in the structure of occupational morbidity of workers of a uranium mining enterprise over a 50-year period.

Materials and methods. The work was performed on the model of a large uranium mining enterprise within the Rosatom State Corporation in Russia with extremely dangerous working conditions. Cases of occupational diseases detected in workers from the beginning of the operation of the company from 1970 to 2019 were analyzed. The structure of occupational diseases was characterized, and the share contribution of the main nosological forms over 5-year periods was analyzed.

Results. The main nosological forms of occupational diseases in underground miners of a uranium ore mining enterprise were identified. A steady trend towards an increase in the total number of cases of diseases was noted. There was a gradual increase in the proportion of diseases of the musculoskeletal system and peripheral nervous system, a decrease in the proportion of “dust” pathology, an increase and subsequent decrease in the proportion of sensorineural hearing loss, as well as a stable contribution to the structure of occupational pathology of malignant neoplasms.

© Н.А. Дайхес, В.Б. Панкова, П.В. Серебряков, Л.М. Сааркоппель, И.Н. Федина, Н.Г. Бомштейн, А.Г. Учиров, 2024

Conclusion. Indicators of a priori occupational health and safety risk of uranium mining workers reflect the levels of their occupational morbidity. Musculoskeletal system disorders and occupational malignancies dominate in the structure of occupational diseases. This morbidity is many times higher than the national average.

Keywords: occupational pathology structure; occupational risk; diseases of the musculoskeletal system; occupational malignancies

For citation: Daikhes N.A., Pankova V.B., Serebryakov P.V., Saarkoppel L.M., Fedina I.N., et al. Features of occupational morbidity of uranium mining workers. *Extreme Medicine*. 2024;26(4):66–73. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-66-73>

Funding: the research was carried out without sponsorship.

Potential conflict of interest: Nikolay A. Daikhes is a member of the Editorial Council of journal "Extreme Medicine". The other authors declare no conflict of interest.

✉ Vera B. Pankova pankova@vniiig.ru

Received: 29 July 2024 **Revised:** 10 Oct. 2024 **Accepted:** 15 Oct. 2024

ВВЕДЕНИЕ

Обеспечение медицинской составляющей безопасности производства, сохранение здоровья и профессионального долголетия лиц трудоспособного возраста являются приоритетными задачами здравоохранения Российской Федерации. Стратегически значимые производства нуждаются в высококвалифицированных кадрах, на подготовку которых расходуются существенные временные и материальные ресурсы. В этой связи здоровье работников организаций отдельных отраслей промышленности с особо опасными условиями труда имеет большую медико-социальную и экономическую значимость [1, 2].

Важность данного направления особо подчеркнул Председатель Правительства Российской Федерации М.В. Мишустин на открытии «Всероссийской недели охраны труда — 2021»: «...быстро меняющийся мир ставит перед нами новые вызовы, возникают неизвестные ранее риски, связанные с профессиональными заболеваниями <...> необходимо вовремя выявлять признаки начального развития возможного профессионального заболевания».

По определению ВОЗ профессиональный риск — это прогностическая вероятность частоты и тяжести неблагоприятных реакций на воздействие вредных факторов рабочей среды и трудового процесса. Производственные факторы (шум, вибрация, тяжесть трудового процесса) при превышении санитарно-гигиенических нормативов оказывают негативное воздействие на организм работников, обусловливают риск развития профессиональных заболеваний, усугубляют течение ряда общих заболеваний, определяют потерю трудоспособности и наступление инвалидности [3–5].

Значимость атомной энергетики в нашей стране трудно переоценить: в настоящее время на долю АЭС в общей выработке электроэнергии по России приходится около 20%. Выработка электроэнергии на АЭС, добыча сырья и обогащение ядерного топлива у нас осуществляются на предприятиях Госкорпорации «Росатом» — одного из крупнейших производителей природного урана в мире [6, 7].

Основные исследования состояния здоровья работников уранодобывающих производств в нашей стране проводились в конце XX — начале XXI века. Они зафиксировали наличие таких приоритетных факторов условий труда, как промышленные аэрозоли, интенсивный шум, локальная и общая транспортно-технологическая

вибрация, физические перегрузки, функциональное перенапряжение опорно-двигательного аппарата, ионизирующая радиация [8–12].

Основными формами профессиональных заболеваний работников в тот период являлись патология респираторной системы (силикоz, пневмокониоз), вибрационная болезнь и профессиональная тугоухость [13–18].

Следовательно, научное исследование, направленное на изучение особенностей профессиональных нарушений здоровья работников, подвергающихся воздействию вредных производственных факторов в процессе добычи урановой руды, и разработка мероприятий по управлению рисками их развития являются обоснованными и актуальными.

Цель исследования — изучение особенностей структуры профессиональной заболеваемости работников уранодобывающего предприятия за 50-летний период.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на модели крупного уранодобывающего предприятия России с особо опасными условиями труда ГК «Росатом».

Проведен анализ случаев профессиональных заболеваний, выявляемых у работников от начала работы предприятия за период с 1970 по 2019 г. Охарактеризована структура профессиональных заболеваний, в динамике по 5-летним периодам проанализирован долевой вклад основных нозологических форм (силикоz, вибрационная болезнь (ВБ), нейросенсорная тугоухость (НСТ), хронический пылевой бронхит (ХПБ), патология опорно-двигательного аппарата и периферической нервной системы, злокачественные новообразования) [19, 20].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установлено, что на рабочих местах изученного уранодобывающего предприятия основными факторами профессионального риска для здоровья в настоящее время являются интенсивный шум, локальная и общая вибрация, а также физические перегрузки и функциональное перенапряжение опорно-двигательного аппарата, обусловленные недостаточной механизацией трудового процесса и большой распространенностью ручного труда у работников основных профессий. Дополнительное негативное влияние на здоровье горнорабочих оказывает воздействие радиационных факторов (гамма-излучение, радон и его

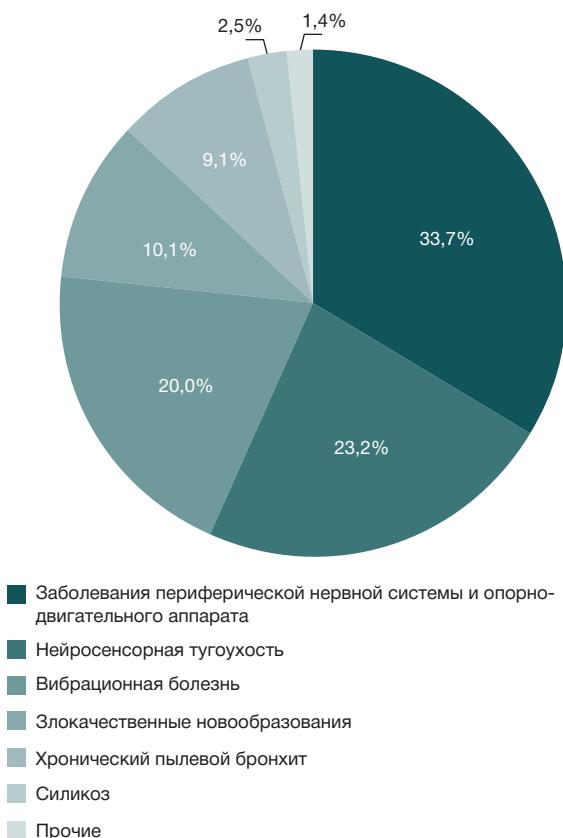


Рисунок подготовлен авторами по архивным данным

Рис. 1. Структура нозологических форм профессиональной патологии, выявленных у работников уранодобывающего предприятия за период 1970–2019 гг. (число случаев, %)

короткоживущие дочерние продукты распада, долгоживущие альфа-нуклиды ряда природного урана). Полученные данные сопоставимы с имеющимися сведениями в ранее опубликованных источниках литературы [21–23].

Воздействие промышленных аэрозолей в силу применения различных способов пылеподавления не выражено и в настоящее время не вносит существенного вклада в структуру профессионального риска горнорабочих уранодобывающего предприятия.

Таблица 1. Случаи профессиональных заболеваний по 5-летним периодам за 1970–2019 гг. (абсолютные значения)

Случаи	ВБ	ЗНО	НСТ	ПНС и ОДА	Силикоз	ХПБ	Прочие	ВСЕГО
1970–1974	2		1		5		0	8
1975–1979	8	2	10		14	6	0	40
1980–1984		2	4		5	1	1	13
1985–1989		7	5		1	27	5	45
1990–1994	4	5	56	8	1	25	2	101
1995–1999	7	25	27	4	1	19	1	84
2000–2004	9	28	23	11		2	0	73
2005–2009	57	9	59	27	1	4	2	159
2010–2014	85	20	51	162		13	2	333
2015–2019	55	17	27	170		6	3	278
Всего за 1970–2019 гг.	227	115	263	382	28	103	16	1134

Таблица подготовлена авторами по архивным данным

Результаты ретроспективного анализа случаев профессиональных заболеваний по архивным данным результатов профилактических медицинских осмотров за период 1970–2019 гг. представлены в таблице 1.

Всего за период с 1970 по 2019 г. у работников уранодобывающего предприятия зафиксировано 1134 случая профессиональных заболеваний. В динамике отмечается достаточно устойчивый рост числа профессиональных заболеваний, при этом более половины всех случаев (53,9%) выявлено в последние 10 лет, в период с 2010 по 2019 г.

Профессиональная заболеваемость характеризуется следующими приоритетными группами патологии: заболевания периферической нервной системы и опорно-двигательного аппарата (ПНС и ОДА), формирующиеся преимущественно вследствие перенапряжения органов и систем в процессе выполнения трудовых функций (33,7%); нейросенсорная тугоухость (НСТ), вызванная шумом, превышающим ПДУ (23,2%); вибрационная болезнь (ВБ) от воздействия локальной и/или общей вибрации (20,0%); заболевания органов дыхания от воздействия промышленных аэрозолей (11,6%), среди которых были выделены случаи силикоза (2,5%) и хронического пылевого бронхита (ХПБ) (9,1%); злокачественные новообразования (ЗНО) — 10,1% случаев (рис. 1).

Анализ показателей позволил установить особенности динамики развития профессиональной патологии у работников изучаемого предприятия (рис. 2–6).

Так, в период 1970–1989 гг. более половины случаев профессиональных заболеваний (до 62,5%) приходилось на патологию органов дыхания, силикоз и хронический пылевой бронхит (ХПБ). Если до 1984 г. среди профессиональных заболеваний органов дыхания превалировал силикоз, то с 1985 г. приоритетной формой патологии стал хронический пылевой бронхит — до 60% от всех случаев профессиональных заболеваний (ПЗ), при этом силикоз выявлялся лишь в единичных случаях.

С 2000 г. случаи силикоза не выявлялись, а на долю ХПБ приходилось от 2,7 до 3,9% случаев всех профессиональных заболеваний. Важно обратить внимание на тот факт, что случаи силикоза обнаружены у тех работников, которые до начала работы в подразделениях уранодобывающего предприятия уже имели в анамнезе стаж

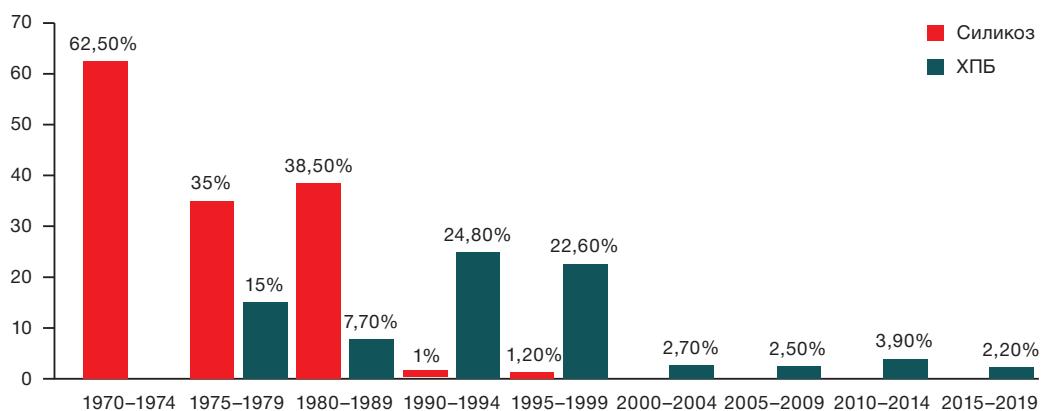


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 2. Динамика доли силикоза и хронического пылевого бронхита в структуре профессиональных заболеваний, выявленных у работников уранодобывающего предприятия в 1970–2019 гг.

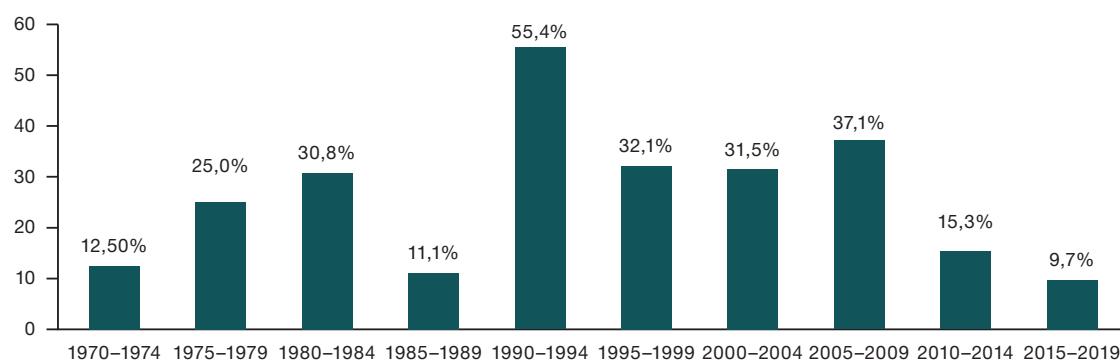


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 3. Динамика доли нейросенсорной тугоухости в структуре профессиональных заболеваний, выявленных у работников уранодобывающего предприятия в 1970–2019 гг.

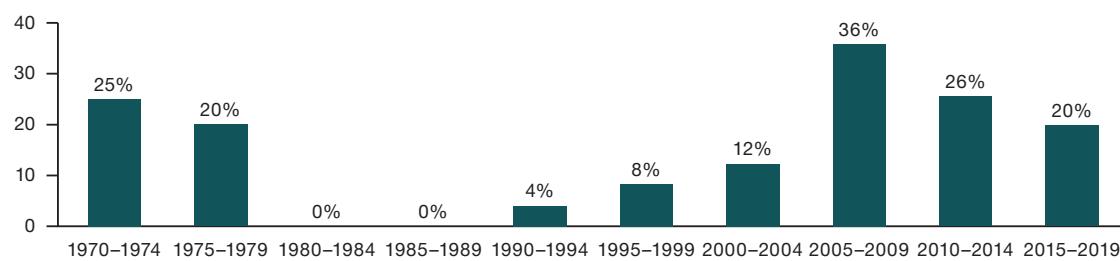


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 4. Динамика доли вибрационной болезни в структуре профессиональных заболеваний, выявленных у работников уранодобывающего предприятия в 1970–2019 гг.

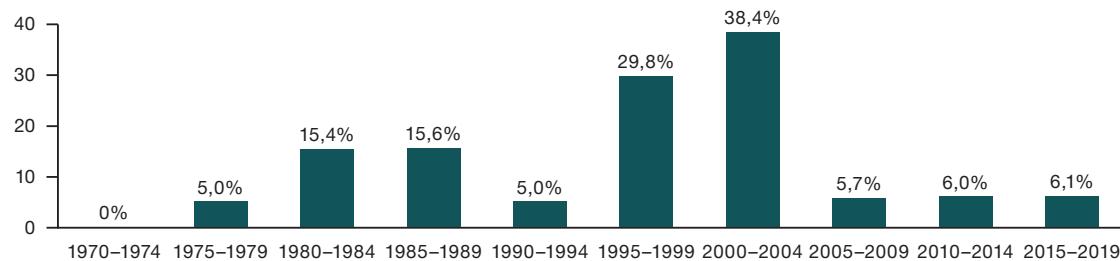


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 5. Динамика доли злокачественных новообразований в структуре профессиональных заболеваний, выявленных у работников уранодобывающего предприятия в 1970–2019 гг.

работы в «пылевых» профессиях на других горнорудных предприятиях.

Доля нейросенсорной тугоухости в структуре профессиональной патологии колебалась в широком

диапазоне: максимально (55,4% случаев) в период 1990–1994 гг. с достаточно существенным уменьшением показателей до 9,7–15,3% в период 2010–2019 гг. Доля вибрационной болезни (ВБ) в структуре профзаболеваемости

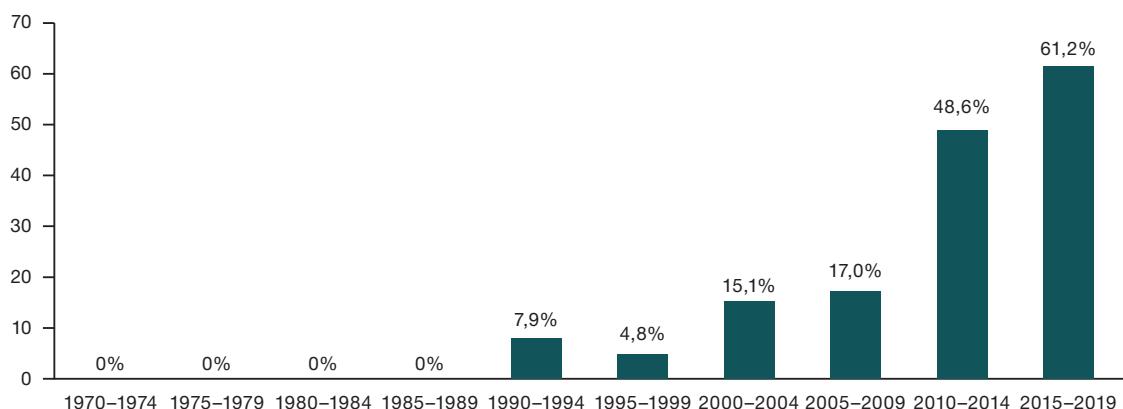


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 6. Динамика доли заболеваний периферической нервной системы и опорно-двигательного аппарата в структуре профессиональных заболеваний, выявленных у работников уранодобывающего предприятия в 1970–2019 гг.

составляла 20–25% в 1970–1979 гг.; в период 1980–1989 гг. случаи ВБ не регистрировались; начиная с 1990 г. отмечено увеличение частоты встречаемости ВБ с 4% в 1990–1994 гг. до 35,8% в 2005–2009 гг. В последующие 10 лет, в 2010–2019 гг., доля случаев ВБ вернулась к уровню 19,8–25,5 %.

Важно отметить, что в структуре профессиональной патологии работников уранодобывающего предприятия регулярно (за исключением 1970–1974 гг.) выявлялись случаи злокачественных новообразований (ЗНО). Среди ЗНО преобладала патология органов дыхания с превалированием случаев рака легких.

Если в структуре профессиональной патологии в Российской Федерации в течение последних 15–20 лет доля ЗНО составляет не более 0,6% случаев, то у работников уранодобывающего предприятия ЗНО составляют не менее 5–6%, достигая в отдельные периоды 29,8–38,4% случаев (1995–2004 гг.). Злокачественные новообразования представлены преимущественно случаями рака легких (94 случая, 81,7%) и некоторыми вариантами гемобластозов (21 случай, 18,3%).

В Российской Федерации в период с 1989 по 2019 г. установлено чуть более 1000 случаев профессионального рака. Полученные данные свидетельствуют, что случаи профессиональных ЗНО, выявляемые у работников уранодобывающего предприятия, составляют практически 10% от всех случаев профессионального рака в целом по стране.

Начиная с 2005 г. отмечается увеличение частоты встречаемости случаев заболеваний опорно-двигательного аппарата и периферической нервной системы, наиболее часто фиксируемых с 2010 г. В 2019 г. они достигли более 60%.

Интенсивные показатели заболеваемости (число случаев на 10 000 работающих) продемонстрировали достаточно значимый прирост ПЗ (56,3% случаев на 10 тыс. работающих во вредных условиях труда). Установлен значительный разброс показателей профессиональной заболеваемости по годам с наибольшим числом в последние 10 лет, что можно связать с повышением знаний медицинских работников и улучшением диагностики различных форм профессиональной патологии. Темпы выявления профессиональных заболеваний наиболее высоки в настоящее время (66,6–69,5% случаев в год). Особенностью заболеваемости работников уранодобывающего предприятия являются участившиеся практически в три раза

случаи вибрационной болезни, заболеваний опорно-двигательного аппарата и периферической нервной системы в период 2005–2019 гг., что составляет 60%.

Данные проведенного ретроспективного анализа показателей структуры профессиональной заболеваемости работников уранодобывающего производства демонстрируют их особенности в сравнении с общей структурой профзаболеваемости работников РФ [24]. Так, более трети всех случаев составляют профессиональные заболевания периферической нервной системы и опорно-двигательного аппарата; почти четверть — нейросенсорная тугоухость; пятую часть — вибрационная болезнь, что сопоставимо с ранее имеющимися в литературе сведениями [25]. Однако частота развития и выявляемости заболеваний органов дыхания незначительна по сравнению с ранее имеющимися данными (более 10% случаев) [26].

Кроме того, особенностью динамики развития отдельных нозологических форм профессиональной патологии у работников уранодобывающего предприятия в период первого анализируемого 10-летнего периода было преобладание числа случаев профессиональных заболеваний органов дыхания (силикоз и хронический пылевой бронхит с преобладанием силикоза). В настоящее время преобладающей формой профессиональных заболеваний органов дыхания от воздействия производственной пыли является пылевой бронхит. Преобладание случаев респираторной патологии у работников в первые десятилетия работы предприятия объясняется тем обстоятельством, что в начальный период значительную долю работающих, в том числе подземных горнорабочих, составляли специалисты, трудившиеся ранее в подземных условиях горнодобывающих производств других регионов страны. По мере подготовки собственных квалифицированных кадров значительно сократилась доля работников, которые были экспонированы к фиброген-ной пыли на других предприятиях, что и привело к изменению структуры профессиональной респираторной патологии.

Значительна доля злокачественных новообразований (за 50 лет она составила 10,1% случаев); и это существенно выше среднероссийских показателей [24]. Регулярное выявление случаев злокачественных новообразований (в основном органов дыхания с превалированием рака легких) заслуживает особого внимания. Эти показатели существенно превышают общероссийские и составляют

практически 10% от всех случаев профессионального рака в целом по стране, что является тревожным фактом и требует особого внимания руководства отрасли, предприятия и медицинских работников. Вместе с тем причиной высокой выявляемости онкологической патологии является ориентированность профпатологической службы на значимый априорный риск ее развития у работников, занятых подземной добычей урановой руды, что за-служивает положительной оценки работы медицинской службы [27].

В настоящее время доля профессиональной тугухости среди работников уранодобывающего предприятия существенно уменьшилась, что, вероятно, связано

с повышением эффективности шумоподавляющих мероприятий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Специфика условий труда работников уранодобывающего предприятия на современном этапе (особенности априорного профессионального риска) находит отражение в показателях профессиональной заболеваемости данного контингента: преобладают профессиональные заболевания костно-мышечной системы, а уровни профессиональных ЗНО многократно превышают среднероссийские показатели.

Литература / References

1. Распоряжение Правительства Российской Федерации № 833-р. Комплекс мер по стимулированию работодателей и работников к улучшению условий труда и сохранению здоровья работников, а также по мотивированию граждан к ведению здорового образа жизни. М.: Правительство Российской Федерации; 26.04.2019. Directive of the Government of the Russian Federation No. 833-r. A set of measures to stimulate employers and employees to improve working conditions and maintain the health of workers, as well as to motivate citizens to lead a healthy lifestyle. Moscow: Government of the Russian Federation; 26.04.2019 (In Russ.).
2. Федеральный закон Российской Федерации № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации». М.: Совет Федерации; 21.11.2011. Federal Law of the Russian Federation No. 323-FZ "On the Fundamentals of Health Protection of Citizens in the Russian Federation". Moscow: Federation Council; 21.11.2011 (In Russ.).
3. Измеров НФ, Денисов ЭИ. Профессиональный риск для здоровья работников. Руководство. М.: Троянт; 2003. Izmerov NF, Denisov EI. Occupational health risks for employees. Guidelines. Moscow: Trovant; 2003 (In Russ.).
4. Федина ИН, Рушкевич ОП, Серебряков ПВ, Гришин ОН. Факторы риска и профессиональное здоровье работников обогатительных фабрик. Материалы II международного научного форума Здоровье и безопасность на рабочем месте; 6–8 июня 2018; Минск, Республика Беларусь. Минск: Регистр; 2018. С. 82–6. Fedina IN, Rushkevich OP, Serebryakov PV, Grishin ON. Risk factors and occupational health of workers in processing plants. Proceedings of the II International Scientific Forum Health and safety in the workplace; 2018 June 6–8; Minsk, Belarus. Minsk: Register; 2018. P. 82–6 (In Russ.).
5. Шайхлисламова ЭР, Каримова ЛК, Бакиров АБ, Серебряков ПВ, Мулдашева НА, Волгарева АД. Системный подход к управлению риском нарушения здоровья работников предприятий по добыче полиметаллических руд. Безопасность жизнедеятельности. 2020;6(234):26–32. Shaykhislamova ER, Karimova LK, Bakirov AB, Serebryakov PV, Muldasheva NA, Volgareva AD. Systematic approach to health risk management in polymetallic ores extraction workers. Life safety. 2020;6 (234):26–32 (In Russ.). EDN: JTHULR <https://doi.org/10.18721/JEST.25401>
6. Нигматулин БИ. Атомная энергетика в мире. Состояние и прогноз до 2050 года. Научно-технические ведомости СПбПУ. Естественные и инженерные науки. 2019;25(4):6–22. Nigmatulin BI. Nuclear industry in the world. State and forecast up to 2050. Scientific and Technical Bulletin of St. Petersburg State University. Natural and engineering sciences. 2019;25(4):6–22 (In Russ.). <https://doi.org/10.18721/JEST.25401>
7. Петрухин НП, ред. Создание и развитие минерально-сырьевой базы отечественной атомной отрасли. М.: АО Атомредметзолото; 2017. Petrukhin NP., editors. Creation and development of the mineral resource base of the domestic nuclear industry. Moscow: JSC Atomredmetzoloto; 2017 (In Russ.).
8. Айсанов ЗР, Чучалин АГ, Калманова ЕН. Хроническая обструктивная болезнь легких и сердечно-сосудистая коморбидность. Кардиология. 2019;59(S8):24–36. Aisanov ZR, Chuchalin AG, Kalmanova EN. Chronic obstructive pulmonary disease and cardiovascular comorbidity. Cardiology. 2019;59(S8):24–36 (In Russ.). <https://doi.org/10.18087/cardio.2572>
9. Милишникова ВВ, Лощилов ЮА, Чеботарева АГ. Профессиональная патология органов дыхания у горнорабочих высокомеханизированных рудных шахт, использующих самоходное дизельное оборудование. Гигиена труда и профессиональные заболевания. 1990;6:15–9. Milishnikova VV, Loschilov YuA, Chebotareva AG. Occupational pathology of the respiratory organs in miners of highly mechanized ore mines using diesel vehicles. Occupational hygiene and occupational diseases. 1990;6:15–9 (In Russ.).
10. Рукавишников ВС, Шаяхметов СФ, Панков ВА, Колычева ИВ. Здоровье работающих в горнодобывающей промышленности Сибири и Крайнего Севера. Медицина труда и промышленная экология. 2004;6:6–9. Rukavishnikov VS, Shayakhmetov SF, Pankov VA, Kolycheva IV. Health of workers engaged into mining industry in Siberia and the Far North. Occupational medicine and industrial ecology. 2004;6:6–9 (In Russ.). EDN: OWBNRK
11. Chapman KR, Mannino DM, Soriano JB, Vermeire PA, Buist AS, Thun MJ, et al. Epidemiology and costs of chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J. 2006; 27:188–207. <https://doi.org/10.1183/09031936.06.00024505>
12. Малашенко АВ, Накатис ЯА. Вопросы патогенеза профессиональной легочной патологии у горнорабочих урановых шахт. Медицина экстремальных ситуаций. 2012;2(40):28–34. Malashenko AV, Nakatis YaA. Pathogenesis of pulmonary pathology among of uranium mines. Extreme medicine. 2012;2(40):28–34 (In Russ.). EDN: SGRCAL
13. Веремчук ЛВ, Черпак НА, Гвозденко ТА, Волкова МВ. Влияние загрязнения воздушной среды на формирование уровней общей заболеваемости бронхолегочной патологией во Владивостоке. Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2014;1:4–8. Veremchuk LV, Cherpak NA, Gvozdenko TA, Volkova MV. The impact of air pollution on formation of the overall incidence of bronchopulmonary pathology in Vladivostok. Health. Medical ecology. Science. 2014;1:4–8 (In Russ.). EDN: SBIRFE
14. Бухтияров ИВ, Чеботарев АГ, Прохоров ВА. Современное состояние условий труда, профессиональной заболеваемости работников предприятий горно-металлургического комплекса. Металлург. 2017;2:9–12. Bukhtiyarov IV, Chebotarev AG, Prokhorov VA. The current state of working conditions, occupational morbidity of employees of

- mining and metallurgical enterprises. *Metallurg.* 2017;2:9–12 (In Russ.).
EDN: [XXWPND](#)
15. Чеботарев АГ. Состояние условий труда и профессиональной заболеваемости работников горнодобывающих предприятий. Горная промышленность. 2018;1(137):92. Chebotarev AG. The state of working conditions and occupational morbidity of employees of mining enterprises. *Mining industry.* 2018;1(137):92 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30686/1609-9192-2018-1-137-92-95>
16. Гурьев АВ, Туков АР, Хохлова ЕА, Калинина МЮ, Антоненков АИ, Кретов АС. Сравнительный анализ профессиональной заболеваемости работников урановых и угольных шахт. *Медицина труда и промышленная экология.* 2017;4:42–6. Guryev AV, Tukov AR, Khokhlova EA, Kalinina MYu, Antonenkov Al, Kretov AS. Comparative analysis of occupational morbidity of uranium and coal mine workers. *Occupational medicine and industrial ecology.* 2017;4:42–6 (In Russ.).
EDN: [YKUYLE](#)
17. Копылова АВ. Анализ и структура основных причин травматизма и профессиональной заболеваемости в горной промышленности. *Горный информационно-аналитический бюллетень (научно-технический журнал).* 2019;S10:133–8. Kopylova AV. Analysis and structure of the main causes of injuries and occupational morbidity in the mining industry. *Mining information and analytical bulletin (scientific and technical journal).* 2019; S10: 133–8 (In Russ.).
<https://doi.org/10.25018/0236-1493-2019-5-10-133-138>
18. Куренкова ГВ, Лемешевская ЕП. Гигиеническая характеристика условий труда в подземных сооружениях и их влияние на здоровье работников. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск).* 2015;136(5):98–105. Kurenkova GV, Lemeshevskaya EP. Hygienic characteristics of working conditions in underground structures and their impact on the health of workers. *Siberian Medical Journal (Irkutsk).* 2015;136(5):98–105 (In Russ.).
EDN: [VMGIGB](#)
19. Дайхес НА, Серебряков ПВ, Бомштейн НГ, Сааркоппель ЛМ и др. Условия труда и состояние здоровья работников предприятия, осуществляющего разработку месторождения урановых руд подземным способом. Свидетельство о регистрации базы данных № 2023623824; 2023. Daykhes NA, Serebryakov PV, Bomshteyn NG, Saarkoppel LM, et al. Working conditions and health status of employees of an enterprise developing a uranium ore deposit using underground mining. Database registration certificate No. 2023623824; 2023 (In Russ.).
EDN: [IAXCSU](#)
20. Дайхес НА, Серебряков ПВ, Бомштейн НГ, Сааркоппель ЛМ и др. Профессиональные заболевания работников ПАО ППГХО, выявленные в период 1970 по 2021 г. Свидетельство о регистрации базы данных № 2024620140; 2024. Daykhes NA, Serebryakov PV, Bomshtein NG, Saarkoppel LM, et al. Occupational diseases of employees of PJSC PIMCU, identified in the period 1970 to 2021. Database registration cer-
- tificate No. 2024620140; 2024 (In Russ.).
EDN: [ZTOFFD](#)
21. Измеров НФ, Бухтияров ИВ, Денисов ЭИ. Оценка профессиональных рисков для здоровья в системе доказательной медицины. *Вопросы школьной и университетской медицины и здоровья.* 2016;1:14–20. Izmerov NF, Bukhtiyarov IV, Denisov EI. Evaluation of occupational risks in the system of evidence-based medicine. *Issues of school and university medicine and health.* 2016;1:14–20 (In Russ.).
EDN: [VZULEX](#)
22. Малашенко АВ, Накатис ЯА. Гигиеническая оценка условий труда шахтеров урановых рудников. *Клиническая больница.* 2014;1(7):3–8. Malashenko AV, Nakatis YaA. Hygienic evaluation of miners working conditions in uranium mines. *Clinical hospital.* 2014;1(7):3–8 (In Russ.).
EDN: [TPIPEN](#)
23. Романова ЕВ. Профзаболеваемость работников горнодобывающих предприятий. *Аллея науки.* 2020;12(51):219–23. Romanova EV. Occupational diseases of workers of mining enterprises. *Science Alley.* 2020;12(51):219–23 (In Russ.).
EDN: [YUTLOX](#)
24. Государственный доклад. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2021. 256 с. National report. On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2020. Moscow: Federal Service for the Oversight of Consumer Protection and Welfare; 2021. 256 p. (In Russ.)
25. Картапольцева НВ. Общие закономерности поражения центральной и периферической нервной системы при действии физических факторов (локальной вибрации и шума) на организм работающих. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук.* 2012;2-1(84):40–4. Kartapol'tseva NV. Common regularities in disorders of central and peripheral nervous system at the influence of physical factors (local vibration and noise) on employees organisms. *Bulletin of the East Siberian Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2012; 2-1(84): 40–4 (In Russ.).
EDN: [PCJLZH](#)
26. Zhong N, et al. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease in China: a large, population-based survey. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176(8):753–60.
<https://doi.org/10.1164/rccm.200612-1749OC>
27. Серебряков ПВ. Профессиональный рак. Проблемы выявляемости. *Медицина труда и промышленная экология.* 2019;59(9):749. Serebryakov PV. Occupational cancer. The Problem of the detection. *Occupational medicine and industrial ecology.* 2019;59(9):749 (In Russ.).
<https://doi.org/10.31089/1026-9428-2019-59-9-749-750>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Н.А. Дайхес — концепция исследования, научное руководство; В.Б. Панкова — научное руководство, формулировка цели и задач исследования, анализ архивных материалов и обсуждение полученных результатов, редактирование статьи; П.В. Серебряков — формулировка цели и задач исследования, анализ архивных материалов, обсуждение полученных результатов, подготовка иллюстративного материала; Л.М. Сааркоппель — анализ архивных материалов и обсуждение полученных результатов, написание статьи; И.Н. Федина — анализ архивных материалов и обсуждение полученных результатов, написание и редактирование статьи; Н.Г. Бомштейн — сбор, подготовка и систематизация архивных материалов, анализ и обсуждение полученных результатов; А.Г. Учuros — сбор, подготовка и систематизация архивных материалов.

ОБ АВТОРАХ

Дайхес Николай Аркадьевич, д-р мед. наук, профессор
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2674-4553>
otolar@fmbamail.ru

Панкова Вера Борисовна, д-р мед. наук, профессор
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3035-4710>
pankova@vnijg.ru

Серебряков Павел Валентинович, д-р мед. наук, профессор
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8769-2550>
drsilver@yandex.ru

Сааркоппель Людмила Мейнхардовна, д-р мед. наук,
профессор
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8937-381X>
lmsaarkoppel@yandex.ru

Федина Ирина Николаевна, д-р мед. наук, профессор
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6394-2220>
infed@yandex.ru

Бомштейн Наталья Геннадьевна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2363-2329>
natalya_bomshteyn@mail.ru

Учоров Александр Геннадьевич
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5189-5567>
zavprofpat@mail.ru



ВОЗМОЖНЫЕ РИСКИ ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ИННОВАЦИОННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В.И. Климов¹, О.С. Лалыменко^{2✉}, Л.В. Корсун²

¹ Научный центр экспертизы средств медицинского применения Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

² Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Введение. Активные фармацевтические ингредиенты для производства лекарственных препаратов, воздействующих на генетический аппарат (генотерапевтических, высокотехнологических, биотехнологических), являются реакционноспособными соединениями с плеiotропной активностью, что сопряжено с рисками здоровью работников, занятых на различных этапах их производства. Клинически значимый фармако/токсикологический эффект инновационных лекарственных препаратов, воздействующих на работающих, имеющих производственный контакт с данными компонентами, с точки зрения риска-ориентированного подхода в медицине труда является небезопасным.

Цель. Оценка потенциальных рисков профессионального воздействия инновационных биологических лекарственных препаратов на работающих в условиях производства/лаборатории и методических подходов их гигиенической регламентации.

Материалы и методы. Поиск научной литературы выполнен в электронных библиографических базах данных на русском (eLibrary, CyberLeninka) и английском (Web of Science, Scopus, PubMed) языках, нормативных документах в справочной правовой системе КонсультантПлюс.

Обсуждение. Рассмотрены отдельные аспекты особенностей разработки биологических лекарственных препаратов нового поколения (генотерапевтических/высокотехнологических/биотехнологических лекарственных средств) и сопряженных с этим рисков профессионального воздействия на работников в условиях фармацевтического или лабораторного производства. Выявлено, что работники подвергаются сочетанному воздействию неблагоприятных факторов производственной среды различной природы: биологических, физических, химических. Отмечается неполнота информации о разработке аналитических методов идентификации компонентов генотерапевтических/высокотехнологических/биотехнологических лекарственных средств в воздухе рабочей зоны, на рабочих поверхностях, в сточных водах. Обозначены актуальные проблемы гигиены труда, связанные с отсутствием законодательных инструментов, научно обоснованных управленческих решений по идентификации факторов риска здоровью работников, диапазонов контроля потенциального производственного воздействия инновационных биологических лекарственных препаратов на основе принципов гигиенической регламентации, направленной на устранение или уменьшение негативного производственного воздействия и обеспечение безопасности и сохранения здоровья работников.

Выводы. Проведенная работа позволила определить основные методические подходы по оценке потенциального производственного воздействия генотерапевтических/высокотехнологических/биотехнологических лекарственных средств на работников соответствующих фармацевтических предприятий. К таким подходам относятся: токсикологическая оценка соединений с установлением возможных параметров токсикометрии, исследование фармако/токсикокинетических особенностей компонентов генных препаратов, разработка методик их количественного определения в различных средах, установление биомаркеров экспозиции и эффекта с последующим гигиеническим нормированием и обоснованием основных профилактических мероприятий.

Ключевые слова: высокотехнологичный лекарственный препарат; генотерапевтический лекарственный препарат; биотехнологический лекарственный препарат; доклинические исследования; моноклональные антитела; профессиональный риск; предельно допустимая концентрация

Для цитирования: Климов В.И., Лалыменко О.С., Корсун Л.В. Возможные риски профессионального воздействия инновационных биологических лекарственных препаратов: обзор литературы. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2024;26(4):74–81. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-74-81>

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200093-9).

Потенциальный конфликт интересов: О.С. Лалыменко и Л.В. Корсун являются сотрудниками редакции журнала «Медицина экстремальных ситуаций». Остальные авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов..

✉ Лалыменко Ольга Сергеевна yalopostaOL@yandex.ru

Статья поступила: 30.09.2024 **После доработки:** 11.11.2024 **Принята к публикации:** 13.11.2024

POTENTIAL RISKS OF OCCUPATIONAL EXPOSURE TO INNOVATIVE BIOPHARMACEUTICALS: A REVIEW

Vladimir I. Klimov¹, Olga S. Lalymenko^{2✉}, Lilia V. Korsun²

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

² Centre for Strategic Planning of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russia

Introduction. Gene-targeted therapies (gene-targeted, high-tech, and biopharmaceuticals) are developed based on active pharmaceutical ingredients, which are reactive compounds with pleiotropic activity. Such ingredients are associated with health hazards to workers employed at various stages of their production. Clinically significant pharmacological or toxicological effects of innovative medications on employees exposed to these components are unsafe from the perspective of a risk-based approach in occupational medicine.

Objective. Assessment of potential risks of occupational exposure to innovative biopharmaceuticals in production or laboratory conditions and approaches to their hygienic management.

Materials and methods. The relevant scientific publications were searched and retrieved via electronic bibliographic databases both in the Russian language (eLibrary, CyberLeninka) and in the English language (WoS, Scopus, PubMed). Regulatory documents were analyzed using the *Consultant Plus* legal information system.

Discussion. Specific features of production of new-generation biopharmaceuticals (gene-targeted, high-tech, or biotechnological medications) and the associated risks of occupational exposure to workers in pharmaceutical or laboratory production are considered. It was established that employees of such enterprises are exposed to the combined influence of adverse — biological, physical, and chemical — production environment factors. There is a lack of information on the development of analytical methods for identifying gene-targeted components (high-tech or biotechnological medications) in the workplace air and wastewater, as well as on workplace surfaces. The identified problems of occupational health are related to the lack of legislative instruments and knowledge-based management decisions on the identification of risk factors and control ranges of potential work-related effects of innovative biopharmaceuticals. Such

© В.И. Климов, О.С. Лалыменко, Л.В. Корсун, 2024

approaches should be based on the principles of hygienic regulation aimed at eliminating or reducing negative industrial effects and ensuring the safety and preservation of employee health.

Conclusions. Major methodological approaches to assessing the work-related impact of gene-targeted, high-tech, or biotechnological therapies on employees of pharmaceutical enterprises are determined. These approaches include: (1) toxicological assessment of compounds with the establishment of possible parameters of toxicometry; (2) evaluation of the pharmacological and toxicokinetic features of gene-targeted therapeutic components; (3) development of methods for their quantitative determination in various environments; (4) establishment of biomarkers of exposure and related effects followed by hygienic rationing and justification of preventive measures.

Keywords: advanced therapy medicinal products; gene therapy medicinal product; biotechnology-derived pharmaceuticals; preclinical studies; monoclonal antibodies; occupational hazard; allowable concentrations

For citation: Klimov V.I., Lalymenko O.S., Korsun L.V. Potential risks of occupational exposure to innovative biopharmaceuticals: A review. *Extreme Medicine.* 2024;26(4):74–81. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-74-81>

Funding: this work was carried out within the state assignment of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products No. 056-00026-24-00 (research practice state reg. No. 124022200093-9).

Potential conflict of interest: Olga S. Lalymenko and Lilia V. Korsun are editorial staff of the journal "Extreme Medicine". The other authors declare no potential conflict of interest.

✉ Olga S. Lalymenko yalopostaOl@yandex.ru

Received: 16 Sep. 2024 **Revised:** 11 Nov. 2024 **Accepted:** 13 Nov. 2024

ВВЕДЕНИЕ

Современная медицина отличается высокими темпами развития и постоянным появлением на рынке инновационных технологий, в том числе лекарственных препаратов (ЛП). Тем не менее до сих пор существует множество заболеваний, для которых отсутствует не только этиотропная, но и патогенетическая терапия [1].

До недавнего времени основными направлениями деятельности фармацевтической индустрии были разработка и промышленное производство низкомолекулярных ЛП. По мере развития научной методологии в аспекте воздействия на генетический аппарат соматических клеток с целью восстановления или модификации синтеза определенных белков, связанных с тем или иным заболеванием, значительно возросли возможности лечения широкого спектра нозологий, для которых не существовало эффективных этиопатогенетических методов терапии, что дало старт стремительному развитию биотехнологической отрасли и созданию инновационных биологических ЛП [2–4].

Активные фармацевтические ингредиенты для производства ЛП, действующие на генетический аппарат, являются реакционноспособными соединениями с плейотропной активностью, что сопряжено с рисками здоровью работников, занятых на различных этапах производства [5]. Несмотря на то что эффекты ЛП для пациентов могут быть желательными или приемлемыми, любой клинически значимый фармако/токсикологический эффект ЛП, действующего на генетический аппарат работающих, имеющих контакт с данными компонентами, с точки зрения риска-ориентированного подхода в медицине труда является небезопасным [6, 7].

Приоритетное направление профилактической медицины — идентификация небезопасного производственного фактора, количественное установление безопасных пределов воздействия вредных и опасных факторов рабочей среды на этапе разработки, синтеза и последующего промышленного использования с целью их гигиенического контроля с учетом принципов безопасности для работников и индифферентности для окружающей среды и населения.

Цель работы: оценка потенциальных рисков профессионального воздействия инновационных биологических лекарственных препаратов на работающих в условиях производства/лаборатории и методических подходов их гигиенической регламентации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поиск, системный анализ и обзор научной литературы выполнен в электронных библиографических базах данных на русском (eLibrary, CyberLeninka) и английском (Web of Science, Scopus, PubMed) языках, нормативных документах в справочной правовой системе КонсультантПлюс. Поисковые запросы включали ключевые слова: высокотехнологичный лекарственный препарат (ВТЛП), генотерапевтический лекарственный препарат (ГТЛП), биотехнологический лекарственный препарат, доклинические исследования, моноклональные антитела (МкАТ), профессиональный риск, предельно допустимая концентрация (Advanced therapy medicinal products, gene therapy medicinal product, biotechnology-derived pharmaceuticals, preclinical studies, monoclonal antibodies, occupational hazard, allowable concentration). Глубина поиска составила 10 лет. Критериями включения были: наличие структурированной информации о доклинической и клинической оценке безопасности ВТЛП, ГТЛП, биотехнологических ЛП, количественных методах их идентификации в различных средах, а также особенностях контроля производственной среды.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Современные стратегии терапии нацелены на индивидуализацию лечебного воздействия для пациента, при котором препарат и доза оптимально адаптируются к потребностям конкретного человека. Основой ее является использование биологических/биотехнологических продуктов, направленных на модификацию последовательности генов или управление их экспрессией, а также на изменение биологических свойств клеток и, соответственно, продукцию терапевтически активных белков в организме для их лечебного или профилактического воздействия [8, 9].

Согласно отчету «Gene Therapy Development & Manufacturing, 2023» в настоящее время на разных стадиях разработки находятся более 3150 биологических, биотехнологических, генотерапевтических лекарственных средств (ЛС) новых поколений и более двух десятков препаратов одобрены к клиническому использованию органами регулирования ЛС разных стран [10].

В Российской Федерации активно осваивается инновационная сфера по разработке, экспертизе, производству, внедрению в практику здравоохранения биологических/биотехнологических ЛП; при этом генная терапия определяется как «совокупность генно-инженерных (биотехнологических) и медицинских методов, направленных на внесение изменений в генетический аппарат соматических клеток человека в целях лечения заболеваний» [11].

К настоящему времени проведена некоторая адаптация нормативно-правового регулирования в данной сфере, свидетельством чего является введение в действие Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 годы для комплексного решения задач ускоренного развития генетических технологий, в том числе технологий генетического редактирования [12–14].

Вместе с тем, согласно ФЗ № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» от 12.04.2010 (ред. от 30.01.2024) п. 6.3 ст. 4, введено понятие «высокотехнологический ЛП — это генотерапевтический лекарственный препарат (ГТЛП) для медицинского применения, или ЛП на основе соматических клеток для медицинского применения, или тканеинженерный ЛП (препарат тканевой инженерии)»; в п. 7.2 ст. 4 данного закона и в решении ЕАЭС № 78 от 03.11.2016 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения» дано определение термина ГТЛП — «биологический ЛП, содержащий активное вещество с рекомбинантной нуклеиновой кислотой или состоящий из нее, вводимый человеку с целью регулирования, восстановления, замены, добавления или удаления генетической последовательности»; а в п. 7.1 ст. 4 этого же закона обозначена дефиниция биотехнологических ЛП, а именно, производство которых осуществляется с использованием биотехнологических процессов и методов (в том числе ДНК-рекомбинантной технологии, технологии контролируемой экспрессии генов, кодирующих биологически активные белки в прокариотах и эукариотах, включая измененные клетки млекопитающих), гибридного метода и метода моноклональных антител.

Наряду с этим в Российской Федерации, согласно ФЗ № 180-ФЗ от 23.06.2016 «О биомедицинских клеточных продуктах», действует понятие «биомедицинский клеточный продукт — комплекс, состоящий из клеточной линии (клеточных линий) и вспомогательных веществ; к которым не относятся объекты трансплантации, а также высокотехнологические лекарственные средства, включая ГТЛП». Требования к условиям производства, валидации производственного процесса, контроля качества целевых и промежуточных продуктов ГТЛП отражены в Национальном стандарте РФ ГОСТ Р 52249-2009 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств» и Государственной фармакопее Российской Федерации XIV ОФС.1.7.1.0011.18 «Биотехнологические лекарственные препараты». Методология и требования к проведению доклинических исследований, изучению стабильности биотехнологических препаратов и безопасности фармацевтической субстанции и готовой

лекарственной формы описаны в национальном стандарте ГОСТ Р 57688-2017 «Лекарственные средства для медицинского применения. Изучение стабильности биотехнологических/биологических лекарственных препаратов».

Обращает на себя внимание тот факт, что вышеописанная нормативно-правовая база регулирует процессы обращения биологических/биотехнологических ЛП и направлена в первую очередь на обеспечение гарантии качества и безопасности именно ЛП, однако не гарантирует безопасности для здоровья персонала фармацевтических предприятий, имеющего производственный контакт с вредными или опасными факторами рабочей среды.

В настоящее время в Российской Федерации законодательная база по медицине труда — отрасли, направленной на охрану здоровья работающего контингента, контактирующего с вредными или опасными факторами рабочей среды (физическими, химическими, биологическими и факторами трудового процесса), представлена широким спектром действующих нормативно-методических/правовых документов, в которые были внесены значительные изменения в период 2021–2022 гг. Эти изменения отражают современные требования к безопасности труда и охране здоровья работающих в соответствии с международными стандартами и с учетом новых разработок и достижений науки и техники.

Так, согласно СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», установлены обязательные требования к комплексу организационных, санитарно-противоэпидемических, лечебно-профилактических, лабораторно-диагностических, инженерно-технических мероприятий, регламентированы порядок учета, хранения, передачи и транспортировки, условия и алгоритм работы на молекулярном, клеточном уровнях для создания модифицированных/генно-инженерно-модифицированных вариантов биологических агентов, диагностические исследования в области биотехнологии, генно-инженерной сферы, микробиологические/вирусологические исследования детекции нуклеиновых кислот, обнаружения антигенов или антител к патогенному агенту.

Важным пунктом недавно принятого Указа Президента Российской Федерации от 11 марта 2019 г. № 97 «Об основах государственной политики Российской Федерации в области обеспечения химической и биологической безопасности на период до 2025 года и дальнейшую перспективу» стало определение стратегических направлений государственной политики в области обеспечения в том числе биологической безопасности, а именно: поддержание допустимого уровня риска негативного воздействия опасных биологических факторов на население и окружающую среду; разработка гигиенических нормативов, методов индикации содержания биологических агентов в окружающей среде; внедрение современных механизмов управления химическими и биологическими рисками; внедрение комплекса мероприятий по предупреждению и минимизации биологических рисков, повышению защищенности населения и окружающей среды от негативного воздействия опасных биологических факторов, а также оценка эффективности указанных мероприятий.

Вопросы методологии разработки и научного обоснования критерии гигиенической оценки воздействия биологического производственного фактора являются актуальными и приоритетными. Необходимо отметить, что на законодательном уровне на данный момент нет

четких указаний о процедуре производственного контроля и алгоритмах гигиенического нормирования вредных факторов рабочей среды, возникающих на различных этапах разработки и производства ГТЛП, ВТЛП, биотехнологических ЛП как в воздухе рабочей зоны, так и на объектах окружающей среды.

Особенностью промышленной биотехнологии, согласно ГОСТ Р 52249-2009 Национальный стандарт «Правила производства и контроля качества лекарственных средств», является многостадийность технологических процессов, использование различных штаммов и серотипов живых микроорганизмов, культивирование клеток или экстракция материала из живых организмов, большого ассортимента сырьевых материалов, образование широкого спектра промежуточных и конечных продуктов микробного синтеза, что определяет комбинированный и сочетанный характер вредного действия биологического и других производственных факторов на организм работников [10, 11].

Общая биотехнологическая схема фармацевтического производства включает 5 этапов: выбор штамма, подбор и приготовление питательной среды, культивирование штаммов-продуцентов (ферментация), получение посевного материала, выделение и очистка целевого продукта. Биотехнологические фармацевтические препараты требуют высокой степени чистоты, что достигается последовательными операциями очистки: сепарацией, разрушением клеточных оболочек (дезинтеграция биомассы), отделением клеточных стенок, отделением и очисткой продукта, тонкой очисткой и разделением препаратов. Следует отметить, что отделение и очистка продукта с последующим разделением препаратов и выделением целевого продукта из культуральной жидкости или гомогената разрушенных клеток проводится путем осаждения (высаливания), экстракции или адсорбции. При этом в ходе процесса осаждения применяются физические (нагревание, охлаждение, разбавление, концентрирование) и химические методы (с помощью неорганических и органических веществ: этанола, метанола, ацетона, изопропанола) [11–14], что создает дополнительную нагрузку в аспекте загрязнения воздуха рабочей зоны химическими органическими и неорганическими соединениями.

В процессе производства фармацевтические ингредиенты могут выделяться в воздух рабочей зоны, как правило, в следовых количествах или в высоких концентрациях при аварийных ситуациях и в случае несоблюдения санитарно-гигиенических требований при недостаточной герметизации оборудования практически на всех этапах технологического процесса. При этом может происходить загрязнение воздуха рабочих помещений, одежды, кожных покровов работников, поверхностей оборудования, строительных конструкций, территории промышленных площадок и окружающей среды. В воздухе производственных помещений вредные вещества могут находиться в виде газов, паров, аэрозолей, а также в виде смесей и поступать в организм главным образом через органы дыхания (ингаляционно), желудочно-кишечный тракт (перорально), кожные покровы (транскutanно), а в отдельных случаях и через слизистую оболочку глаз [10, 12–14].

Риск ингаляционного воздействия компонентов биологических/биотехнологических ЛП (подробно описан в материалах заседания WHO/CDS/CSR/ISR/99.2. Department of Communicable Disease Surveillance and Response) возможен при следующих производственных

манипуляциях: прокаливании бактериологических петель, засеве на чашках с агаром, пипетировании, приготовлении мазков, открывании емкостей с клеточными культурами, наборе проб крови/сыворотки, центрифугировании; риск попадания патогенного агента в пищеварительный тракт вероятен при работе с образцами, мазками и культурами; риск под кожного инфицирования — при использовании игл и шприцев при работе с кровью или при удалении инфицированного материала.

В последние годы значительно возросло количество терапевтических средств, разработанных на основе генно-инженерных моноклональных антител (МкАТ), таких как бевацизумаб, цетуксимаб, дратумумаб, омализумаб, ритуксимаб, трастузумаб, которые по объему производства занимают на мировом фармацевтическом рынке одно из ведущих мест [15–17]. По состоянию на ноябрь 2021 года более 130 препаратов на основе антител одобрены или находится на рассмотрении регулирующих органов, а в мировой клинической практике используются порядка 35 препаратов МкАТ для лечения онкологических, аутоиммунных, инфекционных, аллергических заболеваний, характеризующихся длительным прогрессирующим течением. В России зарегистрировано и успешно применяется более 20 лекарственных препаратов МкАТ [14, 18].

Моноклональные антитела обычно представляют собой большие молекулы с молекулярной массой > 140 кДа и предназначены для воздействия на определенные белки [15, 19, 20]. Биспецифические моноклональные антитела (bsAbs) — это антитела следующего поколения, обычно имеющие молекулярную массу от 50 до 60 кДа, с более высокой клинической эффективностью и безопасностью за счет воздействия на два различных пути иммунорегуляции. Моноклональные антитела получают с использованием гибридомной технологии, рекомбинантной ДНК, а также могут быть произведены с помощью других технологий [21–23].

Активным компонентом лекарственных препаратов МкАТ являются высокоочищенные иммуноглобулины или их фрагменты, например F(ab') 2-фрагменты, характеризующиеся специфичностью к строго определенной детерминанте антигена, продуцируемые одним клоном антителообразующих клеток. Источником получения МкАТ являются клонированные клетки — иммортализованные («бессмертные») В-лимфоциты в виде перевиваемой культуры клеток или клеточной линии, полученные на основе технологии рекомбинантной ДНК [18, 22]. Иммуноглобулины или их фрагменты могут быть изменены путем различных модификаций: конъюгацией с токсином, включением радиоактивной метки, химическим связыванием двух молекул иммуноглобулинов или их производных для получения МкАТ с двойной специфичностью, созданием Fc-связанных слитых белков — белков слияния и др. [16, 19].

Моноклональные антитела обладают необычными характеристиками: являются крупномолекулярными белками, которым присуща гидрофильность и лабильность (как химическая, так и ферментативная), что позволяет им расщепляться в желудочно-кишечном тракте, но вместе с тем оставаться стабильными молекулами с длительным периодом полураспада, обычно составляющим несколько дней или недель [20, 21], кроме того, по данным Brian A. Baldo, конъюгация с полиэтиленгликолем (ПЭГ) или пегилирование МкАТ еще больше продлевает период их полувыведения и создает дополнительные проблемы

безопасности, связанные с отсутствием биоразлагаемости ПЭГ-компонентта [22].

Исследователями David R. Taft et al. установлено, что для моноклональных антител из-за присущей им высокой специфичности связывания и аффинности к своей мишени основным путем элиминации является мишень-опосредованное распределение ЛС, особенно на низких дозах и концентрациях [23]. Это явление целенаправленной «привязки» соединения, в частности моноклонального антитела к клетке-мишени со строго специфичным ему типом рецептора. При этом требуется небольшое количество лекарственного вещества для наступления терапевтического эффекта [24], что является благоприятным критерием для клинического использования МкАТ, однако значительно увеличивает потенциальные риски профессионального воздействия на работников в условиях его промышленного производства.

Brian A. Baldo et al. отмечают, что нежелательными реакциями со стороны иммунной системы, полученными в ходе клинических наблюдений применения МкАТ, являются реакции гиперчувствительности, такие как анафилаксия, кожные проявления, генерализованная цитокиновая реакция, снижение функции иммунной системы и аутоиммунные реакции [25].

По данным M.H. Lars et al., белковые препараты, в том числе МкАТ, в процессе выполнения различных технологических этапов разработки и производства могут находиться в воздухе рабочей зоны в виде газов, паров, аэрозолей и газопароаэрозольных смесей и вызывать нежелательные побочные эффекты у работников биофармацевтических компаний [26]. Учитывая обширную поверхность (более 100 м²) выстилающего легочного эпителия, тесно соприкасающегося с широкой сетью капилляров, абсорбция чужеродных веществ через легкие при ингаляционном пути поступления может происходить с большой скоростью [10, 22, 27]. При этом скорость оседания частиц в эпителии дыхательных путей напрямую зависит от размера респирабельной фракции, а именно: частицы размером более 10 мкм оседают в носоглотке и трахеобронхиальном отделе (в этих отделах респираторного тракта эпителий толще и покрыт слоем слизи), что ограничивает системную абсорбцию, однако не исключает развития местных реакций. Кроме того, реснитчатый эпителий перемещает содержащую частицы слизь в глотку, где она проглатывается и поступает в желудочно-кишечный тракт [28].

Некоторыми исследованиями установлено, что транспортировка крупных молекул, более 0,6 нм, через клеточные слои в кровь при ингаляционном пути поступления белковых препаратов (МкАТ, биспецефических антител, слитых белков) обеспечивается с помощью альвеолярных эпителиальных клеток, имеющих поры и везикулы, путем пассивной диффузии с дальнейшей реализацией их системного воздействия на организм [29]. В то же время в последних исследованиях описано, что для более крупных белков (>40 кДа) доминирующим механизмом трансмембранных транспорта протеинов является рецептор-опосредованный трансцитоз через неонатальный Fc-рецептор (FcRn), который экспрессируется в верхних дыхательных путях приматов, бронхиальных и альвеолярных клетках крыс с присущей возможностью связывания с белками с высоким сродством, что играет важную роль в транспорте IgG в другие ткани [30–32], тогда как для белков меньшего размера могут быть важны как трансцитоз, так и параклеточные механизмы [33–35].

В экспериментальных исследованиях Jennifer A. Dumont et al. при ингаляционных воздействиях белковых препаратов (в том числе МкАТ) на обезьянах было установлено, что уровень абсорбции комплекса Fc-домена IgG1, осевшего в легких, равнозначен концентрации белкового препарата/МкАТ в крови при подкожной инъекции у приматов и человека [36], что создает предпосылки накопления данных препаратов в ткани легких, способных оказывать негативное воздействие на организм работников в условиях производства на всех этапах технологического процесса.

В исследовании J.V. Fahy et al., проведенных на здоровых добровольцах, моделировали производственное ингаляционное воздействие МкАТ: E25 или омализумаба с ежедневной 10-минутной экспозицией через небулайзер в течение 56 дней. При этом было установлено, что более 15 % введенной дозы препарата фактически оседало в альвеолах, а системная биодоступность E25 или омализумаба при ингаляции находилась в пределах 1,6–4,3% [37–39]. Данный факт является важным аспектом для специалистов по медицине труда в связи с тем, что агрегированные в легких МкАТ даже после частичного внутриклеточного ферментативного разрушения легочными антипротеазами способны инициировать в ткани легких каскад патологических процессов [40], что необходимо учитывать при разработке регламентов профессионального воздействия как в воздухе рабочей зоны, так и в биологических средах работающих соответствующих фармацевтических производств.

В работах [41, 42] предложены рекомендации по установлению пределов профессионального воздействия для моноклональных антител и слитых белков в воздухе рабочей зоны на уровне ≥ 1 мкг/м³ при ингаляционном пути поступления, с учетом системной биодоступности после ингаляции менее 1% для соединений с молекулярной массой >10кДа.

С помощью ГТЛП возможна доставка терапевтических генов в клетки-мишени, однако ни ДНК, ни РНК в свободном виде не могут быть использованы для достижения этой цели в связи с довольно быстрой деградацией нуклеиновой кислоты в сыворотке крови под воздействием нуклеаз. Поэтому для доставки генов в эукариотические клетки с начала 1980-х гг. разрабатываются векторные генетические конструкции [43]. На сегодняшний день в качестве вектора доставки гена при клиническом использовании протестированы 5 основных классов вирусных векторов: ретровирусы, аденоандомавирусы, аденоассоциированные вирусы, лентивирусы и вирусы простого герпеса [44, 45].

По данным ряда клинических и доклинических исследований у ГТЛП/БТЛП на основе вирусных векторных систем установлено наличие ряда побочных эффектов. Так, некоторые исследователи отмечали, что генетические изменения, опосредованные препаратами с использованием ретровирусных векторов с дефицитом репликации, вызывали проявления инсерционного мутагенеза и злокачественной трансформации гемопоэтических клеток-предшественников с развитием острого миелолейкоза и лимфопролиферативных заболеваний [46].

В ходе исследований M.G. Ott et al. получены доказательства ретровирусных вектор-индукционных негативных эффектов на гемопоэтическую активность, проявляющихся восстановлением окислительной антимикробной активности в фагоцитах после переноса гена, значительным переносом генов в нейтрофильные

клетки с образованием большого количества функциональных фагоцитов и расширением генно-корректированного миелопоэза с прогрессией в сторону миелодисплазии [47, 48].

В отличие от ГТЛП с использованием ретровирусных векторов, препараты на основе аденонаших векторов не реплицируются и не обладают онкогенностью, однако им присуща выраженная иммуногенность [49] с активацией иммунокомпетентных клеток, которые, в свою очередь, начинают секретировать цитокины и факторы хемотаксиса, привлекающие в очаг нейтрофилы, макрофаги и естественные киллеры с запуском иммунной реакции с выработкой через несколько суток специфических антител. На различных клетках-мишениях *in vitro* и нескольких моделях на мышах *in vivo* установлено, что некоторые аденонашие векторы первого поколения, сохраняющие значительную часть генома, способны инициировать дозозависимый апоптоз, то есть проявлять прямую цитотоксичность [50, 51]. В клинических исследованиях также было зарегистрировано несколько эпизодов развития воспалительной реакции на аденонашие векторы, включая развитие тяжелой гепатотоксичности с летальным исходом [52].

Аденоассоциированные векторы — одни из наиболее распространенных векторов, используемых в генной терапии, хотя при их применении возможна нежелательная случайная активация или ингибирование экспрессии эндогенных генов и инфицирование приматов и человека [53, 54].

Лентивирусные векторы происходят от ВИЧ-1 и способны воздействовать как на делящиеся, так и не делящиеся клетки, в связи с чем являются потенциальным вектором для переноса генов в условиях *in vivo*. Большинство лентивирусных векторов сохраняют способность интегрироваться в геном инфицированных клеток, удаление многих белков ВИЧ снижает вероятность образования вируса, способного к репликации в организме человека [55]. Для получения псевдотипированных лентивирусных векторов используются гликопroteины оболочек вирусов, считающиеся потенциальными агентами биологического оружия (вирусы геморрагических лихорадок Эбола, Марбурга, Росс-Ривер и др.), в связи с чем их использование в исследованиях по-прежнему связано с потенциальными рисками, и долгосрочная безопасность этих клинических вмешательств все еще оценивается [56].

Векторы на основе герпесвирусов обеспечивают долгосрочную экспрессию трансгена, нейротрофичны и высокоэффективны при изучении ретроградного и антероградного транспорта в ЦНС, однако им присуща способность вызывать цитопатические (токсические) эффекты и ответы со стороны иммунной системы [52].

Литература / References

1. Омельяновский ВВ, Мусина МЗ, Лемешко ВА. Готова ли система здравоохранения к применению препаратов генной терапии? (обзор литературы). *Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины.* 2020;28(5):883–92.
Omelianovsky VV, Musina NZ, Lemeshko VA, Gorkavenko FV, Antonov AA. Is the health care system ready to apply gene therapy preparations? *Probl Sotsialnoi Gig Zdravookhranennii i Istor Med.* 2020;28(5):883–92 (In Russ.).
<https://doi.org/10.32687/0869-866X-2020-28-5-883-892>
2. Гречушкина НА. Генная терапия: история развития и современное состояние (обзор литературы). *Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины.* 2022;30(s1):992–7.
Grechushkina NA. Gene therapy: history of development and current state (literature review). *Problemi socialnoi gigieni, zdravookhranenia i istorii meditsini.* 2022; 30(s1):992–7 (In Russ.).
<https://doi.org/10.32687/0869-866X-2022-30-s1-992-997>
3. Безбородова ОА, Немцова ЕР, Якубовская РИ, Каприн АД. Генная терапия — новое направление в медицине. *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена.* 2016;5(2):64–72.
Bezborodova OA, Nemtsova ER, Yakubovskaya RI, Kaprin AD. Gene therapy is a new direction in medicine. *Oncology. Journal named P.A. Herzen.* 2016;5(2):64–72 (In Russ.).

В настоящее время в США и странах ЕС рекомендации по медицине и охране труда при работе с вирусными векторными системами или продуктами генной терапии в условиях фармацевтических предприятий/лабораторий и медицинских учреждений ограничиваются общими правилами биобезопасности при работе с биологическим агентами с учетом уровней биологического риска [13], а в Российской Федерации в силу отсутствия широкого промышленного выпуска генных препаратов нет согласованных и четких алгоритмов для контроля оценки воздействия компонентов ГТЛП/ВТЛП/биотехнологических ЛП на работников во время производственного контакта или терапевтического использования в организациях здравоохранения. Кроме того, остается открытым вопрос научного обоснования принципов гигиенического нормирования аэрозолей фармацевтических компонентов ГТЛП/ВТЛП/биотехнологических ЛП для контроля воздуха производственной среды предприятий или лабораторий биотехнологической отрасли.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашем исследовании приведены отдельные аспекты относительно особенностей разработки биологических лекарственных препаратов нового поколения (ГТЛП/ВТЛП/биотехнологических ЛП) и сопряженных с этим рисков профессионального воздействия на работников в условиях фармацевтического или лабораторного производства. При анализе литературы выявлено, что работники подвергаются сочетанному воздействию неблагоприятных факторов производственной среды различной природы: биологических, физических, химических. При этом отмечается неполнота информации о разработке аналитических методов идентификации компонентов ГТЛП/ВТЛП/биотехнологических ЛП в воздухе рабочей зоны, на рабочих поверхностях, сточных водах и др.; в доступной к анализу литературе нами найдены лишь единичные сообщения.

Проведенная работа позволила определить основные методические подходы по оценке потенциального производственного воздействия ГТЛП/ВТЛП/биотехнологических ЛП на работников соответствующих фармацевтических предприятий, которыми являются токсикологическая оценка соединений с установлением возможных параметров токсикометрии, исследование фармако/токсикокинетических особенностей компонентов генных препаратов, разработка методик их количественного определения в различных средах, установление биомаркеров экспозиции и эффекта, с последующим гигиеническим нормированием и обоснованием основных профилактических мероприятий.

4. Лила АМ, Мартынова ЛВ. Генно-инженерные биологические препараты: проблема первичной и вторичной неэффективности. *Вопросы лечения*. 2011;3(4):153–60.
Lila AM, Martynova LV. Genetically engineered biological drugs: the problem of primary and secondary ineffectiveness. *Treatment issues*. 2011;3(4):153–60 (In Russ.).
5. Ran Tang, Zhigang Xu. Gene therapy: a double-edged sword with great powers. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2020;474(1–2):73–81.
<https://doi.org/10.1007/s11010-020-03834-3>
6. Jedd MZ, Hopf N, Viegas S, et al. Towards a systematic use of effect biomarkers in population and occupational biomonitoring. *Environ Int*. 2021;146(2021):1–18.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.10625>
7. Ahuja V, Krishnappa M. Approaches for setting occupational exposure limits in the pharmaceutical industry. *Applied toxicology*. 2021;42:154–67.
<https://doi.org/10.1002/jat.4218>
8. Немцова ЕР, Безбородова ОА, Якубовская РИ. и др. Генотерапевтические препараты в онкологии: современное состояние. *Исследования и практика в медицине*. 2016;3(4):3.
Nemtsova ER, Bezborodova OA, Yakubovskaya RI, Kaprin AD. Official medications for anti-numor gene therapy. *Research'n Practical Medicine Journal*. 2016;3(4):3 (In Russ.).
<https://doi.org/10.17709/2409-2231.2016-3-4-4>
9. Баранов АА, Алексеева ЕИ, Валиева СИ. и др. Терапия генно-инженерными биологическими препаратами: эффективность и безопасность переключения. *Вопросы современной педиатрии*. 2014;13(1):33–50.
Baranov AA, Alekseeva EI, Valieva SI. and others. Therapy with genetically engineered biological drugs: effectiveness and safety of switching. *Issues of modern pediatrics*. 2014;13(1):33–50 (In Russ.).
<https://doi.org/10.15690/vsp.v13i1.910>
10. Измеров НФ, Кириллов ВФ. ред. *Гигиена труда*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2016.
Izmerov NF, Kirillov VF. ed. *Occupational hygiene*. Moscow: GEOTAR-Media; 2016 (In Russ.).
11. Новиков ДА. Фармацевтическая биотехнология. Минск; 2018.
Novikov DA . Pharmaceutical biotechnology. Minsk; 2018 (In Russ.).
12. Филонюк ВА. Иммунотоксическое действие промышленных штаммов микроорганизмов на организм работников биотехнологических предприятий. *Актуальные проблемы транспортной медицины: окружающая среда, профессиональное здоровье, патология*. 2020;4(62):119–26.
Filonyuk VA. Immunotoxic effect of industrial strains of microorganisms on the body of workers of biotechnological enterprises. *Current problems of transport medicine: environment, professional health, pathology*. 2020;4(62):119–26 (In Russ.).
<https://doi.org/10.5281/zenodo.4396175>
13. Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях. 4 изд. Женева: Всемирная организация здравоохранения; 2022:110.
Practical Guide to Laboratory Biosafety, Fourth Edition. Geneva: World Health Organization;2022:110 (In Russ.).
14. Гайдерова ЛА, Алпатова НА, Лысикова СЛ. и др. Международные стандартные образцы моноклональных антител для оценки биологической активности лекарственных препаратов: современное состояние. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(4):480–98.
Gaiderova LA, Alpatova NA, Lysikova SL. and others. International standard samples of monoclonal antibodies for assessing the biological activity of drugs: current state. *BIOpreparations. Prevention, diagnosis, treatment*. 2023;23(4):480–98 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-480-498>
15. Ferri N., et all. Pharmacokinetics interactions of monoclonal antibodies. *Pharmacological Research*. 2016;111:592–99.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.07.015>
16. Ulrich Brinkmann, Roland E. Kontermann. The making of bispecific antibodies. *MABS*. 2017;9(2):182–92.
<https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1268307>
17. Dahlén Eva Veitonmäki Niina, Norlén Per. Bispecific antibodies in cancer immunotherapy. *Therapeutic Advances in Vaccines Immunotherapy*. 2018; 6(1): 3–17.
<https://doi.org/10.1177/2515135518763280>
18. Liu L. Pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *Protein Cell*. 2018;9(1):15–32.
<https://doi.org/10.1007/s13238-017-0408-4>
19. Ryman JT, at al. Pharmacokinetics of monoclonal antibodies Cpt-Pharm. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2017;6(9):576–88.
<https://doi.org/10.1002/psp4.12224>
20. Brennan FR, Dill Morton L, Spindeldreher S, et al. Safety and immunotoxicity assessment of immunomodulatory monoclonal antibodies. *mAbs*. 2010;2(3):233–55.
<https://doi.org/10.4161/mabs.2.3.11782>
21. Trivedi S, Srivastava RM, Concha-Benavente F, et al. Anti-EGFR targeted monoclonal antibody isotype influences antitumor cellular immunity in head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2016;22(21):5229–37.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-297>
22. Brian A Baldo. Enzymes approved for human therapy: indications, mechanisms and adverse effects. *BioDrugs*. 2015;29(1):31–55.
<https://doi.org/10.1007/s40259-015-0116-7>
23. Taft DR. Drug Excretion. *Pharmacology Principles and Practice*. 2009;9:175–99.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369521-5.00009-9>
24. Guohua An. Concept of pharmacologic target-mediated drug disposition in large-molecule and small-molecule compounds. *J. Clin Pharmacol*. 2020;60(2):149–63.
<https://doi.org/10.1002/jcpb.1545>
25. Brian A Baldo. Immune- and non-immune-mediated adverse effects of monoclonal antibody therapy: A survey of 110 approved antibodies. *Antibodies (Basel)*. 2022;11(1):17.
<https://doi.org/10.3390/antib11010017>
26. Lars MH, Reinders, Dennis Noelle, Martin D Klassen at all. Development and validation of a method for airborne monoclonal antibodies to quantify workplace exposure. *J Pharm Biomed Anal*. 2022;221:115046.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.115046>
27. Martin Harper. Recent advances in occupational exposure assessment of aerosols. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(18):6820.
<https://doi.org/10.3390/ijerph17186820>
28. Cherrie JW, Aitken RJ. Measurement of human exposure to biologically relevant fractions of inhaled aerosols. *Occup Environ Med*. 1999;56(11):747–52.
<https://doi.org/10.1136/oem.56.11.747>
29. Guilleminault L, Azzopardi N, Arnoult C. Fate of inhaled monoclonal antibodies after the deposition of aerosolized particles in the respiratory system. *J. Control Release*. 2014;196:344–54.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.10.003>
30. William M. Baldwin, Anna Valujskikh, Robert L. Fairchild. The neonatal Fc receptor: key to homeostatic control of IgG and IgG-related biopharmaceuticals. *Am J Transplant*. 2019;19(7):1881–7.
<https://doi.org/10.1111/ajt.15366>
31. Ramdani Y, Lamamy J, Watier H, Gouilleux-Gruart V. Monoclonal antibody engineering and design to modulate FcRn activities: a comprehensive review. *Int J Mol Sci*. 2022;23(17):9604.
<https://doi.org/10.3390/ijms23179604>
32. Spiekermann GM, Finn PW, Sally Ward et. all. Receptor-mediated immunoglobulin G transport across mucosal barriers in adult life: functional expression of FcRn in the mammalian lung. *J. Exp Med*. 2002;196(3):303–10.
<https://doi.org/10.1084/jem.20020400>
33. Garcia-Castillo MD, Chinnapan JF, Lencer WI. Membrane transport across polarized epithelia. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9(9):a027912.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027912>
34. Mobley C, Hochhaus G. Methods used to assess pulmonary deposition and absorption of drugs. *Drug Discov Today*. 2001;6(7):367–75.
[https://doi.org/10.1016/s1359-6446\(01\)01691-9](https://doi.org/10.1016/s1359-6446(01)01691-9)

35. Bequignon E, Dhommée C, Angely C. FcRn-dependent transcytosis of monoclonal antibody in human nasal Epithelial cells *in vitro*: A prerequisite for a new delivery route for therapy? *Int J Mol Sci.* 2019; 20(6):1379.
<https://doi.org/10.3390/ijms20061379>
36. Dumont JA, LowSC, Peters RT, Bitonti AJ. Monomeric Fc fusions: impact on pharmacokinetic and biological activity of protein therapeutics. *BioDrugs.* 2006;20(3):151–60.
<https://doi.org/10.2165/00063030-200620030-00002>
37. Fahy JV, Cockcroft DW, Boulet LP, et al. Effect of aerosolized anti-IgE (E25) on airway responses to inhaled allergen in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:1023–7.
<https://doi.org/10.1164/ajrccm.160.3.9810012>
38. Sweeney TD, Marian M, Ruppel J, et al. Chapter 14. Pulmonary delivery of anti-IgE: rationale for topical delivery to the airway. *N. Y.- Informa Healthcare, Marcel Dekker Inc.* 2002.
39. Fung ES, Parker JA, Powell AM, Andrew Maier. Estimating inhalation bioavailability for peptides and proteins 1 to 10 kDa in size. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 2023;137:9–22.
<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2022.105314>
40. Editor G, Chakraborti S, Dhalla NS. Role of Proteases in Inflammatory Lung Diseases. *Proteases in Health and Disease.* 2013;7:361–85.
https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9233-7_21
41. Graham JC, Hillegass J, Schulze G. Considerations for setting occupational exposure limits for novel pharmaceutical modalities. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2020;118:104813.
<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104813>
42. Graham J, Yao H, Franklin E. Occupational Exposure Risks When Working with Protein Therapeutics and the Development of a Biologics Banding System. *Appl Biosaf.* 2021;26(4):193–204.
<https://doi.org/10.1089/abp.2021.0004/>
43. Varanda C, Féli MR, Campos MD, Materatski P. An overview of the application of viruses to biotechnology. *Viruses.* 2021;13(10):2073.
<https://doi.org/10.3390/v13102073>
44. Ghosh S, Brown AM, Jenkins C, Campbell K. Viral vector systems for gene therapy: a comprehensive literature review of progress and biosafety challenges. *Appl Biosaf.* 2020;25(1):7–18.
<https://doi.org/10.1177/1535676019899502>
45. Venugopal Nair. Retrovirus-induced oncogenesis and safety of retroviral vectors. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2008;10(5):431–8.
46. Ott MG, Schmidt M, Schwarzwälder K, Stein S, Sile U, Koehl U, et al. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat. Med.* 2006;12:401–9.
<https://doi.org/10.1038/nm1393>
47. Stein S, Ott MG, Schultze-Strasser S, Jauch A, Burwinkel B, Kinner A, et al. Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat. Med.* 2010;16:198–204.
<https://doi.org/10.1038/nm2088>
48. Lee CS, Bishop ES, Zhang R, et al. Adenovirus-mediated gene delivery: potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes Dis.* 2017;4(2):43–63.
<https://doi.org/10.1016/j.gendis.2017.04.001>
49. Rosewell A, Vetrini F, Ng P. Helper-dependent adenoviral vectors. *J Genet Syndr Gene Ther.* 2011;5:001.
<https://doi.org/10.4172/2157-7412.s5-001>
50. Gregory SM, Nazir SA, Metcalf JP. Implications of the innate immune response to adenovirus and adenoviral vectors. *Future Virol.* 2011;6(3):357–74.
<https://doi.org/10.2217/fvl.11.6>
52. Lundstrom K. Viral vectors in gene therapy. *Diseases.* 2018;6(2):E42.
<https://doi.org/10.3390/diseases6020042>
53. Falese L, Sandza K, Yates B, et al. Strategy to detect pre-existing immunity to AAV gene therapy. *Gene Ther.* 2017;24(12):768–78.
<https://doi.org/10.2174/1566523034578104>
54. Dupont F. Risk assessment of the use of autonomous parvovirus-based vectors. *Curr. Gene. Ther.* 2003;3(6):567–82.
<https://doi.org/10.2174/1566523034578104>
55. Schlimgen R., Howard J., Wooley D., et al. Risks associated with lentiviral vector exposures and prevention strategies. *J. Occup. Environ. Med.* 2016;58(12):1159–66.
<https://doi.org/10.1097/JOM.0000000000000879>
56. William F. Goins, Shaohua Huang, Bonnie Hall, Marco Marzulli, Justus B. Cohen, Cronin J. et al. Engineering HSV-1 vectors for gene therapy. *Methods Mol Biol.* 2020;2060:73–90.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9814-2_4

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Климов В.И. — дизайн исследования, редактирование текста; Лалыменко О.С. — концепция и дизайн исследования, сбор, анализ и обработка материала, написание текста, составление списка литературы, редактирование; Корсун Л.В. — анализ и обработка материала, редактирование, составление списка литературы.

ОБ АВТОРАХ

Климов Владимир Иванович, канд. мед. наук, старший научный сотрудник
<https://orcid.org/0000-0003-1444-6591>
klimov@expmed.ru

Лалыменко Ольга Сергеевна, канд. мед. наук
<https://orcid.org/0000-0002-9279-1377>
yaloposta@gmail.com

Корсун Лилия Владимировна, канд. биол. наук
<https://orcid.org/0000-0003-4068-2870>
korsunlilia27@gmail.com



ТРАВМА ПОДВЕШИВАНИЯ В ТЕЧЕНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОГО ВРЕМЕНИ: ОБЗОР

К. Камлет¹, А. Мацейчик², К. Крупа³, В. Казмерский⁴, К. Коцур⁵, А. Зиобро¹, М. Земек⁶, А. Казмирска⁷, А. Лис⁸

¹ Районная больница Закопане, Польша

² Варшавский медицинский университет, Варшава, Польша

³ Вольская больница, Варшава, Польша

⁴ Независимый институт общественного здравоохранения Министерства внутренних дел и администрации Катовице, Польша

⁵ Районная больница Освенцима, Польша

⁶ Военный институт медицины — Национальный исследовательский институт, Варшава, Польша

⁷ Медицинский университет Силезии, Катовице, Польша

⁸ Медицинский центр Верхней Силезии им. Лешека Геца при Медицинском университете Силезии в Катовице, Польша

Введение. Травма подвешивания, также известная как синдром зависания в обвязке или синдром подвешивания, возникает, когда человек подвешивается неподвижно в страховочных стропах, что приводит к потенциально фатальным последствиям, таким как венозный застой, церебральная гипоперфузия и рабдомиолиз.

Цель. Изучить по данным литературы основные механизмы возникновения травмы подвешивания и потенциальные методы повышения безопасности лиц в группе риска.

Результаты. Это патологическое состояние, впервые упоминаемое еще в 1970-х годах, возникает у людей, занимающихся видами деятельности, требующими использования страховочных систем, такими как альпинизм и промышленные работы. Согласно последним исследованиям в ходе оказания помощи для восстановления кровотока и предотвращения осложнений необходимо немедленно перевести пострадавшего в горизонтальное положение. Надлежащая коррекция гиперкалиемии и рабдомиолиза стала ключевым направлением в протоколах лечения. Кроме того, признание роли рефлекса Бецольда — Яриша в развитии сердечно-сосудистого коллапса подчеркивает важность комплексных стратегий спасения. В качестве важных превентивных мер также отмечаются достижения в разработке более совершенных и безопасных страховочных систем.

Обсуждение. В то время как первоначальные стратегии лечения были направлены на предотвращение внезапного возврата крови к сердцу путем поддержания вертикального положения, последние исследования подчеркивают важность своевременного горизонтального положения. Роль нейрокардиогенных факторов, таких как рефлекс Бецольда — Яриша и влияние гиперкалиемии, связанной с рабдомиолизом, на исход подчеркивают эволюционирующую понимание патофизиологии. Этот сдвиг отражает возросшую осведомленность о комплексных протоколах спасения, которые снижают риски, связанные с синдромом восстановленного кровотока и сердечно-сосудистой нестабильностью.

Выводы. Прогресс в понимании травмы подвешивания значительно улучшил протоколы профилактики и лечения. Немедленное переведение пострадавшего в горизонтальное положение, надлежащее лечение осложнений (например, гиперкалиемии) и усовершенствованная конструкция страховочных систем играют ключевую роль в минимизации летальных исходов. Продолжение изучения основных механизмов патогенеза синдрома подвешивания и разработка новых методов спасения имеют большое значение для дальнейшего повышения безопасности лиц в группе риска.

Ключевые слова: патология страховочной системы; использование страховочных систем; охрана труда; длительное подвешивание; несчастные случаи на отдыхе; шок подвешивания; синдром подвешивания; травма подвешивания

Для цитирования: Камлет К., Мацейчик А., Крупа К., Казмерский В., Коцур К., Зиобро А., Земек М., Казмирска А., Лис А. Травма подвешивания в течение продолжительного времени: обзор. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2024;26(4):82–86. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-82-86>

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки

Потенциальный конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

✉ Катаржина Камлет camkasia@interia.pl

Статья поступила: 13.09.2024 После доработки: 02.11.2024 Принята к публикации: 05.11.2024

THE LONG TIME SUSPENSION TRAUMA: A REVIEW

Katarzyna Camlet¹, Aleksandra Maciejczyk², Katarzyna Krupa³, Wojciech Kaźmierski⁴, Kinga Koçur⁵, Anna Ziobro¹, Mateusz Ziomek⁶, Anna Kaźmierska⁷, Anna Lis⁸

¹ District Hospital in Zakopane, Zakopane, Poland

² Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

³ Wolski Hospital in Warsaw, Warsaw, Poland

⁴ Independent Public Health Care Institute of the Ministry of Internal Affairs and Administration in Katowice, Katowice, Poland

⁵ District Hospital in Oświęcim, Oświęcim, Poland

⁶ Military Institute of Medicine — National Research Institute, 04-141 Warsaw, Poland

⁷ Medical University of Silesia, Katowice, Poland

⁸ Leszek Giec Upper-Silesian Medical Centre of the Medical University of Silesia in Katowice, Katowice, Poland

Introduction. Suspension trauma, also referred to as a harness-induced pathology or suspension syndrome, occurs when an individual is suspended motionless in a harness. Potentially fatal outcomes of such a condition consist in venous pooling, cerebral hypoperfusion, and rhabdomyolysis.

Objective. To review literature sources on the key mechanisms of suspension injury and potential methods for improving the safety of people at risk.

Results. This condition, recognized since the 1970s, affects individuals involved in activities requiring harness use, such as climbing and industrial work. Recent studies have emphasized the need for immediate horizontal positioning during rescue to restore blood flow and prevent complications. Proper management of hyperkalemia and rhabdomyolysis has become a crucial focus in treatment protocols. Additionally, recognition of the role of the Bezold–Jarisch reflex in cardiovascular collapse highlights the importance of comprehensive rescue strategies. Advances in harness design are also noted as significant preventive measures.

Discussion. The findings indicate that while early management strategies focused on preventing sudden blood return to the heart by maintaining an upright position, more recent insights emphasize the importance of prompt horizontal repositioning. The role of neurocardiogenic factors, such as the Bezold–Jarisch reflex and the influence of rhabdomyolysis-related hyperkalemia, on outcomes has been recognized. This shift reflects an increased awareness of comprehensive rescue protocols that might mitigate risks associated with reflow syndrome and cardiovascular instability.

Conclusions. The progress in understanding suspension injury has significantly improved prevention and treatment protocols. Immediate adjustment of the victim to a horizontal position, proper treatment of complications (for example, hyperkalemia), and improved design of safety systems — all play a key role in minimizing deaths. Further studies should be aimed at investigating the main pathogenetic mechanisms of suspension syndrome and development of advanced rescue methods for improving the safety of people at risk.

Keywords: harness-induced pathology; harness use; industrial safety; prolonged suspension; recreational accidents; suspension shock; suspension syndrome; suspension trauma

For citation: Camlet K, Maciejczyk A, Krupa K, Kaźmierski W, Kocur K, Ziobro A, Ziomek M, Kaźmierska A, Lis A. The long time suspension trauma: A review. *Extreme Medicine*. 2024;26(4):82–86. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-82-86>

Funding: the study was performed without sponsorship.

Potential conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

✉ Katarzyna Camlet camkasia@interia.pl

Received: 13 Sep. 2024 **Revised:** 2 Nov. 2024 **Accepted:** 5 Nov. 2024

ВВЕДЕНИЕ

Травма подвешивания (синдром зависания, синдром зависания в обвязке или синдром подвешенного состояния) — угрожающее жизни состояние, которое возникает, когда человек остается подвешенным на страховочных ремнях в течение длительного времени. Травма подвешивания относительно редка в условиях соблюдения техники безопасности и использования надлежащего снаряжения. За 11 лет наблюдений было зафиксировано 5,8 млн часов использования страховочных систем квалифицированным персоналом на различных работах.

За этот период не было зарегистрировано случаев обмороков или травм, повлекших длительный период нетрудоспособности [1]. Это может быть связано с усилиями работодателей по обеспечению безопасности для своих сотрудников. За указанный период было зарегистрировано лишь несколько случаев этого осложнения у здоровых людей в результате несчастных случаев на спортивных и развлекательных мероприятиях, связанных с плохой тренировкой и неправильным использованием страховочного снаряжения [2, 3]. Уровень смертности для травмы подвешивания может сильно варьироваться в зависимости от нескольких факторов, включая продолжительность подвешивания, состояние и сопутствующие заболевания пострадавшего и скорость оказания помощи. Найти точные статистические данные не просто, хотя некоторые исследования показывают, что риск серьезных травм или смерти значительно возрастает после примерно 15-минутного пребывания в обвязке, и, если неказать помощь в течение получаса, уровень смертности может возрасти до 50%. Быстрая эвакуация и надлежащее лечение имеют решающее значение для улучшения результатов лечения пациентов [4].

В этом обзоре мы приводим анализ меняющегося понимания травмы подвешивания, освещая ключевые научные достижения, протоколы лечения и связанные с этим патофизиологические механизмы. Важно отметить, что в Польше до сих пор не было зарегистрировано ни одного случая травмы подвешивания.

История проблемы

Первые сообщения о травмах при подвешивании прозвучали на Второй Международной конференции врачей-

горноспасателей в 1972 г. Этот важный момент повысил осведомленность об опасностях, связанных с неподвижным подвешиванием на страховочной обвязке, особенно для альпинистов и спелеологов. На этой конференции сообщалось, что из 10 человек, оказавшихся в подвешенном состоянии, двое умерли до спасения, трое умерли сразу после этого, а пятеро были объявлены мертвыми в течение следующих нескольких дней [2, 4]. Ранние гипотезы связывали эти смертельные случаи с нарушением кровообращения, что побудило исследователей изучить основные причины и исходы травмы, вызванной подвешиванием, — основные причины и исходы.

Термин «травма подвешивания» получил широкое признание, особенно в отраслях с высоким уровнем риска и при выполнении работ, связанных с использованием страховочных строп и ремней. Первоначально считалось, что стропа вызывает «эффект жгута», сдавливая крупные вены и артерии, нарушая кровообращение [3]. Однако это первоначальное предположение было опровергнуто более поздними исследованиями, показавшими, что важным фактором развития травмы подвешивания был венозный застой, а не механическое сдавливание ремнем безопасности [1, 5].

Патофизиология

Физиологическая реакция на длительное вертикальное подвешивание сложна и включает в себя несколько механизмов. Когда человек неподвижно подвешен в вертикальном положении, сила тяжести заставляет кровь скапливаться в венах нижних конечностей из-за отсутствия мышечных сокращений, необходимых для венозного возврата. Во время движения венозное давление в стопе обычно составляет около 25 мм рт. ст., в то время как в состоянии неподвижности оно может повышаться и превышать 90 мм рт. ст. [6]. В нижних конечностях может задерживаться до 20% объема циркулирующей крови, что приводит к уменьшению венозного возврата к сердцу, а это снижает предварительную нагрузку и, следовательно, сердечный выброс. По мере снижения сердечного выброса происходит снижение системного артериального давления, что серьезно ухудшает церебральную перфузию [7].

Организм пытается компенсировать эту ситуацию, повышая тонус симпатической нервной системы, что приводит к учащению сердцебиения. Однако этих компенсаторных механизмов часто недостаточно, чтобы нейтрализовать последствия длительного венозного застоя. Поскольку мозговой кровоток продолжает снижаться, уменьшается и поступление кислорода в мозг, что приводит к предобморочным симптомам, таким как головокружение, дурнота, помутнение зрения, тошнота и потливость. Если пациент не обращает внимания на тревожные признаки и не предпринимает никаких действий, эти симптомы могут быстро прогрессировать до обморока из-за критической гипоперфузии. В случае потери сознания существует значительный риск летального исхода, особенно если подвешенное положение ухудшает проходимость дыхательных путей или усугубляет нестабильность сердечно-сосудистой системы [1, 5].

Считается, что рефлекс Бецольда — Яриша, который вызывает брадикардию и гипотензию в ответ на снижение притока крови к сердцу, играет ключевую роль в быстром коллапсе, который испытывают люди, пострадавшие от травмы при подвешивании [6, 7]. Как только человек теряет сознание, он не может принять горизонтальное положение, что усугубляет проблему и приводит к дальнейшему снижению церебральной перфузии и оксигенации [3, 1].

Однако гипотеза о том, что снижение предварительной нагрузки на сердце и, следовательно, уменьшение сердечного выброса является основной причиной потери сознания и других травм, не получила четкого подтверждения. В недавних обзорах подчеркиваются нейрокардиогенные механизмы, приводящие к снижению церебральной перфузии и потере сознания. При синдроме подвешивания не наблюдается существенного влияния на системные гемодинамические параметры, такие как компенсаторная тахикардия и снижение ударного объема, которые обычно связаны с низкой сердечной преднагрузкой [8].

Хотя рефлекс Бецольда — Яриша может быть связан с синдромом подвешивания, экспериментальные исследования этого не подтвердили. Механорецепторы, ответственные за этот рефлекс, расположенные в левом желудочке, реагируют на плохое наполнение желудочек [9].

Механизм смерти после спасения до конца не изучен. В литературе описано, что внезапный приток крови с ацидозом, которая накапливается в венах нижней части тела, к сердцу может временно снизить сократительную способность сердца. Однако это не связано с нарушениями сердечного ритма. Опубликованные обзоры подчеркивают, что ключевой причиной синдрома подвешивания является рабдомиолиз, который в первую очередь возникает в результате снижения кровотока и повреждения мышц, что приводит к высвобождению таких веществ, как миоглобин и калий. Риск смерти вследствие синдрома подвешивания наиболее высок, если время подвешивания более 30 минут, высота превышает 1,5 м, а возраст пострадавшего — пожилой.

Клинические наблюдения и отчеты о случаях

Несколько тематических исследований позволили получить подробное представление о клинических проявлениях травмы подвешивания. Например, в 2011 году был описан примечательный случай, когда альпинист был обнаружен без сознания в своей страховочной

обвязке после нескольких часов в подвешенном состоянии. Результаты вскрытия показали, что смерть наступила в результате механической асфиксии, вызванной неподвижностью и венозным застоем [10]. В другой серии инцидентов сообщалось об альпинистах, которые встретили «смерть при спасении» вскоре после того, как их спасли, что свидетельствует об отсроченных последствиях травмы подвешивания [12].

В дополнение к венозному застою и нарушению кровообращения с травмой подвешивания часто связан рабдомиолиз — разрушение мышечной ткани вследствие неподвижности. Это состояние приводит к выбросу миоглобина в кровоток, что может привести к острой почечной недостаточности и усложнить лечение [2, 13]. Повышенный уровень калия (гиперкалиемия), вызванный рабдомиолизом, также может привести к фатальным нарушениям сердечного ритма [13].

Ведение и лечение

На протяжении десятилетий в стандартном протоколе лечения травм, вызванных подвешиванием, особое внимание уделялось поддержанию пострадавшего в вертикальном положении после спасения, исходя из убеждения, что в положении лежа он может вызвать внезапный возврат скопившейся крови к сердцу, что приведет к перегрузке сердца и смерти после спасения [5, 9]. Протокол был разработан в 1970-х годах и основан на наблюдательных исследованиях и мнениях экспертов именно из немедицинских областей [2, 3, 9].

Исследование, проведенное Pasquier et al. (2010), продемонстрировало превосходство инфузационной терапии и восстановления проходимости дыхательных путей (в соответствии с рекомендациями «Современных методов реанимации») над другими вмешательствами при спасении пострадавших. Однако нет научных доказательств, подтверждающих утверждение о том, что горизонтальное положение пациента во время оказания помощи увеличивает риск смерти [14].

Также были обновлены рекомендации Международной комиссии по неотложной медицинской помощи в горах (ICAR MedCom). В последней версии одна из ключевых рекомендаций заключается в том, чтобы как можно скорее уложить пострадавших горизонтально. Это помогает восстановить сердечный выброс и предотвращает последствия венозного застоя. Кроме того, первоочередной задачей является проведение реанимационных мероприятий при первых признаках остановки сердца, включая лечение гиперкалиемии и возможного рабдомиолиза [15].

Профилактика и разработка ремней безопасности

Важным компонентом профилактики травмы подвешивания является использование соответствующих страховочных систем с несколькими точками крепления и регулируемыми лямками, а также таких приспособлений, как петли для ног. Такое оборудование обеспечивает большую мобильность и снижает риск венозного застоя.

Не менее важным является надлежащий инструктаж как пользователей систем безопасности, так и спасательных команд. Пользователи должны быть осведомлены о ранних симптомах травмы подвешивания (приливы жара, потливость и головокружение) и помнить о необходимости двигать ногами во время подвешивания [3, 1].

Спасательные команды должны быть обучены быстрому перемещению пострадавшего и минимизации продолжительности неподвижности [1, 5].

Новые тенденции и направления дальнейших исследований

Понимание травмы подвешивания в наши дни значительно продвинулось. Однако лечение и профилактика постоянно вызывают вопросы. Одной из ключевых областей обсуждения является вопрос о том, существуют ли конкретные переменные, такие как длительность подвешенного состояния, тип страховочной системы или уже имевшиеся патологии и состояния, которые увеличивают риск тяжелых исходов, включая смерть при спасении [1, 9, 16].

Перспективная область исследований сосредоточена на роли синдрома реперфузии или восстановленного кровотока, также известного как смерть при спасении. Опасность синдрома заключается в развитии острой сердечной недостаточности после возвращения депонированной дезоксигенированной крови к сердцу [8, 17, 18]. В то время как более ранние исследования предполагали, что смерть при спасении может наступить в результате слишком быстрого перевода пострадавшего в горизонтальное положение, новые данные свидетельствуют о том, что это явление, скорее всего, связано с гиперкалиемией и ацидозом, которые могут возникать в результате высвобождения продуктов распада мышц (рабдомиолиза) [2, 13, 19]. Необходимы дальнейшие исследования этих механизмов, включая изучение физиологии человека во время подвешивания, для дальнейшего совершенствования протоколов спасения. Сосредоточение внимания на ключевых механизмах, таких как роль воспалительных цитокинов и окислительного стресса в реперфузионных повреждениях или влияние длительного подвешивания на электролитный дисбаланс и распад мышечной ткани, помогло бы определить перспективные направления будущих исследований для оптимизации методов спасения и улучшения исходов лечения пациентов.

Как уже упоминалось, текущие исследования, включая рандомизированные контролируемые, продемонстрировали убедительные доказательства того, что быстрого восстановления притока крови к мозгу и сердцу можно безопасно достичь, уложив пострадавшего на пол, что опровергает прежние опасения по поводу быстрого реперфузионного повреждения [16]. Однако трудности с проведением долгосрочных исследований на людях

Литература / References

- Lee C, Porter KM. Suspension trauma. *Emerg Med J*. 2007;24(4):237–8.
<https://doi.org/10.1136/emi.2007.046391>
- Pasquier M, Yersin B, Vallotton L, Carron P. Clinical update: suspension trauma. *Wilderness Environ Med*. 2011; 22:167–71.
<https://doi.org/10.1016/j.wem.2010.12.006>
- Kolb JJ, Smith EL. Redefining the Diagnosis and Treatment of Suspension Trauma. *J Emerg Med Serv*. 2015;40(6):48–51. PMID: 26263737
- Weber SA, McGahan MM, Kaufmann C, Biswas S. Suspension Trauma: A Clinical Review. *Cureus*. 2020;12(6):
<https://doi.org/10.7759/cureus.8514>
- Thomassen O, Skiaa SC, Brattebo G, Heltne JK, Dahlberg T, Sunde GA. Does the Horizontal Position Increase Risk of Rescue Death Following Suspension Trauma? *Emerg Med J*. 2009;26(12):896–8.
<https://doi.org/10.1136/emi.2008.064931>
- Seddon P. Harness suspension: review and evaluation of existing information. *Health and Safety Executive Research Report 451. London: UK Health and Safety Executive*; [Feb;2020].
- Chmieliauskas S, Mundinas E, Fomin D, et al. Sudden deaths from positional asphyxia: a case report. *Medicine (Baltimore)* 2018;97:0.
<https://doi.org/10.1097/md.00000000000011041>
- Petrone P, Espinoza-Villalobos S, Baltazar GA, Søreide K, Stright A, Brathwaite CEM, Joseph DK. Fatal and non-fatal injuries due to suspension trauma syndrome: A systematic review of definition, pathophysiology, and management controversies. *World J Emerg Med*. 2021;12(4):253–60.
<https://doi.org/10.5847/wjem.j1920-8642.2021.04.001>
- Rauch S, Schenk K, Strapazzon G, et al. Suspension syndrome: a potentially fatal vagally mediated circulatory collapse—an experimental randomized crossover trial. *Eur J Appl Physiol*. 2019;119:135–65.
<https://doi.org/10.1007/s00421-019-04126-5>

из-за этических соображений ограничивают объем доступных данных по тяжелым долгосрочным случаям.

Наконец, совершенствуются стратегии профилактики, которые включают в себя усовершенствованные конструкции страховочных систем, позволяющие подвешенным людям принимать полугоризонтальное положение или активизировать мышцы ног для предотвращения застоя венозной крови. Исследования в области эргономичного дизайна страховочных систем продолжаются, и усилия направлены на повышение комфорта, снижение давления на бедренные вены и ускорение самостоятельного или внешнего спасения. Эти достижения, вероятно, сократят количество смертельных случаев и тяжелых случаев травм при подвешивании в будущем [1, 19].

ВЫВОДЫ

Травма подвешивания, когда-то малопонятное состояние, теперь признана сложным медицинским явлением, требующим быстрого и осознанного вмешательства для предотвращения смертельных исходов. С годами продвинулось наше понимание патофизиологических процессов, связанных с венозным застоем, гипоперфузией головного мозга и рефлексом Бецольда — Яриша. Современная конструкция страховочных систем, усовершенствованные методы спасения и обновленные медицинские протоколы значительно снизили риск смерти, связанный с травмой подвешивания, хотя для оптимизации стратегий лечения и профилактики требуются дальнейшие исследования.

В то время как ранние методы были направлены на поддержание пострадавшего в вертикальном положении после спасения, современные рекомендации настаивают на немедленном горизонтальном положении и последующем лечении таких состояний, как гиперкалиемия и рабдомиолиз. По мере продолжения исследований и совершенствования страховочных систем риски, связанные с травмой подвешивания, вероятно, уменьшатся, но осведомленность и готовность по-прежнему имеют решающее значение для минимизации опасностей, с которыми сталкиваются работники или просто любители активного отдыха, использующие страховочные системы строп и ремней.

Для улучшения стиля рукописи на английском языке были использованы инструменты искусственного интеллекта.

10. Chandler J. Updated: San Juan Capistrano hiker was bright, adventurous. San Juan Capistrano Patch. Retrieved March 29, 2015.
11. Roegla M, Brunner M, Michalek A, et al. Cardiorespiratory response to free suspension simulating the situation between fall and rescue in a rock-climbing accident. *Wilderness Environ Med*. 1996;2:109–14.
[https://doi.org/10.1580/1080-6032\(1996\)007\[0109:crtfss\]2.3.co;2](https://doi.org/10.1580/1080-6032(1996)007[0109:crtfss]2.3.co;2)
12. Mortimer RB. Risks and Management of Prolonged Suspension in an Alpine Harness. *Wilderness Environ Med*. 2011;22(1):77–86.
<https://doi.org/10.1016/j.wem.2010.10.008>
13. Pasquier M, Yersin B, Vallotton L, Carron PN. Clinical update: suspension trauma. *Wilderness Environ Med*. 2011;22(2):167–71.
<https://doi.org/10.1016/j.wem.2010.12.006>
14. Rauch S, Lechner R, Strapazzon G, Mortimer RB, Ellerton J, Skaia SC, et al. Suspension syndrome: a scoping review and recommendations from the International Commission for Mountain Emergency Medicine (ICAR MEDCOM). *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2023 Dec 9;31(1):95.
<https://doi.org/10.1186/s13049-023-01164-z>
15. Adisesh A, Lee C, Porter K. Harness Suspension and First Aid Management: Development of an Evidence-Based Guideline. *Emerg Med J*. 2011;28(4):265–8.
<https://doi.org/10.1136/emy.2010.097246>
16. Cooke MW, Fisher JD, Brown SN. 222: Is There Enough Evidence to Support the Reversal of Standard Trauma Care for Patients Who Have Been Suspended? *Ann. Emerg. Med.* 2008;51(4):538.
<https://doi.org/10.1016/j.annemermed.2008.01.192>
17. Patscheider H. Pathologico-anatomical examination results in the case of death caused by hanging on the rope. Innsbruck, Austria: Papers of the Second International Conference of Mountain Rescue Doctors, 1972.
18. Reinertson R. Suspension Trauma and Rhabdomyolysis. *Wilderness Environ Med*. 2011;22(3):286–7.
<https://doi.org/10.1016/j.wem.2011.05.005>
19. Weems B, Bishop P. Will Your Safety Harness Kill You? *Occup Health Saf*. 2003;72:86–8, 90.
<https://doi.org/10.1007/s00421-019-04126-5>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Катажина Камлет — разработка концепции и дизайна исследования, общее руководство; Анна Лис — поиск данных литературы, обобщение данных; Войцех Казьмiersкий — сбор информации, написание текста рукописи; Матеуш Земек — сбор информации, оформление списка литературы; Александра Мацейчик — сбор информации, редактирование рукописи; Катажина Крупа — редактирование и утверждение окончательного варианта рукописи; Анна Казьмirsкая — сбор и обобщение информации; Анна Зиобро — сбор информации, анализ и интерпретация данных; Кинга Коцур — сбор информации, редактирование рукописи. Все авторы ознакомились с окончательного варианта рукописи для публикации и утвердили ее.

ОБ АВТОРАХ

Катаржина Камлет

camkasia@interia.pl

<https://orcid.org/0009-0000-2897-9394>

Александра Мацейчик

aleksandramaciejczyk99@gmail.com

<https://orcid.org/0009-0008-5709-0269>

Катаржина Крупа

katarzyna.m.krupa@gmail.com

<https://orcid.org/0009-0006-3120-8631>

Войцех Казьмiersкий

wkazmierski97@gmail.com

<https://orcid.org/0009-0001-8699-2914>

Кинга Коцур

kingakocur98@wp.pl

<https://orcid.org/0009-0003-7646-7184>

Анна Зиобро

aannaziobro@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-7031-6006>

Матеуш Земек

mateusz.ziomek98@gmail.com

<https://orcid.org/0009-0009-2082-1459>

Анна Казьмirsкая

ania.kazmierska43@gmail.com

<https://orcid.org/0009-0005-2625-6260>

Анна Лис

lis.anna9898@gmail.com

<https://orcid.org/0009-0003-2577-5945>

<https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-87-97>

ИММУНОТЕРАПИЯ РАКА ЛЕГКОГО: STATUS QUO, ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Ю.В. Озерская^{1✉}, Г.М. Юсубалиева^{2,3}, О.А. Жукова¹, К.А. Зыков¹, В.П. Баклаушев^{1,2,3,4}

¹ Научно-исследовательский институт пульмонологии Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² Федеральный центр мозга и нейротехнологий Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

³ Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

⁴ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

Введение. Рак легкого является основной причиной онкологической смертности и у мужчин, и у женщин. Ввиду высокой распространенности и значительной частоты рецидивов после стандартной терапии поиск новых методов лечения рака легкого является актуальной задачей. Одним из обнадеживающих направлений стала иммунотерапия, целью которой является активация цитотоксического иммунитета против опухолевых клеток.

Цель. Оценка клинической эффективности и перспектив безопасного использования иммунотерапии при злокачественных новообразованиях плевральной полости.

Обсуждение. Внедрение иммунотерапевтических подходов, включающих адоптивную клеточную терапию опухоль-инфилтрирующими лимфоцитами (TIL) или CAR-T-клетками, разработку онкокакцин, онколитических вирусов, в комбинации с химиотерапией и блокированием иммунных контрольных точек (ИКТ) показало положительные результаты на стадии доклинических исследований и находится на разных этапах клинических испытаний безопасности и эффективности.

Выводы. Иммунотерапия рака легкого является перспективным направлением адьювантной терапии. Клиническая трансляция иммунотерапевтических подходов нуждается в повышении их эффективности и минимизации побочных эффектов путем комбинации различных методов терапии, совершенствования биоинженерных и клеточных препаратов, а также снижения стоимости лечения.

Ключевые слова: рак легкого; адоптивная иммунотерапия; химерный антигенный рецептор антигена Т-клеток; опухоль-инфилтрирующие лимфоциты; ингибиторы иммунных контрольных точек; онколитические вирусы

Для цитирования: Озерская Ю.В., Юсубалиева Г.М., Жукова О.А., Зыков К.А., Баклаушев В.П. Иммунотерапия рака легкого: status quo, проблемы и перспективы. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2024;26(4):87–97. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-87-97>

Финансирование: работа была выполнена при финансовой поддержке Федерального медико-биологического агентства (НИР «Легкое-на-чипе», НИР «TILs-glioblastoma»). Часть работы, касающаяся экспериментальных исследований комбинированной иммунотерапии, выполнена при поддержке РНФ (проект № 21-74-20110).

Потенциальный конфликт интересов: Баклаушев В.П. является членом редакционного совета журнала «Медицина экстремальных ситуаций». Остальные авторы декларируют отсутствие потенциального конфликта интересов.

✉ Озерская Юлия Вячеславовна 759317593@mail.ru

Статья поступила: 28.09.2024 **После доработки:** 15.11.2024 **Принята к публикации:** 18.11.2024

LUNG CANCER IMMUNOTHERAPY: STATUS QUO, PROBLEMS, AND PROSPECTS

Iuliia V. Ozerskaya^{1✉}, Gaukhar M. Yusubalieva^{2,3}, Oksana A. Zhukova¹, Kirill A. Zykov¹, Vladimir P. Baklaushev^{1,2,3,4}

¹ Federal Pulmonology Research Institute, Moscow, Russia

² Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies, Moscow, Russia

³ Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Types of Medical Care and Medical Technologies, Moscow, Russia

⁴ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Introduction. Lung cancer is the leading cause of cancer mortality in men and women. Due to its high prevalence and significant recurrence rate after standard therapy, the search for new methods of lung cancer treating is an urgent task. A promising treatment strategy is immunotherapy that elicit immune response against tumor cells.

Objective. Evaluation of the clinical efficacy and prospects for the safe use of immunotherapy in malignant neoplasms of the pleural cavity.

Discussion. The introduction of immunotherapeutic approaches, including adoptive cell therapy with tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) or CAR-T cells, the development of neoantigen vaccines, oncolytic viruses, in combination with chemotherapy and blockade of immune checkpoints (ICP) have shown optimistic results in preclinical studies and are currently at different stages of clinical trials for safety and efficacy.

Conclusions. Immunotherapy of lung cancer is a promising area of adjuvant therapy. For clinical introduction, immunotherapeutic approaches should be further investigated to increase their effectiveness and minimizing side effects by combining different therapies, improving bioengineered and cellular drugs, and reducing the cost of treatment.

Keywords: lung cancer; adoptive immunotherapy; chimeric T-cell antigen receptor; tumor-infiltrating lymphocytes; immune checkpoint inhibitors; oncolytic viruses

For citation: Ozerskaya I.V., Yusubalieva G.M., Zhukova O.A., Zykov K.A., Baklaushev V.P. Lung cancer immunotherapy: Status quo, problems, and prospects. *Extreme Medicine*. 2024;26(4):87–97. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-87-97>

Funding: the work was funded by FMBA of Russia (research projects “Lung-on-a-chip” and “TILs-glioblastoma”). Part of work was supported by Russian Science Foundation (project No. 21-74-20110).

Potential conflict of interest: Vladimir P. Baklaushev is a member Editorial Council of the journal “Extreme Medicine”. The other authors declare no potential conflict of interest.

✉ Iuliia V. Ozerskaya 759317593@mail.ru

Received: 28 Sep. 2024 **Revised:** 15 Nov. 2024 **Accepted:** 18 Nov. 2024

© Ю.В. Озерская, Г.М. Юсубалиева, О.А. Жукова, К.А. Зыков, В.П. Баклаушев, 2024

ВВЕДЕНИЕ

Рак легкого остается ведущей причиной смертности от онкологических заболеваний во всем мире (18,4% от общей онкологической смертности), вызывая значительные социально-экономические потери. По оценкам GLOBOCAN и Международного агентства по изучению рака (от 2018 года), было зарегистрировано 2,09 миллиона новых случаев и 1,76 миллиона смертей от рака легкого, что превышало показатели от 2012 г. [1]. Ввиду длительного бессимптомного течения и неспецифичных начальных симптомов, наряду с недостаточно развитой стратегией активного онкологического скрининга, почти половине пациентов диагностируют данную нозологию на метастатической стадии заболевания, когда радикальное хирургическое лечение уже практически невозможно [2]. По данным C.R. Kelsey, L.B. Marks et al., у трети пациентов, у которых заболевание диагностировано и пролечено на ранних стадиях, развивается рецидив и резистентность к химиотерапии [3]. В связи с этим поиск новых методов терапевтического воздействия при раке легкого по-прежнему является актуальной клинической задачей.

Иммунотерапия в целом представляет широкое научное направление лечения онкопатологии, в основе которого лежит активация противоопухолевого иммунитета путем применения антител, цитокинов, иммунных клеток, химерных Т-клеточных рецепторов, ингибиторов контрольных точек иммунитета и пр. Иммунотерапия показала свою эффективность и безопасность в лечении онкогематологических заболеваний и меланомы [4, 5]. В отношении других солидных опухолей клинические исследования продемонстрировали неоднозначные результаты, однако перспективность данного подхода не вызывает сомнений [6].

Целью иммунотерапии рака легкого является усиление направленной цитотоксичности иммунных клеток преимущественно за счет специфического связывания с опухоль-ассоциированными антигенами [7]. Достижение этой цели существенно затруднено из-за способности опухолевых клеток избегать воздействия иммунной системы путем секреции иммуносупрессивных цитокинов, потери экспрессии антигенов основного комплекса гистосовместимости и экспрессии молекул, ингибирующих активацию Т-клеток (гликопротеин цитотоксических Т-лимфоцитов 4 — CTLA-4, белок запрограммированной гибели клеток 1-PD-1, лиганд запрограммированной смерти 1-PD-L1) [8]. Вследствие иммуносупрессивного опухолевого микроокружения были малоэффективны ранние попытки иммунотерапии немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) [9], однако развитие молекулярной биологии и иммуногенетики в последние десять лет способствовало разработке новых подходов к преодолению иммуносупрессии и увеличению направленности противоопухолевого ответа, что оживило интерес к данной теме. На сегодняшний день, по данным ClinicalTrials.gov, по иммунотерапии рака легкого проводится более 920 исследований, и эта цифра неуклонно растет. Виды иммунотерапевтического лечения весьма разнообразны и включают: противоопухолевые вакцины на основе сенсибилизованных дендритных клеток и опухолевыхneoантител, онкотерапию вирусную, терапию ингибиторами иммунных контрольных точек (ИКТ), терапию опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами, CAR-T, CAR-NK-терапию и др. [10].

Цель работы: оценка клинической эффективности и перспектив безопасного использования иммунотерапии при злокачественных новообразованиях плевральной полости.

ОБСУЖДЕНИЕ

Терапия опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами (TIL) при раке легкого

Терапия, использующая опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL, от англ. Tumor Infiltrating Lymphocytes), представляет собой разновидность адоптивной клеточной терапии, которая включает в себя извлечение TIL из опухолевой стромы, их последующее размножение и активацию вне организма (*ex vivo*) и реинфузию обратно в организм пациента [11]. TIL, выделенные из опухолевого микроокружения, могут быть нацелены против различных опухоль-специфичных neoантител, что делает их более эффективными в отношении гетерогенных клеток рака легкого. Благодаря стимуляции опухолевыми антигенами *in vivo* TIL обладают значительным количеством эфекторных Т-клеток памяти, экспрессирующих на своей поверхности рецепторы к хемокинам (CCR5 и CXCR3), что способствует более эффективной и направленной доставке к опухолевому очагу [12]. Вследствие негативного отбора Т-клеточного рецептора на ранних стадиях развития иммунитета и использования аутологичных клеток пациентов без генных модификаций терапия TIL обладает низкой токсичностью [13].

Иммунное микроокружение при раке легкого является сложным и включает в себя: Т-лимфоциты, В-лимфоциты, естественные киллеры, макрофаги, дендритные клетки и др. Тип, плотность и расположение иммунных клеток в микроокружении опухоли играют ключевую роль в процессах канцерогенеза, прогрессирования рака и эффективности лечения [14]. Исследование иммунного микроокружения при НМРЛ выявило, что отдаленные результаты лечения, такие как общая выживаемость, зависят не от количества, а от природы инфильтрирующих лимфоцитов. Так, обилие CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих цитолитические ферменты, CD4⁺ Т-клеток, лишенных экспрессии ингибирующих рецепторов, и повышенный уровень опухоль инфильтрирующих В-клеток связаны с лучшим прогнозом для жизни [15]. Опухолевые В-клетки секретируют опухолеспецифические антитела, стимулирующие реакции Т-клеток и поддерживающие структуру и функцию третичных лимфоидных структур. Однако В-клетки, обладающие разнообразными эффектами, могут стать иммуносупрессорами, вырабатывая IL-10 и способствуя росту опухоли. Новые стратегии иммунотерапии должны одновременно активировать противоопухолевые В-клетки и подавлять Breg-фенотипы [16]. TIL также могут являться прогностическими биомаркерами ответа на терапию ингибиторами ИКТ. Была обнаружена связь между соотношением CD8⁺/CD4⁺ в опухолевой ткани и ответом на лечение ингибиторами ИКТ у пациентов с НМРЛ, что может быть использовано в прогностических целях [17].

В настоящий момент проводится несколько клинических исследований по оценке безопасности и эффективности введения как неизмененных, так и генно-инженерных TIL пациентам с прогрессирующими НМРЛ (табл. 1). Эффективность адоптивной клеточной терапии дополнительно повышается за счет

использования немиелоаблативной лимфодеплазии (Циклофосфамид + Флударабин) перед инфузией TIL, последующим введением интерлейкина-2, а также за счет комбинации с терапией ингибиторами ИКТ. В одном из завершенных клинических исследований I фазы (NCT03215810) была доказана безопасность и эффективность терапии аутологичными TIL у 20 пациентов с прогрессирующими НМРЛ после неэффективной монотерапии ниволумабом с общей частотой ответа 70% [18]. Результаты остальных исследований еще предстоит проанализировать (табл. 1).

Стоит отметить, что терапия опухоль-инфилтрирующими лимфоцитами имеет ограничения, связанные со сложностью и высокой себестоимостью получения достаточного для терапии количества TIL из опухолевой ткани. При этом терапию TIL в настоящее время следует рассматривать только как адьювантную терапию: после проведения операции по удалению опухоли, для борьбы с отдаленными метастазами. Упрощение и снижение себестоимости технологии производства TIL поэтому имеет крайне важное значение для широкого клинического внедрения.

В целом можно констатировать, что, несмотря на накопленный пул данных о потенциальной эффективности TIL-терапии при НМРЛ, для широкого внедрения этой технологии необходимы как преодоление технологических проблем по стандартизации, упрощению и удешевлению технологии производства TIL, так и дальнейшие клинические испытания TIL в различных комбинациях

и на различных стадиях рака легкого, которые, возможно, позволят уточнить показания для иммунотерапии и выделить группы пациентов, для которых определенная иммунотерапия будет наиболее эффективна.

CAR-T-клеточная терапия рака легкого

CAR-T-клетки (CAR — химерный рецептор антигена Т-клеток) — это Т-клетки пациента, которые благодаря генетически модифицированным химерным антигенным рецепторам обладают способностью распознавать антигены на опухолевых клетках и запускать сигнальный каскад активации эффекторных функций Т-клеток. CAR-T-клетки, разделенные на пять поколений согласно внутриклеточным сигнальным структурным доменам, имеют внеклеточный домен для антигенов, трансмембранный домен и внутриклеточный домен для передачи сигнала внутрь клетки [19]. Одним из преимуществ CAR-T-терапии является ее специфичность, независимость от экспрессии белков главного комплекса гистосовместимости (MHC), которая часто подавлена в опухолевых клетках, а также способность обеспечивать стабильный и длительный противоопухолевый ответ за счет продолжжающейся пролиферации введенных клеток в организме пациента [20].

Применение CAR-T-клеточной терапии при онкогематологических заболеваниях продемонстрировало впечатляющие результаты, приведя к одобрению Food and Drug Administration данного метода лечения [21]. В настоящее

Таблица 1. Клинические исследования применения адоптивной клеточной терапии аутологичными опухоль-инфилтрирующими лимфоцитами при нелокализованном раке легкого

№	Диагноз	Лечение	Фаза	n	Результат	Побочные эффекты	Clinical trial идентификатор
1	НМРЛ	TIL (LN-145) + ИЛ2 + немиелоаблативная лимфодеплазия (Циклофосфамид + Флударабин) + Ниволумаб	I	20	70% — общая частота ответа; 10% — полный ответ; 60% — частичный ответ	Связаны с лимфодеплазией и с введением интерлейкина-2	NCT03215810
2	НМРЛ; метастатическая меланома; плоскоклеточный рак головы и шеи	TIL (LN-145) + ИЛ2 + немиелоаблативная лимфодеплазия (Циклофосфамид + Флударабин) + Пембролизумаб/Ипилимумаб/Ниволумаб	II	178	Исследование продолжается	Нет данных	NCT03645928
3	НМРЛ	TIL (LN-145) + ИЛ2 + немиелоаблативная лимфодеплазия (Циклофосфамид + Флударабин)	II	95	Исследование продолжается	Нет данных	NCT04614103
4	НМРЛ III и IV стадий; метастатическая меланома	Генетически модифицированные TIL (IOV-4001) + ИЛ2 + немиелоаблативная лимфодеплазия (Циклофосфамид + Флударабин)	I/II	Набор	Исследование продолжается	Нет данных	NCT05361174
5	НМРЛ; рак шейки матки; меланома	TIL (LM103) + ИЛ2 + немиелоаблативная лимфодеплазия (Циклофосфамид + Флударабин)	I	15	Исследование продолжается	Нет данных	NCT05366478
6	НМРЛ	L-TIL (Liquid Tumor Infiltrating Lymphocytes) + Тислелизумаб + Доцетаксел	II	33	Исследование продолжается	Нет данных	NCT05878028
7	НМРЛ; меланома; колоректальный рак	Эпигенетически препрограммированные TIL (LYL845)	I	108	Исследование продолжается	Нет данных	NCT05573035
8	НМРЛ; колоректальный рак; меланома и др.	TIL + ИЛ2 + немиелоаблативная лимфодеплазия (Циклофосфамид + Флударабин)	I	18	Исследование продолжается	Нет данных	NCT05902520
9	НМРЛ	TIL + ИЛ2 + немиелоаблативная лимфодеплазия (Циклофосфамид + Флударабин) + Алдеслэйкин	II	85	Исследование продолжается	Нет данных	NCT02133196
10	НМРЛ; рак молочной железы; колоректальный рак; меланома	TIL (TBio-4101) + ИЛ2 + немиелоаблативная лимфодеплазия (Циклофосфамид + Флударабин) + Пембролизумаб	I	60	Исследование продолжается	Нет данных	NCT05576077

Таблица подготовлена авторами по данным ClinicalTrials.gov

время исследователи активно работают над расширением показаний к применению CAR-T-клеточной терапии для борьбы с солидными новообразованиями.

По результатам метаанализа, включившего 22 исследования с участием 262 пациентов, было показано, что общая частота ответа на терапию CAR-T-клетками при различных солидных опухолях составила 9%. Более того, различные стратегии (лимфодеплекция перед инфузией Т-клеток, метод трансфекции, персистенция CAR-T-клеток, общая доза клеток и введение ИЛ-2) существенно не влияли на эффективность лечения [22]. Скромные результаты CAR-T-терапии в отношении солидных опухолей часто связаны с недостатком опухолеспецифических антигенов, низким уровнем инфильтрации CAR-T-клеток в опухолевую ткань, выраженным иммуносупрессивным микроокружением опухоли [23]. Кроме того, данный метод иммунотерапии приводит к серьезным побочным эффектам, включая цитокиновый шторм и нейротоксичность [24]. Чтобы решить проблему низкого рекрутования Т-клеток в очаг опухоли, пытаются вводить CAR-T-клетки внутрь опухоли, что показало обнадеживающие результаты в экспериментальной модели на мышах [25]. Также применяются методы молекулярных модификаций в Т-клетках для повышения целевой доставки [26]. Для преодоления иммуносупрессивного микроокружения исследователи пытаются сочетать терапию CAR-T-клетками с терапией ингибиторами ИКТ [27]. Токсичность и оптимальная терапевтическая дозировка остаются открытой темой для дальнейшего изучения.

Первым шагом в успешной адоптивной Т-клеточной терапии является выбор оптимального опухоль-ассоциированного антигена (ТАА) для CAR-T-клеток. Большинство из используемых антигенов при CAR-T-терапии рака легкого (EGFR, MSLN, MUC1, PSCA, CEA, D-L1, CD80/CD86, ROR1 и HER2) также экспрессируется в нормальных тканях человека, что может привести к нецелевому токсическому воздействию [28]. Недавно была найдена новая мишень при раке легкого в виде LunX (легочно-специфический белок X) — антигена, относящегося к семейству белков-клонов неба, легких и эпителия носа [29]. В отличие от других антигенов, LunX часто высоко экспрессируется в клетках НМРЛ, но не экспрессируется в нормальных тканях легких [30]. Доклинические исследования по оценке эффективности LunX-CAR-T-терапии на модели ксеногrafta рака легкого показали многообещающие результаты. Экспериментально было доказано, что LunX-CAR-T-клетки ингибируют рост LunX-положительных опухолевых клеток и продлевают выживаемость мышей [31]. Параллельно разрабатываются CAR-T-клетки, нацеленные на с-Met-трансмембранный рецептор с тирозин-киназной активностью, экспрессируемый, главным образом, в эпителиальных клетках [32]. Предварительные исследования показали, что с-Met- направленные CAR-T-клетки демонстрируют выраженную противоопухолевую активность как *in vitro*, так и *in vivo* в отношении НМРЛ, открывая новые перспективы для лечения [33].

В настоящее время активно проводятся клинические исследования I и II фазы исследований CAR-T-терапии НМРЛ, нацеленные на различные мишени (эпидермальный фактор роста, мезотелин, PD-L1, муктин-1) в сочетании с иммунотерапией или без, с различной эффективностью и токсичностью [34–36]. В частности, ответ на терапию EGFR-CAR-T-клетками при EGFR + НМРЛ был отмечен у двух пациентов из 11 (18%) [34]. В другом исследовании I фазы клинических испытаний с внутриплевральным

введением мезотелин-таргетных CAR-T в сочетании с терапией пембролизумабом при раке легкого и мезотелиоме плевры хороший ответ наблюдали только у двух пациентов из 27 (7%) [35]. Терапия MUC1-CAR-T-клетками 20 пациентов с НМРЛ привела только к стабилизации заболевания без видимых признаков улучшения у 11 пациентов, в то время как у остальных отмечалось прогрессирование заболевания [36]. Ряд исследований были остановлены из-за высокой токсичности CAR-T-клеточных препаратов.

Резюмируя данный раздел, следует отметить, что, несмотря на интенсивные исследования, иммунотерапия CAR-T-клетками пока не показала сколь-либо значимого клинического эффекта в борьбе с раком легкого и при этом в нынешнем виде отягощена довольно высокой токсичностью. В целом исследования CAR-T-клеточной терапии солидных опухолей вообще и рака легкого в частности находятся на начальной стадии, и предстоит большая работа по оценке перспектив его клинического применения.

Ингибиторы иммунных контрольных точек при раке легкого

Иммунотерапия с использованием ингибиторов контрольных точек иммунной системы является одним из наиболее значимых прорывов в лечении онкологических заболеваний, поскольку в ряде многоцентровых исследований было доказано, что она заметно повышает медиану выживаемости при многих злокачественных новообразованиях, включая рак легкого. Эта технология связана с ингибированием иммуносупрессивных белков CTLA-4 и PD-1/PD-L1, что, в свою очередь, активирует клеточный противоопухолевый иммунитет [37]. Взаимодействие PD-1, находящегося на поверхности тимоцитов и других элементов иммунной системы, с его лигандом PD-L1 на опухолевых клетках подавляет активность Т-клеток, снижая их способность к распознаванию и уничтожению опухоли. Рак легкого часто использует такой механизм для избегания иммунного ответа. CTLA-4 — другой ингибирующий рецептор на Т-клетках, блокада которого способствует увеличению числа активированных Т-клеток и Т-клеток памяти, усиливая атаку иммунной системы на опухоль [38]. В настоящее время как потенциальные мишени для иммунотерапии рака оцениваются следующие иммунные контрольные молекулы: молекула 3, содержащая Т-клеточный иммуноглобулин и муциновый домен (TIM-3), трансмембранный гликопротеин I типа (B7-H3), иммуноглобулин, подавляющий активацию Т-клеток в V-домене (VISTA), ген активации лимфоцитов-3 (LAG-3), Т-клеточный иммуноглобулин и домен ITIM (TIGIT) [39].

На данный момент успешно выполнено свыше 300 клинических испытаний (КИ), направленных на изучение эффективности использования ИКТ в терапии рака легкого. Исходя из результатов этих исследований, для лечения НМРЛ European Medicines Agency и Food and Drug Administration одобрили 1 препарат ингибитора CTLA-4 (ипилимумаб), 5 препаратов ингибиторов PD-1 (ниволумаб, пембролизумаб, цемиплимаб, синтилимаб, камрелизумаб) и 2 ингибитора PD-L1 (дурвалумаб, атезолизумаб). Часть препаратов находится на разных стадиях одобрения, и в ближайшем будущем, по всей вероятности, в каждой из групп ингибиторов ИКТ будет множество лекарственных опций [40].

Рандомизированные клинические исследования показали, что у пациентов с PD-L1-положительными опухолями с экспрессией не менее 50% однокомпонентная иммунотерапия ингибиторами ИКТ превосходит адьювантную химиотерапию как по токсичности, так и по общей выживаемости [41, 42]. Исследование KEYNOTE-024 (III фаза, 305 пациентов) выявило, что пембролизумаб как терапия первой линии у пациентов с метастатическим НМРЛ с экспрессией PD-L1 > 50% существенно улучшал показатели общей выживаемости при более низком уровне побочных эффектов по сравнению с платиносодержащей химиотерапией [43]. Кроме того, исследования KEYNOTE 042 (1274 пациентов, III фаза) [44] и IMpower110 (III фаза, 572 пациента с метастатическим НМРЛ, которые ранее не получали химиотерапию и у которых экспрессия PD-L1 была не ниже ≥1%) подтвердили, что терапия ИКТ обеспечивает значительное улучшение выживаемости у пациентов с различной степенью экспрессии PD-L1, однако особенно выраженный эффект отмечен у лиц с более высокой экспрессией [45]. Это свидетельствует о целесообразности выбора иммунотерапии в качестве первичного метода лечения у пациентов с местнораспространенным нерезектабельным или метастатическим НМРЛ с экспрессией PD-L1 более 1%.

В контексте разработки передовых методов лечения легочного рака особое внимание уделяется исследованию потенциала сочетания иммунотерапии и химиотерапии. По результатам 5-летнего клинического исследования KEYNOTE-189 III фазы (NCT02578680) у 616 рандомизированных пациентов с нелеченым метастатическим НМРЛ без изменений EGFR/ALK на комбинированной иммунотерапии и химиотерапии ($n = 410$, пембролизумаб плюс пеметрексед-платина) 5-летняя общая выживаемость составила 19,4%, в то время как только при монохимиотерапии ($n = 206$, плацебо плюс пеметрексед-платина) 5-летняя общая выживаемость составила 11,3%. Среди 57 пациентов, завершивших 35 циклов приема пембролизумаба, частота объективного ответа составила 86,0% [46].

Метаанализ, включавший 66 исследований, показал, что неoadьювантная иммунотерапия при резектабельном немелкоклеточном раке легкого безопасна и эффективна. По сравнению с лечением только препаратами химиотерапии химиоиммунотерапия в большей степени улучшала показатели терапевтического ответа и выживаемости [47]. Эти данные продолжают подтверждать, что сочетание терапии ингибиторами ИКТ с химиотерапией улучшает выживаемость пациентов с НМРЛ независимо от экспрессии PD-L1. Крупное исследование III фазы CheckMate 9LA продемонстрировало положительные результаты в отношении общей выживаемости с применением ниволумаба плюс ипилимумаба по сравнению с химиотерапией у пациентов с НМРЛ независимо от экспрессии PD-L1, что побудило к применению подхода двойной иммунотерапии без химиотерапии [48]. То, как иммунотерапия может быть объединена с другими терапевтическими средствами для достижения наилучшего эффекта и уменьшения побочных эффектов, заслуживает дальнейшего изучения.

Наиболее распространенными побочными эффектами терапии ингибиторами ИКТ, связанными с иммунитетом, являются кожные и эндокринные нарушения: сыпь, зуд и дисфункция щитовидной железы [49]. Появляется все больше литературных данных о сердечно-сосудистой токсичности, в частности миокардите, что требует более

комплексной оценки исходных показателей сердечно-сосудистой системы и оптимизации факторов риска [50]. Случаи, приводящие к летальному исходу, редки и варьируются от 0,36% при одноагентной иммунотерапии до 1,23% при комбинированной иммунотерапии [51].

Стоит отметить, что, несмотря на значительные клинические улучшения, большинство пациентов в конечном итоге не реагируют на терапию ИКТ из-за развития первичной или вторичной резистентности [52]. Ретроспективное исследование 1201 пациента с НМРЛ, получавшего ингибиторы PD-1, показало, что у 78% из 243 случаев развилась вторичная резистентность после первоначального ответа [53]. У 74% пациентов с НМРЛ с эффективным первоначальным ответом на иммунотерапию в течение 5 лет наблюдалось прогрессирование заболевания. Механизм резистентности к иммунотерапии сложен и, вероятнее всего, связан с изменениями во взаимодействии между клетками и окружающими клеточными популяциями в пределах опухолевого микроокружения (TME) [54]. Изучение клеточных взаимодействий в пределах TME, создание надежных методов оценки иммунных клеток и их влияния на опухоль может пролить свет на механизм преодоления резистентности и повышения эффективности терапии ИКТ. Уже сегодня ингибиторы контрольной точки значительно изменили подход в лечении рака легкого в положительную сторону. По мере того как теории и технологии будут становиться все более усовершенствованными, ожидаются более эффективные варианты лечения.

Онкологическая виротерапия рака легкого и некоторых других опухолей плевральной полости

Онкологическая виротерапия (OB) — это еще один вид иммунотерапии злокачественных новообразований, который обладает потенциалом преодолеть иммuno-спрессивное микроокружение и улучшить клинические исходы. Онкологические вирусы ориентированы на избирательное поражение и размножение в опухолевых клетках, в результате чего опухолевые клетки разрушаются, в то же время активируется системный иммунный ответ против рака [55]. Гибель клеток, сопровождающаяся высвобождением молекул, таких как DAMPs и PAMPs, а также цитокинов, стимулирует активацию и рекрутование противоопухолевых иммунных клеток, включая CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты [56]. В настоящее время в исследованиях особое внимание уделяется различным вирусам, включая адено-вирусы, герпес-вирусы, коревые вирусы, вирусы Коксаки, полиомиелит, реовирусы, вирус болезни Ньюкасла и др. Злокачественные опухолевые клетки могут быть подвержены заражению и репликации вируса в результате своих дефектных механизмов восприятия вируса. Некоторым вирусам не требуется наличия специфических рецепторов [57]. Отдельные вирусы направленно модифицируют, чтобы придать им онкоспецифичность, например, внося дефект в последовательность тимидинкиназы, при котором репликация возможна только в опухолевых клетках с высоким содержанием этого фермента [58].

В настоящее время единственный онкологический вирус, представляющий собой генетически модифицированную форму вируса простого герпеса 1-го типа, был одобрен FDA для лечения злокачественной меланомы [59]. Систематический обзор и метаанализы, оценивающие эффективность и безопасность OB при солидных

опухолях, показали, что частота объективного ответа была значительно выше у пациентов, получавших монотерапию онколитическим аденоизирусом H101 или комбинацию с химиотерапией, по сравнению с пациентами, получавшими только химиотерапию [60]. По данным ClinicalTrials.gov, сейчас проводится более 20 исследований (табл. 2), преимущественно первой или второй фазы клинических испытаний, с оценкой эффективности и безопасности использования онколитической виротерапии при раке легкого и некоторых других злокачественных опухолях плевральной полости, в частности — мезотелиоме плевры. Есть данные об эффективности внутриопухолевого введения онколитического вируса ADV/HSV-tk у 28 пациентов с метастатическим немелкоклеточным раком легкого в комбинации со стереотаксической лучевой терапией и дальнейшей иммунотерапией ИКТ (валцикловир и пембролизумаб) (NCT03004183). У 10 пациентов (37,5%) наблюдалась стабилизация заболевания, у 10 пациентов (37,5%) — прогрессирование заболевания, у 6 пациентов (21,4%) был частичный ответ, а у 2 пациентов (7,1%) был достигнут полный ответ. Результаты другого исследования (NCT02053220) показали, что внутривенное введение аденоизируса ColoAd1 при резектабельном НМРЛ приводило к стимуляции местного противоопухолевого иммунного ответа в виде инфильтрации CD8⁺ Т-клетками [61]. На сегодняшний день клинические испытания онколитической виротерапии при раке легкого находятся на зачаточной стадии и еще не получено достаточно данных, чтобы прогнозировать будущую терапевтическую эффективность.

Клиническая эффективность ОВ в качестве монотерапии остается ограниченной, и поэтому исследователи изучают различные комбинированные тактики лечения. Если говорить о комбинации ОВ со стандартными методами лечения рака легкого, то в одном метаанализе с участием 1494 пациентов (группа комбинированной терапии — 820 пациентов; группа традиционного лечения — 674 пациента) было показано, что комбинированная терапия ОВ в большей степени улучшает показатели объективного ответа у пациентов по сравнению со стандартной терапией [62]. ОВ является особенно привлекательным вариантом в качестве адьювантной терапии для увеличения общей выживаемости, так как может непосредственно воздействовать на остаточные опухолевые очаги и модулировать подавленную иммунную систему после операции [63]. Также есть данные о том, что комбинированная лучевая терапия и онколитическая виротерапия могут усиливать противоопухолевый эффект друг друга и избирательно уничтожать опухолевые клетки легкого [64].

В зависимости от локализации и доступности опухоли вирус может быть введен непосредственно внутрь опухоли (однократно или повторные инъекции) или системно (внутривенное или внутриартериальное введение). Внутриопухолевое введение может быть ограничено внеклеточным матриксом, который служит барьером, препятствующим проникновению и распространению вируса. Еще одна из сложностей доставки вируса — это активация противовирусного иммунитета при его системном введении. Введенные вирусы обнаруживаются иммунной системой хозяина и инактивируются нейтрализующими антителами, что снижает их репликацию и эффективность. Для обхода этой проблемы в исследованиях применяли инкапсуляцию онколитического аденоизируса во внеклеточные везикулы, что значительно

повысило инфекционные показатели *in vitro* и усилило эффект подавления роста опухоли в экспериментальных моделях рака легкого человека [65]. Такие подходы могут быть интегрированы в клиническую практику для повышения эффективности системной доставки ОВ, преодолевая иммунный ответ.

Большой интерес вызывают современные возможности конструирования рекомбинантных вирусов. Большой вирусный геном VV позволяет вводить до 50 kb чужеродных генов, в результате чего действие ОВ может быть усилено за счет селективной к опухоли экспрессии терапевтических биологических препаратов, включая антитела, цитокины, хемокины и лиганды. Гены цитокинов являются одними из наиболее часто используемых иммуномодулирующих генов, поскольку цитокины рекрутируют и регулируют гомеостаз Т-клеток [66]. Вирусы, кодирующие IL-2, IL-12, IL-15, TNF или другие цитокины, были сконструированы таким образом, чтобы стимулировать увеличение популяции лимфоидных клеток после локального введения. Исследования демонстрировали успешную и безопасную доставку IL-2 в микроокружение опухоли, снижая опухолевую нагрузку и увеличивая количество CD8+ лимфоцитов [67]. Исследования подтвердили, что IL-15 выполняет важные функции в активации и выживании Т-лимфоцитов, натуральных киллеров (NK) и NK-T-лимфоцитов, при этом было показано, что комбинация IL-15 и IL-15Ra усиливает их биологическую активность [58]. Методы конструирования рекомбинантных вирусов могут быть ключом к разработке новых подходов лечения рака легкого и улучшения иммунотерапии.

ОВ представляют собой идеальный элемент для комбинированной терапии благодаря своему хорошему профилю безопасности и множеству противоопухолевых механизмов. Вирусная инфекция и способность к лизису опухолей превращали «холодные» опухоли в «горячие» и усиливали инфильтрацию и привлечение иммунных клеток в ТМЕ. ОВ в сочетании с ИКТ демонстрируют мощный синергетический эффект. Разработка стратегий для комбинированных терапий требует аккуратности, поскольку ИКТ может влиять на способность репликации ОВ, и для достижения оптимальных результатов необходимо гармонизировать оба метода лечения, избегая потенциальных рисков, связанных с генной активацией в ОВ [68].

В целом можно сказать, что терапия онколитическими вирусами имеет широкие клинические перспективы для будущего эффективного лечения рака легкого, но требует продолжения клинических испытаний. Универсальность и относительная безопасность ОВ позволяют предположить, что они являются мощным инструментом для оптимизации комбинированной иммунотерапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рак легкого характеризуется выраженным иммуносупрессивным опухолевым микроокружением, которое препятствует как собственному противоопухолевому иммунному ответу, так и противоопухолевой эффективности существующих на данный момент методов аддитивной клеточной иммунотерапии. Вместе с тем комплексное воздействие на опухоль и ее микроокружение с помощью селективных ингибиторов ИКТ, усиленных/таргетированных TIL, CAR-T и TCR-T, и рекомбинантных онколитических вирусов может «раскачать» противоопухолевый иммунный ответ и стать решающим в подавлении роста опухоли и улучшении клинических исходов.

Таблица 2. Клинические исследования применения онкологической виротерапии для лечения ЗНО плевральной полости

№	Диагноз	Лечение	Фаза	Выборка	Результат	Побочные эффекты	Clinical trial идентификатор	Место проведения
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Солидные опухоли (рак легкого, рак головы и шеи, меланома и др.)	Внутриопухолевая инъекция рекомбинантного аденоовируса LIF N	1	28	Статус неизвестен	Нет данных	NCT05180851	Шанхай, Китай
2	Метастатический НМЛР	Стереотаксическая лучевая терапия в комбинации с внутриопухолевым введением онкологического вируса ADV/HSV-tk, терапия ИКТ (валцикловир и пембролизумаб)	2	28	Полный ответ 2 пациента (7,1%); частичный ответ 6 пациентов (21,4%); стабилизация заболевания 10 пациентов (37,5%); прогрессирование заболевания 10 пациентов (37,5%). Показатель общей выживаемости 12,9%	Нет случаев токсичности на введение и серьезных побочных эффектов от проводимого лечения	NCT03004183	Хьюстон, Техас, США
3	Злокачественная мезотелиома плевры	Внутриплевральное введение вакцинированного штамма вируса кори, кодирующего тиреоидальный переносчик йода натрия	1	15	Результаты не опубликованы	Нет данных	NCT01503177	Рочестер, Миннесота, США
4	НМЛР	Кваратусуген оз-пазмид (Remorse) в комбинации с пембролизумабом у пациентов с ранее леченным НМЛР	1 и 2	180	Идет набор	Нет данных	NCT05062980	Хьюстон, Тампа, Сент-Луис, США
5	Диссеминированный мелкоклеточный рак легкого	Внутриопухолевая инъекция онкологического вируса (RT-01)	1	20	Идет набор	Нет данных	NCT05205421	Бенгбу, Китай
6	Рецидивирующие прогрессирующие солидные опухоли	Рекомбинантный онкологический вирус простого герпеса 1-го типа (R130)	1	24	Идет набор	Нет данных	NCT05886075	Аньцин, Аньхой, Китай
7	Прогрессирующие солидные опухоли	Рекомбинантный онкологический вирус простого герпеса 1-го типа (R130)	1	20	Идет набор	Нет данных	NCT05860374	Шанхай, Цзянсу, Китай
8	Прогрессирующие солидные опухоли	Рекомбинантный онкологический вирус простого герпеса 1-го типа (R130)	1	20	Идет набор	Нет данных	NCT05961111	Линьи, Шаньдун, Китай
9	Резистентный к ингибиторам иммунной контрольной точки НМЛР	Онкологический аденоовирус TILT-123 в комбинации с пембролизумабом	1	22	Идет набор	Нет данных	NCT06125197	Местоположение не указано
10	Прогрессирующая злокачественная мезотелиома плевры	Онкологический аденоовирус H101в сочетании с ингибитором PD-1	1	15	Идет набор	Нет данных	NCT06031636	Тяньцзинь, Тяньцзинь, Китай
11	Солидные опухоли	Внутриопухолевая инъекция MEM-288 и ниволумаба	1	61	Идет набор	Нет данных	NCT05076760	Тампа, США
12	Резектабельный НМЛР, резектабельный рак мочевого пузыря, резектабельный рак толстой кишки и др.	Внутриопухолевая инъекция или внутривенная инфузия онкологического аденоовируса группы В (ColoAd1)	1	17	Высокая локальная инфильтрация CD8 ⁺ клетками в 80% протестированных образцов опухолей, что свидетельствует о потенциальному иммунному ответе	Нет случаев токсичности на введение и серьезных побочных эффектов от проводимого лечения	NCT02053220	Мадрид, Испания
13	Немелкоклеточный рак легкого	VSV-IFN-β-NIS + Пембролизумаб + ипилимумаб + ниволумаб	1 и 2	70	Идет набор	Нет данных	NCT03647163	Рочестер, Миннесота, США

Продолжение таблицы 2

№	Диагноз	Лечение	Фаза	Выборка	Результат	Побочные эффекты	Clinical trial идентификатор	Место проведения
1	2	3	4	5	6	7	8	9
14	HER2-положительные опухоли	Внутриопухоловая инъекция аденоовируса CadVEC	1	45	Идет набор	Нет данных	NCT03740256	Хьюстон, Техас, США
15	Прогрессирующий НМЛР	Внутриопухоловая инъекция аденоовируса (CVA21) в комбинации с пембролизумабом	1	11	Не известно	Нет данных	NCT02824965	Гейдельберг, Виктория, Австралия
16	Прогрессирующие солидные опухоли	Внутривенная инъекция вируса герпеса T3011	1 и 2	74	Идет набор	Нет данных	NCT05598268	Пекин, Китай
17	Метастатические солидные опухоли	Внутриопухоловая или внутривенная инъекция TBio-6517 (онкологический вирус осповакцины) в сочетании с пембролизумабом	1 и 2	27	Остановлено	Нет данных	NCT04301011	США
18	Метастатические солидные опухоли	Внутриопухоловая инъекция BT-001 (TG6030), отдельно и в комбинации с пембролизумабом	1 и 2	48	Идет набор	Нет данных	NCT04725331	Брюссель, Бельгия
19	Метастатические солидные опухоли	Внутриопухоловая инъекция рекомбинантной вакцины GM-CSF; RAC VAC GM-CSF (JX-594)	1	23	Идет набор	Нет данных	NCT00625456	США
20	Злокачественная мезотелиома плевры	Внутриплевральный HSV1716, онкологический вирус, представляет собой мутантный вирус простого герпеса (HSV) типа I, удаленный в гене RL1, который кодирует белок ICP34.5	1 и 2	12	Завершено	Нет данных	NCT01721018	Глазго, Великобритания
21	Распространенные солидные опухоли с нейроэндокринными признаками	Внутриопухоловая инъекция пикорна-вируса Seneca Valley Virus (SVV-001)	1	60	Идет набор	Нет данных	NCT00314925	США

Таблица подготовлена авторами по данным ClinicalTrials.gov

Каждый из перечисленных методов в отдельности обладает рядом преимуществ и недостатков, ввиду чего комбинированный и персонализированный подход к иммунотерапии рака легкого на данный момент представляется наиболее рациональным. Развитие технологий рекомбинантных онкологических вирусов, вызывающих продук-

цию клетками микроокружения активирующих цитокинов и хемокинов, наряду с ингибированием сигнальных осей CTLA-4 и PD-1/PD-L1, а также создание генно-инженерных цитотоксических клеток, несомненно, будут способствовать выходу адоптивной иммунотерапии на новый, изменяющий течение метастатического рака легкого, уровень.

Литература / References

- Bade BC, Dela Cruz CS. Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin Chest Med.* 2020;41(1):1–24. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2019.10.001>
- Hárdardóttir H, Jonsson S, Gunnarsson O, Hilmarsdóttir B, Asmundsson J, Gudmundsdóttir I, et al. Advances in lung cancer diagnosis and treatment — a review. *Laeknablaðid.* 2022;108(1):17–29. <https://doi.org/10.17992/lbl.2022.01.671>
- Kelsey CR, Marks LB, Hollis D, Hubbs JL, Ready NE, D'Amico TA, Boyd JA. Local recurrence after surgery for early-stage lung cancer: an 11-year experience with 975 patients. *Cancer.* 2009;115(22):5218–27. <https://doi.org/10.1002/cncr.24625>
- Haslauer T, Greil R, Zaborsky N, Geisberger R. CAR T-Cell Therapy in Hematological Malignancies. *Int J Mol Sci.* 2021;22(16):8996. <https://doi.org/10.3390/jims22168996>
- Filin IY, Mayasin YP, Kharisova CB, Gorodilova AV, Kitaeva KV, Chulpanova DS, et al. Cell Immunotherapy against Melanoma: Clinical Trials Review. *Int J Mol Sci.* 2023;24(3):2413. <https://doi.org/10.3390/jims24032413>
- Yan T, Zhu L, Chen J. Current advances and challenges in CAR T-Cell therapy for solid tumors: tumor-associated antigens and the tumor microenvironment. *Exp Hematol Oncol.* 2023;12(1):14. <https://doi.org/10.1186/s40164-023-00373-7>

7. Sequeira T, Almodovar MT. Immunotherapy in Non-small Cell Lung Cancer: a Review. *Port J Card Thorac Vasc Surg.* 2023;30(3):55–65.
<https://doi.org/10.48729/pjctvs.371>
8. Massarelli E, Papadimitrakopoulou V, Welsh J, Tang C, Tsao AS. Immunotherapy in lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* 2014;3(1):53–63.
<https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2014.01.01>
9. Holt GE, Podack ER, Raez LE. Immunotherapy as a strategy for the treatment of non-small-cell lung cancer. *Therapy.* 2011;8(1):43–54
<https://doi.org/10.2217/thy.10.84>
10. Lahiri A, Maji A, Potdar PD, Singh N, Parikh P, Bisht B, et al. Lung cancer immunotherapy: progress, pitfalls, and promises. *Mol Cancer.* 2023;22(1):40.
<https://doi.org/10.1186/s12943-023-01740-y>
11. Zhao Y, Deng J, Rao S, Guo S, Shen J, Du F, et al. Tumor Infiltrating Lymphocyte (TIL) Therapy for Solid Tumor Treatment: Progressions and Challenges. *Cancers (Basel).* 2022;14(17):4160.
<https://doi.org/10.3390/cancers14174160>
12. Sackstein R, Schatton T, Barthel SR. T-lymphocyte homing: an underappreciated yet critical hurdle for successful cancer immunotherapy. *Lab Invest.* 2017;97(6):669–97.
<https://doi.org/10.1038/labinvest.2017.25>
13. Wang S, Sun J, Chen K, Ma P, Lei Q, Xing S, et al. Perspectives of tumor-infiltrating lymphocyte treatment in solid tumors. *BMC Med.* 2021;19(1):140.
<https://doi.org/10.1186/s12916-021-02006-4>
14. Ma Y, Ou J, Lin T, Chen L, Wang J, Qiao D, et al. Phenotypic analysis of tumor-infiltrating lymphocytes from non-small cell lung cancer and their potential application for adoptive cell therapy. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2020;42(4):319–29.
<https://doi.org/10.1080/08923973.2020.1765375>
15. Federico L, McGrail DJ, Bentebibel SE, et al. Distinct tumor-infiltrating lymphocyte landscapes are associated with clinical outcomes in localized non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2022;33(1):42–56.
<https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.09.021>
16. Wang SS, Liu W, Ly D, Xu H, Qu L, Zhang L. Tumor-infiltrating B cells: their role and application in anti-tumor immunity in lung cancer. *Cell Mol Immunol.* 2019;16(1):6–18.
<https://doi.org/10.1038/s41423-018-0027-x>
17. Giatromanolaki A, Anestopoulos I, Panayiotidis MI, Mitrakas A, Pappa A, Koukourakis MI. Prognostic Relevance of the Relative Presence of CD4, CD8 and CD20 Expressing Tumor Infiltrating Lymphocytes in Operable Non-small Cell Lung Cancer Patients. *Anticancer Res.* 2021;41(8):3989–95.
<https://doi.org/10.21873/anticancres.15196>
18. Creelan BC, Wang C, Teer JK, Toloza EM, Yao J, Kim S, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte treatment for anti-PD-1-resistant metastatic lung cancer: a phase 1 trial. *Nat Med.* 2021;27(8):1410–8.
<https://doi.org/10.1038/s41591-021-01462-y>
19. Chen L, Chen F, Li J, Pu Y, Yang C, Wang Y, et al. CAR-T cell therapy for lung cancer: Potential and perspective. *Thorac Cancer.* 2022;13(7):889–99.
<https://doi.org/10.1111/1759-7714.14375>
20. Dagar G, Gupta A, Masoodi T, Nisar S, Merhi M, Hashem S, et al. Harnessing the potential of CAR-T cell therapy: progress, challenges, and future directions in hematological and solid tumor treatments. *J Transl Med.* 2023;21(1):449.
<https://doi.org/10.1186/s12967-023-04292-3>
21. Tomasik J, Jasiński M, Basak GW. Next generations of CAR-T cells — new therapeutic opportunities in hematology? *Front Immunol.* 2022;13:1034707.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1034707>
22. Hou B, Tang Y, Li W, Zeng Q, Chang D. Efficiency of CAR-T Therapy for Treatment of Solid Tumor in Clinical Trials: A Meta-Analysis. *Dis Markers.* 2019;2019:3425291.
<https://doi.org/10.1155/2019/3425291>
23. Liu G, Rui W, Zhao X, Lin X. Enhancing CAR-T cell efficacy in solid tumors by targeting the tumor microenvironment. *Cell Mol Immunol.* 2021;18(5):1085–95.
<https://doi.org/10.1038/s41423-021-00655-2>
24. Brudno J. N., Kochenderfer J. N. Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management. *Blood Rev.* 2019;34:45–55.
<https://doi.org/10.1016/j.blre.2018.11.002>
25. Van der Stegen SJ, Davies DM, Wilkie S, Foster J, Sosabowski JK, Burnet J, et al. Preclinical in vivo modeling of cytokine release syndrome induced by ErbB-retargeted human T cells: identifying a window of therapeutic opportunity? *J Immunol.* 2013;191(9):4589–98.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301523>
26. Ruixin S, Yifan L, Chuanlong W, Min Z, Hong L, Guoxiu D, et al. Expressing IL-15/IL-18 and CXCR2 improve infiltration and survival of EGFRvIII-targeting CAR-T cells in breast cancer. *Biochem Pharmacol.* 2023;212:115536.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115536>
27. Adusumilli PS, Zauderer MG, Rivière I, Solomon SB, Rusch VW, O'Cearbhail RE, et al. A Phase I Trial of Regional Mesothelin-Targeted CAR T-cell Therapy in Patients with Malignant Pleural Disease, in Combination with the Anti-PD-1 Agent Pembrolizumab. *Cancer Discov.* 2021;11(11):2748–63.
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-0407>
28. Chen L, Chen F, Li J, Pu Y, Yang C, Wang Y, et al. CAR-T cell therapy for lung cancer: Potential and perspective. *Thorac Cancer.* 2022;13(7):889–99.
<https://doi.org/10.1111/1759-7714.14375>
29. Bingle CD, LeClair EE, Havard S, Bingle L, Gillingham P, Craven CJ. Phylogenetic and evolutionary analysis of the PLUNC gene family. *Protein Sci.* 2004;13:422–30.
<https://doi.org/10.1110/ps.03332704>
30. Iwao K, Watanabe T, Fujiwara Y, Takami K, Kodama K, Higashiyama M, et al. Isolation of a novel human lung-specific gene, LUNX, a potential molecular marker for detection of micrometastasis in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer.* 2001;91(4):433–7.
[https://doi.org/10.1002/1097-0215\(200002\)9999:9999<::aid-ijc1059>3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/1097-0215(200002)9999:9999<::aid-ijc1059>3.0.co;2-b)
31. Hu Z, Zheng X, Jiao D, Zhou Y, Sun R, Wang B, et al. LunX-CAR T cells as a targeted therapy for non-small cell lung cancer. *Mol Ther. Oncolytics.* 2020;17:361–70.
<https://doi.org/10.1016/j.omto.2020.04.008>
32. Kim KH, Kim H. Progress of antibody-based inhibitors of the HGF-cMET axis in cancer therapy. *Exp Mol Med.* 2017;49(3):e307.
<https://doi.org/10.1038/emm.2017.17>
33. Min J, Long C, Zhang L, Duan J, Fan H, Chu F, Li Z. c-Met specific CAR-T cells as a targeted therapy for non-small cell lung cancer cell A549. *Bioengineered.* 2022;13(4):9216–32.
<https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2058149>
34. Feng K, Guo Y, Dai H, Wang Y, Li X, Jia H, Han W. Chimeric antigen receptor-modified T cells for the immunotherapy of patients with EGFR-expressing advanced relapsed/refractory non-small cell lung cancer. *Sci China Life Sci.* 2016;59(5):468–79.
<https://doi.org/10.1007/s11427-016-5023-8>
35. Adusumilli PS, Zauderer MG, Rivière I, Solomon SB, Rusch VW, O'Cearbhail RE, et al. A Phase I Trial of Regional Mesothelin-Targeted CAR T-cell Therapy in Patients with Malignant Pleural Disease, in Combination with the Anti-PD-1 Agent Pembrolizumab. *Cancer Discov.* 2021;11(11):2748–63.
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-0407>
36. Lin Y, Chen S, Zhong S, An H, Yin H, McGowan E. Phase 1 clinical trial of PD1 knockout anti-MUC1 CAR-T cells in the treatment of patients with non-small cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2019;30:xi12–5.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdz448>
37. Грибкова ИВ. Ингибиторы иммунных контрольных точек при опухолевых заболеваниях системы крови у детей. *Онкогематология.* 2023;18(2):5–34.
Gribkova IV. Immune checkpoint inhibitors in pediatric hematologic malignancies. *Oncohematology.* 2023;18(2):25–34.
<https://doi.org/10.17650/1818-8346-2023-18-2-25-34>
38. Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Front Oncol.* 2018;8:86.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00086>

39. Marin-Acevedo JA, Kimbrough EO, Lou Y. Next generation of immune checkpoint inhibitors and beyond. *J Hematol Oncol.* 2021;14(1):45.
<https://doi.org/10.1186/s13045-021-01056-8>
40. Pan C, Liu H, Robins E, Song W, Liu D, Li Z, Zheng L. Next-generation immuno-oncology agents: current momentum shifts in cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol.* 2020;13(1):29.
<https://doi.org/10.1186/s13045-020-00862-w>
41. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőzsi T, Fülop A, et al. Five-Year Outcomes with Pembrolizumab Versus Chemotherapy for Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer With PD-L1 Tumor Proportion Score \geq 50. *J Clin. Oncol.* 2021;39,2339–49.
<https://doi.org/10.1200/JCO.21.00174>
42. Wang Y, Han H, Zhang F, Lv T, Zhan P, Ye M, et al. Immune checkpoint inhibitors alone vs immune checkpoint inhibitors-combined chemotherapy for NSCLC patients with high PD-L1 expression: a network meta-analysis. *Br J Cancer.* 2022;127(5):948–56.
<https://doi.org/10.1038/s41416-022-01832-4>
43. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőzsi T, Fülop A, et al. KEYNOTE-024 Investigators. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2016;375(19):1823–33.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606774>
44. Mok TSK, Wu YL, Kudaba I, Kowalski DM, Cho BC, Turna HZ, et al. KEYNOTE-042 Investigators. Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2019;393(10183):1819–30.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32409-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32409-7)
45. Herbst RS, Giaccone G, de Marinis F, Reinmuth N, Vergnenegre A, Barrios CH, et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of PD-L1-Selected Patients with NSCLC. *N Engl J Med.* 2020;383(14):1328–39.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1917346>
46. Gandhi L, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2018;378:2078–92.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1801005>
47. Wu Y, Verma V, Gay CM, Chen Y, Liang F, Lin Q, et al. Neoadjuvant immunotherapy for advanced, resectable non-small cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *Cancer.* 2023;129(13):1969–85.
<https://doi.org/10.1002/cncr.34755>
48. Deng H, Zhou C. From CheckMate 227 to CheckMate 9LA: rethinking the status of chemotherapy in the immunotherapy era-chemo-free or chemo-reform? *Transl Lung Cancer Res.* 2021;10(4):1924–7.
<https://doi.org/10.21037/tlcr-21-179>
49. Yin Q, Wu L, Han L, Zheng X, Tong R, Li L, et al. Immune-related adverse events of immune checkpoint inhibitors: a review. *Front Immunol.* 2023;14:1167975.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1167975>
50. Inno A, Tarantini L, Parrini I, Spallarossa P, Maurea N, Bisceglia I, et al. Cardiovascular Effects of Immune Checkpoint Inhibitors: More Than Just Myocarditis. *Curr Oncol Rep.* 2023;25(7):743–51.
<https://doi.org/10.1007/s11912-023-01411-7>
51. Shankar B, Zhang J, Naqash AR, Forde PM, Feliciano JL, Marrone KA, et al. Multisystem Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Inhibitors for Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol.* 2020;6:1952–6.
<https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.5012>
52. Horvath L, Thienpont B, Zhao L, Wolf D, Pircher A. Overcoming immunotherapy resistance in non-small cell lung cancer (NSCLC) — novel approaches and future outlook. *Mol. Cancer.* 2020;19(1):141.
<https://doi.org/10.1186/s12943-020-01260-z>
53. Schoenfeld A, Rizvi H, Memon D, Luo J, Preeshagul I, Sauter J, et al. Acquired resistance to PD-1 blockade in NSCLC. *J Of Clin Oncol.* 2020;38:9621.
https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.9621
54. Zhou S, Yang H. Immunotherapy resistance in non-small-cell lung cancer: From mechanism to clinical strategies. *Front Immunol.* 2023;14:1129465.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1129465>
55. Cook M, Chauhan A. Clinical Application of Oncolytic Viruses: A Systematic Review. *Int J Mol Sci.* 2020;21(20):7505.
<https://doi.org/10.3390/ijms21207505>
56. Malogolovkin A, Gasanov N, Egorov A, Weener M, Ivanov R, Karabelsky A, et al. Combinatorial Approaches for Cancer Treatment Using Oncolytic Viruses: Projecting the Perspectives through Clinical Trials Outcomes. *Viruses.* 2021;13(7):1271.
<https://doi.org/10.3390/v13071271>
57. Jhawar SR, Thandomi A, Bommareddy PK, Hassan S, Kohlhapp FJ, Goyal S, Oncolytic Viruses-Natural and Genetically Engineered Cancer Immunotherapies. *Front Oncol.* 2017;7:202.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00202>
58. Shakiba Y, Vorobyev PO, Yusubalieva GM, Kochetkov DV, Zajtseva KV, Valikhov MP, et al. Oncolytic therapy with recombinant vaccinia viruses targeting the interleukin-15 pathway elicits a synergistic response. *Mol Ther Oncolytics.* 2023;29:158–68.
<https://doi.org/10.1016/j.omto.2023.05.002>
59. Ferrucci PF, Pala L, Conforti F, Cocorocchio E. Talimogene Laherparepvec (T-VEC): An Intralesional Cancer Immunotherapy for Advanced Melanoma. *Cancers (Basel).* 2021;13(6):1383.
<https://doi.org/10.3390/cancers13061383>
60. Gao P, Ding G, Wang L. The efficacy and safety of oncolytic viruses in the treatment of intermediate to advanced solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Transl Cancer Res.* 2021;10(10):4290–302.
<https://doi.org/10.21037/tcr-21-905>
61. Garcia-Carbonero R, Salazar R, Duran I, Osman-Garcia I, Paz-Ares L, Bozada JM, et al. Phase 1 study of intravenous administration of the chimeric adenovirus enadenotucirev in patients undergoing primary tumor resection. *J Immunother Cancer.* 2017;5(1):71.
<https://doi.org/10.1186/s40425-017-0277-7>
62. Li Y, Shen Y, Tang T, Tang Z, Song W, Yang Z, et al. Oncolytic virus combined with traditional treatment versus traditional treatment alone in patients with cancer: a meta-analysis. *Int J Clin Oncol.* 2020;25(11):1901–13.
<https://doi.org/10.1007/s10147-020-01760-4>
63. Ahmed J, Chard LS, Yuan M, Wang J, Howells A, Li Y, et al. A new oncolytic Vaccinia virus augments antitumor immune responses to prevent tumor recurrence and metastasis after surgery. *J Immunother Cancer.* 2020;8(1):e000415.
<https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000415>
64. Jhawar SR, Wang SJ, Thandomi A, Bommareddy PK, Newman JH, Marzo AL, et al. Combination oncolytic virus, radiation therapy, and immune checkpoint inhibitor treatment in anti-PD-1-refractory cancer. *J Immunother Cancer.* 2023;11(7):e006780.
<https://doi.org/10.1136/jitc-2023-006780>
65. Garofalo M, Saari H, Somersalo P, Crescenti D, Kuryk L, Aksela L, et al. Antitumor effect of oncolytic virus and paclitaxel encapsulated in extracellular vesicles for lung cancer treatment. *J Control Release.* 2018;283:223–34.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.05.015>
66. Li M, Zhang M, Ye Q, Liu Y, Qian W. Preclinical and clinical trials of oncolytic vaccinia virus in cancer immunotherapy: a comprehensive review. *Cancer Biol Med.* 2023;20(9):646–61.
<https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2023.0202>
67. Ekeke CN, Russell KL, Murthy P, Guo ZS, Soloff AC, Weber D, et al. Intrapleural interleukin-2-expressing oncolytic virotherapy enhances acute antitumor effects and T-cell receptor diversity in malignant pleural disease. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2022;163(4):e313–28.
<https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2020.11.160>
68. Rojas JJ, Sampath P, Hou W, Thorne SH. Defining Effective Combinations of Immune Checkpoint Blockade and Oncolytic Virotherapy. *Clin Cancer Res.* 2015;21(24):5543–51.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2009>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Ю.В. Озерская — анализ литературы, написание рукописи; Г.М. Юсубалиева — анализ литературы; О.А. Жукова — сбор материала, составление списка литературы; К.А. Зыков — анализ материала, редактирование текста; В.П. Баклаушев — анализ материала, редактирование текста.

ОБ АВТОРАХ

Озерская Юлия Вячеславовна

<https://orcid.org/0009-0008-4893-2735>
1759317593@mail.ru

Юсубалиева Гаухар Маратовна, канд. мед. наук

<https://orcid.org/0000-0003-3056-4889>
brill78@mail.ru

Жукова Оксана Анатольевна

<https://orcid.org/0000-0002-0907-0078>
oksana.saprikina82@mail.ru

Зыков Кирилл Алексеевич, д-р. мед. наук, профессор

<https://orcid.org/0000-0003-3385-2632>
kirillaz@inbox.ru

Баклаушев Владимир Павлович, д-р. мед. наук, доцент

<https://orcid.org/0000-0003-1039-4245>
serpoff@mail.ru



РОЛЬ ИНФОРМАЦИОННОГО СОПРОВОЖДЕНИЯ В СОВЕРШЕНСТВОВАНИИ МЕДИЦИНСКОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ПЛАВСОСТАВА

Т.В. Яковлева¹, О.Ю. Туренко¹, В.М. Колабутин², В.А. Ратников^{2,3}, Г.М. Орлов², С.С. Москаleva², В.П. Горелов²

¹ Федеральное медико-биологическое агентство, Москва, Россия

² Северо-Западный окружной научно-клинический центр им. Л.Г. Соколова Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

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

Введение. Управление процессом получения, анализа и систематизации результатов медицинских осмотров плавсостава в медицинских организациях ФМБА России требует создания специальной информационной системы.

Цель. На основании комплексного анализа результатов работы медицинских организаций ФМБА России разработать и внедрить в практическое применение информационную систему для обеспечения бесшовной преемственности в оказании всех видов медицинского обеспечения плавсостава, создать цифровой регистр медицинских освидетельствований плавсостава.

Материалы и методы. За период 2014–2023 гг. изучены организационные принципы работы медицинских учреждений, оказывающих медицинскую помощь плавсоставу. Отработана методика организации персонифицированного учета результатов медосмотров данного контингента для формирования регистров. Анализ работы по медицинскому обеспечению лиц, работающих на судах, выполнен по итогам деятельности 35 здравпунктов, 70 судовых врачей, 14 врачей водолазной медицины в структуре ФМБА России в 2023 году.

Результаты. В Головном центре охраны здоровья моряков ФМБА России в марте 2023 года реализован pilotный проект по созданию реестра в Северо-Западном федеральном округе, разработана методика формирования идентификационного номера моряка в реестре, изучено 26 125 записей сведений о лицах, прошедших предварительные и периодические медицинские осмотры. Использование предложенной методики формирования реестров во всех округах позволило получить в информационной системе данные о медицинских освидетельствованиях за 2022–2023 гг. в количестве 38 993 заключений.

Заключение. Единый информационный ресурс в комплексе с реестром по всем 35 медицинским организациям, осуществляющим медицинское обеспечение плавсостава, в том числе проведение предварительных и периодических медицинских осмотров, составляет основу для дальнейшего совершенствования научных подходов к организации и развитию морской и водолазной медицины в Российской Федерации.

Ключевые слова: морская медицина; промышленная медицина; информационное обеспечение; Федеральное медико-биологическое агентство; реестр медицинских освидетельствований плавсостава

Для цитирования: Яковлева Т.В., Туренко О.Ю., Колабутин В.М., Ратников В.А., Орлов Г.М., Москалев С.С., Горелов В.П. Роль информационного сопровождения в совершенствовании медицинского обеспечения плавсостава. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2024;26(4):98–103.
<https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-98-103>

Финансирование: работа выполнена без спонсорской поддержки.

Потенциальный конфликт интересов: Яковлева Т.В. — член редакционного совета журнала «Медицина экстремальных ситуаций». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

✉ Ратников Вячеслав Альбертович ratnikov@med122.ru

Статья поступила: 06.09.2024 После доработки: 21.10.2024 Принята к публикации: 24.10.2024

THE ROLE OF INFORMATION SUPPORT IN IMPROVING MEDICAL SUPPORT FOR SEAFARING PERSONNEL

Tatyana V. Yakovleva¹, Olga Yu. Turenko¹, Valeriy M. Kolabutin², Vyacheslav A. Ratnikov^{2,3}, Gennadiy M. Orlov², Svetlana S. Moskaleva², Victor P. Gorelov²

¹ Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russia

² Sokolov Northwestern District Scientific and Clinical Center, St. Petersburg, Russia

³ Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

Introduction. Managing the process of collecting, analyzing, and systematizing the results of medical examinations of seafaring personnel in medical organizations of the Federal Medical and Biological Agency (FMBA) of Russia requires development of a specialized information system.

Objective. To carry out a comprehensive analysis of the activities of FMBA organizations, to develop on its basis and implement into practical use an information system for ensuring the continuity of all types of medical support for seafaring personnel; to create a digital Register of the results of medical examinations of seafarers.

Materials and methods. During the 2014–2023 period, the principles of organizing the work of medical organizations that provide medical care to seafaring personnel were studied. A methodology for recording the results of medical examinations of seafarers with the purpose of forming an information Register was developed. An analysis of medical support provided to people working on ships in 2023 was conducted based on the reports of FMBA structural units, including 35 health centers, 70 ship doctors, and 14 doctors of diving medicine.

Results. In March 2023, the Head Center for Health Protection of Seafarers, FMBA, implemented a pilot project on creation of a Register in the Northwestern Federal District. Within its framework, a methodology for generating a seafarer identification number in the Register was developed and 26,125 records of information about persons who underwent preliminary and periodic medical examinations were analyzed. The implementation of the proposed methodology for the formation of registers in all districts allowed an information system in the amount of 38,993 conclusions to be drawn based on medical examinations conducted in 2022–2023.

Conclusion. A single informational resource in conjunction with the Register for all 35 medical organizations that provide medical support to seafaring personnel, including conducting preliminary and periodic medical examinations, forms the basis for further improvement of scientific approaches to the organization and development of maritime and diving medicine in the Russian Federation.

© Т.В. Яковлева, О.Ю. Туренко, В.М. Колабутин, В.А. Ратников, Г.М. Орлов, С.С. Москалев, В.П. Горелов, 2024

Keywords: maritime medicine; industrial medicine; information support; Federal Medical and Biological Agency; FMBA; Register of medical examinations of seafaring personnel

For citation: Yakovleva T.V., Turenko O.Yu., Kolabutin V.M., Ratnikov V.A., Orlov G.M., Moskaleva S.S., Gorelov V.P. The role of information support in improving medical support for seafaring personnel. *Extreme Medicine*. 2024;26(4):98–103. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-98-103>

Funding: the study was carried out without sponsorship.

Potential conflict of interest: Tatyana V. Yakovleva is a member of the Advisory Board of "Extreme Medicine". The other authors declare no conflict of interest.

✉ Vyacheslav A. Ratnikov ratnikov@med122.ru

Received: 6 Sep. 2024 **Revised:** 21 Oct. 2024 **Accepted:** 24 Oct. 2024

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы на различных государственных уровнях неоднократно поднимался вопрос о необходимости восстановления единой системы медицинского обеспечения работников морского и речного флотов, распавшейся на множество компаний и организаций в результате неблагоприятных общественно-экономических изменений в стране [1].

Эти требования обозначены в Конвенции Международной организации труда от 2006 года и ратифицированы в Российской Федерации в 2012 году. В настоящее время в Российской Федерации отсутствует единый подход к организации информационного обеспечения медицинского наблюдения за морскими специалистами [2]. В медицинских организациях ФМБА России, принимающих участие в проведении медицинского освидетельствования лиц, работающих на судах, используется Единая ведомственная медицинская информационно-аналитическая система ФМБА России (далее — ЕВМИАС), а также медицинские информационные системы, интегрированные с ЕВМИАС (далее — МИС) [3].

В данных системах был реализован учет выполненных периодических и предварительных медицинских осмотров в соответствии с приказом Минздрава России от 28.01.2021 № 29н «Об утверждении Порядка проведения обязательных предварительных и периодических медицинских осмотров работников, предусмотренных частью четвертой статьи 213 Трудового кодекса Российской Федерации, перечня медицинских противопоказаний к осуществлению работ с вредными и (или) опасными производственными факторами, а также работам, при выполнении которых проводятся обязательные предварительные и периодические медицинские осмотры» [4].

Однако в указанном руководящем документе отсутствует порядок проведения предварительных и периодических медицинских осмотров лиц, работающих на судах. Необходимо отметить, что и в других нормативных актах Российской Федерации порядок медицинских осмотров плавсостава был представлен не в полном объеме. Единственным действующим документом, устанавливающим медицинские противопоказания к работе на судне, было Постановление Правительства Российской Федерации от 24.06.2017 № 742 «Об утверждении перечня заболеваний, препятствующих работе на морских судах, судах внутреннего плавания, а также на судах смешанного (река — море) плавания» [5].

В соответствии с требованиями времени в конце 2022 года вышел приказ Минздрава России от 01.11.2022 № 714н «Об утверждении Порядка проведения

медицинского осмотра на наличие медицинских противопоказаний к работе на судне, включающего в себя химико-токсикологические исследования наличия в организме человека наркотических средств, психотропных веществ и их метаболитов, и формы медицинского заключения об отсутствии медицинских противопоказаний к работе на судне». Данный приказ определил порядок проведения медицинских осмотров плавсостава и создал предпосылки для оптимальной организации соответствующего учета результатов медицинских освидетельствований плавсостава в информационных системах с учетом собранных достоверных статистических данных [6]. Своевременность данного направления деятельности согласуется с мнением ряда авторов, выполнивших комплексный правовой мониторинг национальных нормативных и методических документов, регламентирующих вопросы деятельности центров охраны здоровья моряков, оценивших нормативное регулирование вопроса медицинского сопровождения плавсостава и подчеркнувших необходимость регламентации принципов организации медицинской помощи и санитарно-гигиенического обеспечения судов в плавании с учетом современных достижений медицины, информационных, включая дистанционные, технологий [7, 8].

Таким образом, организация учета предварительных и периодических медицинских осмотров лиц, работающих на судах, в используемых медицинскими организациями ФМБА России информационными системами ЕВМИАС и медицинскими информационными системами, интегрированными с ЕВМИАС, приобрела особую актуальность.

Цель исследования — на основании системного анализа результатов работы медицинских организаций ФМБА России разработать и внедрить в практическое применение информационную систему для обеспечения бесшовной преемственности в оказании всех видов медицинского обеспечения плавсостава с созданием цифрового регистра его медицинских освидетельствований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

За период с 2014 по 2023 год изучены технические особенности, недостатки и перспективы информационного сопровождения медицинского обеспечения плавсостава в реализации данного процесса, систематизированы данные по изучению заболеваемости у плавсостава и водолазов за 2023 год.

Системный анализ массива данных, отражающих работу медицинских организаций (МО) ФМБА России по медицинскому обеспечению лиц, работающих на судах в 2023

году, показал, что в структуре функционирует 35 здравпунктов (ЗП), занято 70 судовых врачей и 14 врачей водолазной медицины. Проведено анкетирование информационных систем всех интегрированных в исследование МО. Для эффективного медицинского сопровождения плавсостава, координации взаимодействия профильного управления ФМБА России с подведомственными учреждениями агентства, а также для создания информационного ресурса, отражающего результаты проводимой работы, приказом Руководителя ФМБА России в 2021 году на базе ФГБУ «Северо-Западный окружной научно-клинический центр им. Л.Г. Соколова» (далее — СЗОНКЦ им. Л.Г. Соколова) создан Головной центр охраны здоровья моряков (далее — Головной центр).

Одной из основных задач Головного центра определено информационно-аналитическое обеспечение охраны здоровья плавсостава, в частности создание и ведение регистра медицинских организаций и цифрового регистра медицинских освидетельствований моряков, создание, совершенствование и информационно-технологическое сопровождение информационной системы.

В 2022 году перед медицинскими организациями ФМБА России Головным центром была поставлена задача организации персонифицированного учета медосмотров плавсостава и предоставления этой информации для формирования регистров. В связи с различной степенью технической готовности МО к началу персонифицированного учета медосмотров плавсостава с применением медицинской информационной системы (МИС) Головной центр обеспечил их необходимыми информационными инструментами, а также прототипом модуля на основе МИС, используемой в СЗОНКЦ им. Л.Г. Соколова.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенного исследования установлено, что создание единого контура мониторинга здоровья плавсостава и водолазов в системе ФМБА России позволило сделать доступным, объективным и эффективным анализ совокупной информации, отражающей результаты деятельности МО во всех федеральных округах.

На основании первичных данных, получаемых из МО ФМБА России, определено, что вычленение информации исключительно по плавсоставу из общего объема сведений о проведенных предварительных и периодических медицинских осмотрах в полной мере было невозможным. Это послужило предпосылкой к получению недостоверных демографических данных и результатов по заболеваемости плавсостава. Взаимодействие с МО также показало, что персонифицированный учет медосмотров плавсостава осуществлялся не повсеместно, а иногда проводился с использованием лишь бумажных носителей.

На первом этапе была разработана концепция по развертыванию и эксплуатации информационно-аналитической системы морской медицины, включая внедрение стандартных протоколов обмена данными с медицинскими информационными системами МО, установку и настройку лицензионного программного обеспечения, формирование информационных ресурсов и мероприятия по обеспечению информационной безопасности.

Во исполнение приказа Минздрава России от 01.11.2022 № 714н [6] в 2022 году начат и в марте 2023 года реализован пилотный проект по созданию регистра

в Северо-Западном федеральном округе (СЗФО). Был разработан состав информационного обеспечения системы ведения регистра центра морской медицины, представленный на рисунке 1.

Была разработана методика формирования идентификационного номера моряка в регистре, состоящего из 12 цифр. При формате «12XX-XXXX-XXXX» — первые две цифры обозначают субъект РФ, в котором моряк прошел профосмотр, «XX34-5XXXX-XXXX» третья-пятая цифры — регистрационный номер медицинской организации в регистре МО, «XXXX-X678-9ABX» шестая-одиннадцатая цифры — порядковый номер моряка, «XXXX-XXXX-XXXС» двенадцатая цифра — контрольная сумма предыдущих цифр (рис. 2).

Вначале были получены результаты формирования Регистра по СЗФО (рис. 3). Как представлено на рисунке 3, МО в СЗФО на первом этапе были собраны и переданы в Головной центр 26 125 записей сведений о лицах, прошедших предварительные и периодические медицинские осмотры.

При анализе данных, представленных на рисунке 3, установлено, что сведения содержат обобщенную информацию как по представителям плавсостава, так и по сотрудникам береговых служб, работающих в АО «Атомфлот» и ФГУП «Росморпорт».

После исключения из базы сведений сотрудников береговых служб на основе признака прикрепления к судну в регистр было включено 8259 записей, что составило 32% от представленных ранее данных. В соответствующих записях были прописаны уникальные коды сведений о моряках с 7800-0000-0016 по 7800-0001-2277 в соответствии с приведенной выше методикой (рис. 2).

Результаты пилотного проекта были представлены на заседании секции Морской медицины Научно-экспертного совета Морской коллегии при Правительстве Российской Федерации в мае 2023 года во Владивостоке.

На следующем этапе был создан регистр медицинских организаций ФМБА России, занимающихся медицинским обеспечением плавсостава, включая проведение предварительных и периодических медицинских осмотров данного контингента. В регистр медицинских организаций было включено 35 медицинских организаций ФМБА России, расположенных в 8 федеральных округах, карта размещения которых приведена на рисунке 4.

По результатам пилотного проекта был доработан регламент предоставления медицинскими организациями сведений о результатах медицинских освидетельствований плавсостава в Головной центр охраны здоровья моряков ФМБА России (далее — Регламент).

Разработанные в ходе реализации проекта методические документы, а также прототип модуля на основе МИС, используемой СЗОНКЦ им. Л.Г. Соколова, в 2023 году были внедрены в работу всех медицинских организаций ФМБА России, включенных в регистр. Это позволило с декабря 2023 года обеспечить полный персонифицированный учет сведений о прохождении периодических и предварительных медицинских осмотров плавсостава, медицинских заключений об отсутствии противопоказаний к работе на судне, сбор, сверку и анализ статистических данных заболеваемости плавсостава, что полностью соответствует современным требованиям системы здравоохранения [9].

Разработан и обоснован объем хранения сведений в регистре медицинских освидетельствований моряков: паспортные данные моряка (32 поля) и медицинские

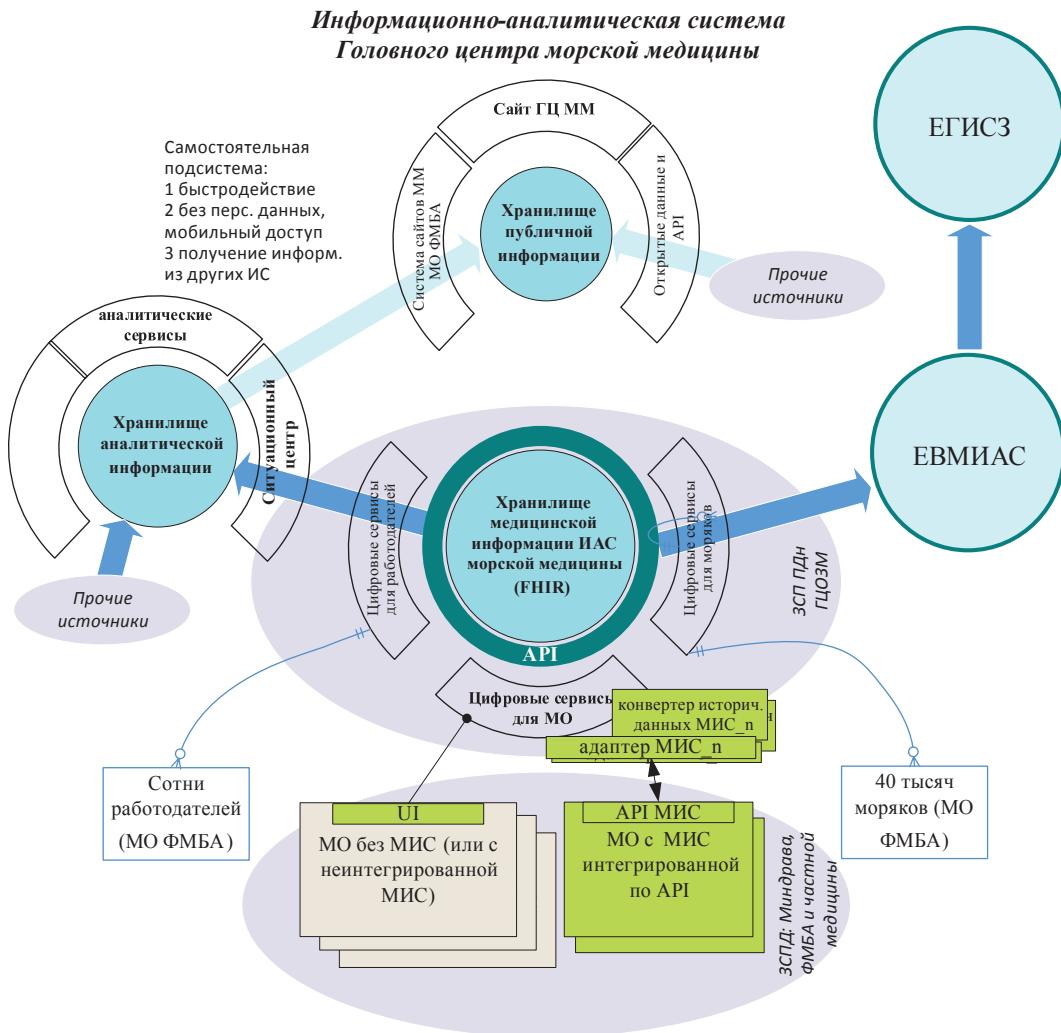


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 1. Схема прототипа информационно-аналитической системы Головного центра

данные по проведенному медицинскому осмотру согласно приказу Минздрава России от 01.11.2022 № 714н (60 полей), включая сведения об оказанной медицинской помощи, лечебно-профилактических мероприятиях, результатах лабораторных и инструментальных исследований, которые имели достаточно большой объем и формировались не только в МО, проводящих медосмотры плавсостава. Поэтому полные медицинские данные было решено получать по запросу в ЕГИСЗ и ЕВМИАС и не хранить в регистре. Состав медицинских данных регистра приведен на рисунке 5.

По итогам полученных данных был сформирован общий регистр по всем 35 медицинским организациям

ФМБА России, осуществляющим медицинское обеспечение плавсостава, включая данные о проведении предварительных и периодических медицинских осмотров (табл. 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ: загрузка данных в Регистр медицинских освидетельствований моряков и Реестр медицинских организаций				
1. Загружено освидетельствований моряков				
№	Наименование организации	«Грязные» данные	«Чистые» данные	%
1	Головной центр ОЗМ на базе ФГБУ СЗОНКЦ им. Л.Г. Соколова ФМБА России	3 166	1 227	39%
2	ФГБУЗ СМКЦ им. Н.А. Семашко ФМБА России	18 758	5 318	28%
3	ФГБУЗ ММЦ им. Н.И. Пирогова ФМБА России	4 201	1 714	41%
ИТОГО		26 125	8 259	32%
2. Внесенные в РМО медицинские организации				
№	Наименование организации	Код	Коды моряков	
1	Головной центр ОЗМ на базе ФГБУ СЗОНКЦ им. Л.Г. Соколова ФМБА России	78000	с 7800-0000-0016 по 7800-0001-2277	
2	ФГБУЗ СМКЦ им. Н.А. Семашко ФМБА России	29000	с 2900-0000-0012 по 2900-0005-3188	
3	ФГБУЗ ЦМСЧ № 58 ФМБА России (не включена в перечень пилотных МО)	29001	-	
4	ФГБУЗ ММЦ им. Н.И. Пирогова ФМБА России	51000	(коды не присвоены)	

МЕДИЦИНСКОЕ СВИДЕТЕЛЬСТВО О СОСТОЯНИИ ЗДОРОВЬЯ

Seafarer Information 7800-0000-2801

Информация о моряке (лице, работающем на судне)

Surname: Nikitin	First name: Oleg
Фамилия	Имя

Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 2. Идентификационный номер моряка в медицинском свидетельстве о состоянии здоровья

Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 3. Результаты формирования регистра медицинских освидетельствований моряков в МО ФМБА России в СЗФО

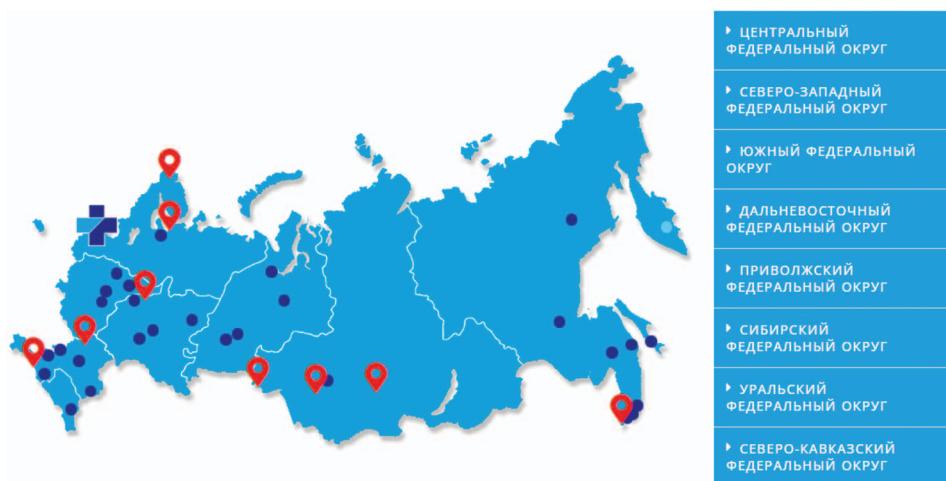


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 4. Схематичное расположение 35 медицинских организаций ФМБА России, занимающихся медицинским обеспечением плавсостава

Рост Height	175	Вес Weight	95	Индекс массы тела BMI	31,0
Резус-фактор крови Blood Rh factor	B Rh+			Флюорография или рентгенография легких X-ray results	Патологические изменения в легких не выявлены
Группа крови Blood group				дата date	
Врач-профилактик Occupational physician	E66,0	Врач-терапевт Primary care physician	E66,0	Врач-нейролог Neurologist	Z10,0
Врач-кардiрг Surgeon	Z10,0	Врач-дерматовенеролог STD and skin specialist	Z10,0	Врач-уролог/ врач-акушер- гинеколог Urologist/ Obstetrician gynecologist	Z10,8
Врач-офтальмолог Ophthalmologist	Z10,0	Правый глаз (острота зрения в условных единицах) Right eye (visual acuity in conventional units)	1,0	Левый глаз (острота зрения в условных единицах) Left eye (visual acuity in conventional units)	1,0
Без очков Without glasses					Аномалии цветового зрения Anomalies of color vision
В очках Wearing glasses					Дата последнего тестирования цветового зрения (число, месяц, год) (Date of last colour vision test (date, month, year))
Врач-оториноларинголог Otorhinolaryngologist	Z10,0	Правое ухо (острота слуха в децибелах) Right ear (hearing acuity in decibels)	6.0	Левое ухо (острота слуха в децибелах) Left ear (hearing acuity in decibels)	6.0
Речь шёпотом Whispering					
Общая речь Ordinary speech					
Медицинские противопоказания к работе на судне					
отсутствует					

Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 5. Состав медицинских данных Регистра медицинских освидетельствований моряков

За период 2022–2023 гг. обработано 38 993 сведений о медицинских освидетельствованиях моряков (табл. 1). Работа целенаправленно продолжается: по итогам I квартала 2024 года всеми МО проведено еще 9504 освидетельствования, при этом общее количество членов плавсостава в регистре достигло 39 333 человека. Следует отметить, что данные о численности плавсостава

являются предварительными, изменяются динамически и требуют дополнительной выверки со сведениями от медицинских организаций, что связано с техническими ошибками заполнения в датах рождения, номерах СНИЛС и ряде других документов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Необходимость воссоздания единой системы медицинского обслуживания плавсостава определена основополагающим документом в области национальной морской политики — Морской доктрины Российской Федерации [10]. В условиях изменившегося геополитического ландшафта на государственный уровень вынесено развитие морской медицины, при этом основная роль в этом процессе доверена Федеральному медико-биологическому агентству.

Систематизация персональных данных контингента по всем 35 медицинским организациям, осуществляющим медицинское обеспечение плавсостава, использование типовых эффективных инструментов, погруженных в единый информационный контур ФМБА России, развитие единого информационного ресурса составит основу для дальнейшего совершенствования научных подходов к организации и развитию морской и водолазной медицины в Российской Федерации.

Таким образом, внедрение единой информационной системы в структуре медицинских учреждений ФМБА является важным этапом на пути реализации Морской доктрины Российской Федерации в вопросах медицинского обеспечения моряков, в полной мере соответствует требованиям Конвенции Международной организации труда.

Таблица 1. Показатели общего регистра медицинских освидетельствований моряков

№ п/п	Показатель	Значение, ед.
1	Количество медицинских организаций в Регистре медицинских организаций и на сайте морской медицины	35
2	Количество полей данных в Регистре по одному моряку — персональных и медицинских	32 + 60
3	Количество медицинских освидетельствований моряков в Регистре:	
3.1	За 2022 год (сведения от 20% медицинских организаций за полугодие)	9949
3.2	За 2023 год (сведения от 100% медицинских организаций к концу года)	29 044
3.3	Общее за 2022–2023 годы	38 993

Таблица подготовлена авторами по собственным данным

Литература / References

1. Мосягин ИГ, Казакевич ЕВ, Бойко ИМ. Роль и место морской медицины в Российском здравоохранении. *Морская медицина*. 2019;5(1):17–29
Mosyagin IG, Kazakevich EV, Kvetnoy IM. The role and place of Maritime medicine in healthcare in Russia. *Marine medicine*. 2019;5(1):17–29 (In Russ.).
<https://doi.org/10.22328/2413-5747-2019-5-1-17-27>
2. 94th session International Labour Organization. Maritime Labour Convention of 2006 on work in sea navigation. Geneva; 2006.
3. Бумай ОК, Иванченко АВ, Абакумов АА и др. Подготовка нормативно-правовой базы системы медико-санитарного обслуживания плавсостава морских и речных судов: анализ проблемы, предложения и перспективы. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2017;59(1):65–77.
Bumaj OK, Ivanchenko AV, Abakumov AA, et al. Legal framework preparation of the medical and sanitary services provided to the crew personnel at sea and river crafts: the analysis of problems, suggestions and opportunities. *Extreme Medicine*. 2017;59(1):65–77 (In Russ.).
EDN: [YHCZDN](#)
4. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 29н «Об утверждении порядка проведения обязательных предварительных и периодических медицинских осмотров работников, предусмотренных частью четвертой статьи 213 Трудового кодекса Российской Федерации, перечня медицинских противопоказаний к осуществлению работ с вредными и (или) опасными производственными факторами, а также работам, при выполнении которых проводятся обязательные предварительные и периодические медицинские осмотры». М.: Министерство здравоохранения; 28.01.2021.
Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 29n "On approval of the procedure for conducting mandatory preliminary and periodic medical examinations of employees provided for in Part Four of Article 213 of the Labor Code of the Russian Federation, the list of medical contraindications to work with harmful and (or) hazardous production factors, as well as work during the performance of which mandatory preliminary and periodic medical examinations are carried out". Moscow: Ministry of Health; 28.01.2021 (In Russ.).
5. Постановление Правительства Российской Федерации № 742 «Об утверждении перечня заболеваний, препятствующих работе на морских судах, судах внутреннего плавания, а также на судах смешанного (река — море) плавания». М.: Правительство Российской Федерации; 24.06.2017.
Resolution of the Government of the Russian Federation No. 742 "On approval of the list of diseases that prevent work on sea vessels, inland navigation vessels, and mixed (river-sea) navigation vessels". Moscow: Government of the Russian Federation; 24.06.2017 (In Russ.).
6. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 714н «Об утверждении Порядка проведения медицинского осмотра на наличие медицинских противопоказаний к работе на судне, включающего в себя химико-токсикологические исследования наличия в организме человека наркотических средств, психотропных веществ и их метаболитов, и формы медицинского заключения об отсутствии медицинских противопоказаний к работе на судне». М.: Министерство здравоохранения; 01.11.2022.
Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 714n "On approval of the Procedure for conducting a medical examination for the presence of medical contraindications to work on a vessel, including chemical and toxicological studies of the presence of narcotic drugs, psychotropic substances and their metabolites in the human body, and the form of a medical report on the absence of medical contraindications to work on a vessel". Moscow: Ministry of Health; 01.11.2022. (In Russ.).
7. Воронкова СВ, Абакумов АА, Торшин ГС, Малинина СВ, Андрусенко АН, Грабский ЮВ. Нормативно-правовые основы создания и функционирования центров охраны здоровья моряков в Российской Федерации. *Медицина труда и промышленная экология*. 2023;63(9):586–95.
Voronkova SV, Abakumov AA, Torshin GS, Malinina SV, Andrusenko AN, Grabskii YuV. Regulatory and legal bases for the establishment and functioning of seafarers' health protection centers in the Russian Federation. *Russian Journal of Occupational Health and Industrial Ecology*. 2023;63(9):586–95 (In Russ.).
<https://doi.org/10.31089/1026-9428-2023-63-9-586-595>
8. Баранкина ТА, Фетисов АО, Валеева РМ, Курбанова СН, Якименко ОН. Организация медицинского обслуживания плавсостава речного флота. *Российский медицинский журнал*. 2020;26(5):283–91.
Barankina TA, Fetisov AO, Valeeva RM, Kurbanova SN, Yakimenko ON. Medical care provided for the river fleet shipboard crews. *Russian Medicine*. 2020;26(5):283–91 (In Russ.).
<https://doi.org/10.17816/0869-2106-2020-26-5-283-291>
9. Мосягин ИГ, Попов АМ, Чирков ДВ. Морская доктрина России — в приоритете человек. *Морская медицина*. 2015;1(3):5–12.
Mosyagin IG, Popov AM, Chirkov DV. The Navy doctrine of Russia: Humans are the priority. *Marine medicin*. 2015;1(3):5–12 (In Russ.).
EDN: [WIMWXR](#)
10. Указ Президента Российской Федерации № 512 «Об утверждении Морской доктрины Российской Федерации». М.: Правительство Российской Федерации; 31.07.2022.
Decree of the President of the Russian Federation No. 512 "On approval of the Maritime Doctrine of the Russian Federation". Moscow: Government of the Russian Federation; 31.07.2022 (In Russ.).

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Т.В. Яковлева — разработка концепции и дизайна исследования, общее руководство; О.Ю. Туренко — разработка концепции и дизайна исследования, редактирование и написание рукописи; В.М. Колабутин — разработка концепции исследования; В.А. Ратников — обработка и интерпретация результатов, редактирование и написание рукописи; Г.М. Орлов — сбор материала, обработка и интерпретация результатов; С.С. Москаleva — сбор материала, обработка и интерпретация результатов; В.П. Горелов — написание рукописи.

ОБ АВТОРАХ

Яковлева Татьяна Владимировна, д-р. мед. наук
yakovleva_tv@fmbo.gov.ru

Туренко Ольга Юрьевна, канд. мед. наук
<https://orcid.org/0000-0003-0056-495X>
turenkoou@fmbo.gov.ru

Колабутин Валерий Михайлович, канд. физ.-мат. наук
<https://orcid.org/0009-0004-6437-667X>
vkolabutin@gmail.com

Ратников Вячеслав Альбертович, д-р мед. наук,
<https://orcid.org/0000-0002-9645-8408>
ratnikov@med122.ru

Орлов Геннадий Михайлович, канд. физ.-мат. наук,
<https://orcid.org/0000-0002-6281-0151>
orlov@med122.ru

Москалев Светлана Сергеевна
<https://orcid.org/0000-0003-1563-5255>
moss261966@gmail.com

Горелов Виктор Павлович, канд. мед. наук
<https://orcid.org/0000-0003-4829-7029>
vgorelov@gmail.com



ПЕРСПЕКТИВЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ МИНИМАЛЬНЫХ ТРАВМ И ПОВРЕЖДЕНИЙ КРУПНЫХ СУСТАВОВ У НЕСОВЕРШЕННОЛЕТНИХ СПОРТСМЕНОВ: СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ

И.В. Зябкин^{1,2,3}, И.В. Панкратов^{1✉}, М.А. Петров¹, М.И. Габаев¹, Р.А. Кешишян¹, В.В. Хижникова¹, А.М. Ковалькова¹

¹Федеральный научно-клинический центр детей и подростков ФМБА России, Москва, Россия

²Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия

³Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Введение. Подавляющее большинство современных видов спорта оказывают значительную нагрузку на опорно-двигательный аппарат (ОДА). Постоянно растущая популярность спорта среди несовершеннолетних детей, их активное участие в различных соревнованиях и тренировках создают повышенный риск получения спортивных травм, особенно минимальных повреждений и травм крупных суставов. Множество работ посвящено клинико-диагностическим и терапевтическим методам, применяющимся при травмах ОДА, однако лишь незначительная их часть касается именно детского спортивного травматизма.

Цель. Оценка существующих методов диагностики и терапии минимальных травм и повреждений крупных суставов у несовершеннолетних спортсменов для выбора наиболее перспективных и эффективных из них.

Обсуждение. Рассмотрены основные причины и механизмы травм, проведена систематизация типов травм в зависимости от вида спорта, выполнен анализ имеющихся современных методов клинико-инструментального исследования и инновационных методов терапии. Выяснено, что наиболее перспективным малоинвазивным методом биотерапии травм и повреждений ОДА, особенно в аспекте применения в детской и подростковой группе спортсменов, является PRP-терапия (терапия богатой тромбоцитами плазмой). Данный метод позволяет существенно восстанавливать анатомическую целостность поврежденных элементов, купировать болевой синдром в покое, при физической нагрузке и в стресс-тесте с возможностью сохранения функции травмированного сустава и реабилитации в кратчайшие сроки. PRP-терапия представляет собой альтернативу традиционным методам лечения, открывая новые горизонты в регенеративной и спортивной медицине.

Выводы. Комплексный персонализированный подход, объединяющий клинический осмотр и инструментальные исследования, является ключевым в обеспечении точности и объективности оценки состояния здоровья юных спортсменов; он позволяет выявить заболевания на ранней стадии, провести дифференциальную диагностику и оценить эффективность лечения с учетом особенностей педиатрической практики.

Ключевые слова: спортивная медицина; детские спортивные травмы; терапия минимальных травм и повреждений крупных суставов; PRP-терапия; несовершеннолетние спортсмены

Для цитирования: Зябкин И.В., Панкратов И.В., Петров М.А., Габаев М.И., Кешишян Р.А., Хижникова В.В., Ковалькова А.М. Перспективы диагностики и лечения минимальных травм и повреждений крупных суставов у несовершеннолетних спортсменов: современные представления. Медицина экстремальных ситуаций. 2024;26(4):104–113. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-104-113>

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания № 124022800121-3, тема НИР «PRP-терапия при травмах и заболеваниях крупных суставов у юниоров спортивных сборных команд Российской Федерации»; шифр темы «PRP-терапия при травмах»; код — 83.002.24.800.

Благодарности: ученному секретарю ФГБУ «ФНКЦ детей и подростков ФМБА России» Мухорты Валерию Алексеевичу за сопровождение написания и подачи рукописи для публикации.

Потенциальный конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

✉ Панкратов Иван Владимирович pankratov@kidsfmba.ru

Статья поступила: 13.09.2024 **После доработки:** 18.11.2024 **Принята к публикации:** 19.11.2024

PROSPECTS FOR DIAGNOSIS AND TREATMENT OF MINIMAL TRAUMA AND INJURY OF LARGE JOINTS IN UNDERAGE ATHLETES: A REVIEW

Ilya V. Zyabkin^{1,2,3}, Ivan V. Pankratov^{1✉}, Mikhail A. Petrov¹, Murat I. Gabayev¹, Razmik A. Keshishyan¹, Victoria V. Khizhnikova¹, Aleksandra M. Kovalkova¹

¹Federal Scientific and Clinical Center for Children and Adolescents of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russia

²Russian State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

³Russian Medical Academy of Continuous Professional Education

Introduction. The vast majority of modern sports exert a significant load on the musculoskeletal system (MSS). The ever-growing popularity of sports among underage children, their active participation in various competitions and trainings impose an increased risk of sports injuries, particularly minimal trauma and injury of large joints. Although numerous works have addressed the development of clinical diagnostic and therapeutic methods used for MSS injuries, there is a lack of publications on sports injuries in underage athletes.

Objective. Evaluation of current methods for diagnosis and therapy of minimal trauma and injury of large joints in underage athletes with the purpose of selecting the most promising and effective methods.

Findings. The main causes and mechanisms of injuries are considered. Such injuries are generalized depending on the sports type. A review of available methods for clinical and instrumental research and innovative therapeutic methods is carried out. Platelet-rich plasma therapy (PRP) was found to be the most promising minimally-invasive biotherapy for MSS injuries, particularly with respect to children and adolescent athletes. This method restores the anatomical integrity of damaged elements and relieves pain at rest, during physical exertion, and in a stress test with the possibility of preserving the function of the injured joint and rehabilitation in the shortest possible time. PRP therapy is an alternative to conventional treatment methods, offering new prospects in regenerative and sports medicine.

Conclusions. A comprehensive personalized approach combining clinical examination and instrumental studies is key to ensuring the accuracy and objectivity of the health status of young athletes. Such an approach allows diseases to be identified at an early stage, differential diagnosis to be conducted, and treatment efficacy to be evaluated, taking the specifics of pediatric practice into account.

© И.В. Зябкин, И.В. Панкратов, М.А. Петров, М.И. Габаев, Р.А. Кешишян, В.В. Хижникова, А.М. Ковалькова, 2024

Keywords: sports medicine; pediatric sports injuries; therapy of minimal trauma and injury of large joints; PRP therapy; underage athletes

For citation: Zyabkin IV., Pankratov I.V., Petrov M.A., Gabayev M.I., Keshishyan R.A., Khizhnikova V.V., Kovalkova A.M. Prospects for diagnosis and treatment of minimal trauma and injury of large joints in underage athletes: A review. *Extreme Medicine.* 2024;26(4):104–113. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-104-113>

Funding: the research was carried out within the state assignment (theme No. 124022800121-3; code 83.002.24.800).

Acknowledgments: the authors express their gratitude to Valery Mukhortykh, Scientific Secretary of the Federal Scientific and Clinical Center for Children and Adolescents of the FMBA, for assistance in preparing the manuscript for publication.

Potential conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

✉ Ivan V. Pankratov pankratov@kidsfmiba.ru

Received: 13 Sep. 2024 **Revised:** 18 Nov. 2024 **Accepted:** 19 Nov. 2024

ВВЕДЕНИЕ

Подавляющее большинство современных видов спорта оказывает значительную нагрузку на опорно-двигательный аппарат (ОДА). При этом частота различных заболеваний ОДА среди спортсменов намного выше, чем среди населения в целом [1]. Так, распространенность травм в результате занятия спортом среди детей в возрасте от 5 до 17 лет составляет порядка 35,8% [2].

Постоянно растущая популярность спорта среди несовершеннолетних, их активное участие в различных соревнованиях и тренировках создают повышенный риск получения спортивных травм, особенно минимальных повреждений и травм крупных суставов [3]. Эти травмы, несмотря на кажущуюся легкость, могут иметь серьезные последствия для спортивной карьеры юного спортсмена, если не проводить своевременную и адекватную диагностику и терапию существующих изменений, особенно на ранних этапах.

Точная диагностика и рационально подобранная тактика ведения пациента с повреждениями и травмами крупных суставов являются ключевыми факторами для достижения максимальной эффективности лечебных мероприятий [4]. Множество работ посвящено клинико-диагностическим и терапевтическим методам при травмах ОДА, однако только незначительное количество их касается именно детского спортивного травматизма [1, 4]. Для формирования комплексного представления о модификациях протоколов ведения несовершеннолетних спортсменов при получении травм ОДА представляется целесообразным системное изучение существующих методов клинико-инструментального обследования, современных и инновационных методик лечения минимальных травм и повреждений.

Цель работы: оценка современных методов диагностики и терапии минимальных травм и повреждений крупных суставов у несовершеннолетних спортсменов для выбора наиболее перспективных и эффективных.

ОБСУЖДЕНИЕ

Общие представления о спортивной травме

Спортивные травмы, нередко являющиеся следствием интенсивных тренировок и соревновательной нагрузки, могут иметь серьезные последствия для спортсменов. Они не только нарушают тренировочный и соревновательный процессы, но и зачастую приводят к длительной реабилитации, нередко сопровождающейся временным

или постоянным ограничением физической активности. В тяжелых случаях спортивные травмы могут стать причиной преждевременного завершения спортивной карьеры и даже привести к инвалидизации, значительно ухудшая качество жизни спортсменов [5].

Травмы, полученные в результате занятий спортом, характеризуются разнообразием механизмов возникновения и зависят от анатомо-физиологических особенностей ребенка и вида спорта, которым он занимается.

Консенсусная группа Международного олимпийского комитета по эпидемиологии травм и заболеваний определяет спортивную травму как «повреждение тканей или другое нарушение нормальной физической функции, вызванное занятиями спортом, возникающее в результате быстрой или повторяющейся передачи кинетической энергии» [6].

Успешное лечение спортивных травм зависит от точной диагностики, которая учитывает ряд ключевых факторов: время возникновения (остро возникшее повреждение или травма, вызванная чрезмерной нагрузкой), тип поврежденной ткани (сухожилие, мышца, хрящ, кость) и степень тяжести травмы (перелом без смещения или со смещением) [7].

При острой травме пациент отчетливо помнит время, место, причину и обстоятельства ее возникновения в отличие от повреждений, связанных с чрезмерным перенапряжением. К наиболее распространенным острым травмам относят растяжение и повреждение связок (разрыв), вывихи суставов и переломы. Травмы от перенапряжения, напротив, развиваются постепенно в результате повторяющихся микротравм, возникающих при чрезмерной и повторяющейся нагрузке. Особенностью таких травм является постепенное проявление симптомов, а основной принцип заключается в том, что повторяющиеся микротравмы перегружают способность тканей к самовосстановлению, что особенно актуально в детской практике, учитывая функциональную незрелость тканей, органов и систем детского организма и меньшую устойчивость к нагрузкам [8].

Повышение уровня тренировочных нагрузок, высокий уровень конкуренции в спорте и требований, предъявляемых к ребенку, приводят к тому, что спортивные травмы занимают ведущее место в структуре заболеваемости юных спортсменов. В работах J.S. Brenner et al. показано, что травмы от перенапряжения и эмоциональное выгорание ребенка являются двумя основными причинами завершения спортивной карьеры [9].

Понимание механизмов возникновения травмы играет важную роль в диагностике и лечении, так как помогает

понять процессы, возникшие во время получения травмы, для последующего выбора тактики обследования пациента и своевременного определения критериев лечения (консервативного/оперативного) [10].

Понимание всех аспектов возникновения спортивной травмы с учетом половозрастных особенностей и вида спорта, а также частоты травматизма и вероятности получения острой травмы или травмы в результате перенапряжения играет важную роль в формировании персонализированного подхода к ведению спортсменов, включая разработку комплекса превентивных мероприятий. Для системной оценки спортивных травм необходима дифференциация по локализации анатомического сегмента и по типу поврежденной ткани травмы (связка, мышца, кость). Например, травмы области бедра/колена: ушиб мышцы, синдром мышечного компартмента, тендинопатия, разрыв сухожилия. Большинство детских травм, связанных с чрезмерной нагрузкой, затрагивают нижние конечности, особенно колени, лодыжки и ступни, а также включают повреждения мышц и сухожилий [11]. Травмы от чрезмерных нагрузок (в сравнении с острыми) примерно в 2 раза чаще отмечены в коленном суставе, в то время как острые травмы примерно в 3 раза чаще возникают в голеностопном суставе [12].

По данным исследования из Шеффилда, коленный сустав наиболее часто подвергается травматизации в таких видах спорта, как футбол и регби [13]. При этом автор особое внимание уделяет оценке, лечению и реабилитации нестабильности коленного сустава и сложностям, с которыми сталкивается лечащий врач при ведении молодых и активных пациентов. В работе других авторов отмечено, что распространенность тендинопатии надколенника (симптомокомплекса «колена прыгуна») у спортсменов составляет примерно 14%, при этом частота рецидивов достигает 45% у волейболистов и 32% у баскетболистов [14]. В исследовании R. Bahr показано, что от 29 до 44% элитных волейболистов, выполняющих более 500 прыжков в неделю, сообщают о симптомах «колена прыгуна» [15]. В структуре спортивного травматизма повреждения голеностопного сустава достигают 10–12% всех повреждений опорно-двигательной системы и 20–25% всех спортивных повреждений нижних конечностей.

По данным S. Sobhani et al., самой распространенной травмой в футболе, связанной с чрезмерным перенапряжением, является тендинопатия ахиллова сухожилия. Это может быть объяснено тем, что данный вид спорта

включает в себя бег и прыжки [16]. Наиболее распространенные травмы ОДА в результате перенапряжения представлены в таблице 1.

Современные методы диагностики минимальных травм и повреждений крупных суставов у детей

Ключевым фактором успешного восстановления спортсмена после получения травм ОДА является комплексное и динамичное клинико-инструментальное обследование [3, 16, 18], позволяющее не только диагностировать степень повреждения, но и отслеживать прогресс реабилитации в динамике. Внедрение в клиническую практику инструментальных методов исследования существенно расширило возможности ранней диагностики [3, 16].

Своевременная и правильная диагностика позволяет определить степень повреждения, адекватные методы лечения и реабилитации, что, в свою очередь, способствует скорейшему возвращению спортсмена к прежней физической активности и профессиональным нагрузкам [19].

Наиболее частыми повреждениями ОДА у квалифицированных, включая несовершеннолетних, спортсменов являются так называемые малые повреждения [20]: ушибы, растяжения, хронические микротравмы, дегенеративно-дистрофические процессы и др. Большая часть таких повреждений являются проявлениями перетренированности либо незначительными спортивными травмами, не требующими специализированной диагностики и лечения.

Однако нередко под маской малых повреждений могут скрываться начальные проявления более значимых повреждений и патологических состояний (спондилолистез, протрузии и грыжи дисков, миотензопатии, апофизеолизы замыкательных колец тел позвонков, недиагностированные повреждения позвоночника и др.), которые при отсутствии вовремя начатого лечения могут приводить к более серьезным проблемам со здоровьем спортсмена. Сложность диагностики малых повреждений ОДА состоит в их скучной и неспецифической симптоматике. Спортсмены предъявляют жалобы на дискомфорт в области повреждений или слабо выраженный болевой синдром без четкой локализации. Как правило, должного значения таким «жалобам» не уделяется, а их дискомфорт относят к реакции на тренировочные нагрузки, перетренированность и др. Более сложная ситуация в данном аспекте складывается с несовершеннолетними

Таблица 1. Травмы опорно-двигательного аппарата в результате перенапряжения

Ткань	Тип травмы	Примеры в спорте
Мышцы/фасции	Синдром хронического компартмента; Отсроченная мышечная болезненность (DOMS); Фасциит	Илиотибиональный синдром при беге
Сухожилие	Тендинопатия (включает паратенонит, теносиновит, тендиноз и тендинит)	Тендинопатия ахиллова сухожилия у футболистов; Тендиноз надколенника в волейболе («колено прыгуна»)
Сустав	Синовит; Травмы верхней губы; Хондропатия; Травмы внутренних структур сустава	Поражения передне-верхне-заднего отдела губы плечевого сочленения (SLAP) у спортсменов, занимающихся метанием (бейсбол, крикет); Повреждения внутренних структур коленного сустава (бег, прыжки)
Связочный аппарат	Хроническая дегенерация/микроразрывы	Травма коллатеральной локтевой связки в бейсболе
Кость	Стressовая реакция, стрессовый перелом; Остеит, периостит; Апофизит	Стрессовый перелом плюсневой кости при беге и в балете; Синдром напряжения медиальной большеберцовой кости в беге и танцах; Поражение Осгуда — Шлаттера; Стрессовый перелом

Таблица подготовлена авторами по данным [21]

спортсменами ввиду специфики сбора и интерпретации жалоб в педиатрической практике, что требует более тщательного подхода к опросу юного пациента лечащим врачом. Другой диагностической проблемой является низкая чувствительность и специфичность стандартных травматолого-ортопедических тестов к ряду малых повреждений ОДА. Такие тесты по большей части ориентированы на оценку пассивного объема движений, активное функционирование опорно-двигательного аппарата спортсмена и не ассоциированы с конкретным видом спорта, что ограничивает их клиническую значимость и применение [21].

Малые повреждения проявляются, как правило, при выполнении специфических активных движений, характерных для определенных видов спорта, которые зачастую невозможно воспроизвести в условиях стандартного клинического осмотра.

Учитывая частоту встречаемости малых травм и повреждений ОДА, в том числе у несовершеннолетних спортсменов, требуется системный подход в клинико-диагностическом обследовании с тщательным сбором жалоб и анамнеза, что позволит своевременно диагностировать имеющуюся патологию и разработать персонифицированный подход к ведению лечения.

В работе M. Dietvorst описаны особенности диагностики повреждений передней крестообразной связки у детей и подростков и подтверждена диагностическая ценность сбора анамнеза, физического осмотра и проведенной артроскопии [22]. В своем исследовании D. Endele показал достаточную эффективность стандартных клинических, рентгенологических и ультразвуковых методов диагностики для первичного выявления переломов и повреждений связок голеностопного сустава у детей [23].

Тщательный сбор анамнеза является незаменимым инструментом для диагностики повреждений ОДА, который позволяет не только выявить механизм травмы, но и сделать заключение о предполагаемом типе повреждения, а также определить наиболее целесообразные направления дальнейшего обследования и лечения.

Болевой синдром может носить диффузный или локальный характер. При определении интенсивности боли наиболее часто, в том числе в травматологической практике, используют визуальную аналоговую шкалу боли (ВАШ) — A Visual Analogue Scale (VAS) [24].

Физикальное обследование включает осмотр сустава на предмет припухлости и его пальпацию на предмет болезненности. При этом оценивается ряд факторов: местная температура, болезненность, флюктуация, расстройства чувствительности (гиперестезия, гипостезия, анестезия), тургор тканей, состояние кожи и мышц, отечность тканей, крепитация отломков, баллотирование надколенника, подвижность сухожилий. Пальпаторно диагностируется крепитирующий и стенозирующий паратенонит, «щелкающий сустав», «лопаточный хруст». Кроме того, проводят измерение длины и окружности конечности, определяют амплитуду ее движений.

Рентгенологические исследования значительно расширяют диагностические возможности, позволяя получить данные, которые нельзя выявить обычными клиническими методами.

В современной клинической практике предпочтение отдается высокинформативным методам исследования. В качестве основных из них для визуализации костных и хрящевых структур в настоящее время используются ультразвуковое исследование (УЗИ),

магнитно-резонансная томография (МРТ) и мультиспиральная компьютерная томография (МСКТ) [3, 16].

Авторы, акцентируя внимание на визуализации, поясняют, что первоочередными при диагностике травм и повреждений ОДА являются рентгенография, ультразвуковое исследование и возможно расширение спектра применяемых методов (при необходимости) [25].

Достаточно высокой точностью для диагностики внутрисуставных повреждений обладает УЗИ суставов. При этом исследовании коленного сустава наиболее часто выявляемыми являются повреждения внутреннего и наружного менисков.

В работе, посвященной скрытым внутрисуставным травмам коленного сустава у детей, показана необходимость использования МРТ-диагностики для установления диагноза при отсутствии или минимальном количестве рентгенологических данных [26].

В некоторых исследованиях сделан акцент на значимости магнитно-резонансной томографии в диагностике повреждений связочного аппарата коленного сустава у детей [27].

МРТ обладает высокой мягкотканной контрастностью и позволяет проводить исследование в любых плоскостях с учетом анатомических особенностей пациента (включая трехмерные изображения). Более того, МРТ является единственным методом неинвазивной диагностики, обладающим высокой чувствительностью и специфичностью при выявлении отека и инфильтрации костной ткани. Так, например, данным методом могут быть обнаружены даже минимальные повреждения менисков, в том числе и в педиатрической практике. МРТ-диагностика позволяет врачу установить точный диагноз и назначить соответствующее лечение.

Таким образом, современная диагностика спортивных травм опирается на комплексный подход, включающий сбор анамнеза, который определяет характер травмы, обстоятельства ее получения, длительность течения (острая или хроническая), клинический осмотр (с проведением провокационных тестов), а также дополнительные методы обследования (КТ, МРТ, УЗИ, рентгенографию поврежденных сегментов конечности и стандартные лабораторные исследования, такие как клинический и биохимический анализ крови). При травмах и повреждениях ОДА у детей, применяя общие подходы к ведению пациентов, необходимо особое внимание уделять сбору жалоб и анамнеза, так как недостаток информации или неверная ее интерпретация могут являться причиной неправильного диагноза и, как следствие, неверно выбранной тактики обследования и лечения.

Терапия минимальных травм и повреждений крупных суставов у детей

Методы лечения и время, затраченное на лечение (консервативное или оперативное), определяются конкретным вариантом травмы сегмента (какая ткань повреждена, степень ее повреждения), возрастом юного спортсмена и видом спорта, которым он занимается.

К наиболее частым спортивным травмам, не требующим специализированной медицинской помощи, относятся поверхностные травмы, а именно: ушибы мягких тканей, растяжения, разрывы связочного аппарата, повреждения суставов.

Первый этап лечения спортивных травм у детей основан на протоколе Р.Р.И.С.Е и/или Р.И.С.Е: защита (Protection),

покой (Rest), лед (Ice), компрессия (Compression), возвышенное положение (Elevation) (PRICE). При этом под Protection понимается ограничение или исключение нагрузки при помощи костылей, трости, частичная иммобилизация травмированной области с помощью повязки, шины или бандажа; Rest предусматривает ограничение движений, «относительный отдых», когда исключаются действия, которые нагружают травмированную область до такой степени, что возникает боль, или которые могут замедлить или предотвратить заживление; Ice — криотерапия при острых травмах для уменьшения отека и болевого синдрома; Compression включает использование компрессионной повязки — эластичного бинта для легкой поддержки поврежденной ткани; под Elevation понимают размещение поврежденной области выше уровня сердца с целью уменьшения скопления жидкости в поврежденной конечности или суставе и, как следствие, снижения уровня боли [28].

PRICE является основой лечения острых травм мягких тканей, пропагандируя консервативный подход в течение первых 24–48 часов после травмы. Целью этого протокола является минимизация кровотечения, уменьшение отека и облегчение дискомфорта в месте травмы, что потенциально ускоряет процесс восстановления [28]. Научные открытия и достижения в клинической практике позволили предположить, что PRICE не может быть универсальным подходом для всех сценариев лечения травм [29, 30].

Новые данные подтверждают использование более активных стратегий восстановления, основанных на следующих принципах: движение, упражнения, обезболивание, лечение (MEAT — Movement, Exercise, Analgesia, Treatment); защита, оптимальная нагрузка, лед, сжатие, подъем (POLICE — Protection, Optimal Loading, Ice, Compression, Elevation) и защита, подъем, отсутствие противовоспалительных средств, компрессия, обучение и нагрузка, оптимизм, вакуляризация и упражнения (PEACE and LOVE — Protection, Elevation, Avoid anti-inflammatory, Compression, Education and Load, Optimism, Vascularisation, and Exercise) [31, 32]. Таким образом, вышеперечисленные принципы подчеркивают важность ранней двигательной активности, индивидуальных упражнений и комплексного ухода для улучшения заживления и функционального восстановления, однако основополагающие элементы PRICE по-прежнему сохраняют свою ценность, особенно при оказании экстренной помощи после травм [33].

Различные методы лечения направлены на восстановление анатомической целостности и функциональности суставов, минимизацию болевого синдрома, предотвращение развития осложнений и хронических заболеваний суставов и (самое главное) на обеспечение безопасного и скорейшего возвращения к занятиям спортом.

В современной клинической практике выделяют следующие методы лечения минимальных травм и повреждений крупных суставов:

1. Консервативное лечение

- Иммобилизация сустава: фиксация сустава с помощью гипса, ортезов или бандажей, которая необходима для стабилизации сустава и предотвращения дальнейшего его повреждения [34].
- Фармакотерапия: включает в себя применение обезболивающих, противовоспалительных и других препаратов для купирования болевого синдрома и уменьшения воспалительного процесса. Медикаментозная

терапия может быть эффективной при легких повреждениях, но не всегда может полностью устраниć симптомы. Кроме того, некоторые препараты могут иметь побочные эффекты, такие как аллергические реакции и желудочно-кишечные расстройства [35, 36].

- Комплексная медицинская реабилитация, включающая восстановительные программы: лечебную физкультуру (комплекс упражнений, направленный на восстановление амплитуды движения в суставах, силы мышц, координации движений и равновесия), массаж, физиотерапевтические процедуры (для уменьшения воспаления, снятия боли и ускорения процесса реабилитации) [37].

Консервативное лечение минимальных травм и повреждений крупных суставов у несовершеннолетних спортсменов имеет ряд преимуществ: оно неинвазивно, не требует хирургического вмешательства, что снижает риск послеоперационных осложнений, инфекций и рубцевания тканей, а также характеризуется минимальным риском (по сравнению с операцией консервативное лечение менее рискованно для молодых спортсменов, особенно в периоды активного роста) и экономичностью. Однако консервативное лечение имеет ряд ограничений: оно может быть недостаточно эффективным при тяжелых повреждениях, требует длительного периода восстановления и повышает риск развития хронической нестабильности, что может привести к повторным травмам. Таким образом, консервативное лечение является перспективным методом лечения минимальных травм и повреждений крупных суставов у несовершеннолетних спортсменов, однако в ряде случаев может потребоваться хирургическое вмешательство [38].

2. Оперативное лечение

Хирургическое вмешательство применяется при тяжелых повреждениях, требующих восстановления целостности связок, хрящей или костей, а также для стабилизации суставов. Показаниями к оперативному вмешательству служат полный или частичный разрыв связок, не поддающиеся консервативному лечению, переломы костей сустава, требующие фиксации фрагментов, а также воспалительные процессы, которые не поддаются консервативному лечению, хрящевые дефекты, вызывающие боль, ограничение подвижности и угрожающие разрушению суставной поверхности, постоянные вывихи или подвывихи, не поддающиеся консервативной терапии [39]. Оперативное вмешательство позволяет восстановить анатомию сустава и обеспечить его стабильность (что необходимо для восстановления функции и предотвращения повторных травм), уменьшить болевой синдром, улучшить подвижность сустава и повысить качество жизни спортсмена. К недостаткам данного лечения относят риск осложнений и длительный период реабилитации.

Таким образом, операции при травмах суставов у спортсменов, включая несовершеннолетних, являются серьезным вмешательством, которое требует тщательного планирования и индивидуального подхода.

3. Малоинвазивные методы (внутрисуставные инъекции)

PRP-терапия (Platelet Rich Plasma) — это инновационный метод лечения, который активно применяется в различных областях медицины, особенно в ортопедии и спортивной медицине [40, 41]. Данный метод основан

на использовании аутологичной (собственной) плазмы крови пациента, обогащенной тромбоцитами [40]. Тромбоциты содержат факторы роста, которые стимулируют регенерацию тканей, ускоряют заживление и способствуют восстановлению после травм или операций [41]. Одним из главных преимуществ PRP-терапии является быстрое восстановление после процедуры [40, 41]. Пациенты могут вернуться к спортивным нагрузкам уже через несколько дней после проведения данной процедуры. Кроме того, PRP может помочь улучшить кровообращение и обмен веществ в тканях сустава, что также способствует их восстановлению. Этот метод является безопасным, что связано с минимальным риском аллергических заболеваний. Немаловажно, что состав PRP может быть адаптирован под индивидуальные потребности пациента. Это делает данный метод универсальным для различных видов травм и заболеваний. Кроме того, в настоящее время имеется возможность использования PRP в профессиональном спорте, несмотря на содержание в составе ростовых факторов, которые самостоятельно рассматриваются в качестве допинга и в соответствии с решением Антидопингового агентства являлись причиной сдерживания применения PRP до 2011 года в спортивной медицине при повреждении мышц [42].

Таким образом, существует несколько вариантов терапии травм ОДА, при этом выбор конкретного метода зависит от вида поврежденной ткани, характера и степени тяжести повреждения, возраста спортсмена и вида спорта, а также от типа травмы (острая или связанная с перенапряжением / чрезмерной нагрузкой). С целью облегчения болевого синдрома, сокращения реабилитационного периода и скорейшего возвращения в спорт высоких достижений при отсутствии показаний к хирургическому лечению приоритетными в применении, несомненно, являются малоинвазивные методы, включая PRP-терапию как в качестве монотерапии, так и в комплексе с консервативным лечением [43].

PRP-терапия как инновационный метод лечения минимальных травм и повреждений крупных суставов в педиатрической практике и спортивной медицине

Современные знания об анатомии и физиологии развития ребенка, учитывающие возрастные особенности и процессы роста, в сочетании с передовыми методами обследования (МРТ, КТ, УЗИ) вывели диагностику травм и повреждений на качественно новый уровень, позволяя выявлять даже минимальные повреждения и назначать соответствующее патогенетически обоснованное лечение [3, 18].

Консервативное лечение, включающее покой, иммобилизацию и физиотерапию, несомненно, доказало свою эффективность и проверено временем, но сегодняшние реалии диктуют свои условия, требующие более быстрого заживления поврежденной части и своевременного возвращения к спортивной форме, в том числе в спорт высших достижений [34–36].

Вышеуказанное явилось стимулом к поиску новых методов лечения. В области ортопедической медицины поиск инновационных методов терапии, направленных на облегчение боли, ускорение восстановления и содействие регенерации тканей, привел к появлению такого раздела, как регенеративная терапия. В ее основе лежит применение инновационных клеточных технологий

и продуктов для восстановления поврежденных тканей и органов. В рамках развития регенеративной терапии большое значение имеет применение ортобиотических продуктов — биологических веществ, которые способствуют более быстрому восстановлению поврежденных тканей. К ним относятся гиалуроновая кислота, плазма, обогащенная тромбоцитами (PRP), мезенхимальные стволовые клетки, концентрат аспираата костного мозга (BMAC), культивированные мезенхимальные стволовые клетки [44]. Ортобиотические продукты естественным образом содержатся в организме, но в более высоких концентрациях могут способствовать ускорению процесса заживления [45].

Среди новых методов биотерапии травм и повреждений ОДА в последнее время большое внимание уделяется применению PRP-терапии, показывающей положительные результаты купирования болевого синдрома, улучшения функции и сокращения реабилитационного периода у пациентов с травмами опорно-двигательного аппарата [46–48].

PRP является методом ортобиологического воздействия, в основе которого лежит применение биологически активных молекул тромбоцитов [49]. На исходных уровнях тромбоциты функционируют как естественный резервуар факторов роста, включая фактор роста тромбоцитарного происхождения (PDGF), эпидермальный фактор роста (EGF), трансформирующий фактор роста бета-1 (TGF- β 1), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), базовый фактор роста фибробластов (FGF), фактор роста гепатоцитов (HGF) и инсулиноподобный фактор роста (IGF-I). PRP обычно используется в ортопедической практике для ускорения заживления тканей в результате полученных травм, в том числе связанных с занятиями спортом [50].

Согласно отечественной и зарубежной литературе Platelet Rich Plasma — это обобщающий термин, обозначающий группу продуктов аутологичной крови человека [51].

PRP включает в себя продукты, полученные из аутологичной крови, такие как: богатая тромбоцитами плазма (Platelet-Rich Plasma), аутологичная кондиционированная плазма (Autologous Conditioned Plasma).

Полученные из тромбоцитов продукты были классифицированы на чистый PRP (Pure Platelet-Rich Plasma / P-PRP), плазму, обогащенную факторами роста (Plasma Rich Growth Factors / PRGF), лейкоцитарную и тромбоцитарную плазму, чистый тромбоцитарный фибрин (Pure Platelet-Rich Fibrin / P-PRF), а также лейкоцитарный (Leukocyte-Platelet-Rich Fibrin / L-PRF) и тромбоцитарный фибрин (Advanced / A-PRF). Состав этих продуктов может варьироваться в зависимости от содержания клеток и фибринова, а также от плотности фибриновой сети [52].

В 2009 году была предложена первая классификация концентратов тромбоцитов [53]. Эта классификация проста и основана на содержании тех или иных компонентов крови и их количестве. Данная классификация разделяет продукты по двум главным параметрам: клеточному составу (в основном лейкоцитов) и архитектуре фибрина. Это разделение позволило определить 4 основных семейства для перегруппировки продуктов.

1. Продукты Pure Platelet-Rich Plasma (P-PRP), или Leukocyte-Poor Platelet-Rich Plasma, — это препараты без лейкоцитов и с фибриновой сетью низкой плотности после активации. По определению все продукты этого семейства могут использоваться в виде жидких растворов или в форме активированного геля. Поэтому его можно

вводить инъекционно (в виде раствора) или наносить в виде геля на поверхность раны или шва (аналогично использованию фибриновых kleев). К ним относятся богатая тромбоцитами плазма (Platelet-Rich Plasma / PRP), аутологичная кондиционированная плазма (Autologous Conditioned Plasma /ACP).

2. Продукты плазмы, обогащенной лейкоцитами и тромбоцитами (L-PRP), представляющие собой препараты с лейкоцитами и сеткой фибрина низкой плотности после активации. По определению, как и P-PRP, все продукты этого семейства могут использоваться в виде жидких растворов или в форме активированного геля [54].

3. Чистый богатый тромбоцитами фибрин (P-PRF) или бедный лейкоцитами и богатый тромбоцитами фибрин — это препараты без лейкоцитов, но с высокоплотной фибриновой сетью. По определению эти продукты существуют только в форме сильно активированного геля и не могут быть введены инъекционно или использованы как традиционные фибриновые kleи.

4. Продукты Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) представляют собой препараты с лейкоцитами и с высокоплотной фибриновой сетью [55].

Описанная выше классификация систематизирована и охватывает все формы концентратов тромбоцитов. В травматологии и ортопедии была предложена своя классификация, которая основана на применении плазмы, обогащенной тромбоцитами (только PRP).

Mishra et al. предложили классифицировать продукты PRP с учетом концентрации тромбоцитов и лейкоцитов специально для использования в лечебной практике у спортсменов [49]. Эта классификация подразделяет PRP на четыре типа в зависимости от присутствия или отсутствия лейкоцитов, а также от того, активирована PRP или нет. Согласно этой классификации тип 1 PRP представляет собой раствор L-PRP, тип 2 PRP — гель L-PRP, тип 3 PRP — раствор PPRP, тип 4 PRP — гель P-PRP. Данная классификация по принципу конструирования аналогична общей, опубликованной в 2009 году, однако подразделение продуктов PRP ограничено клеточным составом и активацией, что делает ее более понятной для клинического применения [49].

Единственным новым параметром этой классификации является оценка концентрации тромбоцитов, причем PRP типа А в 5 и более раз превышает концентрацию тромбоцитов в крови, а PRP типа В только в 5 раз превышает концентрацию тромбоцитов в крови. Этот последний параметр является спорным, поскольку концепция учета концентрации тромбоцитов в составе продукта PRP была в значительной степени отвергнута в предыдущие годы по логичной причине: концентрация тромбоцитов зависит только от объема жидкой сыворотки, используемой для поддержания тромбоцитов в суспензии. Количество сыворотки сильно варьируется в зависимости от протокола и ожидаемого применения и не влияет на предполагаемый эффект. Концепция абсолютного количества тромбоцитов была бы более логичной, даже если бы большинство публикаций не смогли обнаружить четкого и воспроизводимого влияния этого параметра на клинические результаты. С этой точки зрения 5-кратный порог не имеет общепринятого смысла и обоснования [56].

PRP обладает выраженным противовоспалительным, обезболивающим и прорегенераторным и антиапоптотическим действием, стимулирует рост и миграцию фибробластов и остеобластов. Поэтому она широко используется для лечения последствий травм опорно-двигательного

аппарата. Многочисленными исследованиями доказана эффективность PRP при пателлярной тендинопатии, латеральном эпикондилите, повреждении ротаторной манжеты плеча, травмах сухожилий и мышц различной локализации [50, 51].

Таким образом, PRP-терапия представляет собой перспективный метод лечения повреждений крупных суставов, который может стать альтернативой традиционным методам лечения, таким как консервативная терапия и хирургическое вмешательство.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современная медицина уделяет большое внимание диагностике травм и повреждений у юных спортсменов, особенно в контексте восстановительных мероприятий после минимальных травм и повреждений крупных суставов. Понимание обстоятельств травмы (причин, времени, механизмов), а также точное определение поврежденной ткани в конкретном сегменте конечности спортсмена являются ключевыми факторами для врача, позволяющими определить оптимальную тактику обследования и разработать индивидуальный план лечения, а также спрогнозировать процесс восстановления и возможность возвращения к полноценной спортивной нагрузке. Особое внимание следует уделять юным спортсменам, у которых костно-мышечная система находится только в стадии формирования и более уязвима к повреждениям.

Благодаря современным инструментальным методам можно предотвратить развитие осложнений и выбрать оптимальное лечение. Клинический осмотр и сбор анамнеза позволяют врачу получить первичное представление о состоянии пациента, помогая выявить основные жалобы и симптомы. Инструментальные методы исследования, такие как рентгенография, КТ, МРТ и УЗИ, предоставляют более детальную информацию о структуре и функции органов и систем организма, что дополняет клиническую картину, формирует системное представление лечащего врача о патологическом процессе и способствует постановке точного диагноза.

Комплексный подход, объединяющий клинический осмотр и инструментальные исследования, является ключевым фактором для обеспечения точности и объективности оценки состояния пациента, что, в свою очередь, позволяет выявить заболевания на ранней стадии, провести дифференциальную диагностику и оценить эффективность лечения.

Наряду с традиционными подходами к терапии минимальных травм и повреждений ОДА у спортсменов, в том числе у детей и подростков, включающими консервативный и хирургический методы, в последние годы все больше внимания уделяется малоинвазивному лечению, предусматривающему применение ортобиотических продуктов. Последние способствуют ускорению процесса заживления поврежденных клеток, тканей и органов, сокращению реабилитационного периода, что является особенно важным для юных спортсменов в рамках развития профессиональных спортивных компетенций.

Наиболее перспективным малоинвазивным методом биотерапии травм и повреждений ОДА, особенно в аспекте применения в детской и подростковой группе спортсменов, является PRP-терапия (терапия богатой тромбоцитами плазмой). Данный метод позволяет существенно восстанавливать анатомическую целостность поврежденных элементов, купировать болевой синдром

в покое, при физической нагрузке и в стресс-тесте с возможностью сохранения функции травмированного сустава и реабилитации в кратчайшие сроки. PRP-терапия представляет собой альтернативу традиционным методам лечения, открывая новые горизонты в регенеративной и спортивной медицине.

Таким образом, комплексный подход к диагностике, объединяющий клинический осмотр и инструментальные

исследования, применение малоинвазивных инновационных клеточных технологий у несовершеннолетних профессиональных спортсменов с травмами и повреждениями ОДА, включая крупные суставы, становится незаменимым инструментом в руках врача, помогая ему точно оценить состояние юного пациента, обеспечить ему наиболее эффективное лечение и быстрое восстановление после травм.

Литература / References

1. Рябов ВП, Нуруллин ИФ, Курмаев ЗФ. Профессиональные травмы и заболевания у спортсменов. Казань 2017.
Rjabov VP, Nurullin IF, Kurmaev ZF. Occupational injuries and diseases in athletes: a method. stipend. Kazan'; 2017 (In Russ.).
2. NCAA Injury Surveillance 1997–1998. Overland Park, Kan: National Collegiate Athletic Association; 1998.
3. Chang EY, Du J, Chung CB. UTE imaging in the musculoskeletal system. *J Magn Reson Imaging*. 2015;41: 870–83.
<https://doi.org/10.1002/jmri.24713>
4. Yelin E, Weinstein S, King T. The burden of musculoskeletal diseases in the United States. *Semin Arthritis Rheum*. 2016;46:259–60.
<https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2016.07.013>
5. Kujala UM. Acute injuries in soccer, ice hockey, volleyball, basketball, judo and karate: an analysis of national registry data. *BMJ*.1995;311:1465–8.
<https://doi.org/10.1136/bmj.311.7018.1465>
6. Ross AG, Donaldson A, Poulos RG. Nationwide sports injury prevention strategies: A scoping review. *Scand J Med Sci Sports*.2021;31(2):246–64.
<https://doi.org/10.1111/sms.13858>
7. Bray CC, Walker CM, Spence DD. Orthobiologics in Pediatric Sports Medicine. *Orthop Clin North Am*. 2017;48(3):333–42.
<https://doi.org/10.1016/j.ocl.2017.03.006>
8. Clarsen Benjamin. Overuse injuries in sport: development, validation and application of a new surveillance method diss.; 2015.
9. Brenner JS, Watson A. Council on sports medicine and fitness. Overuse Injuries, Overtraining, and Burnout in Young Athletes. *Pediatrics*. 2024;153(2):2023065129.
<https://doi.org/10.1542/peds.2023-065129>
10. Bahr R, Clarsen B, Derman W, Dvorak J, Emery CA, Finch CF, et al. International Olympic Committee consensus statement: methods for recording and reporting of epidemiological data on injury and illness in sport 2020 (including STROBE Extension for Sport Injury and Illness Surveillance (STROBE-SIIS)). *Br J Sports Med*. 2020;54(7):372–89.
<https://doi.org/10.1136/bjsports-2019-101969>
11. Hamilton B, Pollock N, Reurink G, de Vos RJ, Purdam C, Thorborg K. Muscle Injury Classification and Grading Systems. In: Thorborg, K., Opar, D., Shield, A. (eds) *Prevention and Rehabilitation of Hamstring Injuries*. Springer Cham, 2020.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-31638-9_8
12. Owoeye OB, Ghali B, Befus K, Stilling C, Hogg A, Choi J, Palacios-Derflinger L, Pasanen K, Emery CA. Epidemiology of all-complaint injuries in youth basketball. *Scand J Med Sci Sports*. 2020;30(12):2466–76.
<https://doi.org/10.1111/sms.13813>
13. Webb J, Corry I. Injuries of the sporting knee. *Sports Medicine*. 2000;34:227–8.
<https://doi.org/10.1136/bjsm.34.5.395>
14. Lian OB, Engebretsen L, Bahr R. Prevalence of jumper's knee among elite athletes from different sports: a cross-sectional study. *Am J Sports Med*. 2005;33(4):561–7.
<https://doi.org/10.1177/0363546504270454>
15. Bahr MA, Bahr R. Jump frequency may contribute to risk of jumper's knee: a study of interindividual and sex differences in a total of 11 943 jumps video recorded during training and matches in young elite volleyball players. *British journal of sports medicine*. 2014;48(17):1322–6.
<https://doi.org/10.1136/bjsports-2014-093593>
16. Jiménez Díaz F, Gitto S, Sconfienza LM, Draghi FJ. Ultrasound of iliotibial band syndrome. *Ultrasound*. 2020;23(3):379–85.
<https://doi.org/10.1007/s40477-020-00478-3>
17. Peter Brukner, Ben Clarsen, Jill Cook, Ann Cools, Kay Crossley et al. *Clinical Sports Medicine*. McGraw-Hill Education. Australia. 2017;1104.
18. Christensen-Jeffries K, Couture O, Dayton PA, Eldar YC, Hyynnen K, Kiessling F, O'Reilly M, Pinton GF, Schmitz G, Tang MX, Tanter M, van Sloun RJJG. Super-resolution Ultrasound Imaging. *Ultrasound Med Biol*. 2020;46(4):865–91.
<https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2019.11.013>
19. Sutter EG, Liu B, Utturkar GM, Widmyer MR, Spritzer CE, Cutcliffe HC et al. Effects of Anterior Cruciate Ligament Deficiency on Tibiofemoral Cartilage Thickness and Strains in Response to Hopping. *Am J Sports Med*. 2019;47:96–103.
<https://doi.org/10.1177/0363546518802225>
20. Епифанов ВА, Епифанов АВ. Восстановительное лечение при повреждениях опорно-двигательного аппарата. М.: Авторская академия, 2009.
Epifanov VA., Epifanov AV. Rehabilitation treatment for injuries of the musculoskeletal system. Moscow: Author's Academy; 2009 (In Russ.).
21. Самойлов АС, Васильев ОС, Левушкин СП. Диагностика малых повреждений опорно-двигательного аппарата квалифицированных спортсменов методом поуровневого анализа построения движения. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2018;20(2):197–202.
Samojlov AS, Vasil'ev OS, Lyovushkin SP. Diagnosis of minor injuries of the musculoskeletal system of qualified athletes by the method of level-by-level analysis of the construction of the movement. *Medicine of Extreme Situations*. 2018;20(2):197–202 (In Russ.).
22. Dietvorst M, van der Steen MCM, Reijman M, Janssen RPA. Diagnostic values of history taking, physical examination and KT-1000 arthrometer for suspect anterior cruciate ligament injuries in children and adolescents: a prospective diagnostic study. *BMC Musculoskelet Disord*. 2022;23(1):710.
<https://doi.org/10.1186/s12891-022-05659-1>
23. Jerbara Saeed, Changb Eric Y, Dua Jiang Magnetic resonance imaging (MRI) studies of Knee joint under mechanical loading: review. *Magn Reson Imaging*. 2020;65:27–36.
<https://doi.org/10.1016/j.mri.2019.09.007>
24. Морозов АМ, Жуков СВ, Беляк МА, Минакова ЮЕ, Протченко ИГ. О возможности оценивания болевого синдрома при помощи наилучше валидизированных шкал боли (обзор литературы). *Вестник новых медицинских технологий*. 2020;2:62–8.
Morozov AM, Zhukov SV, Belyak MA, Minakova YuE, Protchenko IG About the possibilities of evaluating a pain syndrome using the most validated pain scales. *Bulletin of new medical technologies*. 2020;2:62–8 (In Russ.).
<https://doi.org/10.24411/1609-2163-2020-16663>
25. Askenberger M, Ekström W, Finnbogason T, Janarv PM. Occult Intra-articular Knee Injuries in Children with Hemarthrosis. *Am J Sports Med*. 2014;42(7):1600–6.
<https://doi.org/10.1177/0363546514529639>
26. Ende D, Jung C, Bauer G, Mauch F. Value of MRI in diagnosing injuries after ankle sprains in children. *Foot Ankle Int*. 2012;33(12):1063–8.
<https://doi.org/10.3113/FAI.2012.1063>

27. Askenberger M, Arendt EA, Ekström W, Voss U, Finnbogason T., Janarv P.M. Medial Patellofemoral Ligament Injuries in Children with First-Time Lateral Patellar Dislocations: A Magnetic Resonance Imaging and Arthroscopic Study. *Am J Sports Med.* 2016;44(1):152–8.
<https://doi.org/10.1177/0363546515611661>
28. Järvinen TA, Järvinen TL, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med.* 2005;33(5):745–64.
<https://doi.org/10.1177/0363546505274714>
29. Sun Y, Chen J. Advancements in Sports Medicine. *J Clin Med.* 2023;12(10):3489.
<https://doi.org/10.3390/jcm12103489>
30. Guillodo Y, Saraux A. Treatment of muscle trauma in sportspeople (from injury on the field to resumption of the sport). *Ann Phys Rehabil Med.* 2009;52(3):246–55.
<https://doi.org/10.1016/j.rehab.2008.12.014>
31. Campbell Ryan MEAT vs RICE for injury management. Goodmed Direct Primary Care; 2013.
32. Dubois B, Esculier JF. Soft-tissue injuries simply need PEACE and LOVE. *Br J Sports Med.* 2020;54(2):72–3.
<https://doi.org/10.1136/bjsports-2019-101253>
33. Knight KL. Cryotherapy in Sport Injury Management. Champaign, IL: Human Kinetics; 2015.
34. Schneider F, Sperl M, Steinwender G, Kraus T. Kindliche Kniebinnenverletzungen. *Orthopade.* 2014;43(4):393–401
<https://doi.org/10.1007/s00132-014-2290-6>
35. Ключников СО, Козлов ИГ, Пушкина ТА и др. Формулярное руководство по применению лекарственных препаратов в детско-юношеском спорте. *Медицина экстремальных ситуаций.* 2014;(54):68–74.
Klyuchnikov SO, Kozlov IG, Pushkina TA, i dr. Federal guidelines (formulary) on the medications prescribed to child and adolescent athletes. *Extreme Medicine.* 2014;(54): 68–74 (In Russ.).
EDN: [VBCUPP](#)
36. Drendel AL, Lyon R, Bergholte J, et al. Outpatient pediatric pain management practices for fractures. *Pediatr Emerg Care.* 2006;22(2):94–9.
<https://doi.org/10.1097/01.pec.0000199564.64264.f4>
37. Cohen E, Sala DA. Rehabilitation of pediatric musculoskeletal sport-related injuries: a review of the literature. *Eur J Phys Rehabil Med.* 2010;46(2):133–45.
38. Yurlova Y, Dianov. Anatomical-physiological features of knee injuries and possibilities of conservative treatment. E3S Web of Conferences. TPACCEE-2021. 2021;284:1–8.
<https://doi.org/10.1051/e3sconf/202128402018>
39. Gaal BT, Knapik DM, Gilmore A. Patient-Reported Outcome Measures Following Surgical Intervention for Pediatric Sports-Related Injuries to the Knee: a Systematic Review. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2022;15(3):187–93.
<https://doi.org/10.1007/s12178-022-09755-5>
40. Sheth U, Dwyer T, Smith I, Wasserstein D, Theodoropoulos J, Takhar S, Chahal J. Does Platelet-Rich Plasma Lead to Earlier Return to Sport When Compared With Conservative Treatment in Acute Muscle Injuries? A Systematic Review and Meta-analysis. *Arthroscopy.* 2018;34(1):281–8.
<https://doi.org/10.1016/j.arthro.2017.06.039>
41. Zhang JY, Fabricant PD, Ishmael CR, Wang JC, Petriglano FA, Jones KJ. Utilization of Platelet-Rich Plasma for Musculoskeletal Injuries: An Analysis of Current Treatment Trends in the United States. *Orthop J Sports Med.* 2016; 4(12):2325967116676241.
<https://doi.org/10.1177/2325967116676241>
42. Потапнев МП, Загородный ГМ, Кривенко СИ, и др. Современные аспекты применения плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов, в лечении травм и заболеваний опорно-двигательного аппарата. *Спортивная медицина: наука и практика.* 2019;9(4):33–45.
Potapnev MP, Zagorodnyj GM, Krivenko SI, i dr. Modern aspects of the use of plasma enriched in soluble platelet factors in the treatment of injuries and diseases of the musculoskeletal system. *Sports medicine: science and practice.* 2019;9(4):33–45 (In Russ.).
<https://doi.org/10.17238/ISSN2223-2524.2019.4.33>
43. Загородный ГМ, Муха ПГ, Ясюкевич АС, Гуlevич НП. Отечественный и зарубежный опыт применения PRP-терапии в медицине и спортивной практике. *Прикладная спортивная наука.* 2017;1(5):83–91.
Zagorodny GM, Mukha PG, Yasyukevich AS, Gulevich NP. Domestic and foreign experience of prp-therapy's administration in medicine and sports (literature review). *Applied Sports Science.* 2017;1(5):83–91 (In Russ.).
EDN: [YUIOTT](#)
44. Эйсмонт ОЛ. Ортобиологические технологии в лечении остеоартрита суставов. *Актуальные проблемы отечественной травматологии и ортопедии.* 2020;8:45–8.
Eismont OL Orthobiologics in osteoarthritis treatment. Current problems of Russian traumatology and orthopedics. 2020;8:45–8 (In Russ.).
EDN: [ETQNTV](#)
45. Bray CC, Walker CM, Spence DD. Orthobiologics in Pediatric Sports Medicine. *Orthop Clin North Am.* 2017;48(3):333–42.
<https://doi.org/10.1016/j.ocl.2017.03.006>
46. Bansal H, Leon J, Pont JL, Wilson DA, Bansal A, Agarwal D, et al. Platelet-rich plasma (PRP) in osteoarthritis (OA) knee: Correct dose critical for long term clinical efficacy. *Sci Rep.* 2021;11(1):3971.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-83025-2>
47. Chen X, Jones IA, Park C, Vangsness CT Jr. The Efficacy of Platelet-Rich Plasma on Tendon and Ligament Healing: A Systematic Review and Meta-analysis With Bias Assessment. *Am J Sports Med.* 2018;46(8):2020–32.
<https://doi.org/10.1177/0363546517743746>
48. Godek P. High Volume PRP Therapy. *Ortop Traumatol Rehabil.* 2022;24(1):43–60.
<https://doi.org/10.5604/01.3001.0015.7806>
49. Mishra A, Harmon K, Woodall J, Vieira A. Sports medicine applications of platelet rich plasma. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;3(7):1185–95.
<https://doi.org/10.2174/138920112800624283>
50. Fang J, Wang X, Jiang W, Zhu Y, Hu Y, et al. Platelet-Rich Plasma Therapy in the Treatment of Diseases Associated with Orthopedic Injuries. *Tissue Eng Part B Rev.* 2020;26(6):571–85.
<https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2019.0292>
51. Milano Giuseppe Platelet-rich plasma in orthopaedic sports medicine: state of the art. *Journal of ISAKOS.* 2019;4:188–95.
<https://doi.org/10.1136/iisakos-2019-000274>
52. Крупина ЕА. Анализ молекулярных и биологических аспектов применения PRP- и ACP-терапии. *Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова.* 2020;15(3):80–5.
Krupina EA Molecular and biological aspects of platelet-rich plasma therapies. *Bulletin of the National Medical and Surgical Center named after N.I. Pirogov.* 2020;15(3):80–5. (In Russ.).
<https://doi.org/10.25881/BPNMSC.2020.30.34.015>
53. Dohan Ehrenfest, Rasmussen L., Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 2009;27(3):158–67.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.11.009>
54. Everts PA, Hoffmann J, Weibrich G, Mahoney CB, Schönberger JP, van Zundert A, et al. Differences in platelet growth factor release and leucocyte kinetics during autologous platelet gel formation. *Transfus Med.* 2006;16(5):363–8.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2006.00708.x>
55. Clark RA. Fibrin and wound healing. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;936:355–67.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03522.x>
56. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone.* 2004;34(4):665–71.
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2003.12.010>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: И.В. Зябкин — создание концепции, конструирование разделов работы; И.В. Панкратов — работа с источниками литературы, анализ и обобщение полученных данных, написание текста рукописи; М.А. Петров — написание текста рукописи; М.И. Габаев — сбор данных литературы; Р.А. Кешишян — критический пересмотр текста рукописи; В.В. Хижникова — написание текста рукописи относительно инструментальных методов диагностики; А.М. Ковалькова — сбор данных литературы.

ОБ АВТОРАХ

Зябкин Илья Владимирович, д-р. мед. наук, профессор
<https://orcid.org/0000-0002-9717-5872>
zyabkin@kidsfmba.ru

Панкратов Иван Владимирович
<https://orcid.org/0009-0007-6665-6394>
pankratoviv@kidsfmba.ru

Петров Михаил Анатольевич, канд. мед. наук
<https://orcid.org/0000-0002-1709-2437>
adm@kidsfmba.ru

Габаев Мурат Исаевич, канд. мед. наук
<https://orcid.org/0009-0005-7013-8894>
adm@kidsfmba.ru

Кешишян Размик Арамович, д-р. мед. наук
<https://orcid.org/0000-0003-3686-3708>
adm@kidsfmba.ru

Хижникова Виктория Валерьевна
<https://orcid.org/0009-0009-6101-7299>
adm@kidsfmba.ru

Ковалькова Александра Маратовна
<https://orcid.org/0009-0000-6070-0947>
gimadeeva.alexandra@yandex.ru



ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ МОНИТОРИНГА СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА

В.А. Иванов[✉], Я.Д. Шанский¹, К.А. Прусаков¹, Ю.А. Беспятых^{1,2}, Д.В. Басманов¹

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. академика Ю.М. Лопухина, Москва, Россия

² Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия

Введение. В связи с увеличением длительности космических полетов растет и продолжительность пребывания членов экипажа в неблагоприятных условиях микрогравитации, что требует разработки подходов, направленных на диагностику состояния здоровья непосредственно в процессе полета. Данное исследование направлено на поиск и выбор перспективных биологических маркеров, целесообразных для изучения в условиях космического полета.

Цель. Изучить современное состояние проблемы и определить биохимические и молекулярные маркеры, наиболее перспективные для направления медико-биологических исследований, выполняемых в условиях космического полета.

Результаты. Проведен анализ данных литературы, посвященных изучению методов контроля уровня биологических маркеров, характеризующих вызываемые условиями космического полета изменения иммунной, выделительной, репродуктивной систем, опорно-двигательного аппарата и системы свертывания крови.

Выводы. В настоящем обзоре рассмотрены данные, касающиеся биологических маркеров, позволяющих контролировать состояние здоровья космонавтов. По мнению коллектива авторов, наиболее перспективными являются белковые маркеры, отражающие перестройку костной ткани. Развивающееся в результате микрогравитации снижение плотности костной ткани потенциально несет риски травматизма, поэтому скрининговая диагностика состояния опорно-двигательной системы является актуальной проблемой лабораторной диагностики. Исходя из данных литературы, наиболее информативными маркерами образования новой костной ткани могут служить P1NP и остеокальцин, а ее лизиса — С-телефептид коллагена, пиридиновые сшивки и тартрат-резистентная кислая фосфатаза.

Ключевые слова: космическая медицина; ремоделирование кости; биологические маркеры; минерализация кости; космос; невесомость; тромбоз

Для цитирования: Иванов В.А., Шанский Я.Д., Прусаков К.А., Беспятых Ю.А., Басманов Д.В. Перспективные направления мониторинга состояния здоровья человека в условиях длительного космического полета. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2024;26(4):114–122. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-114-122>

Финансирование: публикация подготовлена в рамках государственного задания «Амальтея-1», номер государственного учета НИОКР № 124031500113-3

Потенциальный конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

✉ Виктор Андреевич Иванов Vanov.va@inbox.ru

Статья поступила: 07.07.2024 **После доработки:** 07.10.2024 **Принята к публикации:** 09.10.2024

PROSPECTIVE DIRECTIONS IN HUMAN HEALTH MONITORING DURING LONG-TERM SPACEFLIGHTS

Viktor A. Ivanov[✉], Yaroslav D. Shansky¹, Kirill A. Prusakov¹, Julia A. Bespyatykh^{1,2}, Dmitry V. Basmanov¹

¹Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

²Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia

Introduction. The increasing duration of spaceflights and the associated prolonged exposure of space crewmembers to unfavorable microgravity conditions necessitate the development of improved approaches to diagnosing the health status directly during the flight. This study is aimed at searching and selecting promising biological markers suitable for studying directly during spaceflights.

Objective. To review the current status of the abovementioned problem and to identify biochemical and molecular markers most promising for biomedical research in spaceflight conditions.

Methods. A literature review of methods currently used for monitoring the level of biological markers characterizing variations in the immune, excretory, reproductive, musculoskeletal, and blood coagulation systems caused by spaceflight conditions was carried out.

Findings. Data concerning biological markers used for monitoring the health status of space crewmembers were analyzed. The authors argue that protein markers reflecting bone tissue remodeling hold particular promise. The decrease in bone tissue density developed as a result of microgravity carries potential risks of traumatism, thus making screening diagnostics of the state of the musculoskeletal system a key focus of laboratory diagnostics. The conducted literature review suggests that P1NP and osteocalcin may serve as the most informative markers of new bone tissue formation, while collagen C-telopeptide, pyridine cross-links, and tartrate-resistant acid phosphatase may serve as markers of bone tissue lysis.

Keywords: aerospace medicine; bone remodeling; molecular markers; bone mineralization; micro-RNA; spaceflight; microgravity; thrombosis

For citation: Ivanov V.A., Shansky Y.D., Prusakov K.A., Bespyatykh J.A., Basmanov D.V. Prospective directions in human health monitoring during long-term spaceflights. *Extreme Medicine*. 2024;26(4):114–122. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-114-122>

Funding: the study was performed within the framework of the state assignment “Amalthea-1”, R&D Reg. No. 124031500113-3.

Potential conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

✉ Viktor A. Ivanov Vanov.va@inbox.ru

Received: 7 July 2024 **Revised:** 7 Oct. 2024 **Accepted:** 9 Oct. 2024

ВВЕДЕНИЕ

В связи с увеличением объема разнообразных работ, выполняемых в условиях космического полета каждым членом экипажа (включая проведение длительных технических и биологических экспериментов), растет продолжительность пребывания космонавтов на околоземной орбите. Нахождение в условиях космоса включает длительные неблагоприятные воздействия невесомости, а именно: гиподинамию, длительного нахождения в замкнутом объеме, повышенного уровня шумовой, радиационной, психологической нагрузок, а также ограниченного рациона питания [1]. Человечество не оставляет надежд на длительные пилотируемые миссии за пределы ближнего космоса, что потребует еще большей продолжительности пребывания в неестественных для организма человека условиях. Поддержание физического и психического здоровья космонавтов требует изучения особенностей функционирования органов и систем человека в условиях продолжительного полета. Уровень технического развития дает возможность создавать лабораторные анализаторы, адаптированные для работы в условиях космической станции и позволяющие проводить оценку множества параметров функционирования систем организма, корректируя при необходимости рацион питания, физическую нагрузку и условия жизни.

Существуют различные подходы для оценки функционального состояния организма, а именно: проведение измерений, в том числе неинвазивных, во время полета и в условиях невесомости; сбор и хранение образцов с последующим их анализом после возвращения на Землю.

Проведение измерений непосредственно в условиях невесомости дает возможность избегать дополнительных манипуляций, связанных с консервацией, хранением и доставкой биологических образцов, исключая тем самым влияние условий хранения/транспортировки на целевые компоненты в этих биосредах. Большое внимание уделяется разработке и применению неинвазивных методов диагностики состояния здоровья космонавтов, таких как доплеровское определение клеточного состава крови [2], оценка распределения жидкостей тела [3], велоэргометрия и другие. К сожалению, на сегодня данные методы не позволяют оценивать малые изменения параметров и анализировать специфические маркеры клинических состояний организма человека.

Широко распространенный подход со сбором биологических образцов в процессе полета с последующей доставкой для анализа на Землю неприменим для множества клинико-лабораторных показателей из-за невозможности проведения их анализа после замораживания и/или длительного хранения биосред. Кроме того, при данном подходе анализ динамики изменения лабораторных показателей осуществим только по истечении длительного времени, что исключает возможность внесения необходимых корректировок в протокол проведения эксперимента, а также не позволяет проводить мониторинг и корректировку состояния здоровья космонавтов в реальном времени [4].

Таким образом, в настоящий момент актуальным является поиск, анализ, выбор биологических маркеров, отражающих изменения в состоянии здоровья человека во время космического полета и способствующих разработке и совершенствованию валидных диагностических тест-систем для оценки функционального состояния здоровья космонавтов.

Цель работы — изучение современных перспективных направлений медико-биологических исследований, проводимых в условиях космического полета.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Современное состояние проблемы

В настоящее время проведено достаточно большое количество исследований, изучающих состояние здоровья космонавтов. Однако большинство из них подразумевает осуществление клинико-лабораторного анализа уже после возвращения космонавтов на Землю. Их результаты, пополняя базу знаний в области космической медицины, непригодны для оценки состояния здоровья в процессе полета. Диагностическая ценность таких образцов минимальна, поскольку они не отражают динамику изменений в состоянии органов и систем космонавтов на момент их пребывания в космосе. Важно учитывать, что в условиях невесомости невозможна адекватная организация длительного хранения и доставки в земные условия биологических образцов, содержащих цельные клетки. Кроме того, необходимость анализа ряда биологических субстратов, в частности протеинсодержащих, непосредственно во время аэрокосмического полета обусловлена недопустимостью их замораживания.

В условиях космоса / космической экспедиции в связи с изменением поведения биологических жидкостей при малой гравитации изменяются требования к забору биологического материала. Инвазивный забор биосубстрата с применением традиционных технологий (с помощью шприца или открытым способом) становится затруднительным. Процедура забора крови связана с венопункцией, что в условиях космической станции несет риски образования низкодисперсного аэрозоля в воздухе или развития инфекционных осложнений. Актуальным для анализа становится использование биологических сред, доступных при малоинвазивном или самостоятельном способах забора. К таковым биосубстратам относятся слюна, отпечатки пота и образцы мочи. При необходимости проведения исследований на компонентах крови следует стремиться к минимизации объема аликвот и учитывать ограничения, связанные с особенностями систем вакуумного отбора образцов.

Кроме того, изменяются предпочтения перед определенной техникой внесения образцов в рабочую зону тест-системы. Например, становится нереализуемой инкубация свободно налитой жидкости при выполнении традиционного иммуноферментного анализа (ИФА). В условиях микрогравитации сохраняются адгезионные/капиллярные взаимодействия жидкости с твердой фазой, что позволяет в настоящее время использовать на Международной космической станции (МКС) диагностические системы в виде тест-полосок. Однако подобные тест-системы имеют ряд ограничений, одним из которых является полу количественное определение концентраций. Необходимо отметить, что стремительное развитие микрофлюидных технологий и успешное их применение в земных условиях дает возможность предположить, что адаптация данных технологий для условий микрогравитации позволит перейти к анализу биологических маркеров, включая методы ИФА.

На сегодня ряд физиологических параметров, таких как содержание уровня гемоглобина, концентрация глюкозы в крови и другие, в условиях космической станции

измеряют методом иммунохемилуминесценции на тест-полосках («Рефлotron», F.Hoffmann-La Roche Ltd. / Roche Diagnostics GmbH, Германия) [5]. Иные анализы и образцы требуют транспортировки в земные условия и подвергаются анализу по завершении полета. К таким образцам относятся сыворотка крови, смывы с внутренних поверхностей станции и поверхностей пробоотборников, образцы для микробиологических исследований, например собранные в рамках эксперимента «Хроматомасс-спектр М». Подобные исследования важны для изучения непрерывно меняющегося микробиома станции [6], связанного с постоянным обменом микрофлорой с космонавтами [7], однако срочность получения таких результатов значительно ниже, чем в случае контроля состояния здоровья экипажа.

В настоящее время опубликованы результаты ряда проектов по изучению состояния здоровья космонавтов по отдельным индикативным маркерам различных состояний систем организма в условиях микрогравитации. Так, в рамках эксперимента «Спланх» на МКС, а ранее на космической станции «МИР», на модифицированном приборе «Рефлotron-4» проводились измерения уровня маркеров поражения сердечно-сосудистой системы: аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ). Гематологические исследования в условиях космического полета выполнялись на борту МКС, а ранее на станции «МИР» на протяжении 15 месяцев в ходе 3-х экспедиций «МИР» (15, 16 и 17-й). Эти исследования включали оценку клеточного состава крови, гематокрита, гемоглобина, ретикулоцитов, лейкоцитарной формулы [8]. Анализы проводились на мазках капиллярной крови с применением прибора «Микровзор», сочетающего микроскоп с телепередатчиком. В российском сегменте МКС измерение гематокрита проводилось при помощи прибора «Гематокрит». Н. Kunz, Н. Quirriarte et al. зафиксировали, что на ранних этапах полета был значительно повышен уровень гематокрита, он остается таковым на протяжении всего пребывания в космосе, что связано со снижением объема циркулирующей крови и плазмы крови в условиях микрогравитации. В раннем послеполетном периоде отмечено снижение гематокрита ниже предполетного уровня, что свидетельствует о потере пула клеток [9]. Некоторыми авторами (П.А. Михайлов и соавт.) в экспериментах на животных отмечено развитие функциональной эритропении и роста числа аномальных эритроцитов при ортостатическом вывешивании [10].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Особенности влияния условий космического полета на иммунную систему

Необходимость изучения особенностей функционирования иммунной системы экипажа космических станций диктуется спецификой условий на них: замкнутое пространство пилотируемых станций, наличие скрытых полостей, сниженная гравитация, способствующая образованию аэрозолей в воздухе. Все это является благоприятной средой для роста и передачи патогенных микроорганизмов, в том числе вируса герпеса [11]. А.М. Paul, S.D. Mhatre et al. в качестве оценки клеточного компонента проводили подсчет лейкоцитарной формулы крови и цитокинового профиля [12, 13]. В их исследовании было установлено снижение количества эозинофилов

и некоторое повышение числа нейтрофилов при пассивизации Т-лимфоцитов *in vitro*, что, вероятно, связано со снижением экспрессии CD3 и IL-2 рецепторов на поверхности Т-лимфоцитов [14]. В других работах выявлено снижение количества лейкоцитов, в частности лимфоцитов, моноцитов [9], и дифференцировки лейкоцитов [15]. Микрогравитация способствует повышению выработки фактора некроза опухоли и развитию апоптоза иммунных клеток [16], что подтверждается исследованиями на клеточных линиях. С.А. Savary et al. установили, что дендритные клетки, полученные путем дифференцировки донорских CD34⁺ клеток-предшественников, в условиях врачающейся культуральной ячейки, моделирующей условия микрогравитации, демонстрировали снижение способности к фагоцитозу грибов *Candida albicans* и презентации антигенов [17].

В ряде работ зафиксировано снижение цитотоксической функции натуральных киллеров в отношении лейкоцитных клеток линии K562 в условиях *in vitro*, возникающих на ранних этапах космического полета [18].

V.K. Ilyin et al. установили, что во время космического полета снижаются уровни иммуноглобулинов IgA, IgM, и IgG в слюне и десневой жидкости. Отмеченные сдвиги, по всей видимости, могут являться триггерами снижения защитной функции слюны и способствовать риску возникновения инфекционно-воспалительных процессов при выявлении у испытуемых основных пародонтопатогенных штаммов возбудителей в ротовой полости [19].

В работах С.М. Ott et al. показано, что в условиях микрогравитации и длительного космического полета происходит реактивация латентных герпесвирусов, о чем свидетельствует повышение частоты определения в слюне космонавтов вируса герпеса человека 1-го типа и учащение случаев опоясывающего лишая. Кроме того, исследователи диагностировали в моче 47% членов экипажа «Спейс Шаттла» цитомегаловирус [20].

Рядом научных исследований подтверждено формирование в условиях космического полета общего дисбаланса со стороны иммунной системы: с данными нарушениями иммунитета столкнулось порядка 46% членов экипажа МКС [21]. Зарегистрировано снижение местного иммунитета, функциональной активности натуральных киллеров, что привело к реактивации латентных вирусов, в частности вируса герпеса. Рядом публикаций (порядка 17% сообщений) отмечены аллергические реакции, обусловленные как сдвигом цитокинового профиля, так и иными факторами космического полета (стресс, космическая радиация), влияющими на состояние иммунной системы [21].

Сотрудниками Национального управления по аeronautике и исследованию космического пространства NASA (National Aeronautics and Space Administration, NASA) также были выявлены изменения со стороны иммунного ответа у астронавтов в условиях полета на космических аппаратах «Apollo» (1975) и «Skylab» (миссия «Skylab-3», 1973). Собранные в рамках космического полета образцы сыворотки крови были проанализированы на предмет содержания микро-RНК miR-21, экспрессия которых увеличивается примерно в два раза при ранней активации Т-клеток. По результатам исследований 4-х биологических образцов с помощью количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) установлено подавление экспрессии miR-21 в условиях космического полета и подавление экспрессии 85 генов. В частности, была снижена

экспрессия белка ответа раннего роста 3 (EGR3), Fas-лиганды суперсемейства TNF (FASLG), белка семейства (BTG2), гомолога 2 Спрути (SPRY2) и белка-активатора Т-клеточной ГТФазы (TAGAP), чья регуляция осуществляется именно miR-21. По мнению M. Hughes-Fulford et al., изменение экспрессии TAGAP функционально может быть связано с развитием ревматоидного артрита и множественного склероза, а снижение экспрессии гена BTG2 снижает клеточный иммунный ответ [22].

Особенности влияния условий космического полета на выделительную систему

Согласно данным литературы, фильтрационную функцию почек в условиях микрогравитации традиционно изучали по концентрации креатинина и остаточного продукта метаболизма белков — концентрации мочевины. Поскольку креатинин содержится в мышечных клетках, то, учитывая относительно стабильную мышечную массу, уровень его не подвержен существенным колебаниям. Экскреция креатинина производится почками, что при отсутствии данных о мышечной травме позволяет эффективно оценивать скорость почечной фильтрации [23]. Общий анализ мочи традиционно применяется в практике клинико-лабораторной диагностики для оценки выделительной и фильтрующей функции почек и оценки гомеостаза организма. В практике космической медицины он реализуется на платформе входящего в состав бортового оборудования МКС анализатора мочи «Уролюкс», в котором используются 10-зонные тест-полоски. Измерения проводят методом рефлексионной фотометрии. Оцениваемые параметры включают удельную плотность мочи, кислотности (рН), наличие лейкоцитов, нитритов, белка, глюкозы, кетоновых тел, уробилиногена, билирубина и элементов крови (эритроциты, лейкоциты) [24]. В настоящее время биохимический анализ мочи является еще одним рутинным комплексным методом оценки состояния выделительной системы, в том числе в условиях космического полета. K. Siew et al. сообщают об обратимой перестройке почечных клубочков, вызванной адаптацией к изменениям электролитного состава крови, и перераспределении жидкости в организме, обусловленном краиальным смещением. Отмечено повышение секреции ионов кальция, фосфора и магния в выделяемой моче, которое предположительно связано с резорбцией костной ткани [25].

Особенности влияния условий космического полета на систему свертывания крови

Проблема тромбообразования в условиях микрогравитации является актуальной в современной космонавтике. В 2019 году методом УЗИ установлено, что у 6 из 11 членов экипажа МКС имелось бессимптомное нарушение кровотока в сосудах головы и шеи, при этом у одного из космонавтов в ходе планового ультразвукового исследования был обнаружен окклюзирующий тромбоз левой внутренней яремной вены [26]. Причиной тромбообразования является как снижение скорости движения крови по сосудам, связанное с гиподинамией, так и биохимические изменения крови и эндотелия. Изменение белкового состава крови влияет на толщину и функциональное состояние гликокаликса сосудов [27] и меняет реологические свойства крови, повышая ее вязкость, что ведет к повышенному риску тромбообразования. В раннем

послеполетном периоде было отмечено увеличение показателей, свидетельствующих о повышенном потенциале тромбообразования, таких как растворимые фибриномономерные комплексы (РФМК) [28], фактор XI, фибриноген, фибринопептид А, ингибитор активатора плазминогена серпин-3 и многие другие [29]. На формирование тромбоза также может влиять плановое употребление оральных контрацептивов в процессе полета с целью достижения медикаментозной аменореи [30], практикуемой из гигиенических и водосберегающих соображений у женщин-космонавтов. Согласно опубликованным данным, регулярный прием препарата, содержащего дроспиренон, приводит к снижению концентрации альбумина в плазме крови. В отсутствие приема фармпрепаратов белковый состав плазмы крови и связанные с этим риски тромбозов не имели половых различий [31]. Однако исследуемая выборка космонавтов в настоящее время мала по объему, и ее дальнейшее увеличение в ходе развития космических программ в будущем может выявить предпосылки к возникновению разнонаправленных отклонений в системе гемостаза.

На сегодня повышенный риск тромбообразования, вызванный длительным пребыванием в условиях микрогравитации, связан с рядом факторов, трудно поддающихся коррекции, таких как изменения кровообращения, клеточного состава крови и активности сигнальных молекул. Для выявления патологического звена в системе коагуляции необходимо определение большого числа биомаркеров, что сопряжено с одновременной обработкой различных типов биоматериала и длительным этапом пробоподготовки. Забор биоматериалов различного типа в условиях невесомости является нежелательным в связи техническими ограничениями и возрастанием дополнительных рисков для здоровья космонавтов. Данные ограничения выдвигают требования к созданию тест-систем, способных анализировать минимальное количество интегральных показателей в свертывающей системе крови, достаточных для мониторинга состояния здоровья космонавтов, с перспективой возможности определения механизмов развития конкретной патологии. В случае обнаружения тромбоза крупных сосудов ввиду логистических особенностей невозможно оказание хирургической помощи, а применение медикаментозной терапии затруднено ввиду ограниченного набора фармпрепаратов и развития возможных осложнений, способных утяжелить состояние космонавта.

Таким образом, поиск ранних биомаркеров состояния системы гемостаза, научное обоснование способов диагностики/коррекции и профилактики коагулопатий у членов экипажа космических станций является перспективным направлением развития космической медицины. Однако на данный момент количество биологических маркеров, необходимых для полной характеристики процессов свертывания, очень велико, что делает их измерение в условиях полета затруднительным.

Потенциальными информативными маркерами функционирования свертывающей системы крови могут быть микро-РНК — небольшие некодирующие молекулы РНК (16–25 нуклеотидов), выполняющие регуляторную функцию в отношении ряда генов. В исследованиях на грызунах, а также в рамках NASA Twins Study были выявлены микро-РНК, связанные с системой гемостаза и более интенсивно экспрессируемые в условиях космического полета: miR-125, miR-16 и let-7a/7c [32, 33]. Данные

микро-РНК ассоциированы с механизмами развития радиационного повреждения сосудистой стенки и, следовательно, могут быть предикторами тромбообразования. Отмечено изменение уровня miR-16, имеющего противовоспалительное и антитромботическое действие [32]. На сегодня отсутствует однозначная информация относительно прогностической ценности определения микро-РНК в крови человека в связи недостаточным объемом накопленных научных данных, и это не позволяет использовать микро-РНК в качестве биомаркера контроля состояния здоровья экипажа. Проведение исследований микро-РНК связано с постановкой ПЦР, что в условиях невесомости пока не реализуется.

Влияние условий космического полета на репродуктивную систему

В рамках эксперимента «ИММУНО» (2012–2017 гг.) в течение 5 лет проводили оценку состояния репродуктивной системы космонавтов, осуществлявших длительные миссии на МКС. В экспериментальную группу были включены исключительно лица мужского пола, что следует учитывать при трактовке данных. Проводили измерение уровня лютеинизирующего (ЛГ) и фолликулостимулирующего (ФСГ) гормонов, влияющих на синтез тестостерона интерстициальными клетками Лейдига [34]. Определяли уровень активина А, отвечающего за регуляцию синтеза ФСГ, регулирующего иммунный ответ и процесс заживления ран [35], а также антагонистичного ему белка, вырабатываемого клетками Сертоли ингибина В, подавляющего синтез фолликулостимулирующего гормона [36]. Исследование дополняли определением концентрации антиспермальных иммуноглобулинов А, Г, М (AC-IgA, AC-IgG, AC-IgM) и суммы антиспермальных антител, а также общего и свободного кортизола в слюне [37], тестостерона, эстрадиола и альдостерона [38]. Стоит отметить, что все исследования выполняли после завершения космического полета методом ИФА. Установлено, что в условиях длительного космического полета повышен был уровень эстрогенов, что связывали со снижением содержания специфических и неспецифических транспортных белков в организме, в то же время отмечали повышение концентрации стрессового гормона кортизола. В ходе исследования И.А. Ничипорук и соавт. [37] не удалось однозначно установить совокупность факторов, приводящих к гормональному дисбалансу, однако было отмечено, что изменения в репродуктивной системе носят обратимый характер.

Особенности влияния космического полета на опорно-двигательный аппарат

В условиях длительного космического полета все космонавты подвержены деградации опорно-двигательного аппарата, что проявляется в снижении мышечной массы, минерализации костей и перестройке коллагена в костях, сухожилиях и связках. Большинство крупных костей, испытывающих в условиях земного тяготения постоянную нагрузку, в невесомости подвергаются частичной резорбции, что ведет как к перестройке микро- и макроструктуры кости, так и к деминерализации большинства костей. Наибольшую опасность вызывают повреждения скелета нижних конечностей, тел поясничных позвонков, костей таза, высоконагруженных костей основания черепа и шейных позвонков. Менее критичной является

частичная деминерализация тонких губчатых костей, несущих меньшую нагрузку. Единственным исключением являются кости верхней части черепа, плотность которых в условиях невесомости возрастает, что обусловлено естественным компенсаторным ответом на изменяющуюся нагрузку. Данные состояния серьезно влияют на физическое здоровье космонавтов и возможность выполнения ими своих основных задач. В условиях космического полета для оценки физического состояния человека проводили измерения объема мышц [39], динамометрию, миографию [40], тензометрию, биомпедансометрию, являющиеся косвенными методами, не дающими ясной картины происходящих в организме процессов. В предполетном и раннем послеполетном периодах проводили обследования с использованием неинвазивного метода остеоденситометрии [41]. Установлено, что влияние микрогравитации не ограничивается развитием остеопении, а сопровождается перераспределением минеральной плотности костной ткани.

Состояние мышечной системы и эффективность тренировок перед выходом в открытый космос оценивают методом велоэргометрии; на результаты оказывают влияние возраст, состояние сердечно-сосудистой системы, утомление. Более того, требуется наличие данных о предыдущих измерениях исследуемого.

Оптимальным является определение клинических молекулярных маркеров, проводимое непосредственно в процессе полета и позволяющее оценивать как общее состояние, так и его изменение под воздействием нагрузок и других внешних факторов. Часть маркеров являются низкомолекулярными соединениями и выводятся почками, что делает доступным их определение в моче, в то время как другие маркеры не способны пройти почечный барьер, и их определение возможно только в крови.

Повреждение мышечной системы можно устанавливать по уровню креатинкиназы, что было реализовано в работе [42], однако данный параметр неспецичен относительно вида мышечной ткани и может свидетельствовать о повреждении как скелетной мышцы, так и миокарда.

Резорбция кости — сравнительно медленный процесс, осуществляемый остеокластами. Активированный остеокласт фиксируется специфическими белками интегринами к костному матриксу и запускает синтез катепсина-К, который относится к кислым протеазам, способным разрушать структурный коллаген первого типа, составляющий более 80% органического вещества кости. В результате этого процесса в кровоток попадают крупные фрагменты коллагена, содержащие большое количество пиридиновых сшивок. Остеоклазы синтезируют матрикные металлпротеазы, в результате работы которых в очаге резорбции в кровоток попадают крупные фрагменты коллагена, состоящие из двух С-телопептидов коллагена первого типа, быстро выводящихся с мочой. Третьим важным компонентом резорбции кости является трансмембранный транспорт в клетку продуктов разрушения матрикса с помощью тартрат-резистентной кислой фосфатазы. В процессе резорбции происходит высвобождение ионов кальция и рост его концентрации в крови, что может способствовать развитию уро- и нефролитиаза. В исследовании [43] показано повышенное содержание кальция в утренней моче и предложено использовать его определение для контроля состояния костной системы. Однако концентрация ионизированного

кальция зависит не только от процессов, происходящих в костной ткани, что существенно снижает диагностическую ценность его определения.

Таким образом, С-теплопептид коллагена, пиридиновые сшивки (пиридинолин и деоксиридины) и тартрат-резистентная кислая фосфатаза являются удобными маркерами костной резорбции.

Параллельно костной резорбции идет процесс формирования костной ткани остеобластами. Резорбционную гашишову лакуну заполняют фибробласты и остеобласти, синтезирующие коллаген первого типа, формируя остеоид. В процессе созревания коллагена от него отделяется определяемый в крови N-пропептид (P1NP, амино-терминальный пропептид проколлагена 1-го типа), который можно рассматривать как маркер формирования костного матрикса. В то же время высокая механическая прочность кости обеспечивается минеральной составляющей, в формировании которой важную роль играет неколлагеновый белок остеокальцин, способствующий минерализации кости за счет укладки ориентированных кристаллов гидроксиапатита [44]. В формировании костного матрикса участвует фермент щелочной фосфатазы, точная функция которой до сих пор неизвестна. Учитывая, что недостаточный уровень кальция в крови может препятствовать формированию новой кости или провоцировать снижение минерализации, при tolковании результатов исследования необходимо учитывать уровень ионизированного кальция в крови [45].

Ранее проведенные исследования показали снижение P1NP и костной щелочной фосфатазы уже к 8-м суткам пребывания в условиях невесомости. Одновременно повышались такие маркеры костной резорбции, как пиридиновые сшивки и С-теплопептиды коллагена первого типа в крови и моче [46].

Влияние на процессы костного ремоделирования не ограничивается гиподинамией и ортостатической гипотензией. Направление протекающих процессов регулируется гуморальной системой, в том числе стероидными гормонами. Космический полет связан с серьезными физическими и психоэмоциональными нагрузками, что ведет к выработке кортизола. Кортизол препятствует формированию новой костной ткани, сдвигая равновесие костного ремоделирования в сторону нарушения трофики костной ткани и резорбции [47].

В контексте потери костной тканью своей обычной структуры в условиях космического полета представляется интерес участие микро-RНК в регуляции образования костной ткани *de novo*. Для проверки гипотезы об изменении секреции микро-RНК остеобластами человека в условиях микрогравитации была изучена экспрессия микро-RНК в бедренной кости крыс. Были выявлены 14 микро-RНK, значимо снижающих экспрессию в условиях моделирования невесомости, и 5 микро-RНK, экспрессия которых в этих условиях значимо увеличивалась. Основными мишеними, регулируемыми данными микро-RНK, были гены сигнального пути Wnt/β-катенин и эстроген-опосредованной регуляции клеточного цикла [48]. Предполагается, что полученные результаты могли бы косвенно свидетельствовать о состоянии костной ткани космонавта, однако подобные результаты в литературе на данный момент отсутствуют.

В 2014–2015 гг. NASA проводило исследования содержания в моче соединений, отражающих состояние опорно-двигательной системы: мочевины, фосфора и кальция, креатинина. Результаты представляли в виде

отношения к креатинину как показателю, отражающему скорость клубочковой фильтрации. Отмечено временное снижение соотношений мочевина/креатинин и фосфор/креатинин, одновременно наблюдали повышение соотношения кальций/креатинин [49].

Исследование протеома мочи после длительного космического полета показало исчезновение пептидов: рецептора тирозинкиназы (IPI00296992); цитоскелетного кератина-1 (IPI00009865); связанного с G-белком рецептора из семейства C (IPI00789902); ингибитора интер-α (глобулина) H4 (IPI00944960) и белка гена SERPING1 (IPI00879931) [41, 50].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ результатов проведенных исследований позволяет заключить, что наиболее перспективными для оценки состояния организма человека в условиях невесомости (микрогравитации) являются маркеры следующих систем: костной, системы свертывания крови, иммунной системы.

Развивающееся в результате микрогравитации снижение плотности костной ткани потенциально несет риски травматизма, например при возвращении космонавтов на Землю, поэтому мониторинг состояния костного скелета человека является актуальной проблемой лабораторной диагностики. Наиболее информативными маркерами образования новой костной ткани могут служить P1NP, костная щелочная фосфатаза и остеокальцин, а ее лизиса — С-теплопептид коллагена, пиридиновые сшивки (пиридинолина и деоксиридины) и тартрат-резистентная кислая фосфатаза. Микро-RНK также являются перспективными маркерами состояния опорно-двигательного аппарата, однако их участие в регуляции ряда систем организма не позволяет судить о процессах в костной ткани по отдельно взятым микро-RНK. Выходом из данной ситуации может быть многопараметрический анализ набора из нескольких микро-RНK. Своего технологического решения требует также трудность постановки ПЦР в условиях невесомости.

К патологиям сердечно-сосудистой системы, риск которых повышается в условиях микрогравитации, относится уменьшение микроциркуляции и развитие тромбозов. Наиболее информативными маркерами риска и динамики развития тромботических осложнений, согласно доступным данным литературы, могут служить РФМК, фактор XI, фибриноген, фибринопептид А и ингибитор активатора плазминогена серпин-3. Микро-RНK семейств miR-125, miR-16 и let-7a/7c также являются перспективными молекулярными маркерами осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы.

В данной работе не рассмотрены маркеры состояния ЦНС. В настоящее время отсутствуют однозначные молекулярные и биохимические маркеры, позволяющие диагностировать конкретное неврологическое нарушение, а также выявить различия между здоровыми людьми и пациентами с нарушениями деятельности ЦНС. Дополнительно нарушения функционирования ЦНС у человека выявляются уже на этапе отбора специалистов к полетам.

Увеличение длительности пребывания в условиях микрогравитации, в том числе связанное с перспективой осуществления пилотируемых межпланетных полетов, выдвигает новые требования к контролю состояния здоровья космонавтов. Актуальным является тотальный

мониторинг состояния организма, однако ввиду ограничений в условиях космической станции необходимо сосредоточиться на постепенном внедрении диагностических маркеров — анализаторов для работы в условиях микрогравитации и последующем расширении панели. Например, по мнению авторов, стоит рассмотреть биологические маркеры, характеризующие процесс

ремоделирования костной ткани, характеризующийся резорбцией костной ткани нижних отделов тела, гиперминерализацией костей черепа и шейных отделов позвоночника. При этом аналитические системы на основе микрофлюидных технологий представляются наиболее перспективным инструментом для мониторинга данных маркеров во время космического полета.

Литература / References

- Zwart SR, Mulavara AP, Williams TJ, George K, Smith SM. The role of nutrition in space exploration: Implications for sensorimotor, cognition, behavior and the cerebral changes due to the exposure to radiation, altered gravity, and isolation/confinement hazards of spaceflight. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2021;127:307–31.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.10.008>
- Ковалева АА, Пичулин ВС, Скединя МА. Неинвазивные методы исследования клеточного состава крови в условиях космического полета. *Труды МАИ*. 2013;65:12.
Kovaleva AA, Pichulin VS, Skedina MA. Neinvazivnye metody issledovanija kletochnogo sostava krovi v uslovijah kosmicheskogo poleta. *TrudyMAI*. 2013;65:12 (In Russ.).
EDN: [RBWGMV](#)
- Ракетно-космическая корпорация «Энергия» имени С.П. Королева. Эксперимент «Профилактика-2». URL: <https://www.energia.ru/ru/iss/researches/human/26.html> (дата обращения 29.05.2024).
Raketno-kosmicheskaja korporacija «Jenergija» imeni S.P. Koroljova. jeksperiment «profilaktika-2». URL: <https://www.energia.ru/ru/iss/researches/human/26.html> (available from: 29.05.2024) (In Russ.).
- Tang O, Selvin E, Arends V, Saenger A. Short-Term Stability of Hematologic Parameters in Frozen Whole Blood. *The journal of applied laboratory medicine*. 2019;4(3):410–4.
<https://doi.org/10.1373/jalm.2018.028357>
- Эксперимент «Гематология». URL: <https://tsniiimash.ru/science/scientific-experiments-onboard-the-is-rs/cnts/experiments/gematologiya/> (дата обращения: 30.05.2024).
Jeksperiment “Gematologija”. URL: <https://tsniiimash.ru/science/scientific-experiments-onboard-the-is-rs/cnts/experiments/gematologiya/> (accessed: 30.05.2024) (In Russ.).
- Checinska Sielaff A, Urbaniak C, Mohan GBM, Stepanov VG, Tran Q, Wood JM et al. Characterization of the total and viable bacterial and fungal communities associated with the International Space Station surfaces. *Microbiome*. 2019;7(1):50.
<https://doi.org/10.1186/s40168-019-0666-x>
- Tozzo P, Delicati A, Caenazzo L. Skin Microbial Changes during Space Flights: A Systematic Review. *Life*. 2022;12(10):1498.
<https://doi.org/10.3390/life12101498>
- Поляков ВВ, Иванова СМ, Носков ВБ, Лабецкая ОИ, Ярлыкова ЮВ, Карапшин ВВ и др. Гематологические исследования в условиях длительных космических полетов. *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 1998;2(32):9–18.
Polyakov VV, Ivanova SM, Noskov VB, Labetskaya OL, Yarlykova YuV, Karashtin VV et al. Hematological investigations in conditions of long-term space flights. *Aviakosm Ekolog Med*. 1998;2(32):9–18 (In Russ.).
EDN: [TOKWLD](#)
- Kunz H, Quirriarte H, Simpson RJ, Ploutz-Snyder R, McMonigal K, Sams C et all. Alterations in hematologic indices during long-duration spaceflight. *BMC Hematol*. 2017;17(1):12.
<https://doi.org/10.1186/s12878-017-0083-y>
- Михайлова ПА, Кропотова МО, Шикульский АС, Нестеренко ТС, Григорьев ДА, Горбунов ММ. Изменение качественного и количественного состава крови у крыс под влиянием невесомости. *Форум молодых ученых*. 2018;9(25):568–71.
Mikhailova PA, Kropotova MO, Shikulsky AS, Nesterenko TS, Grigoryev DA, Gorbunov MM. The change in the qualitative and quantitative composition of the blood in rats under the influence of weightlessness. *Forum molodyh uchenyh*. 2018;9(25):568–71 (In Russ.).
EDN: [RBWGMV](#)
- Sobisch L-Y, Rogowski KM, Fuchs J, Schmieder W, Vaishampayan A, Oles P, et al. Biofilm Forming Antibiotic Resistant Gram-Positive Pathogens Isolated From Surfaces on the International Space Station. *Frontiers in microbiology*. 2019;10:543.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00543>
- Paul AM, Mhatre SD, Cekanaviciute E, Schreurs, A-S, Tahimic CGT, Globus RK et al. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio: A Biomarker to Monitor the Immune Status of Astronauts. *Frontiers in Immunology*. 2020;11:564950.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.564950>
- Krieger SS, Zwart SR, Mehta S, Wu H, Simpson RJ, Smith SM et al. Alterations in Saliva and Plasma Cytokine Concentrations During Long-Duration Spaceflight. *Frontiers in Immunology*. 2021;12:725748.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.725748>
- Akiyama T, Horie K, Hinoi E, Hiraiwa M, Kato A, Maekawa Y et al. How does spaceflight affect the acquired immune system?. *NPJ Microgravity*. 2020;6(1):14.
<https://doi.org/10.1038/s41526-020-0104-1>
- Crucian B, Stowe RP, Mehta S, Quirriarte H, Pierson D, Sams C et all. Alterations in adaptive immunity persist during long-duration spaceflight. *NPJ Microgravity*. 2015;1:15013.
<https://doi.org/10.1038/npjmggrav.2015.13>
- Bakos A, Varkonyi A, Minarovits J, Batkai L. Effect of simulated microgravity on human lymphocytes. *J Gravit Physiol*. 2001;8(1):69–70.
- Bakos A, Varkonyi A, Minarovits J, Batkai L. Characteristics of human dendritic cells generated in a microgravity analog culture system. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2001;37(4):216–22.
<https://doi.org/10.1007/BF02577532>
- Bigley AB, Agha NH, Baker FL, Spielmann G, Kunz HE, Mylabathula PL et al. NK cell function is impaired during long-duration spaceflight. *J Appl Physiol*. 2019;126(4):842–853.
<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00761.2018>
- Ильин ВК, Шумилина ГА, Соловьева ЗО, Носовский АМ, Каминская ЕВ. Некоторые показатели состояния полости рта и зубов космонавтов при полетах на международной космической станции. *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2016;50(6):25–30.
Ilyin VK, Shumilina GA, Solovieva ZO, Nosovsky AM, Kamin-skaya EV. Some characteristics of the oral cavity and teeth of cosmonauts on missions to the international space station. *Aerospace and Environmental Medicine*. 2016;50(6):25–30 (In Russ.).
EDN: [XHTNYN](#)
- Ott C. M, Oubre C, Wallace S, Mehta S, Pierson D, et al. Risk of Adverse Health Effects Due to HostMicroorganism Interac. Report Number JSC-CN-38050 Houston, 2016.
- Crucian B, Babiak-Vazquez A, Johnston S, Pierson DL, Ott CM, Sams C. Incidence of clinical symptoms during long-duration orbital spaceflight. *Int J Gen Med*. 2016;9:383–91.
<https://doi.org/10.2147/IJGM.S114188>
- Hughes-Fulford M, Chang TT, Martinez EM, Li CF. Spaceflight alters expression of microRNA during T-cell activation. *The FASEB Journal*. 2015;29(12):4893–900.
<https://doi.org/10.1096/fj.15-277392>
- Каюков ИГ, Галкина ОВ, Тимшина ЕИ, Зубина ИМ, Михеева АЮ, Бердичевский ГМ. Креатинин в современной оцен-

- ке функционального состояния почек (обзор литературы и собственные данные). *Нефрология*. 2020;24(4):21–36.
- Kayukov IG, Galkina OV, Timshina E.I.2, Zubina IM, Miheeva AU, Berdichevsky GM. Creatinin in the modern evaluation of the kidneys functional condition(Literature review and own data). *Nephrology (Saint-Petersburg)*. 2020;24(4):21–36 (In Russ.).
<https://doi.org/10.36485/1561-6274-2020-24-4-21-36>
24. Носкин А. Бортовое медицинское оборудование российского сегмента Международной космической станции (РСМКС). *Аэрокосмический курьер*. 2000;3:26–27.
 Noskin A. Bortovoe medicinskoe oborudovanie rossijskogo segmenta Mezhdunarodnoj kosmicheskoy stancii (RSMKS). *Ajero-kosmicheskij kur'yer*. 2000;3:26–7 (In Russ.)
25. Siew K, Nestler KA, Nelson C, D'Ambrosio V, Zhong C, Li Z, et al. Cosmic kidney disease: an integrated pan-omic, physiological and morphological study into spaceflight-induced renal dysfunction. *Nature communications*. 2024;15(1):4923.
<https://doi.org/10.1038/s41467-024-49212-1>
26. White NJ, Wenthe A. Managing Hemostasis in Space. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2023;43(11):2079–87.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.123.318783>
27. Aldecoa C, Llau JV, Nuvials X, Artigas A. Role of albumin in the preservation of endothelial glycocalyx integrity and the microcirculation: a review. *Ann Intensive Care*. 2020;10(1):85.
<https://doi.org/10.1186/s13613-020-00697-1>
28. Кузичкин ДС, Коcherгин АЮ. Влияние средств профилактики неблагоприятных эффектов космического полета на плазменный компонент системы регуляции агрегатного состояния крови человека. *Медицина труда и промышленная экология*. 2020;60(11):818–20.
 Kuzichkin DS, Kochergin AYU. Influence of means of prevention of adverse effects of space flight on the plasma component of the system of regulation of the aggregate state of human blood. *Meditina Truda i Promyshlennaya Ekologiya. Institut meditsiny truda RAMN*. 2020;60(11):818–20 (In Russ.).
<https://doi.org/10.31089/1026-9428-2020-60-11-818-820>
29. Kashirina DN, Percy AJ, Pastushkova LK, Borchers CH, Kireev KS, Ivanisenko VA, et al. The molecular mechanisms driving physiological changes after long duration space flights revealed by quantitative analysis of human blood proteins. *BMC Med Genomics*. 2019;12(S2):45.
<https://doi.org/10.1186/s12920-019-0490-y>
30. Jain V, Wotring VE. Medically induced amenorrhea in female astronauts. *NPJ Microgravity*. 2016;2(1):16008.
<https://doi.org/10.1038/npjgrav.2016.8>
31. Zwart SR, Auñón-Chancellor SM, Heer M, Melin MM, Smith SM. Albumin, oral contraceptives, and venous thromboembolism risk in astronauts. *Journal of applied physiology*. 2022;132(5):1232–9.
<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00024.2022>
32. Malkani S, Chin CR, Cekanaviciute E, Mortreux M, Okinula H, Tarbier M, et all. Circulating miRNA Spaceflight Signature Reveals Targets for Countermeasure Development. *Cell reports*. 2020;33(10):108448.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108448>
33. Garrett-Bakelman FE, Darshi M, Green SJ, Gur RC, Lin L, Macias BR, et al. The NASA Twins Study: A multidimensional analysis of a year-long human spaceflight. *Science*. 2019;364(6436):eaau8650.
<https://doi.org/10.1126/science.aau8650>
34. Chauvigné F, Verdura S, Mazón MJ, Duncan N, Zanuy S, Gómez A et all. Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone Mediate the Androgenic Pathway in Leydig Cells of an Evolutionary Advanced Teleost1. *Biol Reprod*. 2012;87(2).
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.100784>
35. Muttukrishna S, Farouk A, Sharma S, Evans L, Groome N, Ledger W et all. Serum activin A and follistatin in disorders of spermatogenesis in men. *Eur J Endocrinol*. 2001;144(4):425–9.
<https://doi.org/10.1530/eje.0.1440425>
36. Галимова ЭФ, Ахмадуллина ГХ, Булыгин КВ, Мочалов КС, Галимов ШН. Ингибитор Активин А в патогенезе идиопатического бесплодия у мужчин. *Казанский медицинский журнал*. 2015;96(5):749–52.
- Galimova EF, Akhmadullina GK, Bulygin KV, Mochalov KS, Galimov ShN. Inhibitor b and activin a in the pathogenesis of idiopathic male infertility. *Kazan medical journal*. 2015;96(5):749–52 (In Russ.).
<https://doi.org/10.17750/KMJ2015-749>
37. Ничипорук ИА, Чистокходова СА. Влияние длительных космических полетов на репродуктивную систему мужчин и ее взаимосвязь с составом тела. *Международный научно-исследовательский журнал*. 2023;1(127):76.
<https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.127.64>
- Nichiporuk IA, Chistokhodova SA. The effects of long term spaceflight on the male reproductive system and its relationship to body composition. *International Research Journal*. 2023;1(127):76 (In Russ.).
<https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.127.64>
38. Nichiporuk IA, Chistokhodova SA, Vorontsov AL. The effect of steroid hormones on physiological parameters and human body composition during short-term simulation of space flight factors. *International Research Journal*. 2022;12(126):70.
<https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.126.35>
39. Gopalakrishnan R, Genc KO, Rice AJ, Lee SM, Evans HJ, Maender CC, et al. Muscle Volume, Strength, Endurance, and Exercise Loads During 6-Month Missions in Space. *Aviat Space Environ Med*. 2010;81(2):91–104.
<https://doi.org/10.3357/asem.2583.2010>
40. Bensch L, Nilsson T, Cowley A. Electroencephalography (EEG), electromyography (EMG) and eye-tracking for astronaut training and space exploration. 2022. *Preprint*.
<https://doi.org/10.48550/arXiv.2212.06139>
41. Оганов ВС, Бакулин АВ, Новиков ВЕ, Мурашко ЛМ, Кабитская ОЕ. Изменения костной ткани человека в космическом полете. Феноменология. *Остеопороз и остеопатии*. 2005;8(2):2–7.
 Oganov VS, Bakulin AV, Novikov VE, Murashko LM, Kabitskaya OE. Izmeneniya kostnoy tkani cheloveka kosmicheskym polote: o vozmozhnykh mekhanizmakh osteopenii. *Osteoporosis and Bone Diseases*. 2005; 8(2):2–7 (In Russ.).
 EDN: MTBJPN
42. Clarkson PM, Kearns AK, Rouzier P, Rubin R, Thompson PD. Serum Creatine Kinase Levels and Renal Function Measures in Exertional Muscle Damage. *Medicine and science in sports and exercise*. 2006;38(4):623–7.
<https://doi.org/10.1249/01.mss.0000210192.49210.fc>
43. Thamer S, Buckey JC. First Void Urinary Calcium for Tracking Bone Loss and Kidney Stone Risk in Space. *Aerospace medicine and human performance*. 2022;93(7):546–50.
<https://doi.org/10.3357/AMHP.5979.2022>
44. Caillot-Augusseau A, Vico L, Heer M, Vorobiev D, Souberbielle JC, Zitterman A et al. Space Flight Is Associated with Rapid Decreases of Undercarboxylated Osteocalcin and Increases of Markers of Bone Resorption without Changes in Their Circadian Variation: Observations in Two Cosmonauts. *Clinical chemistry*. 2000;46(8):1136–43.
45. Кучин РВ, Стогов МВ, Нененко НД, Максимова ТА. Функциональная гипокальциемия как вероятный триггер роста костной массы у лыжниц. *Теория и практика физической культуры*. 2022;9(9):57–9.
 Kuchin RV, Stogov MV, Nenenko ND, Maksimova TA. Functional hypocalcemia as a probable trigger for bone mass growth in skiers. *Theory and practice of physical culture*. 2022;9(9):57–9 (In Russ.).
 EDN: BEYONH
46. Caillot-Augusseau A, Lafage-Proust MH, Soler C, Pernod J, Dubois F, Alexandre C. Bone formation and resorption biological markers in cosmonauts during and after a 180-day space flight (Euromir 95). *Clinical chemistry*. 1998;44(3):578–85.
47. Корокин МВ, Солдатов ВО, Гудырев ОС, Коклин ИС, Таран ЭИ, Мишенин МО. Роль метаболизма кортизола в реализации патогенетических звеньев развития остеопороза — обоснование поиска новых фармакотерапевтических мишней (обзор). *Научные результаты биомедицинских исследований*. 2022;8(4):457–73.
 Korokin MV, Soldatov VO, Gudyrev OS, Koklin IS, Tarhan EI, Mishenin MO. The role of cortisol metabolism in the realization

- of pathogenetic links in the development of osteoporosis — the rationale for the search for new pharmacotherapeutic targets (review). *Research Results in Biomedicine*. 2022;8(4):457–73 (In Russ.).
<https://doi.org/10.18413/2658-6533-2022-8-4-0-5>
48. Thomas NJ, Choi CY, Alwood JS. Skeletal Micro-RNA Responses to Simulated Weightlessness [Electronic resource]. URL: <https://ntrs.nasa.gov/citations/20160009015> (Available from: 28.05.2024). Document ID 20160009015.
49. Bilancio G, Cavallo P, Lombardi C, Guarino E, Cozza V, Giordano F et al. Urea and Minerals Monitoring in Space Missions by Spot Samples of Saliva and Urine. *Aerospace medicine and human performance*. 2019;90(1):43–7.
<https://doi.org/10.3357/AMHP.5200.2019>
50. Пастушкова ЛХ, Валеева ОА, Кононихин АС, Nikolaev EN, Ларина ИМ, Доброхотов ИВ. и др. Изменения белковой композиции мочи человека после продолжительных орбитальных полетов. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2013;156(2):201–4.
Pastushkova LK, Valeeva OA, Larina IM, Dobrokhотов IV, Kononikhin AS, Nikolaev EN, et al. *Changes of protein profile of human urine after long-term orbital flights*. 2013;156(2):201–4 (In Russ.).
EDN: [OWMSSD](#)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: В.А. Иванов, Я.Д. Шанский — концепция, дизайн исследования, сбор информации, работа с литературой, написание текста; К.А. Прусаков — редактирование текста; Ю.А. Беспятых, Д.В. Басманов — концепция, дизайн исследования, редактирование текста, общее руководство.

ОБ АВТОРАХ

Иванов Виктор Андреевич
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4766-1386>
Ivanov@rcpcm.org

Шанский Ярослав Дмитриевич, канд. бiol. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4672-2474>
yar.shansky@rcpcm.org

Прусаков Кирилл Александрович
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7244-5741>
kaprusakov@gmail.com

Беспятых Юлия Андреевна, канд. бiol. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4408-503X>
JuliaBes@rcpcm.org

Басманов Дмитрий Викторович
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6620-7360>
dmitry.basmanov@niifhm.ru

<https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-123-131>

КОРРЕЛЯЦИЯ ПАРАМЕТРОВ ПРОТЕОМА КРОВИ С КОЛИЧЕСТВОМ НЕКОТОРЫХ БАКТЕРИЙ КИШЕЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ У ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН

Д.В. Комиссарова[✉], Л.Х. Пастушкова, Д.Н. Каширина, В.К. Ильин, И.М. Ларина

Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

Введение. Микрофлора кишечника человека обладает целым спектром важных для организма функций: осуществляет неспецифическую противовоспалительную защиту посредством продукции бактериоцинов, органических кислот и веществ с бактериостатическими свойствами, стимулирует эукариотические клетки к синтезу муцина и веществ с антимикробной активностью, подавляет развитие воспалительных реакций в клетках эпителия кишечника. Очевидно, эти бактерии действуют синергично с иммунокомпетентными клетками кишечника, претерпевающими изменения в условиях невесомости, моделируемых с помощью «сухой» иммерсии. Регуляторные и метаболические изменения, происходящие во время модельных экспериментов, отражаются в том числе на белковом составе крови.

Цель. Выявление взаимосвязи между уровнем белков в крови человека и количеством *E. coli*, *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. и *Bifidobacterium* spp. в кишечнике с применением экспериментальной модели 3-суточной «сухой» иммерсии для потенциального использования в качестве клинических рекомендаций по коррекции микрофлоры кишечника, основываясь на данных протеомного профиля крови.

Материалы и методы. Исследование проведено с участием 6 женщин возрастом 25–40 лет. Во время 3-суточной «сухой» иммерсии испытуемые находились в иммерсионной ванне полностью погруженными в воду комнатной температуры, исключая прямой контакт кожи испытуемых и воды. В ходе исследования отбирались фекальные пробы и образцы капиллярной крови у каждой из участниц. Для оценки количества белков проводили хромато-масс-спектрометрический анализ образцов высущенных пятен крови с использованиемnano-ВЭЖХ Dionex Ultimate3000, совмещенным с масс-спектрометром TimsTOF Pro. Исследование количества кишечных бактерий проводили с помощью культурального посева предварительно разведенных образцов фекалий на селективные среды по стандартной методике с последующим учетом колоний.

Результаты. Регрессионная модель показала связь между уровнями отдельных белков и представителями кишечной микрофлоры. Была выявлена статистически значимая корреляционная взаимосвязь белков крови ENO1 ($r = 0,71$), MYH9 и SPTA1 ($r = -0,99$) с количеством *E. coli*; белков крови EPB41, VCP, C8B и CCT2 ($r = 0,74$) и белков FAH, YWHAE ($r = -0,46$) с количеством *Bifidobacterium* spp., а также достоверная сильная положительная корреляционная взаимосвязь между *Lactobacillus* spp. и белками ENO1, CA2 ($r = 0,74$), S100A6 и HSPA4 ($r = -0,87$). С количеством *Enterococcus* spp. коррелировал белок CALM2 ($r = -0,76$).

Выводы. Выявлены комплексы белков, количество которых коррелировало с количеством некоторых видов микрофлоры кишечника: белки, связанные с иммунной системой; белки, прямо или косвенно влияющие на процессы пищеварения и минеральный обмен; белки, влияющие на толерантность клеток к гипоксии.

Ключевые слова: микрофлора кишечника; белки крови; «сухая» иммерсия; хромато-масс-спектрометрия

Для цитирования: Комиссарова Д.В., Пастушкова Л.Х., Каширина Д.Н., Ильин В.К., Ларина И.М. Корреляция параметров протеома крови с количеством некоторых бактерий кишечной микрофлоры у здоровых женщин. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2024;26(4):123–131. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-123-131>

Финансирование: исследование выполнено в рамках тем фундаментальных научных исследований FMFR-2024-0035 и FMFR-2024-0032.

Благодарности: авторы выражают благодарность Елене Сергеевне Томиловской из ГНЦ РФ Института медико-биологических проблем РАН за проведение эксперимента с «сухой» иммерсии.

Соответствие принципам этики: исследование одобрено биоэтической комиссией Института медико-биологических проблем РАН (протокол № 544 от 16 июля 2020 г.) и полностью соответствовало принципам Хельсинкской декларации 1964 г. Все участницы исследования добровольно подписали информированное согласие после объяснения им потенциальных рисков, преимуществ и характера предстоящего исследования.

Потенциальный конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

✉ Комиссарова Дарья Валерьевна d.komisarova@yandex.ru

Статья поступила: 06.09.2024 **После доработки:** 28.10.2024 **Принята к публикации:** 30.10.2024

CORRELATION OF BLOOD PROTEOME PARAMETERS TO THE NUMBER OF CERTAIN INTESTINAL MICROFLORA BACTERIA IN HEALTHY WOMEN

Daria V. Komissarova[✉], Ludmila Kh. Pastushkova, Daria N. Kashirina, Vyacheslav K. Ilyin, Irina M. Larina

Institute of Biomedical Problems, Moscow, Russia

Introduction. Human intestinal microflora fulfills a wide range of important functions for the body. It provides non-specific anti-inflammatory defense through the production of bacteriocins, organic acids and substances with bacteriostatic properties. It also stimulates eukaryotic cells to synthesize mucin and substances with antimicrobial activity, thus suppressing the development of inflammatory reactions in intestinal epithelial cells. These bacteria obviously act synergistically with immunocompetent intestinal cells undergoing changes in zero gravity conditions modeled using dry immersion. Regulatory and metabolic changes which occur during model experiments are reflected, inter alia, in the protein composition of the blood.

Objective. Identification of the relationship between the blood protein level and the amount of *E. coli*, *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. and *Bifidobacterium* spp. in the intestine using an experimental model of 3-day dry immersion for potential use as clinical recommendations for the correction of intestinal microflora, based on data from the proteomic profile of the blood.

Materials and methods. The study was conducted among six women aged 25–40 years. During 3-day dry immersion, the subjects were completely immersed in an immersion bath containing water at room temperature. Direct contact between the subjects' skin and the water was excluded. During the study, fecal samples and capillary blood samples were taken from each of the participants. In order to assess the protein levels, chromatography-mass spectrometric analysis of samples of dried blood spots was performed using nano-HPLC Dionex Ultimate3000 combined with a timsTOF Pro mass spectrometer. The study of the number of intestinal bacteria was carried out using culture seeding of pre-diluted fecal samples on selective media according to a standard technique, followed by consideration of colonies.

© Д.В. Комиссарова, Л.Х. Пастушкова, Д.Н. Каширина, В.К. Ильин, И.М. Ларина, 2024

Results. The regression model showed a relationship between the levels of individual proteins and representatives of the intestinal microflora. A statistically significant correlation was found between blood proteins ENO1 ($r = 0.71$), MYH9 and SPTA1 ($r = -0.99$) with the amount of *E. coli*; blood proteins EPB41, VCP, C8B, CCT2 ($r = 0.74$), FAH, YWHAE ($r = -0.46$) with the amount of *Bifidobacterium* spp. There was also a significant strong positive correlation between *Lactobacillus* spp. and proteins ENO1, CA2 ($r = 0.74$) and S100A6 and HSPA4 ($r = -0.87$). The CALM2 protein ($r = -0.76$) correlated with the amount of *Enterococcus* spp.

Conclusions. Protein complexes were identified, the number of which correlated with the number of certain types of intestinal microflora: proteins associated with the immune system; proteins which directly or indirectly affect digestion and mineral metabolism; and proteins which affect cell tolerance to hypoxia.

Keywords: intestinal microflora; blood proteins; dry immersion; chromatography-mass spectrometry

For citation: Komissarova D.V., Pastushkova L.Kh., Kashirina D.N., Ilyin V.K., Larina I.M. Correlation of blood proteome parameters to the number of certain intestinal microflora bacteria in healthy women. *Extreme Medicine*. 2024;26(4):123–131. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-123-131>

Funding: the study was carried out as part of themes of scientific investigations FMFR-2024-0035 and FMFR-2024-0032.

Acknowledgements: the authors express their gratitude to Elena S. Tomilovskaya from the Institute of Biomedical Problems for conducting the dry immersion experiment.

Compliance with ethical principles: the study was approved by the Bioethical Commission of the Institute of Biomedical Problems (Protocol No. 544 of July 16, 2020) and was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki of 1964. All participants in the study voluntarily signed an informed consent after explaining to them the potential risks, benefits and nature of the upcoming study.

Potential conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

✉ Daria V. Komissarova d.komisarova@yandex.ru

Received: 6 Sep. 2024 **Revised:** 28 Oct. 2024 **Accepted:** 30 Oct. 2024

ВВЕДЕНИЕ

Нормальная микрофлора кишечника человека представлена широким спектром микроорганизмов, большинство из которых являются облигатными или факультативными анаэробами. Оппортунистические инфекции могут возникать непосредственно из-за облигатных возбудителей или косвенно из-за чрезмерного роста условно-патогенных микроорганизмов (УПМ); важную роль в этом играет и истощение популяции кишечных комменсалов (КК) [1]. Известно, что факторы космического полета, например измененный режим питания, гигиенических процедур, психоэмоциональное напряжение, постоянный микробный обмен, неизбежно возникающий в гермозамкнутом помещении космического корабля, негативно влияют на состав кишечной микробиоты, при этом отмечается активное размножение условно-патогенного компонента микрофлоры и снижение количества протективных видов микроорганизмов [2]. Это определяет необходимость разработки средств профилактики и снижения рисков развития дисбиотических состояний, а также проведения исследований для углубленного понимания взаимосвязей кишечной микробиоты и иных физиологических и биохимических показателей здоровья человека, что впоследствии позволит влиять на состав кишечной микробиоты через точечные воздействия на отдельные процессы в организме, например на метаболизм отдельных белков.

Подавляющее большинство бактерий обитает в толстом кишечнике. В проксимальных отделах тонкого кишечника в норме содержится до 10^4 КОЕ/мл микроорганизмов, что связано с pH среды (7,2–7,6) и бактерицидным действием желчи. Комменсальная микрофлора кроме участия в процессах пищеварения обладает целым спектром важных для организма хозяина функций. Она осуществляет неспецифическую противовоспалительную защиту через продукцию бактериоцинов, органических кислот и веществ с бактериостатическими свойствами, стимулирует эукариотические клетки к синтезу муцина и веществ с антимикробной активностью. Кроме того,

сообщество комменсальной микрофлоры направленно подавляет развитие воспалительных реакций в клетках эпителия кишечника. Очевидно, эти представители микрофлоры кишечника действуют синергично с местной иммунной системой [3, 4].

Следовательно, кишечник человека является не только важной частью пищеварительной системы для переваривания пищи, всасывания воды и питательных веществ, он также играет существенную роль в организации иммунной защиты [5]. Эпителиальные клетки слизистой оболочки кишечника задействованы в иммунной регуляции. В собственной пластинке слизистой оболочки кишечника присутствуют Т- и В-клетки, защищающие организм от проникновения патогенов. Помимо этого, клетки слизистой оболочки кишечника продуцируют различные цитокины, такие как гамма-интерферон (IFN- γ), фактор некроза опухоли α (TNF- α), интерлейкин 2 (IL-2) и интерлейкин 6 (IL-6), которые являются важными регуляторами как физиологических адаптивных реакций, так и врожденных иммунных реакций [6]. В частности, они могут участвовать в воспалительных реакциях и опосредовать дифференцировку, пролиферацию и активацию различных иммунных клеток [7]. Более того, кишечная микрофлора необходима для организации и осуществления различных иммунных реакций [8]. Так, микрофлора кишечных комменсалов активирует как врожденный, так и адаптивный иммунитет в клетках слизистой оболочки кишечника [9].

В настоящем исследовании нами предпринята попытка проанализировать возможную взаимосвязь комплекса белков в крови с количеством ряда бактерий кишечника женщин, участвующих в эксперименте с 3-суточной «сухой» иммерсией [10].

В проведенных ранее исследованиях микрофлоры кишечника у людей в эксперименте «сухой» иммерсии было выявлено существенное ухудшение состояния микрофлоры: увеличение доли УПМ, снижение количества КК [11].

По мнению некоторых исследователей, регуляторные и метаболические изменения, происходящие во время

экспериментов с «сухой» иммерсией, отражаются и на белковом составе крови. Исследования, выполненные методами протеомики на основе масс-спектрометрии, выявили изменения уровней плазминогена, фибронектина, других факторов свертывания и фибринолиза, повышение содержания продуктов фибринолиза, активацию системы комплемента [12]. Очевидно, что протеомные методы позволяют определить белки, реагирующие на сложный комплекс факторов «сухой» иммерсии, и уточнить молекулярные механизмы изменений в различных физиологических системах.

Цель исследования — выявление взаимосвязи между уровнем белков в крови человека и количеством *E. coli*, *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. и *Bifidobacterium* spp. в кишечнике с применением экспериментальной модели 3-суточной «сухой» иммерсии для потенциального использования в качестве клинических рекомендаций по коррекции микрофлоры кишечника, основываясь на данных протеомного профиля крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн эксперимента

В эксперименте «сухой» иммерсии продолжительностью 3 сут приняли участие 6 женщин в возрасте от 25 до 40 лет. Во время эксперимента все испытуемые не принимали антибактериальные препараты и иные средства, способные оказать влияние на колебания уровней микрофлоры. В начале эксперимента все участницы были распределены по фазе менструального цикла (фолликулярная фаза), чтобы избежать различий в уровнях эстрadiола и его эффектов на микрофлору и белки плазмы. Во время периода «сухой» иммерсии испытуемые не подвергались никаким дополнительным воздействиям, направленным на предотвращение адаптивных изменений в физиологических системах [10].

Эксперимент «сухая» иммерсия является одним из методов имитации таких факторов, действующих на организм в космическом полете, как гипогравитация, опорная разгрузка, перераспределение жидкых сред организма в краинальном направлении. Во время «сухой»

иммерсии испытуемые женщины находились в иммерсионной ванне полностью погруженными в воду комнатной температуры, но благодаря водонепроницаемой пленке соприкосновения кожи испытуемых с водой не происходило, что позволяло увеличивать время пребывания в ванне (рис. 1).

Исследование было проведено на стеновой базе «Сухая иммерсия» ИМБП РАН. В течение всего эксперимента участницы находились в горизонтальном положении без физических нагрузок с ограничением произвольных движений.

Сбор образцов кала, культивирование и идентификация представителей кишечной микрофлоры

Пробы кала отбирали за 1–2 сут до начала эксперимента и на 1–3 сут после окончания «сухой» иммерсии для оценки количества *E. coli*, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Enterococcus faecium*. Из образцов фекалий готовили ряд десятикратных разведений в стерильном физиологическом растворе от 10^{-1} до 10^{-9} и затем 100 мкл инокулята высевали в чашки Петри с селективными питательными средами: среда Мана, Рогозы и Шарпа (МРС) (для культивирования бактерий рода *Lactobacillus* spp.), среда Эндо (для выращивания *E. coli*), агар для энтерококков, бифидоагар (производитель всех сред — Himedia, Индия). Культуры выращивали в термостате при 37 °C в течение 48–72 ч в зависимости от исследуемой культуры, бифидобактерии и лактобациллы выращивали в анаэробных условиях. Выросшие колонии подсчитывали с помощью счетчика колоний Stegler СКМ-2 и визуально идентифицировали [13].

Сбор образцов сухих пятен крови

Забор образцов капиллярной крови объемом 20 мкл для проведения хромато-масс-спектрометрического анализа проводили с помощью автоматического скарификатора путем прокола концевой фаланги безымянного пальца с последующим нанесением на специальные фильтры (Perkin Elmer) для высушивания (метод «сухого пятна»).



Фото публикуется с письменного согласия участников исследования

Рис. 1. Испытуемая в иммерсионной ванне

Образцы крови собирали у добровольцев за 2 сут до начала эксперимента и в динамике на 1-е, 2-е, 3-и сут во время «сухой иммерсии», а также через 2 сут после ее окончания. Пробы капиллярной крови после сбора были высушены при комнатной температуре в течение 2 часов, а затем хранили высушенные образцы пятен крови при -20 °C.

Сухие пятна крови готовили к хромато-массспектрометрическому анализу для определения белков в крови человека следующим образом: белки экстрагировали в буфере, содержащем 25 мМ бикарбоната аммония, 1% дезоксихолата натрия и 5 мМ ТСЕР (трип-2-карбоксиэтил) фосфин гидрохлорид (Thermo Scientific), при температуре 60 °C со скоростью встряхивания 1000 оборотов в минуту (термомиксер, Eppendorf) в течение 1 часа, затем восстанавливали, алкилировали, осаждали и расщепляли трипсином, как описано в методике [14].

Хромато-масс-спектрометрический анализ экстрактов сухих пятен крови

Смеси триптических пептидов разделяли с помощью жидкостной хроматографии на основе нано-ВЭЖХ Dionex Ultimate3000 (Thermo Fisher Scientific, США), затем анализировали на масс-спектрометре TimsTOF Pro (Bruker Daltonics, США) с использованием метода параллельного накопления при последовательной фрагментации (PASEF) [15].

Статистический анализ

Статистический анализ полученных данных проведен с использованием ряда непараметрических методик. Изменения в кишечной микрофлоре оценивали с помощью непараметрического критерия Краскела — Уоллиса для связанных выборок. Вычисляли эубиотический индекс, который выражается в суммировании положительных и отрицательных количественных изменений проективных и условно-патогенных групп микроорганизмов

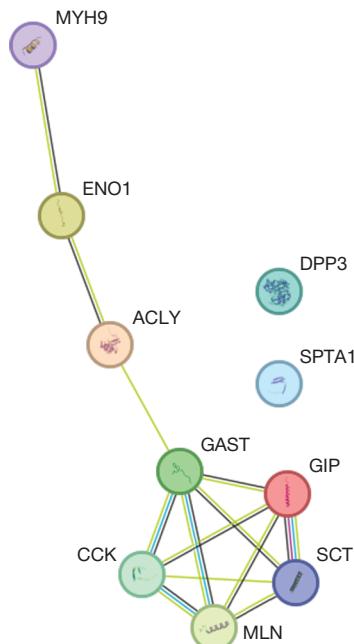


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 2. Взаимосвязь белков крови с количеством *E. coli* в кишечной микрофлоре испытуемых

и отражает позитивные сдвиги в составе микрофлоры. Статистическая обработка эубиотического индекса проводилась с помощью парного двухвыборочного *t*-теста для средних.

Изменение количества белков в крови оценивали с помощью дискриминантного анализа для малых выборок. Связь между уровнем белков в крови человека и численностью ряда бактерий кишечника была адекватно описана с помощью регрессионной модели, в которой в качестве зависимой переменной выступало количество ряда бактерий, в качестве независимой — количество белков [16]. Обработку результатов осуществляли с помощью пакета программного обеспечения Statistica 12.0. За критический уровень значимости принимали $p \leq 0,05$. Для визуализации взаимосвязей белков использовалась база данных STRING.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В образцах сухих пятен крови женщин-добровольцев идентифицировали порядка 1256 белков с определением их относительных уровней с использованием безметкового метода количественной оценки (label free quantification). Регрессионная модель показала связь между количеством ряда белков в крови, описанных ниже, и численностью бактерий *E. coli*, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Enterococcus faecium*.

В результате проведенного регрессионного анализа была выявлена взаимосвязь ряда белков с количеством кишечной палочки (*E. coli*) (рис. 2). Количество белка ENO1 (альфа-енолаза) в крови положительно коррелировало с количеством кишечной палочки ($r = 0,71$), в то время как для белков MYH9 (немышечный миозин с тяжелой цепью IIa), ACLY (АТФ-цитратлиаза), DPP3 (дипептидилпептидаза 3), SPTA1 (альфа-цепь спектрина) была выявлена сильная отрицательная корреляционная связь $r = -0,99$ ($p \leq 0,05$).

С количеством бифидобактерий (*Bifidobacterium* spp.) в кишечнике статистически значимо коррелировали белки EPB41 (мембранный белок эритроцитов band 4.1), A1BG (альфа-1-B гликопротеин), VCP (валозин-содержащий белок), C8B (бета-цепь C8 комплемента) и CCT2 (бета субъединица Т-комплекса), $r = 0,74$ ($p \leq 0,05$), также слабая отрицательная корреляция $r = -0,46$ ($p \leq 0,05$) наблюдалась для белков FAH (фермент фумарилакетоат-гидролаза) и YWHAE (белок активации тирозин-3-монооксигеназы/триптофан-5-монооксигеназы эпсилон). Соответствующие данные представлены на рисунке 3.

В ходе проведенного исследования при анализе данных была выявлена достоверная сильная положительная

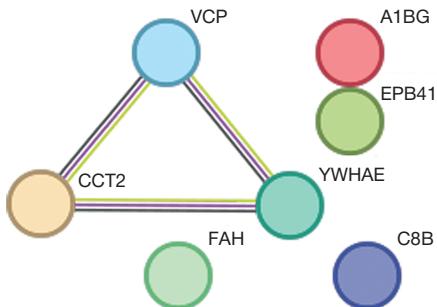


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 3. Взаимосвязь белков крови с количеством *Bifidobacterium* spp. в кишечной микрофлоре испытуемых

корреляционная взаимосвязь между количеством лактобацилл и белков в крови испытуемых ENO1, CA2 ($r = 0,74$) и отрицательная корреляционная связь между количеством *Lactobacillus* spp. и белками S100A6 и HSPA4 ($r = -0,87$). Также была выявлена отрицательная корреляционная зависимость между белком CALM2 (кальмодулин) в крови с количеством энтерококков в кишечной флоре ($r = -0,76$) ($p \leq 0,05$). Обобщенные данные о выявленной корреляционной зависимости белков с некоторыми представителями кишечной микрофлоры приведены в таблице 1.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенного регрессионного анализа была выявлена взаимосвязь ряда белков с количеством кишечной палочки. В крови количество белка ENO1 (альфа-енолаза — гликолитический фермент, катализирующий превращение 2-фосфоглицерата в фосфоенолпириват) положительно коррелирует с количеством кишечной палочки. Основными функциями данного белка являются участие в гликолизе, процессах клеточного роста и аллергических реакциях. Кроме того, данный белок служит рецептором на поверхности лейкоцитов и стимулирует выработку иммуноглобулинов [17].

Необходимо сказать, что кишечная палочка играет важную роль в организме человека. Она способна вырабатывать ряд витаминов (B₁, B₂, B₆, K и др.), жирные кислоты, участвует в обмене холестерина, билирубина, холина, желчных кислот и включена в процессы всасывания железа и кальция [3, 5].

Показано, что *E. coli* продуцирует имеющее иммунологическое сходство с соматостатином вещество [16]. Também соматостатин продуцируется D-клетками тонкого кишечника, в то же время соматостатин-28 участвует в ингибировании инсулина, секретина, глюкагона, гастрин и других гормонов в желудочно-кишечном тракте. Основными функциями синтезированного в кишечнике соматостатина являются предотвращение секреции соляной кислоты, замедление перистальтики кишечника и изменение уровня желчных кислот [18].

В секрете толстого кишечника имеется значительное количество отторгнутых клеток эпителия, лимфоцитов и слизи, а также содержится небольшое количество ферментов. Либеркюнова железа (крипта), наряду с кишечными ворсинками, является одной из двух важнейших структурных единиц слизистой оболочки кишечника. На каждую ворсинку у человека приходится от 4 до 7 либеркюновых желез, максимальное их количество находится в 12-перстной кишке. Либеркюновы железы толстого кишечника выстланы однослойным цилиндрическим полярным эпителием, высота которого выше у устья, чем у основания. Эпителий либеркюновых желез содержит различные эндокринные клетки: I-клетки, производящие холецистокинин (CCK), S-клетки — секретин

(SCT), K-клетки — глюкозависимый инсулинопротонный полипептид (GIP), M-клетки — мотилин (MLN), G-клетки — гастрин (GAST) [19]. Вышеперечисленные белки биохимически связаны между собой и с белком ACLY (АТФ-цитратлиаза), с уровнем которого коррелирует *E. coli*. Кроме того, ACLY и ряд дифференциально экспрессируемых генов участвуют в ErbB (эрритробластический онкоген B) сигналинге и холецистокинин/гастрин сигналинге. ACLY является важным ферментом, связывающим углеводы с метаболизмом липидов путем выработки ацетил-КоА из цитрата для биосинтеза жирных кислот и холестерина [20]. Изменения уровней ACLY, вероятно, связаны с сигналингом гастрином.

Еще одним белком, оказывающим влияние на количество кишечной палочки, является MYH9 (немышечный миозин с тяжелой цепью IIa, член семейства моторных белков). MYH9 участвует в процессах секреции, цитокинезе и обеспечивает подвижность клеток. Количество *E. coli* отрицательно коррелирует с количеством данного белка в крови, что также может быть связано с сигналингом гастрином.

Анализ полученных данных позволяет сделать вывод о том, что повышение уровня ENO1 и снижение MYH9 и ACLY способствуют увеличению численности кишечной палочки. Гены ENO1, MYH9 и ACLY коэкспрессируются и участвуют в сигналинге гастрином. Гастрин, в свою очередь, связан с холецистокинином, секретином, глюкозависимым инсулинопротонным полипептидом и мотилином, которые вырабатываются либеркюновыми железами толстой кишки. При этом глюкозависимый инсулинопротонный полипептид (инкретин) тормозит абсорбцию жиров, что, вероятно, вызывает увеличение их количества в непереваренной пище и, как следствие, приводит к увеличению количества *E. coli*, для которой жирные кислоты являются одним из источников энергии [21]. Инкретин также ингибирует липопротеинлипазу. По данным R.A. Scholl et al., со снижением данного фермента коррелирует высокое количество *E. coli* [22].

Положительно коррелирующий с количеством кишечной палочки белок ENO1 стимулирует выработку иммуноглобулинов, что может свидетельствовать об усиении иммунной активности локально в толстом кишечнике. Одним из объяснений выявленной взаимосвязи может служить предположение, что аутологичная комменсальная микрофлора кишечника, вероятно, обладает толерантностью к местно выделяемым иммуноглобулинам. Аналогичная взаимосвязь отмечена и для другого облигатного представителя кишечной флоры — *Lactobacillus* spp. Суммируя вышесказанное: ENO1, MYH9 и ACLY тесно связаны с процессами экскреции биологически активных веществ клетками либеркюновых желез толстой кишки, в частности инкретина (GIP), который, в свою очередь, учитывая его функции, способствует увеличению численности кишечной палочки.

Таблица 1. Выявленные в исследовании корреляции белков с некоторыми представителями кишечной микрофлоры, ($p \leq 0,05$)

Микроорганизм кишечного микробиома	Отрицательно коррелирующие с данным микроорганизмом белки	r	Положительно коррелирующие с данным микроорганизмом белки, коэффициент корреляции	r
<i>E. coli</i>	MYH9, ACLY, DPP3, SPTA1	0,99	ENO1	0,71
<i>Lactobacillus</i> spp.	S100A6, HSPA4	0,87	ENO1, CA2	0,97
<i>Enterococcus</i> spp.	CALM2	0,76	-	
<i>Bifidobacterium</i> spp.	YWHAE, FAH	0,46	VCP, C8B, CCT2, EPB41, A1BG	0,74

Таблица подготовлена авторами по собственным данным

Белок DPP3 (дипептидилпептидаза 3) является цинк-зависимой пептидазой, внутриклеточной сериновой пептидазой и обладает участком уникальной каталитической последовательности, обеспечивающей деградацию олигопептидов с остатками от 4 до 10 аминокислот. Данный участок в нашем исследовании имел достаточно сильную отрицательную корреляционную связь с количеством кишечной палочки. Известно, что белок DPP3 имеет широкий спектр биологических функций. Так, он участвует во внутриклеточном расщеплении белков, кроме того, в некоторых исследованиях [23] была показана активность DPP3 в клетках врожденной иммунной системы, например в полиморфно-ядерных гранулоцитах и нейтрофилах, что отчасти подтверждает его активное участие в регуляции иммунной функции организма. Интересно отметить, что в нашем исследовании была выявлена сильная отрицательная корреляционная связь количества данного белка как с количеством кишечной палочки, так и с количеством гемолитических стафилококков.

В проведенном исследовании также было установлено, что уровень белка SPTA1 имел достаточно сильную отрицательную корреляцию с количеством кишечной палочки, однако, учитывая функции данного белка, возможные причины взаимодействия уровней данного белка и числа представителей *E. coli* остаются неясными.

Бифидобактерии являются одними из важнейших компонентов кишечной микрофлоры. Они участвуют в синтезе лактата и ацетата, регулирующих pH содержимого кишечника, а также обеспечивают усиление колонизационной резистентности кишечной микрофлоры.

В нашем исследовании наиболее сильные связи с количеством бифидобактерий в кишечнике были выявлены для белков EPB41, A1BG, VCP, C8B и CCT2, также слабая корреляционная связь установлена с количеством белков FAH и YWHAE.

Белок, кодируемый геном EPB41 (мембранный белок эритроцитов band 4.1), представляет собой многофункциональный протеин, который опосредует взаимодействия между цитоскелетом эритроцитов и плазматической мембраной. Кодируемый геном EPB41 белок связывает и стабилизирует дофаминовые рецепторы D2 и D3 на плазматической мемbrane нейронов, участвует в регуляции транспорта ионов кальция и регуляции кишечной абсорбции [24]. В проведенных исследованиях была установлена положительная корреляция между количеством белка EPB41 и количеством бифидобактерий. Отмечено, что при снижении количества белка EPB41 наблюдается нарушение всасывания кальция в клетках тонкого кишечника [23]. Таким образом, при увеличении количества белка EPB41 происходит усиление абсорбции кальция в эпителии тонкого кишечника. Аналогичный процесс контролируется и бифидобактериями, которые также вызывают усиление всасывания ионов кальция. Наибольшее количество *Bifidobacterium* spp. содержится в толстом отделе кишечника, в то же время бифидобактерии и лактобациллы составляют около 20–30% микрофлоры тонкого кишечника, локализуясь в основном в тощей кишке [25].

Одной из предполагаемых функций белка A1BG (альфа-1-В гликопротеин), экспрессирующегося в печени, является участие в распознавании клеток и регуляции клеточного поведения [26]. Для данного белка отмечена положительная корреляционная связь с количеством бифидобактерий, что может быть объяснено толерантностью иммунной системы в отношении KK и усилении иммунного ответа на фоне стрессового фактора, которым

является «сухая» иммерсия. Важно отметить, что белок C8B (бета-цепь C8 комплемента, лектиновый путь активации), который также играет ключевую роль в реализации механизмов врожденного и адаптивного иммунного ответа, отрицательно коррелирует с количеством бифидобактерий в кишечнике.

Белок CCT2 (бета-субъединица белка 1-го Т-комплекса, молекулярный шаперон) способствует сворачиванию протеинов при гидролизе АТФ и в составе комплекса TRiC (шаперонин) играет роль в сворачивании актина и тубулина. Согласно данным литературы, спектриновый цитоскелет является мишенью для кишечных бактериальных патогенов (например, патогенных штаммов *E. coli*, *S. Typhimurium*, *L. Monocytogene*) за счет усиления адгезии клеток и играет решающую роль в прогрессировании дисбиотических состояний [27]. Вероятно, аналогичный механизм также позволяет усилить адгезию *Bifidobacterium* spp. на эпителии кишечника и таким образом способствовать их росту, поскольку в нашем исследовании была отмечена положительная корреляционная связь количества данного белка с количеством бифидобактерий.

В то же время YWHAE (белок активации тирозин-3-монооксигеназы/триптофан-5-монооксигеназы эпсилон), участвующий в регуляции широкого спектра как общих, так и специализированных сигнальных путей, также задействован в реализации различных биохимических процессов, связанных с передачей сигналов, таких как деление клеток и регуляция чувствительности к инсулину. Его уровень тесно связан с количеством белка HSF1 (фактор теплового шока 1), продукция которого клеткой, в свою очередь, индуцируется воздействием не только температурного стресса, но и множеством других провоцирующих факторов, а именно: гипоксических условий, воздействия ксенобиотиков, протеотоксического стресса [28]. Взаимосвязь уровней белка YWHAE в крови и количества *Bifidobacterium* spp. в кишечной флоре отрицательная. То есть при увеличении воздействия стрессовых факторов и увеличении соответственно белка YWHAE в крови происходит угнетение роста бифидобактерий, что подтверждает взаимосвязь между уровнями стресса различной этиологии и кишечной флоры.

Белок FAH (фермент фумарилацитоацетат гидролаза, который расщепляет 4-фумарилацитоацетат до ацетоацетата и фумарата, обеспечивая финальную стадию катаболизма аминокислоты тирозина), как это следует из его основной функции, вовлечен в метаболизм тирозина и является последним из пяти ферментов, расщепляющих данную аминокислоту. Следствием действия этой гидролазы и превращения 4-фумарилацитоацетата в фумарат и ацетоацетат является повышение уровня кетоновых тел в крови. Было показано, что избыток кетоновых тел, например при кетодиете, снижает количество бифидобактерий, то есть между ними, по данным Q.Y. Ang, существует отрицательная корреляционная взаимосвязь [29]. В нашем эксперименте установлена прямая положительная корреляционная связь между количеством белка FAH и количеством *Bifidobacterium* spp., хотя степень выраженности ее была относительно слабой.

Вместе с тем белок VCP (валозин-содержащий белок) — АТФаза переходного эндоплазматического ретикулума является компонентом процесса деградации белков, связанного с эндоплазматической сетью и отвечающего за поддержание протеостаза клеток, в том числе эндотелия кишечника. Также в отдельных исследованиях было

выдвинуто предположение о возможном вкладе белка VCP в течение инфекции, вызываемой токсоглазмой [30]. Данный белок положительно коррелирует с количеством бифидобактерий. Кроме того, он коэкспрессируется с белками CCT2 и YWHAE.

Лактобациллы играют важную роль в поддержании колонизационной резистентности желудочно-кишечного тракта. Несмотря на то что большинство бактерий в ЖКТ обитают в толстом кишечнике, лактобациллы и энтерококки являются доминирующей флокой в двенадцатиперстной и тощей кишке. Их количество по сравнению с толстой кишкой невелико (около 10^3 – 10^4 КОЕ/мл), однако они играют важную роль в иммуномодуляции и проявляют антагонистическую активность в отношении патогенных микроорганизмов [31].

Большинство штаммов *Lactobacillus* spp., заселяющих кишечник человека, являются гомоферментативными и образуют в качестве результата брожения преимущественно молочную кислоту, используя гликолиз для образования лактата из глюкозы. По отношению к кислороду большинство лактобациллов являются аэроболерантными анаэробами, то есть активнее всего растут при дефиците кислорода.

В нашем исследовании при анализе данных была выявлена взаимосвязь количества белков ENO1, CA2, S100A6 и HSPA4 с количеством лактобациллов. При этом ENO1 и CA2 имели положительную, а S100A6 и HSPA4 — отрицательную корреляционную связь с количеством *Lactobacillus* spp.

В некоторых исследованиях установлено, что ENO1 является белком, обеспечивающим толерантность клеток к гипоксии, а также катализирует превращение 2-фосфоглицерата в фосфоенолпирват в процессе гликолиза, причем присутствует как в клетках и тканях человека, так и у некоторых видов *Lactobacillus* spp. Вероятнее всего, взаимосвязь количества данного белка с количеством лактобациллов обусловлена в первую очередь увеличением толерантности клеток кишечника к гипоксии, которая, в свою очередь, способствует росту количества лактобациллов.

Белок CA2, принадлежащий к семейству карбоангираз, играет решающую роль в функционировании гемоглобина благодаря катализу процесса гидратации углекислого газа с образованием угольной кислоты и последующей диссоциацией ее в воде. Это приводит к снижению pH крови, что, в свою очередь, снижает сродство гемоглобина к кислороду. Таким образом, увеличение количества данного белка также связано с гипоксией и, как следствие, с созданием наиболее благоприятных условий для размножения *Lactobacillus* spp.

Кальций-связывающий белок A6 S100A6 (S100) играет важную роль в связывании кальция. Уровень данного белка в крови отрицательно коррелирует с количеством лактобациллов (*Lactobacillus* spp.), которые в процессе метаболизма цитрата используют ионы кальция [32]. Следовательно, при увеличении количества белка S100A6 количество кальция, необходимого для метabolизма лактобациллов, снижается и уровень *Lactobacillus* spp. падает.

Установлено, что белок HSPA4 (член семейства белков теплового шока Hsp110) имеет важные функции молекуллярного шаперона внутри клетки: ответ на развернутый

белок, импорт белка во внешнюю мембрану митохондрий, сборка белковых комплексов. В условиях воздействия многих стрессовых факторов, вызывающих нарушение процессов протеостаза, также происходит и снижение комменсалов кишечника [33, 34]. В проведенных нами исследованиях корреляция количества данного белка с количеством *Lactobacillus* spp. была отрицательной: чем больше данного белка в крови, тем выше уровень стресса и тем меньше количество лактобациллов.

Энтерококки являются одним из важных компонентов микрофлоры кишечника. Ряд препаратов, применяемых в качестве пробиотиков в настоящее время, содержат *Enterococcus faecium*. Численность энтерококков в кишечнике в норме должна составлять 10^6 КОЕ/мл. Энтерококки (вместе с лактобациллами), помимо толстого кишечника, колонизируют и тонкую кишку, однако их количество заметно меньше. *Enterococcus* spp. относят к молочнокислым микроорганизмам, так как они осуществляют метаболизм бродильного типа и ферментируют углеводы с образованием молочной кислоты, которая, в свою очередь, снижает pH среды. Кроме того, энтерококки являются хорошо известными продуцентами анти-mикробных пептидов (энтероцинов).

При анализе полученных данных была выявлена отрицательная корреляционная взаимосвязь белка CALM2 (кальмодулин) в крови с количеством энтерококков в кишечной флоре. Кальмодулин экспрессируется клетками эпителия практически во всех отделах тонкого кишечника и, вероятно, регулирует концентрацию свободного кальция в клетках микроворсинок. Имеются данные, что повышенное содержание ионов кальция и магния в среде ингибирует выработку энтероцинов и метаболизм энтерококков [35]. Это, вероятно, является одной из возможных причин отрицательной корреляции белка CALM2 в крови и количества *Enterococcus* spp. в кишечной флоре.

ВЫВОДЫ

1. В результате проведенных исследований были выявлены комплексы белков, уровень которых в крови хозяина коррелировал с количеством протективных микроорганизмов (ПМ).

2. Все белки, коррелирующие с разными ПМ, можно условно разделить на 4 группы в зависимости от функций и характера взаимодействия этих белков с различными микроорганизмами: белки, связанные с иммунной системой; белки, прямо или косвенно влияющие на процессы пищеварения и минеральный обмен; белки, влияющие на толерантность клеток к гипоксии; белки, имеющие высокий коэффициент регрессии при корреляции с некоторыми микроорганизмами, но не имеющие очевидной функциональной взаимосвязи.

3. Полученные данные способствуют не только фундаментальному пониманию взаимосвязи различных процессов в организме человека, но и могут послужить важной отправной точкой для формирования клинических рекомендаций по коррекции микрофлоры кишечника, основываясь на данных протеомного профиля крови или, напротив, коррекции белковых показателей крови с помощью пробиотических и аутопробиотических средств.

Литература / References

1. Ильин ВК, Воложин АИ, Виха ГВ. Колонизационная резистентность организма в измененных условиях обитания. М.: Наука; 2005.
Ilyin VK, Volozhin AI, Vikha GV. Colonization resistance of an organism in altered living conditions. Moscow: Science; 2005 (In Russ.).
2. Turroni S, Magnani M, Kc P, Lesnik P, Vidal H, Heer M. Gut microbiome and space travelers' health: state of the art and possible pro/prebiotic strategies for long-term space missions. *Front Physiol.* 2020;11:553929.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.553929>
3. Reinos Webb C, Koboziev I, Furr KL, Grisham MB. Protective and pro-inflammatory roles of intestinal bacteria. *Pathophysiology.* 2016;23(2):67–80.
<https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2016.02.002>
4. Iacob S, Iacob DG, Luminos LM. Intestinal microbiota as a host defense mechanism to infectious threats. *Front. Microbiol.* 2019;9:3328.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03328>
5. Leser TD, Mølbak L. Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environ. Microbiol.* 2009;11(9):2194–206.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01941.x>
6. Onyiah JC, Colgan SP. Cytokine responses and epithelial function in the intestinal mucosa. *Cell. Mol. Life Sci.* 2016;73(22):4203–4212.
<https://doi.org/10.1007/s00018-016-2289-8>
7. Metryka E, Chibowska K, Gutowska I, Falkowska A, Kupnicka P, Barczak K, et al. Lead (Pb) exposure enhances expression of factors associated with inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(6):1813.
<https://doi.org/10.3390/ijms19061813>
8. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell.* 2014;157(1):121–41.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.011>
9. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science.* 2012;336(6086):1268–73.
<https://doi.org/10.1126/science.1223490>
10. Tomilovskaya E, Amirova L, Nosikova I, Rukavishnikov I, Chernogorov R, Lebedeva S, et al. The first female dry immersion (NAIAD-2020): design and specifics of a 3-day study. *Front. Physiol.* 2021;12:661959.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.661959>
11. Ильин ВК, Комиссарова ДВ, Морозова ЮА, Жиганшина АА. Изменение микрофлоры кишечника, верхних дыхательных путей и вагинальных слизистых оболочек у добровольцев в эксперименте с 3-суточной «сухой» иммерсии. Материалы 56-х научных чтений, посвященных разработке научного наследия и развитию идей К.Э. Циolkовского. Калуга; 2021.
Ilyin VK, Komissarova DV, Morozova YuA, Zhiganshina AA. Changes in the intestinal microflora, upper respiratory tract and vaginal mucous membranes in volunteers in an experiment with «3-day «dry» immersion. Conference proceedings of the 56th scientific readings dedicated to the development of the scientific heritage and the development of the ideas of K.E. Tsiolkovsky. Kaluga; 2021 (In Russ.).
12. Pastushkova LCh, Goncharova AG, Kashirina DN, Goncharov IN, Rukavishnikov IV, Brzhozovskiy AG, et al. Characteristics of blood proteome changes in hemorrhagic syndrome after head-up tilt test during 21-day dry immersion. *Acta Astronautica.* 2021;189:158–65.
<https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2021.08.044>
13. Меньшиков ВВ, ред. Клиническая лабораторная аналитика. М.; 2013.
Menshikov VV, ed. Clinical laboratory analytics. Moscow; 2013 (In Russ.).
14. Kashirina D, Brzhozovskiy A, Sun W, Pastushkova L, Popova O, Rusanov V, et al. Proteomic characterization of dry blood spots of healthy women during simulation the microgravity effects using dry immersion. *Front. Physiol.* 2022;12:75329.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.753291>
15. Meier F, Brunner AD, Koch S, Koch H, Lubeck M, Krause M, et al. Online Parallel Accumulation–Serial Fragmentation (PASEF) with a novel trapped ion mobility mass spectrometer. *Mol. Cell. Proteomics.* 2018;17(12):2534–45.
<https://doi.org/10.1074/mcp.TIR118.000900>
16. Кулачев АП. Методы и средства комплексного статистического анализа данных: учебное пособие. 5-е изд. М.: ИНФРА-М; 2017.
Kulaichev AP. Methods and tools of complex statistical data analysis: a tutorial. 5th ed. Moscow: INFRA-M; 2017 (In Russ.).
17. Jensen EA, Young JA, Mathes SC, List EO, Carroll RK, Kuhn J, et al. Crosstalk between the growth hormone/insulin-like growth factor-1 axis and the gut microbiome: A new frontier for microbial endocrinology. *Growth Horm. IGF Res.* 2020;53–4:101333.
<https://doi.org/10.1016/j.ghir.2020.101333>
18. Schubert ML. Gastric acid secretion. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2016;32(6):452–60.
<https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000308>
19. Функциональная гастроэнтерология. Available from: <https://www.gastroscan.ru/handbook/117/309>
Functional gastroenterology. Available from: <https://www.gastroscan.ru/handbook/117/309>
20. Feng X, Zhang L, Xu S, Shen AZ. ATP-citrate lyase (ACLY) in lipid metabolism and atherosclerosis: An updated review. *Prog. Lipid Res.* 2020;77:101006.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.101006>
21. Tazi A, Araujo JR, Mulet C, Arena ET, Nigro G, Pédrón T, Sansonetti PJ. Disentangling host-microbiota regulation of lipid secretion by enterocytes: insights from commensals *Lactobacillus paracasei* and *Escherichia coli*. *mBio.* 2018;9(5):e01493–18.
<https://doi.org/10.1128/mBio.01493-18>
22. Scholl RA, Lang C.H., Bagby G.J. Hypertriglyceridemia and its relation to tissue lipoprotein lipase activity in endotoxemic, *Escherichia coli* bacteremic, and polymicrobial septic rats. *J. Surg. Res.* 1984; 37(5): 394–401.
[https://doi.org/10.1016/0022-4804\(84\)90205-1](https://doi.org/10.1016/0022-4804(84)90205-1)
23. Grdisa M, Vitale L. Types and localization of aminopeptidases in different human blood cells. *Int. J. Biochem.* 1991;23(3):339–45.
[https://doi.org/10.1016/0020-711x\(91\)90116-5](https://doi.org/10.1016/0020-711x(91)90116-5)
24. Liu C, Weng H, Chen L, Yang S, Wang H, Debnath G, et al. Impaired intestinal calcium absorption in protein 4.1R-deficient mice due to altered expression of plasma membrane calcium ATPase 1b (PMCA1b). *J. Biol. Chem.* 2013;288(16):11407–15.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.436659>
25. Инновационные пищевые технологии. Available from: <https://propionix.ru/kolichestvo-mikroorganizmov-v-tonkom-i-tolstom-kishechnike>
Innovative food technologies. Available from: <https://propionix.ru/kolichestvo-mikroorganizmov-v-tonkom-i-tolstom-kishechnike>
26. Sun D, Zhao YY, Dai SP, Fang K, Dong LY, Ding Q. Cloning and analysis of human alpha-1B glyccoprotein precursor gene: a novel member of human immunoglobulin superfamily. *Acta Genetica Sinica.* 2002;29(4):299–302.
PMID: 11985261.
27. Ruetz T, Cornick S, Guttman JA. The spectrin cytoskeleton is crucial for adherent and invasive bacterial pathogenesis. *PLOS ONE.* 2011;6(5):e19940.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019940>
28. Dayalan Naidu S, Dinkova-Kostova AT. Regulation of the mammalian heat shock factor 1. *FEBS J.* 2017;284(11):1606–27.
<https://doi.org/10.1111/febs.13999>
29. Ang QY, Alexander M, Newman JC, Tian Y, Cai J, Upadhyay V, et al. Ketogenic diets alter the gut microbiome resulting in decreased intestinal Th17 cells. *Cell.* 2020;181(6):1263–75.e16.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.027>
30. Clough B, Fisch D, Mize TH, Encheva V, Snijders A, Frickel E-M. p97/VCP targets *Toxoplasma gondii* vacuoles for parasite restriction in interferon-stimulated human cells. *bioRxiv.* 2023.06.20.545566.
<https://doi.org/10.1101/2023.06.20.545566>

31. Яруллина ДР, Фахруллин РФ. Бактерии рода Lactobacillus: общая характеристика и методы работы с ними. Учебно-методическое пособие Казанского (Приволжского) федерального университета. Казань; 2014.
- Yarullina DR, Fakhruлlin RF. Bacteria of the genus Lactobacillus: general characteristics and methods of working with them. Study guide of the Kazan (Volga Region) Federal University. Kazan; 2014 (In Russ.).
32. Mortera P, Pudlik A, Magni C, Alarcón S, Lolkema JS. Ca²⁺-citrate uptake and metabolism in Lactobacillus casei ATCC 334. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013;79(15):4603–12.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00925-13>
33. Lutgendorff F, Akkermans LM, Söderholm JD. The role of microbiota and probiotics in stress-induced gastro-intestinal damage. *Curr. Mol. Med.* 2008;8(4):282–98.
<https://doi.org/10.2174/156652408784533779>
34. Марданов АВ, Бабыкин ММ, Белецкий АВ, Григорьев АИ, Зинченко ВВ, Кадников ВВ и др. Метагеномный анализ динамики изменений состава микробиома кишечника участников эксперимента «Марс-500», имитирующего длительный космический полет. *Acta Naturae*. 2013;3(48):120–8.
- Mardanov AV, Babykin MM, Beletsky AV, Grigoriev AI, Zinchenko VV, Kadnikov VV, et al. Metagenomic analysis of the dynamics of changes in the composition of the intestinal microbiome of participants in the Mars-500 experiment simulating a long-term space flight. *Acta Naturae*. 2013;3(48):120–8.
35. Kumar M, Srivastava S. Effect of calcium and magnesium on the antimicrobial action of enterocin LR/6 produced by Enterococcus faecium LR/6. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2011;37(6):572–5.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.01.014>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Д.В. Комиссарова — статистическая обработка результатов, написание разделов результаты, материалы и методы, обсуждение результатов, выводы; Л.Х. Пастушкова — дизайн экспериментальной части по протеомике, написание разделов введение, результаты и обсуждение результатов; Д.Н. Каширина — проведение экспериментальной части по протеомике, написание разделов введение, материалы и методы, обсуждение результатов; В.К. Ильин — дизайн и проведение экспериментальной части по микробиологии; И.М. Ларина — дизайн экспериментальной части по протеомике, написание разделов результаты, обсуждение результатов и выводы.

ОБ АВТОРАХ

Комиссарова Дарья Валерьевна, канд. биол. наук
<https://orcid.org/0000-0003-2042-3193>
d.komisarova@yandex.ru

Пастушкова Людмила Ханифовна, д-р биол. наук
<https://orcid.org/0000-0002-2071-0443>
lpastushkova@mail.ru

Каширина Дарья Николаевна, канд. биол. наук
<https://orcid.org/0000-0002-9646-7275>
daryakudryavtseva@mail.ru

Ильин Вячеслав Константинович, д-р мед. наук, профессор
<https://orcid.org/0000-0003-3896-5003>
piton2004@bk.ru

Ларина Ирина Михайловна, д-р мед. наук, профессор
<https://orcid.org/0000-0001-6783-4200>
irina.larina@gmail.com

<https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-132-140>



МИКРОЧАСТИЦЫ КАК КРИТЕРИИ КАЧЕСТВА КОНЦЕНТРАТА ТРОМБОЦИТОВ

Г.В. Гришина[✉], А.Д. Касьянов, Д.В. Ласточкина, И.И. Кробинец, И.С. Голованова, О.Ю. Матвиенко

Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

Введение. В связи с возросшей потребностью применения концентрата тромбоцитов для лечения и профилактики тромбоцитопатии актуальной задачей является разработка, совершенствование и внедрение новых подходов мониторинга параметров его качества и оценки безопасности.

Цель. Проведение систематического обзора и анализа литературных данных для выявления перспективных подходов к оценке адекватного анализа качества тромбоцитного концентрата для повышения эффективности и безопасности трансфузий.

Обсуждение. Выявлены возможности и преимущества рационального подхода к переливанию концентрата тромбоцитов с учетом степени активации тромбоцитов для оптимизации заготовки компонента. Особое вниманиеделено методам оценки активации тромбоцитов. Обнаружение микрочастиц на основе динамического рассеяния света позволит отличать активированные (с высоким содержанием микрочастиц) от неактивированных (с низким содержанием микрочастиц) тромбоцитов при проведении как лечебных, так и профилактических трансфузий и оптимизировать использование этого дефицитного компонента крови.

Выводы. Возможность дифференцировки концентратов тромбоцитов на основе скрининга содержания микрочастиц, образующихся в результате активации, будет способствовать повышению эффективности и безопасности трансфузционной терапии.

Ключевые слова: трансфузия; концентрат тромбоцитов; микрочастицы; светорассеяние; рефрактерность

Для цитирования: Гришина Г.В., Касьянов А.Д., Ласточкина Д.В., Кробинец И.И., Голованова И.С., Матвиенко О.Ю. Микрочастицы как критерии качества концентрата тромбоцитов. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2024;26(4):132–140. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-132-140>

Финансирование: исследование проведено в рамках государственного задания Федерального медико-биологического агентства, рег. № 124031500048-8.

Потенциальный конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Гришина Галина Викторовна reger201309@mail.ru

Статья поступила: 03.06.2024. **После доработки:** 02.11.2024 **Принята к публикации:** 05.11.2024

MICROPARTICLES AS QUALITY CRITERIA FOR PLATELET CONCENTRATE

Galina V. Grishina[✉], Andrei D. Kasyanov, Daria V. Lastochkina, Irina I. Krobinets, Irina S. Golovanova, Olesya Yu. Matvienko

Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St. Petersburg, Russian Federation

Introduction. Due to the increased requirement for platelet concentrate use in the treatment and prevention of thrombocytopenia, there is a pressing need for the development, improvement and implementation of new approaches to monitoring its quality parameters and safety assessment.

Objective. To conduct a systematic review and analysis of literature data, in order to identify promising approaches to evaluating an adequate analysis of the quality of platelet concentrate to improve the effectiveness and safety of transfusions.

Discussion. The possibilities and advantages of a rational approach to platelet concentrate transfusion are established, while considering the degree of platelet activation required to optimize the preparation of the component. Special attention was paid to methods for evaluating platelet activation. The detection of microparticles based on dynamic light scattering will make it possible to distinguish activated platelets (with a high content of microparticles) from inactive (with a low content of microparticles) platelets during both therapeutic and preventive transfusions and optimize the use of this scarce blood component.

Conclusions. The ability to differentiate platelet concentrates based on the screening of the content of microparticles formed due to activation will contribute to improving the effectiveness and safety of transfusion therapy.

Keywords: transfusion; platelet concentrate; microparticles; light scattering; refractoriness

For citation: Grishina G.V., Kasyanov A.D., Lastochkina D.V., Krobinets I.I., Golovanova I.S., Matvienko O.Yu. Microparticles as quality criteria for platelet concentrate. *Extreme Medicine*. 2024;26(4):132–140. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-132-140>

Funding: the work is carried out within the framework of the state assignment of the Federal Medico-Biological Agency of Russia No. 124031500048-8.

Potential conflict of interest: the authors declare no obvious or potential conflicts of interest related to the publication.

Galina V. Grishina reger201309@mail.ru

Received: 3 June 2024. **Revised:** 2 Nov. 2024 **Accepted:** 5 Nov. 2024

ВВЕДЕНИЕ

В последние два десятилетия в Российской Федерации наблюдается устойчивый рост потребности в использовании тромбоцитных концентратов (ТК) в связи с совершенствованием и интенсификацией лечебных программ с применением ТК во многих областях медицины.

Тромбоциты — это специализированные безъядерные клетки крови, играющие ключевую роль в остановке кровотечений и опасном перекрывании здоровых сосудов при тромбозе. Неактивированные тромбоциты представляют собой сплюснутые сфероиды (диски) с соотношением полуосей от 2 до 8 и характерным размером от 2 до 4 мкм в диаметре. В активированном состоянии

© Г.В. Гришина, А.Д. Касьянов, Д.В. Ласточкина, И.И. Кробинец, И.С. Голованова, О.Ю. Матвиенко, 2024

форма тромбоцитов изменяется: часть активированных тромбоцитов приобретает форму близкую к сферической. При переходе в активированное состояние от тромбоцитов отделяются микрочастицы с размерами в интервале от 50 до 100 нм, которые попадают в межклеточное пространство крови [1]. Показателем доли активных тромбоцитов является содержание микрочастиц в данном концентрате.

Концентраты тромбоцитов — это один из дефицитных компонентов крови, используемых при гемотрансфузиях. Для оценки качества этих концентратов и правильного их использования важно иметь информацию о доле активных тромбоцитов, содержащихся в них [1–4]. Этот показатель зависит от индивидуальных особенностей донора, способа получения концентрата тромбоцитов из донорской крови, длительности и условий хранения концентрата. Слишком большая доля микрочастиц в концентрате делает его непригодным для использования при трансфузии. Возможность использования концентратов с уменьшенной долей активных тромбоцитов и, соответственно, микрочастиц зависит от особенностей пациента, для которого этот концентрат предназначен.

Цель исследования: проведение систематического обзора и анализа литературных данных для выявления перспективных подходов к оценке адекватного анализа качества тромбоцитного концентрата для повышения эффективности и безопасности трансфузий.

ОБСУЖДЕНИЕ

Свойства и функции тромбоцитарных микрочастиц

Образование микрочастиц (МЧ) (микровезикул) является неотъемлемым проявлением жизнедеятельности клеток и происходит как *in vivo*, так и *in vitro*. Образование микрочастиц стимулируется действием патогенов, стрессом, различными повреждениями и иными неблагоприятными факторами [1]. Наиболее активная продукция микрочастиц свойственна форменным элементам крови, а также эндотелиальным и гладкомышечным клеткам сосудов [2]. Среди всех микрочастиц, находящихся в крови, микрочастицы тромбоцитов (МТ) являются наиболее многочисленными [3] и составляют около 70–90% от общего числа клеток. Растет научный и клинический интерес к физиологической роли, которую играют тромбоцитарные микрочастицы [4]. По сравнению с тромбоцитами, которые имеют среднюю продолжительность жизни около 10 суток, длительность существования тромбоцитарных микрочастиц измеряется минутами [5], при этом остается невыясненным аспект удаления микрочастиц из циркуляции в кровеносном русле.

Микрочастицы тромбоцитов представляют собой фрагменты размером 0,1–1 мкм, выделяемые из плазматических мембран тромбоцитов, которые подвергаются активации, стрессу или апоптозу, с широким спектром биологической активности. Они имеют структуру на основе фосфолипидов (ФЛП) и экспрессируют функциональные рецепторы из мембран тромбоцитов. Являясь наиболее распространенными микрочастицами в крови, МТ экспрессируют прокоагулянт фосфатидилсерин (ФС) и, вероятно, дополняют, если не усиливают, функции тромбоцитов в гемостазе, тромбозе, онкологическом процессе и воспалении, но также действуют как стимуляторы регенерации тканей. Их размер и структура делают МТ незаменимыми в системе межклеточных взаимодействий

с клетками тканей в качестве инструмента доставки переносимых тромбоцитами биологически активных молекул, включая факторы роста, другие сигнальные молекулы и микроРНК.

Учитывая реакционноспособность МТ, они могут оказывать различное патофизиологическое влияние на клеточную среду при взаимодействии с компонентами кровеносной системы. Так же появляется все больше доказательств того, что выработка МТ запускается во время донации, разделения на компоненты и хранения крови, что может привести к тромботическим и воспалительным побочным эффектам у реципиентов. Оценка МТ требует строгих преаналитических и аналитических процедур во избежание генерации артефактов и обеспечения точной оценки количества, перераспределения размера и функциональных свойств этих микрочастиц [6, 7].

В условиях *in vivo* МТ могут высвобождаться из тромбоцитов в нормальных физиологических условиях или в результате активации, стресса или апоптоза. Исследование поверхностных маркеров показало, что МТ, вероятно, являются наиболее распространенными МЧ у здоровых людей, составляя 70–90% циркулирующих клеток в крови [6], с диапазоном их количества примерно 100–1000/мкл [7]. Мегакариоциты также могут высвобождать МЧ [8], но определение их доли требует дальнейших исследований. Остальные МЧ высвобождаются эндотелиальными клетками, лейкоцитами и эритроцитами. Оценка МТ по-прежнему требует разработки строгих преаналитических и аналитических процедур для обеспечения наиболее точной оценки численности, размера и функциональных свойств. Количество МТ увеличивается в результате активации коагуляционного каскада или системы комплемента, а также под действием апоптотических сигналов или сдвиговых сил. Число МТ увеличивается при некоторых протромботических и воспалительных заболеваниях, а также при некоторых видах рака [9].

Вероятно, количественное содержание микрочастиц в крови связано с состоянием баланса между их образованием и утилизацией [10]. При различных патологических состояниях этот баланс нарушается и в крови регистрируется увеличение содержания тромбоцитарных микрочастиц, вызванное «хронической активацией» тромбоцитов [11]. Микрочастицы тромбоцитов гетерогенны и характеризуются присутствием или отсутствием митохондрий [12], а также варьированием размеров. Поскольку МТ могут экспрессировать функциональные рецепторы от мембран тромбоцитов и являются наночастицами на основе ФЛП, они все чаще рассматриваются как инструментальные средства во взаимодействии между тромбоцитами и клетками тканей [13]. Микрочастицы тромбоцитов содержат биологически активные молекулы, включая факторы роста и другие сигнальные молекулы, способные передавать сообщения соседним клеткам или клеткам-мишеням [14]. Таким образом, МТ потенциально могут оказывать влияние на клеточную среду, которая взаимодействует с кровеносной сетью, поскольку они обнажают поверхность прокоагулянта ФЛП и действуют как транспортер ранее указанных биологически активных молекул, а также генетических материалов, включая микроРНК [15]. Генерация МТ также запускается *in vitro* во время обработки и хранения клеток крови [16], что потенциально может вызвать побочные эффекты при проведении трансфузационной терапии.

Точная характеристика МТ требует тщательной подготовки образцов для исследования, чтобы избежать

экспериментальных артефактов. Кроме того, при оценке ТК должен быть сделан разумный выбор аналитических методов, сочетающих методики, характеризующие клеточное происхождение, численность, размер и функциональную активность микрочастиц [17].

Микрочастицы как универсальный показатель качества концентратов тромбоцитов

В клинической практике ТК имеют широкое применение. У онкологических пациентов тромбоциты используются для профилактики геморрагического синдрома. Лицам, перенесшим травму или операционные вмешательства, трансфузии ТК проводят с целью остановки кровотечения. Кроме того, внедрение инъекций богатой тромбоцитами плазмы основано на иммунологических функциях тромбоцитов.

Требования к качеству тромбоцитов, предназначенных для предотвращения и остановки кровотечений или ускорения заживления ран, потенциально сильно различаются. Может ли одна измеримая характеристика описать качество тромбоцитов для всех видов применения? Положительный ответ на этот вопрос содержится в работе E. Maurer-Spurej, в которой представлены данные относительно использования измерения содержания микрочастиц в образцах тромбоцитов в качестве универсальной характеристики качества для производства, хранения, оценки жизнеспособности, функции и совместимости ТК [18].

Предполагается, что при получении тромбоконцентрата содержащиеся в нем жизнеспособные тромбоциты теряют свою жизнеспособность вследствие изменений во время хранения (storage lesion); при этом вариабельность доноров не считается основным способствующим этому фактором [19]. Из этого следует, что пациентам с показаниями к трансфузиям ТК, содержащим жизнеспособные тромбоциты, длительно циркулирующие в кровотоке, необходимо переливать компоненты в ближайшее время после их заготовки. Традиционно оценка качества тромбоцитов *in vitro* основывалась на этих предположениях [20]. Измерение экспрессии поверхностного рецептора CD62, уровня агрегации, стимулированной АДФ проводится в связи с изменением данных параметров как при активации тромбоцитов, так и в процессе их хранения. Показано, что высвобождение микрочастиц тромбоцитами следует за активацией и увеличивается по мере хранения тромбоцитарных компонентов [21]. Таким образом, качество тромбоцитов оценивается с точки зрения производителя и регулируется для обеспечения последовательности и стабильности производственного процесса [22].

Поскольку основное внимание при проведении оценки качества ТК уделяется обнаружению деградации от начала до конца регламентированного 5-дневного срока хранения [23], нормативные показатели имеют высокую разрешающую способность для небольших изменений у «покоящихся/жизнеспособных» тромбоцитов и низкую — у «активированных/функциональных». Анализируемые характеристики качества донорских тромбоцитов имеют значение в оценке немедленного ответа на трансфузию, но сохранение длительности ответа зависит преимущественно от характеристик пациента [24, 25].

В исследованиях E. Maurer-Spurej, R. Larsen, A. Labrie et al. отмечено, что в 17% случаев (независимо от возраста) переливание концентратов донорских тромбоцитов

не приводило к ожидаемому увеличению количества тромбоцитов после трансфузии у онкогематологических пациентов [26]. Одной из возможных причин такого неожиданно высокого уровня неблагоприятных клинических исходов является то, что жизнеспособность тромбоцитов в значительной степени зависит от характеристик донора. Действительно, установлено, что у примерно 33% доноров обнаруживали предварительно активированные тромбоциты, о чем свидетельствовал высокий уровень микрочастиц в заготовленном тромбоконцентрате [27]. Пациенты с онкопатологией обычно нуждаются в переливании тромбоцитов не по причине активного кровотечения, а в связи с предрасположенностью к развитию кровотечений из-за низкого количества тромбоцитов, вторичного по отношению к основному заболеванию и/или терапии. У этих пациентов донорские тромбоциты для возможной активации должны оставаться в циркуляторном русле. Из-за сниженной жизнеспособности предварительно активированные тромбоциты не рекомендуются для хранения или применения у онкологических больных [28]. Напротив, считается, что предварительно активированные тромбоциты, обладающие повышенной гемостатической активностью, эффективны для остановки острого кровотечения, что особенно важно для пациентов с хирургическими вмешательствами или травмами [29].

Тромбоциты используются в клинической практике для самых различных целей, и качество тромбоцитарного концентрата должно соответствовать конкретной задаче переливания. Следовательно, идеальный параметр качества для прогнозирования функционирования тромбоцитов после трансфузии ТК должен позволять различать покоящиеся/жизнеспособные и предварительно активированные/высокофункциональные тромбоциты с одинаковым разрешением по всему спектру жизнеспособности/функциональности [28, 29].

Показатель содержания микрочастиц как фрагментации и гетерогенности тромбоцитов можно рассматривать как критерий качества для производства, хранения, жизнеспособности, функции и совместимости тромбоцитов [30, 31]. Гетерогенность концентратов тромбоцитов, с учетом степени активации по микрочастицам, позволяет корректировать процесс заготовки, а также дифференцировать ТК для профилактических и лечебных трансфузий.

Если тромбоциты более жизнеспособны, то есть способны пережить определенные условия хранения, транспортировку, облучение и другие воздействия, то они по определению менее функциональны. Данный факт известен еще с 1970-х годов, когда исследователи пытались определить оптимальную температуру хранения концентратов тромбоцитов. Оказалось, что тромбоциты, хранившиеся при комнатной температуре, были более жизнеспособны, но охлажденные тромбоциты демонстрировали лучшую функциональную активность, оцениваемую по критерию изменений гемостатических показателей у добровольцев, получавших аспирин, или у пациентов с тромбоцитопенией [32]. Поддержание жизнеспособности тромбоцитов является важной ролью антикоагулянтов. Концентраты, богатые жизнеспособными тромбоцитами, однородны по своему составу, содержат преимущественно дисковидные тромбоциты и небольшое количество (или отсутствие) микрочастиц или микроагрегатов [27]. Напротив, ожидается, что длительно хранящиеся, охлажденные или иным образом активированные тромбоциты будут гетерогенными,

содержащими тромбоциты с высокой полидисперсностью из-за полиморфизма, высокой поверхностной экспрессии маркеров активации, большого количества микрочастиц и присутствия микроагрегатов [33].

Гетерогенность концентратов тромбоцитов увеличивается при хранении [34], а также при патогенредукции [23] и сильно варьирует у здоровых доноров [35]. Наибольший вклад в гетерогенность тромбоцитов вносит содержание микрочастиц.

В настоящее время актуальными являются два важных вопроса: во-первых, оказывают ли микрочастицы в компонентах крови потенциально патогенный эффект и, во-вторых, как процесс заготовки, дополнительная обработка и хранение компонентов крови влияют на высвобождение микрочастиц. В последнее время нарастает значение микрочастиц как индикаторов качества ТК из-за их потенциальной физиологической и патофизиологической роли. Признается важность микрочастиц в трансfusionной медицине, поскольку микрочастицы присутствуют как в плазме, так и в клеточных продуктах крови [7]. Патофизиологическое воздействие МТ, связанное с регуляцией иммунных реакций, вызывает очевидные опасения по поводу потенциального пагубного воздействия, связанного с переливанием крови у иммунокомпромитированных пациентов [36, 37]. Имеются убедительные данные о том, что как микрочастицы, полученные из клеток крови, так и микрочастицы тромбоцитов образуются при производстве и хранении всех компонентов крови, плазмы для переливания, а также концентратов эритроцитов и тромбоцитов, приготовленных из цельной крови методом афереза [38, 39]. Высвобождение МТ вызывается такими раздражителями, как напряжение сдвига, возникающего в результате активации или апоптоза клеток во время хранения и их контакта со стенками контейнера для хранения [38]. При хранении тромбоцитных концентратов при +20–24 °C или эритроцитных единиц при +1–6 °C образуются побочные продукты экспрессии клеток [40].

Микрочастицы тромбоцитов, по всей видимости, присутствуют в более высоких количествах в ТК, заготовленном методом афереза, чем в концентрате тромбоцитов, полученном из лейкотромбослоя. Показано, что особенности протокола процедуры афереза или тип используемого клеточного сепаратора могут влиять на степень высвобождения МТ во время обработки [41]. Микрочастицы тромбоцитов, по-видимому, не удаляются путем лейко-редукции [42], однако было обнаружено, что лейко-фильтрация цельной крови снижает риск последующего образования МТ [43]. Свежезамороженная плазма, приготовленная после ночной экспозиции цельной крови при температуре +4 °C, содержала больше МТ, чем та, которая была получена по истечении 8 ч после забора крови [44]. В то же время, по данным L.N. George et al., криопреципитат, содержащий высококонцентрированные МТ, имел потенциально более выраженный гемостатический эффект по сравнению с исходной плазмой [45].

Более четкое понимание механизма высвобождения МТ во время обработки и хранения компонентов крови с помощью тщательной подготовки образцов и комбинации аналитических методов [46] очень важно для безопасности трансfusionной терапии. Предполагаемые осложнения при трансfusionии включают повышенный риск развития инфекционных осложнений, почечной, дыхательной и полиорганной недостаточности [37]. Некоторыми авторами (A.A. Khorana, C.W. Francis et al.)

установлено наличие взаимосвязи повышения частоты венозных тромбозов и эмболий после введения концентратов тромбоцитов с присутствием МТ [47], которые, как известно, проявляют более высокую прокоагулянтную активность (50–100 раз) по сравнению с эквивалентными активированными тромбоцитами [48]. Хотя считается, что период полувыведения МТ очень короткий из-за фагоцитоза макрофагами, недавние эксперименты показывают, что он может составлять примерно 5,8 ч при введении концентратов тромбоцитов пациентам с тяжелой тромбоцитопенией [49]. Фосфатидилсерин-экспрессирующие МТ могут активировать клетки брожденного иммунитета, приводя к воспалительной реакции, опосредующей острое повреждение легких, связанное с переливанием крови (TRALI) [50]. Микрочастицы тромбоцитов также могут способствовать иммunoупрессивным эффектам, возникающим при трансfusionии, что косвенно объясняет возникновение посттрансfusionных инфекций или рецидивов рака [40]. Еще одним возможным побочным эффектом МЧ является потенциальный высокий риск аллоиммунизации против антигенов клеток крови, поскольку они могут обладать высоким иммунологическим потенциалом [51].

Рефрактерность тромбоцитов — ситуация, при которой у пациента не наблюдается ожидаемого клинически значимого ответа на переливание ТК [52], что является осложнением, наблюдаемым у 27% реципиентов тромбоцитов [53]. Рефрактерность к трансfusionям тромбоцитов определяется как две последовательные трансfusionии тромбоцитов, приводящие к недостаточному увеличению скорректированного прироста тромбоцитов (СПТ). Порог, ниже которого СПТ считается недостаточным, зависит от момента измерения: СПТ менее 5000–7500 тромбоцитов/мкл, измеренный в образце крови реципиента, взятом через 1 ч после переливания, характеризует низкое восстановление; СПТ менее 5000 тромбоцитов/мкл в образце, взятом через 24 ч после переливания, характеризует низкую выживаемость. У пациентов с иммунной рефрактерностью наблюдается низкий посттрансfusionионный СПТ как через 1 ч, так и через 24 ч после переливания, который может быть устранен (или нет) с помощью подбора соответствующих HLA/HPA-концентратов тромбоцитов [54]. Однако увеличение количества тромбоцитов через 1 ч с последующим значительным снижением количества тромбоцитов через 24 ч после трансfusionии выявляют даже при отсутствии документально подтвержденной аллоиммунизации. Было высказано предположение, что неадекватное качество тромбоцитов является одной из причин, по которой у онкологических пациентов после переливания крови может наблюдаться особенно низкая выживаемость тромбоцитов через 24 ч [12]. Помимо усложнения самого лечебного процесса, при лечении пациентов с резистентностью к тромбоцитам по сравнению с пациентами без рефрактерности более чем вдвое увеличивается себестоимость койко-дней, при этом пребывание в стационаре происходит на 21 день дольше [55].

Микрочастицы являются маркерами протромботического воспаления. У пациентов, которые становятся невосприимчивыми к переливанию тромбоцитов, часто наблюдается сопутствующая лихорадка или системное воспаление, которые могут быть обнаружены в виде повышенного содержания микрочастиц [56]. Следовательно, гомогенные тромбоциты могут быть лучшим выбором для онкологических пациентов с риском развития рефрактерности, в то время как гетерогенные тромбоциты

могут приводить к развитию осложнений. Отсюда следует, что переливание тромбоцитов от доноров с высоким содержанием микрочастиц может быть наиболее оптимальной опцией. По всей вероятности, переливание гетерогенных тромбоцитов пациентам, чья иммунная система гиперактивирована, может подтолкнуть их к переломному моменту, когда они станут невосприимчивыми к трансфузии тромбоцитов. В независимых друг от друга исследованиях I. Cortés-Puch et al. и W.A. Flegel et al. установлено, что отказ от переливания гетерогенных тромбоцитов в профилактических целях может предотвратить рефрактерность. Похожая концепция анализировалась в экспериментальном исследовании на животных, у которых сочетание бактериальной инфекции и трансфузии «более старых» эритроцитов, содержащих высокие концентрации микрочастиц, приводило к увеличению риска смертности [57, 58].

Гетерогенные концентраты тромбоцитов содержат предварительно активированные тромбоциты, которые способны быстро реагировать при попадании в кровоток. Таким образом, гетерогенные тромбоциты обладают более выраженной функциональной активностью и, как было показано, останавливают кровотечение быстрее, чем гомогенные жизнеспособные тромбоциты [33].

Внедрение измерений микрочастиц для контроля качества и безопасности концентратов тромбоцитов могло бы устранить влияние на ТК инактивации патогенов, внесенных добавочных растворов и условий 7-дневного хранения. Управление запасами, основанное на этом показателе, может привести к оптимизации лечебного процесса и существенно снизить затраты.

Оценка содержания тромбоцитарных микрочастиц

Для обнаружения и анализа микрочастиц тромбоцитарного происхождения используется ряд экспериментальных методов: проточная цитометрия, анализ траекторий наночастиц, электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия, динамическое рассеяние света [59–61].

Наиболее информативным из названных методов является проточная цитометрия. Этот метод реализует измерение интенсивности упругого рассеяния света от единичной клетки или частицы, последовательно проходящих через зону фокусировки лазерного луча, с последующей обработкой этих данных с помощью специальных математических алгоритмов. При этом характеристики фронтального и бокового светорассеяния позволяют получить представление о размерах и структуре клетки, кроме того, учитывается уровень флуоресценции химических соединений, входящих в состав клетки. Метод требует использования достаточно сложной и дорогостоящей аппаратуры и больших затрат времени на подготовку и проведение анализов, поэтому он малопригоден для оперативного скрининга концентратов тромбоцитов.

В качестве экспресс-метода, позволяющего оперативно контролировать содержание микрочастиц в концентратах тромбоцитов, было предложено использовать динамическое рассеяние света (ДРС). Достаточно эффективный метод измерения размеров и распределения по размерам частиц в жидкости. В анализаторах ДРС непосредственно измеряется зависимость от времени интенсивности лазерного излучения, рассеянного взвешенными в жидкости частицами. По этой зависимости восстанавливается распределение частиц в координатах «диаметр частиц — относительная интенсивность

излучения», рассеянного частицами данного диаметра (распределение по интенсивности). На таких распределениях выделяют две области: в интервале от 0,05 до 0,5 мкм, соответствующую микрочастицам, и в области от 1 до нескольких мкм, соответствующую тромбоцитам. На этом принципе основана оценка концентратов тромбоцитов с помощью специализированного ДРС анализатора ThromboLUX, выпускавшегося канадской фирмой LightIntegra Technology [59].

При использовании методики ThromboLUX с тестируемым концентратом тромбоцитов проводят три измерения: при температуре 37 °C, при охлаждении до 20 °C, при повторном нагревании до 37 °C. В исследовании E. Maurer-Spurej et al. продемонстрирован результат измерений распределений частиц методом ДРС [27]. Установлено, что при охлаждении с 37 до 20 °C доля тромбоцитов уменьшается с 72 до 65%, а микрочастиц — возрастает с 26 до 31%. При повторном нагревании до 37 °C восстанавливается прежнее соотношение микрочастиц и тромбоцитов.

Показана хорошая корреляция оценок состояния тромбоцитов и микрочастиц, полученных по методике ThromboLUX, с данными проточной цитометрии и электронной микроскопии [59]. Содержание микрочастиц может быть достаточно универсальным индикатором, позволяющим оценить качество тромбоцитов в концентрате. В экспериментальном исследовании [18] на основании анализа большого количества данных была показана схема выбора оптимального концентрата тромбоцитов для разных категорий больных. Методика ThromboLUX применялась в США и Канаде, в частности, для сравнительного анализа качества КТ, полученных от разных доноров или различными способами из крови одного донора [60].

Микрочастицы в концентратах тромбоцитов совсем недавно исследовались с помощью универсального ДРС анализатора — прибора Malvern Zetasizer [61]. В этом приборе обеспечивается сбор рассеянного излучения под углом 173° (технология обратного рассеяния), что дает возможность проводить измерения для малопрозрачных образцов. Наиболее информативными оказываются распределения частиц, измеренные для неразбавленных концентратов тромбоцитов. На рисунке 1 приведены распределения по интенсивности рассеянного излучения микрочастиц и тромбоцитов, измеренные при указанных выше условиях. Для каждого из исследованных образцов проведено по 3 измерения. Первое измерение произведено при температуре 37 °C — это характеристика исходного состояния концентрата, второе характеризует устойчивость тромбоцитов к температурному стрессу, т.е. активации при понижении температуры до 20 °C. Третье измерение выполнено после повышения температуры с 20 до 37 °C, его результаты позволили оценить способность тромбоцитов восстанавливаться после стресса.

Из данных, представленных на рисунке 1, видна большая доля микрочастиц в КТ при температуре 20 °C (зеленый цвет линии) и ее снижение при нагреве до 37 °C (синий цвет линии). В работе A. Labrie et al. произведен анализ тромбоцитарных концентратов, полученных разными способами: путем афереза, из обогащенной тромбоцитами плазмы и из лейкоцитарно-фосфористой пленки. В измеренных распределениях микрочастиц по размерам отчетливо видны пики, соответствующие экзосомам (более мелким частицам, диаметр которых не превышает 100 мкм) и микрочастицам тромбоцитарного происхождения [59].

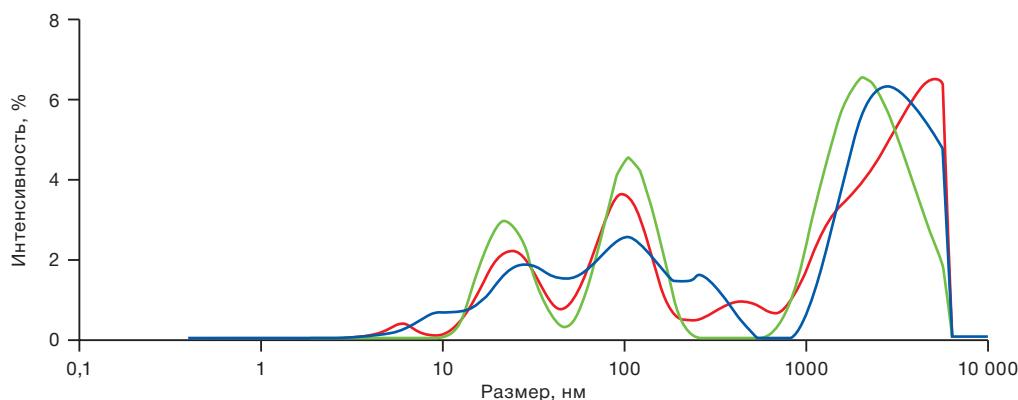


Рисунок подготовлен и адаптирован авторами по данным источника [59]

Рис. 1. Распределение по интенсивности рассеянного излучения микрочастиц и тромбоцитов в концентрате тромбоцитов

Примечание: красный цвет — при температуре 37 °C (исходное состояние); зеленый цвет — при температуре 20 °C; синий цвет — после повышения температуры от 20 до 37 °C.

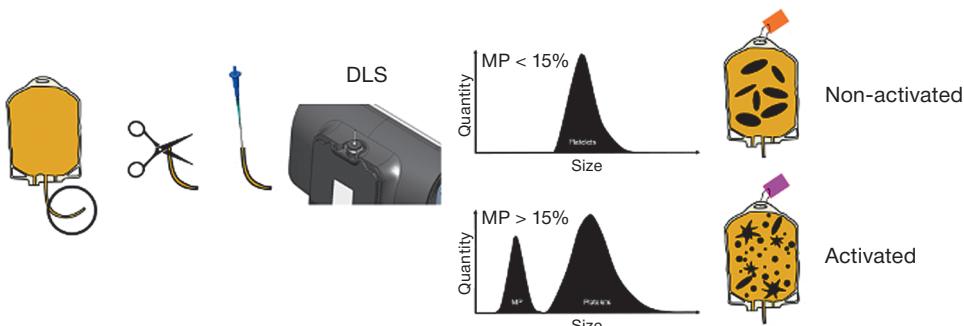


Рисунок подготовлен авторами по данным источника [60]

Рис. 2. Метод выявления содержания микрочастиц, позволяющий различать концентраты активированных и неактивированных тромбоцитов

Однако в зависимости от способа получения ТК положения этих пиков по шкале диаметров частиц заметно различаются [60].

В последние годы интенсивно разрабатываются технологии заготовки, переработки, хранения и применения ТК, для которых необходимы новые способы оценки качества и безопасности компонентов крови, отвечающие современным стандартам [59–63]. Способ определения микрочастиц в ТК как одна из возможностей сохранения их качественных характеристик и безопасности при последующих трансфузиях показан на рисунке 2.

На рисунке 2 показаны действия, которые необходимо выполнить для рутинного управления запасами тромбоцитов в банке крови: получение образца из концентрата тромбоцитов, загрузка образца в капилляр для измерения ДРС, выполнение теста ДРС для идентификации микрочастиц и использование сообщенного содержания микрочастиц для идентификации активированных тромбоцитов. Среднестатистическому пользователю требуется 3 мин 23 с, чтобы подготовить систему ДРС к тесту, получить и протестировать образец в соответствии с протоколом и пометить пакет с тромбоцитами. Основное внимание в этом протоколе уделяется определению состава частиц, присутствующих в переливаниях тромбоцитов, и использованию микрочастиц в качестве биомаркеров активации тромбоцитов. Переливания тромбоцитов помечаются как неактивированные или активированные на основе порогового значения процента микрочастиц 15%. К концу срока хранения в КТ отмечается увеличение количества циркулирующих МЧ тромбоцитарного происхождения, что свидетельствует об избыточной активации

и/или апоптозе тромбоцитов и потере их функциональной активности и приводит в конечном итоге к снижению ожидаемого терапевтического эффекта от применения ТК. Определение количества тромбоцитарных МЧ методом ДРС может быть перспективным методом оценки качества КТ.

Перспективной является разработка отечественной методики с использованием динамического светорассеяния для анализа содержания микрочастиц в концентратах тромбоцитов как одного из критериев контроля качества компонентов крови. Современный анализ будет проводить рутинный скрининг микрочастиц обогащенной тромбоцитами плазмы или концентратов тромбоцитов с валидацией результатов и формированием заключения о возможности использования ТК для последующей трансфузии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С развитием современных технологий все большее значение приобретает поиск новых методов определения качества и безопасности компонентов крови, в том числе концентратов тромбоцитов. Для проведения рутинного скрининга ТК возможно проведение быстрого и неинвазивного теста, который оценивает характеристики тромбоцитов, имеющие значение для реципиента. В качестве исследуемого параметра может быть определение содержания микрочастиц. Измеряя состав концентрата тромбоцитов, можно определить характеристики компонента при хранении, устойчивость к дополнительным нагрузкам и обосновать его оптимальное использование.

Представленный метод оценки качества и безопасности тромбоконцентратов основан на динамическом рассеянии света, имеющем ряд преимуществ над предшествующими тестами. Внедрение метода в клиническую практику позволит оценить эффективность использования ТК до проведения трансфузии, что имеет важное значение, так как многократные трансфузии ТК у пациентов могут вызвать нежелательные явления. Пациентам, имеющим кровопотерю в результате травмы

Литература / References

1. Tetta C, Bruno S, Fonsato V, Deregibus MC, Camussi G. The role of microvesicles in tissue repair. *Organogenesis*. 2011;7(2):105–15.
<https://doi.org/10.4161/org.7.2.15782>
2. Nomura S, Ozaki Y, Ikeda Y. Function and role of microparticles in various clinical settings. *Thromb Res*. 2008;123(1):8–23.
<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2008.06.006>
3. Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest*. 2004;34(6):392–401.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2004.01355.x>
4. Burnouf T, Goubran HA, Chou ML, Devos D, Radosevic M. Platelet microparticles: detection and assessment of their paradoxical functional roles in disease and regenerative medicine. *Blood Rev*. 2014;28(4):155–66.
<https://doi.org/10.1016/j.blre.2014.04.002>
5. Flaumenhaft R. Formation and fate of platelet microparticles. *Blood Cells Mol Dis*. 2006;36(2):182–7.
<https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2005.12.019>
6. Lynch SF, Ludlam CA. Plasma microparticles and vascular disorders. *Br J Haematol*. 2007;137(1):36–48.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06514.x>
7. Simak J, Gelderman MP. Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfus Med Rev*. 2006;20(1):1–26.
<https://doi.org/10.1016/j.tmr.2005.08.001>
8. Siljander PR. Platelet-derived microparticles — an updated perspective. *Thromb Res*. 2011;127 Suppl 2:S30–3.
[https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(10\)70152-3](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(10)70152-3)
9. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev*. 2007;21(3):157–71.
<https://doi.org/10.1016/j.blre.2006.09.001>
10. Ayers L, Nieuwland R, Kohler M, Kraenkel N, Ferry B, Leeson P. Dynamic microvesicle release and clearance within the cardiovascular system: triggers and mechanisms. *Clin Sci (Lond)*. 2015;129(11):915–31.
<https://doi.org/10.1042/CS20140623>
11. Tan KT, Lip GY. The potential role of platelet microparticles in atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 2005;94(3):488–92.
<https://doi.org/10.1160/TH05-03-0201>
12. Marcoux G, Duchez AC, Rousseau M, Lévesque T, Boudreau LH, Thibault L et al. Microparticle and mitochondrial release during extended storage of different types of platelet concentrates. *Platelets*. 2017;28(3):272–80.
<https://doi.org/10.1080/09537104.2016.1218455>
13. Baj-Krzyworzeka M, Majka M, Pratico D, Ratajczak J, Vilair G, Kijowski J et al. Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp Hematol*. 2002;30(5):450–9.
[https://doi.org/10.1016/s0301-472x\(02\)00791-9](https://doi.org/10.1016/s0301-472x(02)00791-9)
14. Delabranche X, Berger A, Boisramé-Helms J, Meziani F. Microparticles and infectious diseases. *Med Mal Infect*. 2012;42(8):335–43.
<https://doi.org/10.1016/j.medmal.2012.05.011>
15. Laffont B, Corduan A, Plé H, Duchez AC, Cloutier N, Boillard E et al. Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2•microRNA complexes to endothelial cells via microparticles. *Blood*. 2013;122(2):253–61.
<https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-492801>
16. Saas P, Angelot F, Bardiaux L, Seilles E, Garnache-Ottou F, Perruche S. Phosphatidylserine-expressing cell by-products in transfusion: A pro-inflammatory or an anti-inflammatory effect? *Transfus Clin Biol*. 2012;19(3):90–7.
<https://doi.org/10.1016/j.traci.2012.02.002>
17. Momen-Heravi F, Balaj L, Alian S, Tigges J, Toxavidis V, Ericsson M et al. Alternative methods for characterization of extracellular vesicles. *Front Physiol*. 2012;3:354.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00354>
18. Maurer-Spurej E, Chipperfield K. Could Microparticles Be the Universal Quality Indicator for Platelet Viability and Function? *J Blood Transfus*. 2016;2016:6140239.
<https://doi.org/10.1155/2016/6140239>
19. Mittal K, Kaur R. Platelet storage lesion: An update. *Asian J Transfus Sci*. 2015;9(1):1–3.
<https://doi.org/10.4103/0973-6247.150933>
20. Holme S. Storage and quality assessment of platelets. *Vox Sang*. 1998;74(2):207–16.
<https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1998.tb05422.x>
21. Pienimaeki-Roemer A, Kuhlmann K, Böttcher A, Konovalova T, Black A, Orsó E et al. Lipidomic and proteomic characterization of platelet extracellular vesicle subfractions from senescent platelets. *Transfusion*. 2015;55(3):507–21.
<https://doi.org/10.1111/trf.12874>
22. Farrugia A, Vamvakas E. Toward a patient-based paradigm for blood transfusion. *J Blood Med*. 2014;5:5–13.
<https://doi.org/10.2147/JBM.S55769>
23. Johnson L, Schubert P, Tan S, Devine DV, Marks DC. Extended storage and glucose exhaustion are associated with apoptotic changes in platelets stored in additive solution. *Transfusion*. 2016;56(2):360–8.
<https://doi.org/10.1111/trf.13345>
24. Murphy S. Utility of in vitro tests in predicting the in vivo viability of stored PLTs. *Transfusion*. 2004;44(4):618–9.
<https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2004.00355.x>
25. Apelseth TO, Bruserud O, Wentzel-Larsen T, Hervig T. Therapeutic efficacy of platelet transfusion in patients with acute leukemia: an evaluation of methods. *Transfusion*. 2010;50(4):766–75.
<https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2009.02540.x>
26. Maurer-Spurej E, Labrie A, Pittendreigh C, Chipperfield K, Smith C, Heddle N et al. Platelet quality measured with dynamic light scattering correlates with transfusion outcome in hematologic malignancies. *Transfusion*. 2009;49(11):2276–84.
<https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2009.02302.x>
27. Maurer-Spurej E, Larsen R, Labrie A, Heaton A, Chipperfield K. Microparticle content of platelet concentrates is predicted by donor microparticles and is altered by production methods and stress. *Transfus Apher Sci*. 2016;55(1):35–43.
<https://doi.org/10.1016/j.transci.2016.07.010>
28. Schiffer CA, Anderson KC, Bennett CL, Bernstein S, Elting LS, Goldsmith M et al. American Society of Clinical Oncology. Platelet transfusion for patients with cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol*. 2001;19(5):1519–38.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2001.19.5.1519>
29. Getz TM, Montgomery RK, Bynum JA, Aden JK, Pidcock HF, Cap AP. Storage of platelets at 4°C in platelet additive solutions prevents aggregate formation and preserves platelet functional responses. *Transfusion*. 2016;56(6):1320–8.
<https://doi.org/10.1111/trf.13511>

или хирургического вмешательства, целесообразно переливать более активные тромбоциты, содержащие высокий уровень микрочастиц. При трансфузиях ТК больным с онкологическими заболеваниями активированные тромбоциты нежелательны, вследствие чего необходимо применение тромбоконцентрата с минимальным содержанием микрочастиц. Однако использование данного метода в клинической практике требует дальнейшего изучения.

30. Johnson L, Reade MC, Hyland RA, Tan S, Marks DC. In vitro comparison of cryopreserved and liquid platelets: potential clinical implications. *Transfusion*. 2015;55(4):83–47.
<https://doi.org/10.1111/trf.12915>
31. Johnson L, Tan S, Wood B, Davis A, Marks DC. Refrigeration and cryopreservation of platelets differentially affect platelet metabolism and function: a comparison with conventional platelet storage conditions. *Transfusion*. 2016;56(7):1807–18.
<https://doi.org/10.1111/trf.13630>
32. Valeri CR. Circulation and hemostatic effectiveness of platelets stored at 4°C or 22°C: studies in aspirin-treated normal volunteers. *Transfusion*. 1976;16(1):20–3.
<https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1976.16176130832.x>
33. Reddoch KM, Pidcock HF, Montgomery RK, Fedyk CG, Aden JK, Ramasubramanian AK et al. Hemostatic function of apheresis platelets stored at 4°C and 22°C. *Shock*. 2014;41 Suppl 1(01):54–61.
<https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000082>
34. Johnson L, Schubert P, Tan S, Devine DV, Marks DC. Extended storage and glucose exhaustion are associated with apoptotic changes in platelets stored in additive solution. *Transfusion*. 2016;56(2):360–8.
<https://doi.org/10.1111/trf.13345>
35. Phang M, Linoz L, Seldon M, Garg ML. Acute supplementation with eicosapentaenoic acid reduces platelet microparticle activity in healthy subjects. *J Nutr Biochem*. 2012;23(9):1128–33.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.06.006>
36. Kim HK, Song KS, Park YS, Kang YH, Lee YJ, Lee KR, Kim HK, Ryu KW, Bae JM, Kim S. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. *Eur J Cancer*. 2003;39(2):184–91.
[https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(02\)00596-8](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(02)00596-8)
37. Kriebardis A, Antonelou M, Stamoulis K, Papassideri I. Cell-derived microparticles in stored blood products: innocent bystanders or effective mediators of post-transfusion reactions? *Blood Transfus*. 2012;10 Suppl 2:s25–38.
<https://doi.org/10.2450/2012.0065>
38. Bode AP, Orton SM, Frye MJ, Udis BJ. Vesiculation of platelets during in vitro aging. *Blood*. 1991;77(4):887–95.
39. Kraladsiri P, Seghatchian J. Are all leucodepleted platelet concentrates equivalent? Comparison of Cobe LRS Turbo, Haemonetics MCS+ LD, and filtered pooled buffy-coat-derived platelets. *Vox Sang*. 2000;78(3):171–5.
<https://doi.org/10.1159/000031176>
40. Vamvakas EC, Blajchman MA. Transfusion-related immunomodulation (TRIM): an update. *Blood Rev*. 2007;21(6):327–48.
<https://doi.org/10.1016/j.blre.2007.07.003>
41. Rank A, Nieuwland R, Liebhardt S, Iberer M, Grützner S, Toth B, et al. Apheresis platelet concentrates contain platelet-derived and endothelial cell-derived microparticles. *Vox Sang*. 2011;100(2):179–86.
<https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2010.01385.x>
42. Devine DV, Bradley AJ, Maurer E, Levin E, Chahal S, Serrano K, et al. Effects of prestorage white cell reduction on platelet aggregate formation and the activation state of platelets and plasma enzyme systems. *Transfusion*. 1999;39(7):724–34.
<https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1999.39070724.x>
43. Sugawara A, Nollet KE, Yajima K, Saito S, Ohto H. Preventing platelet-derived microparticle formation--and possible side effects-with prestorage leukofiltration of whole blood. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134(5):771–5.
<https://doi.org/10.5858/134.5.771>
44. Lawrie AS, Cardigan RA, Williamson LM, Machin SJ, Mackie IJ. The dynamics of clot formation in fresh-frozen plasma. *Vox Sang*. 2008;94(4):306–44.
<https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2008.01037.x>
45. George JN, Pickett EB, Heinz R. Platelet membrane microparticles in blood bank fresh frozen plasma and cryoprecipitate. *Blood*. 1986;68(1):307–9.
46. Strasser EF, Happ S, Weiss DR, Pfeiffer A, Zimmermann R, Eckstein R. Microparticle detection in platelet products by three different methods. *Transfusion*. 2013;53(1):156–66.
<https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2012.03720.x>
47. Khorana AA, Francis CW, Blumberg N, Culakova E, Refaai MA, Lyman GH. Blood transfusions, thrombosis, and mortality in hospitalized patients with cancer. *Arch Intern Med*. 2008;168(21):2377–81.
<https://doi.org/10.1001/archinte.168.21.2377>
48. Sinauridze El, Kireev DA, Popenko NY, Pichugin AV, Pantaleev MA, Krymskaya OV, et al. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb Haemost*. 2007;97(3):425–34.
49. Rank A, Nieuwland R, Crispin A, Grützner S, Iberer M, Toth B et al. Clearance of platelet microparticles in vivo. *Platelets*. 2011;22(2):111–6.
<https://doi.org/10.3109/09537104.2010.520373>
50. Saas P, Angelot F, Bardiaux L, Seilles E, Garnache-Ottou F, Perruche S. Phosphatidylserine-expressing cell by-products in transfusion: A pro-inflammatory or an anti-inflammatory effect? *Transfus Clin Biol*. 2012;19(3):90–7.
<https://doi.org/10.1016/j.traci.2012.02.002>
51. Kitazawa J, Nollet K, Morioka H, Tanaka K, Inomata M, Kubuki Y et al. Non-D Rh antibodies appearing after apheresis platelet transfusion: stimulation by red cells or microparticles? *Vox Sang*. 2011;100(4):395–400.
<https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2010.01435.x>
52. Rebulla P. A mini-review on platelet refractoriness. *Haematologica*. 2005;90(2):24753.
53. Slichter SJ, Davis K, Enright H, Braine H, Gernsheimer T, Kao KJ et al. Factors affecting posttransfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients. *Blood*. 2005;105(10):4106–14.
<https://doi.org/10.1182/blood-2003-08-2724>
54. Hess JR, Trachtenberg FL, Assmann SF, Triulzi DJ, Kaufman RM, Strauss RG, et al. Clinical and laboratory correlates of platelet alloimmunization and refractoriness in the PLADO trial. *Vox Sang*. 2016;111(3):281–91.
<https://doi.org/10.1111/vox.12411>
55. Meehan KR, Matias CO, Rathore SS, Sandler SG, Kallich J, LaBrecque J, et al. Platelet transfusions: utilization and associated costs in a tertiary care hospital. *Am J Hematol*. 2000;64(4):251–6.
[https://doi.org/10.1002/1096-8652\(200008\)64:4<251::aid-ajh3>3.0.co;2-n.CO](https://doi.org/10.1002/1096-8652(200008)64:4<251::aid-ajh3>3.0.co;2-n.CO)
56. Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GF, Coblyn JS, Weinblatt ME et al. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science*. 2010;327(5965):580–3.
<https://doi.org/10.1126/science.1181928>
57. Cortés-Puch I, Remy KE, Solomon SB, Sun J, Wang D, Al-Hamad M, et al. In a canine pneumonia model of exchange transfusion, altering the age but not the volume of older red blood cells markedly alters outcome. *Transfusion*. 2015;55(11):2564–75.
<https://doi.org/10.1111/trf.13275>
58. Flegel WA, Natanson C, Klein HG. Does prolonged storage of red blood cells cause harm? *Br J Haematol*. 2014;165(1):3–16.
<https://doi.org/10.1111/bjh.12747>
59. Labrie A, Marshall A, Bedi H, Maurer-Spurej E. Characterization of platelet concentrates using dynamic light scattering. *Transfus Med Hemother*. 2013;40(2):93–100.
<https://doi.org/10.1159/000350362>
60. Millar D, Hayes C, Jones J, Klapper E, Kniep JN, Luu HS, et al. Comparison of the platelet activation status of single-donor platelets obtained with two different cell separator technologies. *Transfusion*. 2020;60(9):2067–78.
<https://doi.org/10.1111/trf.15934>
61. Li M, Zhao Y, Chen X, Du X, Luo Y, Li Y, et al. Comparative analysis of the quality of platelet concentrates produced by apheresis procedures, platelet rich plasma, and buffy coat. *Transfusion*. 2024;64(2):367–79.
<https://doi.org/10.1111/trf.17704>
62. Кищенко ВВ, Сироткина ОВ, Сидоркевич СВ, Вавилова ТВ. Тромбоцитарные везикулы—потенциальный маркер каче-

- ства концентратов тромбоцитов. *Профилактическая и клиническая медицина.* 2020;77(4):93–101.
- Kishchenko VV, Sirotkina OV, Sidorkevich SV, Vavilova TV. Platelet vesicles are a potential marker of platelet concentrate quality. *Preventive and clinical medicine.* 2020;77(4):93–101 (In Russ.).
https://doi.org/10.47843/2074-9120_2020_4_93
63. Пономаренко ЕА, Игнатова АА, Федорова ДВ, Жарков ПА, Пантелейев МА. Функциональная активность тромбоцитов: физиология и методы лабораторной диагностики. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии.* 2019;18(3):112–19.
- Ponomarenko EA, Ignatova AA, Fedorova DV, Zharkov PA, Panteleev MA. Functional activity of platelets: physiology and laboratory diagnostic methods. *Issues of hematology/oncology and immunopathology in pediatrics.* 2019;18(3):112–19 (In Russ.).
<https://doi.org/10.24287/1726-1708-2019-18-3-112-119>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Г.В. Гришина — написание текста рукописи, анализ данных, оформление статьи, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации; А.Д. Касьянов — планирование и разработка дизайна исследований, оформление статьи; И.С. Голованова, Д.В. Ласточкина — анализ тестов; О.Ю. Матвиенко — анализ данных; И.И. Кробинец — разработка дизайна исследований, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

ОБ АВТОРАХ

Гришина Галина Викторовна, канд. бiol. наук
<https://orcid.org/0000-0003-4842-2504>
reger201309@mail.ru

Касьянов Андрей Дмитриевич, канд. мед. наук
<https://orcid.org/0000-0002-3597-664X>
bloodscience@mail.ru

Ласточкина Дарья Вячеславовна
<https://orcid.org/0000-0002-2727-1092>
bloodscience@mail.ru

Кробинец Ирина Ивановна, д-р бiol. наук
<https://orcid.org/0000-0002-6404-2387>
transfusion_spb@mail.ru

Голованова Ирина Станиславовна
<https://orcid.org/0000-0002-1677-1956>
bloodscience@mail.ru

Матвиенко Олеся Юрьевна, канд. мед. наук
<https://orcid.org/0000-0003-2728-6590>
bloodscience@mail.ru

<https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-141-148>

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛАКТУЛОЗЫ В СОСТАВЕ КРИОКОНСЕРВАНТА ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ КЛЕТОК КРОВИ

А.А. Власов^{1✉}, С.Ф. Андрусенко¹, О.И. Анфиногенова¹, А.Б. Эльканова¹, А.А. Каданова¹, У.Е. Сорокина¹, Э.Е. Рыбчинская¹, Д.А. Доменюк²

¹ Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия

² Ставропольский государственный медицинский университет, Ставрополь, Россия

Введение. Криоконсервация позволяет длительно сохранять биоматериал, однако существует ряд проблем, связанных с недостаточной эффективностью криоконсервантов и токсичностью ряда криокомпонентов, в связи с чем актуален поиск низкотоксичных биосовместимых криоагентов.

Цель. Оценка морфофункциональных особенностей форменных элементов крови в криоконсерванте с лактулозой на основании показателей лейкоцитарных, тромбоцитарных и эритроцитарных параметров для хранения цельной крови при умеренно низкой температуре (-20°C).

Материалы и методы. Исследование проведено на 30 добровольцах-донарах женского пола в возрасте 18–23 лет. Объект исследования — периферическая венозная кровь, стабилизированная 3-замещенной калиевой солью этилендиаминетрауксусной кислоты. При приготовлении модельного криоконсерванта был использован 0,9 % раствор хлорида натрия для поддержания изотонической концентрации. В качестве криопротекторов, проникающих в клетку, использовали глицерин и диметилсульфоксид, в качестве не проникающего — дисахарид лактулозу. Оптимизация состава криоконсерванта проводилась за счет варьирования массовых долей компонентов. Общий анализ крови выполняли на автоматическом гематологическом анализаторе «Гемалайт 1270». Компьютерное цитоморфометрическое исследование проводили на аппаратно-программном комплексе «МЕКОС-С2».

Результаты. В ходе исследования в условиях сохранения образцов крови с применением разработанного криоконсерванта после 24 ч хранения при температуре -20°C увеличивался процент сохранности лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов ($88,6 \pm 0,41$, $92,1 \pm 0,31$, $91,4 \pm 0,52\%$ соответственно) с сохранением форменных элементов крови в физиологически активном состоянии после оттаивания по сравнению с образцами крови, сохранившимися при комнатной температуре.

Выводы. Выявлена морфологическая и функциональная сохранность форменных элементов крови в образцах с применением разработанного криоконсерванта после 24 ч хранения при температуре -20°C . Преимущества данного криоконсерванта: возможность его длительного хранения без потери криопротекторных свойств, обеспечение криопротектором стабилизации форменных элементов крови к воздействию субмеренно низкой температуры -20°C , применение нетоксичного дисахарида лактулозы, не проникающего внутрь клетки. Разработанный криоконсервант является эффективным в условиях замораживания при -20°C и доступным (все компоненты производятся на территории Российской Федерации). Исследования в данном направлении позволяют более эффективно использовать аутодонорство во избежание ряда осложнений при трансфузии компонентов крови.

Ключевые слова: криоконсервация; криопротекторы; эритроциты; лейкоциты; тромбоциты; лактулоза; морфофункциональные свойства

Для цитирования: Власов А.А., Андрусенко С.Ф., Анфиногенова О.И., Эльканова А.Б., Каданова А.А., Сорокина У.Е., Рыбчинская Э.Е., Доменюк Д.А. Использование лактулозы при криоконсервировании клеток крови для персонализированной терапии. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2024;26(4):141–148. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-141-148>

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Соответствие принципам этики: исследование одобрено этическим комитетом Северо-Кавказского федерального университета (протокол № 002 от 11 июля 2024 г.). Все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Потенциальный конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

✉ Власов Александр Александрович alecs-aspirini@yandex.ru

Статья поступила: 30.09.2024 После доработки: 07.11.2024 Принята к публикации: 08.11.2024

USE OF LACTULOSE IN THE COMPOSITION OF BLOOD CELL CRYOPRESERVATIVES

Aleksander A. Vlasov^{1✉}, Svetlana F. Andrusenko¹, Oksana I. Anfinogenova¹, Aishat B. Elkanova¹, Anna A. Kadanova¹, Uliana E. Sorokina¹, Elvira E. Rybchinskaya¹, Dmitriy A. Domenyuk²

¹ North-Caucasus Federal University, Stavropol, Russia

² Stavropol State Medical University, Stavropol, Russia

Introduction. Cryopreservation allows for long-term conservation of biomaterials. The insufficient efficacy of available cryopreservatives and the toxicity of a number of cryocomponents renders the search for low-toxic biocompatible cryoagents highly relevant.

Objective. Assessment of morphological and functional features of blood cells in a lactulose-based cryopreservative for storing whole blood at moderately low temperatures (minus 20°C) using leukocyte, platelet, and erythrocytes parameters.

Materials and methods. The study was conducted using peripheral venous blood of 30 female donor volunteers aged 18–23 years. Samples of peripheral venous blood were stabilized by 3-substituted potassium salt of ethylenediaminetetraacetic acid. The cryopreservative was prepared using a 0.9 % sodium chloride solution to maintain the isotonic concentration. Glycerin and dimethyl sulfoxide were used as cell-penetrating cryoprotectors; lactulose disaccharide was used as a non-penetrating cryoprotector. The composition of the obtained cryopreservative was optimized by varying the mass fractions of the components. Clinical blood tests were performed using a Gemalite 1270 automatic hematology analyzer. A computer cytomorphometric study was performed in the МЕКОС-С2 hardware and software environment.

Results. The conservation of blood samples using the developed cryopreservative for 24 h at a temperature of minus 20°C increased the percentage of preserved leukocytes, erythrocytes, and platelets to $88.6 \pm 0.41\%$, $92.1 \pm 0.31\%$, and $91.4 \pm 0.52\%$, respectively. The blood cells retained their physiological activity after thawing compared to blood samples stored at room temperature.

Conclusions. The morphological and functional safety of blood cells in samples stored with the developed cryopreservative was revealed after 24 h of storage at minus 20°C . The advantages of this cryopreservative include the possibility of its long-term storage without loss of cryoprotective properties, stabilizing

© А.А. Власов, С.Ф. Андрусенко, О.И. Анфиногенова, А.Б. Эльканова, А.А. Каданова, У.Е. Сорокина, Э.Е. Рыбчинская, Д.А. Доменюк, 2024

blood cells to the effects of sub-moderate low temperatures of minus 20 °C, the use of non-toxic lactulose disaccharide that does not penetrate into the cell. The developed cryopreservative proves effective in freezing conditions at minus 20 °C, being affordable in terms of cost (all components are manufactured in the Russian Federation). Further research in this direction will contribute to the development of safer blood donation approaches and reducing complications during transfusion of blood components.

Keywords: cryopreservation; cryoprotectors; erythrocytes; leukocytes; platelets; lactulose; morphofunctional properties

For citation: Vlasov A.A., Andrusenko S.F., Anfinogenova O.I., Elkanova A.B., Kadanova A.A., Sorokina U.E., Rybchinskaya E.E., Domenyuk D.A. Use of lactulose in the composition of blood cell cryopreservatives. *Extreme Medicine*. 2024;26(4):141–148. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-26-4-141-148>

Funding: the study was performed without sponsorship.

Compliance with the principles of ethics: the study was approved by the Ethics Committee of the North-Caucasus Federal University (Protocol No. 002 dated July 11, 2024). All participants signed a voluntary informed consent to participate in the study.

Potential conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

✉ Aleksander A. Vlasov alecs-aspirini@yandex.ru

Received: 30 Sep. 2024 Revised: 7 Nov. 2024 Accepted: 8 Nov. 2024

ВВЕДЕНИЕ

Проблема сохранения клеток крови вне организма является весьма актуальной для практической медицины. Криоконсервация позволяет длительно хранить биообразцы без изменений клеточной структуры с поддержанием их функциональной активности. Использование жидкого азота требует громоздкого, дорогостоящего оборудования, регулярного пополнения его запасов, что сказывается на себестоимости хранения материала и перевозки образцов [1], в связи с чем востребованы эффективные криоконсерванты для температурного диапазона от -20 до -80 °C. Для криоконсервации характерным недостатком является возможное разрушение клеточных оболочек, возникающее вследствие недостаточной эффективности существующих криоконсервантов [2]. В то же время криоагенты должны обладать низкой токсичностью [3, 4], использование которых не будет приводить к потере фенотипических и функциональных свойств биоматериала, в связи с чем существует потребность в поиске низкотоксичных биосовместимых криоагентов [5].

Наилучшие результаты достигаются при использовании комбинированных криоконсервантов, включая эндо- и экзоцеллюлярные криопротекторы [6]. Для уменьшения токсического действия криосистем дополнительно вносят в качестве криоагентов природного происхождения липиды, белки, углеводы [7–10], аминокислоты [11] и многоатомные спирты [12]. Одним из перспективных классов криопротекторов являются низкомолекулярные углеводы [13]. Выраженным защитным действием на клеточные мембранны обладает и дисахарид трегалоза [14]. Смеси сахаров и полиолов рассматриваются в качестве естественной эвтектической системы [15]. В настоящее время в литературе недостаточно экспериментальных данных о влиянии ряда углеводов на клетки при использовании их в качестве криопротекторов, в частности дисахарида лактулозы. Лактулоза — безопасное соединение для всех возрастных групп, в том числе для детей младше одного года [16]. При исследовании лактулозы данных о токсическом, тератогенном и мутагенном действии в клинических исследованиях с участием людей получено не было [17]. При этом отмечены защитные свойства лактулозы на микроорганизмы при их заморозке [18, 19].

В настоящее время возросла потребность в постоянном наличии запасов полноценной крови и ее компонентов [20]. Образцы свежей цельной крови являются наиболее предпочтительными для анализа, но недостатком работы с ней является необходимость ее быстрого анализа после взятия биопробы и ограниченное количество повторных проверок, которые могут быть выполнены без дополнительного взятия крови [21]. Описан опыт криоконсервирования в полевых условиях капиллярной крови с последующим анализом методом цитометрии [22], однако аналогичных данных о криоконсервации венозной крови нет. Таким образом, актуален анализ морффункциональных параметров криоконсервированной цельной венозной крови в аспекте поиска критериев, позволяющих увеличить сроки хранения стабилизованных образцов крови без особых изменений аналитических методик и определяемых показателей крови.

Цель работы — оценка морффункциональных особенностей форменных элементов крови в криоконсерванте с лактулозой на основании лейкоцитарных, тромбоцитарных и эритроцитарных параметров для хранения цельной крови при умеренно-низкой температуре (-20 °C).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено с участием 30 здоровых женщин-доноров в возрасте 18–23 лет. Все участницы были распределены по фазе менструального цикла (фолликулярная фаза). Критериями включения в исследование было отсутствие у женщин хронических заболеваний в периоде обострения, вредных привычек и видимых признаков аллергического или инфекционного заболевания. Всеми участниками было подписано информированное согласие об участии в исследовании. Объектом исследования была периферическая венозная кровь, стабилизированная 3-замещенной калиевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты (К3 ЭДТА) *in vitro*. Пробы венозной крови объемом 15 мл отбирали однократно в утренние часы из локтевой вены в специализированные вакуумные пробирки для гематологических исследований с К3 ЭДТА.

Из числа проб были сформированы три группы. В контрольную группу включили 10 образцов крови, в которой исследовали характеристики и параметры форменных элементов крови при температуре +20 ± 1,0 °C. В 1-ю опытную группу было включено 10 образцов крови,

в которые предварительно был внесен модельный криоконсервант. Данные образцы исследовали по истечении 4 ч при температуре $+20 \pm 1,0$ °C. Во 2-ю опытную группу вошли 10 образцов крови, в которые был внесен модельный криоконсервант, с последующим введением образцов в состояние холодового анабиоза при температуре $-20 \pm 1,0$ °C на 24 ч для оценки сохранности образцов после однократного цикла замораживания/оттаивания. Далее образцы размораживали и исследовали характеристики и параметры форменных элементов крови при температуре $+20 \pm 1,0$ °C.

При приготовлении модельного криоконсерванта был использован 0,9 % раствор хлорида натрия для поддержания изотонической концентрации. В качестве криопротекторов, проникающих в клетку, использовали глицерин и диметилсульфоксид (ДМСО), в качестве не проникающего — дисахарид лактулозу. Оптимизация состава криоконсерванта проводилась за счет варьирования массовых долей компонентов. Конечный состав модельного криоконсерванта имел следующие соотношения компонентов: глицерин (чда) — 20%, ДМСО (хч) — 10%, лактулоза (торговая марка «Лактусан» по ТУ 9229-004-53757476-04) — 2,5% и изотонический (0,9%) раствор хлорида натрия до 100%. Приготовленный раствор автоклавировали (без ДМСО) при 1,2 атм в течение 30 мин и хранили в холодильнике при температуре $+2\ldots+4$ °C. При соприкосновении с воздухом ДМСО окисляется, распадаясь на соединения, усиливающие токсичность химического вещества, поэтому автоклавированию не подлежит. Стерилизацию ДМСО осуществляли методом стерилизующего фильтрования с последующим хранением ДМСО в стеклянных стерильных пробирках при температуре -10 °C. Размораживание ДМСО проводилось на водяной бане UT-4334 («ULAB», Россия) при температуре 37 ± 1 °C. ДМСО вносили в готовый стерильный модельный криоконсервант непосредственно перед замораживанием опытных образцов.

В образцы 1-й и 2-й опытных групп добавляли с помощью дозаторов смешного объема модельный криоконсервант в количестве 500 мкл при соотношении венозная кровь / криоконсервант 2:1 по объему. Пробирки герметизировали пробками, содержимое перемешивали в течение 10 мин с использованием орбитального шейкера (PSU-10i, Латвия). Далее спустя 4 ч образцы 1-й опытной группы исследовали при температуре $+20 \pm 1,0$ °C. Образцы 2-й опытной группы помещали в морозильную камеру электроморозильника с температурой $-20 \pm 1,0$ °C и выдерживали 24 ч. После этого образцы размораживали на водяной бане UT-4334 («ULAB», Россия) в ручном режиме при температуре $+37 \pm 1$ °C в течение 1 мин. Далее исследовали характеристики

и параметры форменных элементов крови при температуре $+20 \pm 1,0$ °C. Компьютерное цитоморфометрическое исследование клеток крови выполняли на аппаратно-программном комплексе «МЕКОС-Ц2» («Медицинские компьютерные системы», Россия). При проведении *in vitro* диагностических тестов общего анализа крови (ОАК) в лабораторных условиях использовали автоматический гематологический анализатор «Гемалайт 1270» (Dixion, Россия).

Для обработки полученных результатов использовали программное обеспечение статистический пакет версии IBM SPSS Statistic 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY, США). Характер распределения величин изучаемых показателей оценивали с помощью *W*-критерия Шапиро — Уилка. Уровень статистической значимости межгрупповых различий при соответствии распределения значений показателя закону нормального распределения оценивали с помощью параметрического *t*-критерия Стьюдента для несвязанных выборок, для показателей с ненормальным распределением — при помощи непараметрического *U*-критерия Манна — Уитни. Для показателей с нормальным распределением вычисляли среднее значение (M), ошибку среднего (m) и стандартное отклонение (δ). Межгрупповые различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе исследования проводили анализ состояния лейкоцитарного звена в опытных и контрольной группах (в 1-й опытной группе с криоконсервантом при температуре $+20 \pm 1,0$ °C и 2-й опытной группе с криоконсервантом при температуре $-20 \pm 1,0$ °C). Соответствующие данные представлены в таблице 1.

При анализе лейкоцитарных показателей как в 1-й, так и во 2-й опытных группах по сравнению с контролем отмечено статистически значимое снижение количества лейкоцитов, наиболее выраженное во второй опытной группе ($3,94 \pm 0,87 \times 10^9/\text{л}$ ($p < 0,01$) против $(4,55 \pm 0,83) \times 10^9/\text{л}$ в первой опытной группе и $(5,60 \pm 0,92) \times 10^9/\text{л}$ в контроле соответственно. При этом значение средних клеток достоверно увеличено как в 1-й, так и во 2-й группе в сравнении с контролем, что свидетельствует о снижении распознавания лейкоцитарных клеток анализатором крови. Несмотря на существенные межгрупповые различия, данный показатель находился в диапазоне физиологических референсных значений. Процент сохранности лейкоцитов в образцах крови с внесенным криоконсервантом (температура $+20 \pm 1,0$ °C) составил $81 \pm 0,89$ %, при воздействии отрицательных температур ($-20 \pm 1,0$ °C) — $88,6 \pm 0,41$ %.

Таблица 1. Лейкоцитарные показатели ОАК в группах исследований

Показатели ОАК	Контрольная группа $n = 10$	1-я опытная группа $n = 10$	2-я опытная группа $n = 10$
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	$5,60 \pm 0,92$	$4,55 \pm 0,83^*$	$3,94 \pm 0,87^*$
Лимфоциты, %	$38,31 \pm 4,21$	$25,70 \pm 3,14$	$25,70 \pm 2,17$
Гранулоциты, %	$56,20 \pm 5,23$	$51,10 \pm 4,24$	$51,10 \pm 3,21$
Процент средних клеток, %	$6,20 \pm 1,43$	$10,20 \pm 1,47^{**}$	$9,20 \pm 1,23^{**}$

Таблица составлена авторами по собственным данным

Примечание: данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего значения ($M \pm m$);

* статистически достоверное различие между контрольной и опытными группами ($p < 0,01$);

• статистически достоверное различие между 1-й и 2-й опытными группами ($p < 0,01$).

Компьютерная морфометрия позволяет получить математические характеристики клеточной популяции, а также дает возможность судить об активности внутриклеточных процессов [23]. Для оценки функционального состояния клеток проводили анализ компьютерной цитоморфометрии лейкоцитов в контрольной группе и опытных группах (в 1-й опытной группе с криоконсервантом при температуре $+20 \pm 1,0$ °C и 2-й опытной группе с криоконсервантом при температуре $-20 \pm 1,0$ °C). Соответствующие данные представлены в таблице 2.

Анализ данных компьютерной цитоморфометрии лейкоцитов показал, что во 2-й группе (образцы с консервантом, замороженные при $-20 \pm 1,0$ °C) значительно возросла оптическая плотность цитоплазмы (до $1,03 \pm 0,01$ у.е.) как по сравнению с контролем ($0,66 \pm 0,01$ у.е.), так и с 1-й опытной группой ($0,50 \pm 0,01$ у.е.), что, вероятно, подтверждает увеличение проницаемости в клетку эндоцеллюлярных криоагентов.

Также проводили анализ эритроцитарных показателей в контрольной группе и опытных группах (в 1-й опытной группе с криоконсервантом при температуре $+20 \pm 1,0$ °C и во 2-й опытной группе с криоконсервантом при температуре $-20 \pm 1,0$ °C). Соответствующие данные представлены в таблице 3.

При выполнении общего анализа крови были получены значения, свидетельствующие об изменении количественных и расчетных показателей, а именно был достоверно снижен уровень общего гемоглобина

крови как в 1-й, так и во 2-й опытной группе ($119,25 \pm 4,27$ и $111,64 \pm 4,42$ г/л) по отношению к группе контроля соответственно.

Также отмечали снижение среднего содержания гемоглобина в эритроцитах в двух опытных группах в сравнении с контрольной группой. Данные показатели имеют тенденцию к снижению, что косвенно отражает картину предразведения исследуемой пробы, однако можно сказать, что консервант в условиях комнатной температуры не приводит к критически значимым изменениям компонентов крови. Снижение как общего гемоглобина, так и его среднего содержания в клетках говорит о процессах повышения трансмембранный проницаемости, при этом данные показатели в опытных группах не выходили за рамки референсного диапазона физиологически допустимых значений.

Сохранность эритроцитов в образцах крови с внесенным криоконсервантом (температура $+20 \pm 1,0$ °C) составила $89,00 \pm 0,20$ %, при воздействии отрицательных температур ($-20 \pm 1,0$ °C) — $92,10 \pm 0,31$.

В ходе проведения компьютерной цитоморфометрии эритроцитов в обеих опытных группах по сравнению с контрольной достоверно увеличивалась площадь клетки в 1-й группе (значение составило $15,00 \pm 1,22$ мкм²), во 2-й группе — $22,00 \pm 1,45$ мкм² против $14,00 \pm 2,10$ мкм² в контроле. Значение среднего диаметра клетки имеет тенденцию к увеличению и в 1-й группе составляет $6,11 \pm 0,91$ мкм, во 2-й группе — $9,04 \pm 1,34$ мкм в сравнении

Таблица 2. Показатели различий компьютерной цитоморфометрии лейкоцитов в группах исследований

Свойства объекта	Контрольная группа n = 10	1-я опытная группа n = 10	2-я опытная группа n = 10
Площадь клетки, мкм ²	$70,00 \pm 4,16$	$59,00 \pm 5,23$	$60 \pm 5,92$
Формфактор клетки, %	$14,11 \pm 5,12$	$18,01 \pm 3,84$	$16,7 \pm 4,33$
Индекс поляризации клетки, %	$0,16 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,01$
Оптическая плотность цитоплазмы, у.е.	$0,66 \pm 0,01$	$0,50 \pm 0,01^{**}$	$1,03 \pm 0,01^{**}$
Площадь ядра, мкм ²	$52,00 \pm 5,32$	$40,00 \pm 4,88^{**}$	$38 \pm 4,41^{**}$
Форм-фактор ядра, %	$14,30 \pm 3,41$	$13,10 \pm 2,88$	$11,4 \pm 3,23$
Поляризация ядра, %	$0,06 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,01$
Ядерно-клеточное отношение, %	$0,74 \pm 0,01$	$0,68 \pm 0,01$	$0,63 \pm 0,01$
Доля дополнения ядра, %	$0,04 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$

Таблица составлена авторами по собственным данным

Примечание: данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего значения ($M \pm m$);

* статистически достоверное различие между контрольной и опытными группами ($p < 0,01$);

• статистически достоверное различие между 1-й и 2-й опытными группами ($p < 0,01$).

Таблица 3. Эритроцитарные показатели ОАК в группах исследований

Показатели ОАК	Контрольная группа n = 10	1-я опытная группа n = 10	2-я опытная группа n = 10
Эритроциты, $\times 10^{12}/\text{л}$	$4,62 \pm 0,24$	$4,08 \pm 0,22$	$3,75 \pm 0,41$
Гемоглобин, г/л	$131,00 \pm 5,34$	$119,25 \pm 4,27^{*}$	$111,64 \pm 4,42^{**}$
Средний объем эритроцита, фл	$86,30 \pm 4,36$	$84,30 \pm 4,11$	$81,70 \pm 3,47$
Гематокрит, %	$39,3 \pm 1,55$	$35,40 \pm 1,45$	$32,20 \pm 1,27$
Среднее содержание гемоглобина в эритроцитах, пг	$28,50 \pm 0,30$	$26,20 \pm 1,47^{*}$	$23,70 \pm 1,25^{**}$
Насыщение эритроцита гемоглобином, г/л	$336,00 \pm 29,74$	$311,00 \pm 23,37$	$305,00 \pm 19,89$
Степень отклонения размера эритроцитов, %	$12,20 \pm 1,65$	$11,70 \pm 1,44$	$10,50 \pm 1,47$

Таблица составлена авторами по собственным данным

Примечание: данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего значения ($M \pm m$);

* статистически достоверное различие между контрольной и опытными группами ($p < 0,01$);

• статистически достоверное различие между 1-й и 2-й опытными группами ($p < 0,01$).

Таблица 4. Показатели различий компьютерной цитоморфометрии эритроцитов в группах исследований

Свойства объекта	Контрольная группа n = 10	1-я опытная группа n = 10	2-я опытная группа n = 10
Площадь клетки, мкм ²	14,00 ± 2,10	15,00 ± 1,22*	22,00 ± 1,45**
Средний диаметр клетки, мкм	6,11 ± 0,91	7,01 ± 1,12	9,04 ± 1,34
Фактор формы, %	0,16 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,33 ± 0,01
Поляризация, %	0,66 ± 0,01	0,50 ± 0,01	0,47 ± 0,01
Интегральная оптическая плотность (Кра), мкм ²	52,00 ± 2,18	40,00 ± 2,25	38,00 ± 1,43
Интегральная оптическая плотность (Зел), мкм ²	14,30 ± 2,15	13,10 ± 1,49	12,10 ± 1,43
Интегральная оптическая плотность (Син), мкм ²	0,06 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01

Таблица составлена авторами по собственным данным

Примечание: данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего значения ($M \pm m$);

* статистически достоверное различие между контрольной и опытными группами ($p < 0,01$);

• статистически достоверное различие между 1-й и 2-й опытными группами ($p < 0,01$).

Таблица 5. Тромбоцитарные показатели ОАК в группах исследований

Показатели ОАК	Контрольная группа n = 10	1-я опытная группа n = 10	2-я опытная группа n = 10
Тромбоциты, ×10 ⁹ /л	230,08 ± 6,31	198,60 ± 5,36*	181,5 ± 5,71**
Средний объем тромбоцитов, фл	8,24 ± 1,31	7,56 ± 1,47	6,13 ± 1,54
Тромбокрит, %	2,23 ± 0,65	2,10 ± 0,74	2,03 ± 0,14
Коэффициент больших тромбоцитов, %	17,38 ± 3,31	21,24 ± 2,36	20,12 ± 3,51

Таблица составлена авторами по собственным данным

Примечание: данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего значения ($M \pm m$);

* статистически достоверное различие между контрольной и опытными группами ($p < 0,01$);

• статистически достоверное различие между 1-й и 2-й опытными группами ($p < 0,01$).

с группой контроля 7,01 ± 1,12 мкм. Увеличение как площади, так и диаметра эритроцитов свидетельствует о возможном повышении проницаемости в клетку примененного криоагента. Соответствующие данные представлены в таблице 4.

При сравнительном анализе тромбоцитарных показателей достоверно снижалось количество тромбоцитов. В 1-й группе значение составляло (198,60 ± 5,36)×10⁹/л, во 2-й группе (181,50 ± 5,71)×10⁹/л против контрольных значений на уровне (230,08 ± 6,31)×10⁹/л. Снижение количества клеток, вероятнее всего, обусловлено увеличением объема исследуемой пробы на фоне внесения криоконсерванта. В то же время отмечена тенденция к увеличению коэффициента больших тромбоцитов в обеих опытных группах в сравнении с группой контроля, соответствующие данные приведены в таблице 5.

Сохранность тромбоцитов в образцах крови с внесенным криоконсервантом (температура +20 ± 1,0 °C) составила 86,20 ± 0,31%, при воздействии отрицательных температур (-20 ± 1,0 °C) — 91,40 ± 0,52%.

Предположительно криоконсервант в какой-то степени активирует тромбоциты, что сопровождается их увеличением, однако все исследуемые показатели находились в диапазоне допустимых физиологических значений, следовательно, наблюдали реакцию адаптации тромбоцитов на воздействие чужеродного компонента, в частности криоконсерванта.

В ходе проведения компьютерной цитоморфометрии тромбоцитов в группах исследований отмечали статистически значимое увеличение площади клеток по сравнению с контролем, причем более выраженное в образцах 1-й группы (с внесенным исследуемым криоконсервантом) на уровне 11,85 ± 1,15 мкм², 2-й группы (с внесенным криоконсервантом и замораживанием) — на уровне

9,12 ± 1,12 мкм². Следует отметить, что, несмотря на существенные межгрупповые различия, данный показатель отражает картину активности площади тромбоцитов с последующей адаптацией после заморозки. Отмеченные изменения находились в диапазоне физиологических референсных значений. Соответствующие данные представлены в таблице 6.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При сравнительном анализе показателей ОАК в опытных группах с внесением криоконсерванта (вне зависимости от температурных условий сохранения образцов крови) установлено достоверное снижение общего количества лейкоцитов, что, вероятно, обусловлено изменением соотношения жидкой части крови и форменных элементов в условиях введения криоконсерванта и сопряжено со снижением распознавания лейкоцитарных клеток анализатором крови. При этом было отмечено достоверное увеличение процента содержания средних клеток в образцах с температурой консервации -20 ± 1,0 °C. Вероятно, это связано с изменением морфологии лейкоцитов, на что указывают изменения в оптической плотности цитоплазмы лейкоцитов, выявленные при компьютерной цитоморфометрии. Данные изменения могут быть связаны и с эффектом влияния криоконсерванта, однако в образцах, подвергшиеся замораживанию, показатели были более стабильны.

При сравнительном анализе эритроцитарных показателей в группах с внесением криоконсерванта как в условиях положительной температуры, так и при замораживании образцов установлено достоверное снижение общего гемоглобина крови, среднего содержания гемоглобина в эритроцитах, при этом статистически значимых

Таблица 6. Показатели компьютерной цитоморфометрии тромбоцитов в группах исследований

Свойства объекта	Контрольная группа n = 10	1-я опытная группа n = 10	2-я опытная группа n = 10
Площадь клетки, мкм ²	7,70 ± 1,23	11,85 ± 1,15*	9,12 ± 1,12**
Мин. диаметр, мкм	2,65 ± 0,15	2,83 ± 0,54	2,72 ± 0,71
Макс. диаметр, мкм	4,03 ± 0,43	4,94 ± 0,33	4,81 ± 0,25
Ср. диаметр, мкм	3,44 ± 0,27	3,92 ± 0,78	3,88 ± 0,31
Фактор формы, %	12,90 ± 2,10	14,87 ± 2,88	13,10 ± 1,97

Таблица составлена авторами по собственным данным

Примечание: данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего значения ($M \pm m$);

* статистически достоверное различие между контрольной и опытными группами ($p < 0,01$);

** статистически достоверное различие между 1-й и 2-й опытными группами ($p < 0,01$).

изменений в концентрации эритроцитов не выявлено, что говорит об эффективности примененного криопротектора. В то же время по данным компьютерной цитоморфометрии увеличение площади клетки эритроцита и тенденция к увеличению среднего диаметра клетки и фактора формы эритроцитов в образцах с криоконсервантом и последующим замораживанием подтверждает трансмембранное проникновение криоагентов внутрь клеток.

При анализе тромбоцитарных показателей установлено, что в крови с внесенным криоконсервантом (+20 ± 1,0 °C) статистически значимо снижалась концентрация тромбоцитов, что связано с изменением соотношения клеток к жидкой части крови. Отмечено более выраженное снижение показателя в образцах, сохранявшихся в условиях отрицательных температур, по сравнению с образцами первой группы (внесенным криоконсервантом и температурой +20 ± 1,0 °C), при этом его изменения не выходили за границы физиологической нормы. Тем самым применение данного способа консервации крови может быть использовано в формировании криоконсервированного банка тромбоцитарного гемоконцентрата. При компьютерной цитоморфометрии тромбоцитарных клеток установлено статистически значимое увеличение площади клетки. Скорее всего, увеличение данного показателя объясняется тем, что тромбоцит запускает процессы активации в ответ на контакт с чужеродным агентом в виде криоконсерванта. В то же время в образцах крови 2-й группы также с внесенным криоконсервантом, но при замораживании мы регистрировали менее выраженное увеличение площади тромбоцита, что, по всей видимости, объясняется запуском процессов адаптации к криоконсерванту при воздействии отрицательных температур, однако выявленная особенность требует дальнейшего изучения.

В ходе исследования в условиях сохранения образцов крови с применением разработанного криоконсерванта после 24 ч хранения при температуре -20 °C увеличивался процент сохранности форменных элементов клеток крови (лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов: 88,6 ± 0,41, 92,1 ± 0,31, 91,4 ± 0,52% соответственно) с сохранением форменных элементов клеток крови в физиологически активном состоянии после оттаивания по сравнению с образцами крови, сохранившимися при комнатной температуре. Необходимо отметить, что в работах Г.Ю. Кирьяновой и соавт. при использовании в качестве криоконсерванта раствора «Криосин» процент сохранности эритроцитов составил 83,80 ± 4,09% [24]. В работах Н.В. Исаевой и соавт. при оценке жизнеспособности ядроодержащих клеток

в лейкоконцентратах на этапах их получения и замораживания было отмечено, что в жизнеспособном состоянии сохраняется 86,7% [25]. В работах К.А. Ветошкина и соавт. при замораживании тромбоцитов крови доноров под защитой комбинированного криоконсерванта сохранилась их функциональная активность, но находилась лишь в пределах 63,5—88,8% [26]. Исследовали также форменные элементы цельной крови после суточного хранения при температуре -40 °C, при этом морфологическая и функциональная сохранность клеток составила: для эритроцитов — 85,30 ± 0,30%, для тромбоцитов — 75,00 ± 0,71%, для лейкоцитов — 90,10 ± 0,91% от значений, зарегистрированных до замораживания [27].

В работах И.Г. Широких и соавт. при исследовании действия полисахаридных фракций на криоконсервированную венозную кровь человека было установлено снижение осмолярности крови человека от 281 до 149 мОsm/l, что обусловлено взаимодействием функциональных групп полисахаридов с осмотически активными веществами плазмы крови и приводило к снижению осмолярности среды и ускорению кристаллизации воды [28]. Лактулоза (как и другие дисахариды) относится к непроникающим криопротекторам, и создает осмотическое давление, которое вызывает дегидратацию клеток и уменьшает степень образования льда внутри клеток. Криоэффект лактулозы, очевидно, близок к действию дисахарида трегалозы, выполняющего функции ингибитора роста кристаллов льда в ходе замораживания и перекристаллизации льда в процессе оттаивания, образуя высоковязкое стеклоподобное состояние [29]. Тем не менее криопротекторный эффект лактулозы еще полностью не определен и нуждается в дальнейшем изучении механизма его криозащитного действия.

Основные результаты исследования нашли свое отражение в патенте на изобретение [30]. Преимуществами использования разработанного нами криопротектора являются: возможность длительного хранения без потери криопротекторных свойств, обеспечение стабилизации форменных элементов клеток крови к воздействию субумеренно низкой температуры -20 °C, приготовление криопротектора не требует громоздкого, дорогостоящего оборудования, применение нетоксичного, не проникающего внутрь клетки дисахарида лактулозы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлена морфологическая и функциональная сохранность форменных элементов крови в образцах с применением разработанного криоконсерванта после 24 ч хранения при температуре -20 °C. Разработанный

криоконсервант является эффективным в условиях замораживания при -20°C , доступным (все компоненты производятся на территории Российской Федерации), что расширяет спектр применяемых криоконсервантов для проведения анализа морфофункциональных параметров образцов замороженной цельной крови при крупномасштабных исследованиях, для полевой медицины, при хранении биоматериала в длительных экспедициях и отдаленных местностях. Работы, проводимые в таком

направлении, позволят более эффективно использовать аутодонорство во избежание ряда осложнений при переливании компонентов крови.

На наш взгляд, представленные данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения лактулозы в качестве криокомпонента для обеспечения сохранности клеток крови при более длительных сроках хранения.

Литература / References

- Hidi L, Komorowicz E, Kovács GI, Szeberin Z, Garbaisz D, Nikолова N, et al. Cryopreservation moderates the thrombogenicity of arterial allografts during storage. *PLoS One*. 2021;16(7): e0255114. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255114>
- Bojic S, Murray A, Bentley BL, Spindler R, Pawlik P, Cordeiro JL, et al. Winter is coming: the future of cryopreservation. *BMC Biol*. 2021;19(1):56. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-00976-8>
- Awan M, Buria I, Fleck R, Fuller B, Goltsev A, Kerby J, et al. Dimethyl sulfoxide: a central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity? *Regenerative medicine*. 2020;15(3):1463-91. <https://doi.org/10.2217/rme-2019-0145>
- Liu X, Pan Y, Liu F, He Y, Zhu Q, Liu Z, et al. A review of the material characteristics, antifreeze mechanisms, and applications of cryoprotectants (CPAs). *Journal of Nanomaterials*. 2021;2:1-14. <https://doi.org/10.1155/2021/9990709>
- Заикина ЕВ, Гончарова АС, Позднякова ВВ, Пандова ОВ, Пржедецкий ЮВ, Воловик ВГ и др. Обзор современных методов криоконсервации различных видов биологического материала. *Современные проблемы науки и образования*. 2022;4:135. Zaikina EV, Goncharova AS, Pozdnyakova VV, Pandova OV, Przhedetskiy YV, Volovik VG, et al. Review of modern methods of cryopreservation of various types of biological material. *Modern problems of science and education*. 2022;4:135 (In Russ.). <https://doi.org/10.17513/spho.31790>
- Тимохина ОВ, Гончаров АЕ. Характеристика криопротекторов, используемых для долговременного хранения донорских дендритных клеток. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2021;3:102-8. Timohina OV, Hancharou AY. Characteristics of cryoprotectors used for long-term storage of donor dendritic cells. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2021;3:102-8 (In Russ.). <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-3-102-108>
- Силюкова ЮЛ, Станишевская ОИ, Плешанов НВ, Курочкин АА. Эффективность использования комбинаций сахаридов в средах для криоконсервации спермы петухов. *Сельскохозяйственная биология*. 2020;55(6):1148-58. Silyukova YI, Stanishevskaya OI, Pleshanov NV, Kurochkin AA. Efficiency of using a combination of mono- and disaccharides in a diluent for freezing rooster semen. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya*. 2020;55(6):1148-58 (In Russ.). <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2020.6.1148rus>
- Jahan S, Kaushal R, Pasha R, Pineault N. Current and Future Perspectives for the Cryopreservation of Cord Blood Stem Cells. *Transfus Med Rev*. 2021;35(2):95-102. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2021.01.003>
- Tas RP, Sampaio-Pinto V, Wennekes T, van Laake LW, Voets IK. From the freezer to the clinic: Antifreeze proteins in the preservation of cells, tissues, and organs. *EMBO Rep*. 2021;22(3):52162. <https://doi.org/10.15252/embr.202052162>
- Whaley D, Damyar K, Witek RP, Mendoza A, Alexander M, Lakey JR. Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. *Cell Transplant*. 2021;30:963689721999617. <https://doi.org/10.1177/0963689721999617>
- Ma J, Zhang X, Cui Z, Zhao M, Zhang L, Qi H. Investigation into antifreeze performances of natural amino acids for novel CPA development. *J Mater Chem B*. 2023;11(18):4042-9. <https://doi.org/10.1039/d3tb00131h>
- Zhong Y, McGrath JK, Gong B. Dipropionates of Sugar Alcohols as Water-Soluble, Nontoxic CPAs for DMSO-Free Cell Cryopreservation. *ACS Biomater Sci Eng*. 2021;7(10):4757-62. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.1c00995>
- Кит ОИ, Гненная НВ, Филиппова СЮ, Чембарова ТВ, Лысенко ИБ, Новикова ИА и др. Криоконсервация гемоцитоцитических стволовых клеток периферической крови в трансплантологии: современное состояние и перспективы. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2023;22(11):3691. Kit Ol, Gnennaya NV, Filippova SYu, Chembarova TV, Lysenko IB, Novikova IA, et al. Cryostorage of peripheral blood hematopoietic stem cells in transplantation: current status and prospects. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2023;22(11):3691 (In Russ.). <https://doi.org/10.15829/1728-8800-2023-3691>
- Dou M, Lu C, Sun Z, Rao W. Natural cryoprotectants combinations of l-proline and trehalose for red blood cells cryopreservation. *Cryobiology*. 2019;91:23-9. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.11.002>
- Craveiro R, Castro V, Vicoso M, Dionísio M, Reis R, Duarte A, et al. Influence of natural deep eutectic systems in water thermal behavior and their applications in cryopreservation. *Journal of Molecular Liquids*. 2021;329:115533. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115533>
- Бордин ДС, Индейкина ЛХ, Винницкая ЕВ, Данилов МА, Сабельникова ЕА. Лактулоза: преимущества и место препарата в клинических рекомендациях. *Эффективная фармакотерапия*. 2023;19(35):42-9. Bordin DS, Indeikina LKh, Vinnitskaya EV, Danilov MA, Sabelnikova EA. Lactulose: The Advantages and Place of the Drug in Clinical Recommendations. *Effective pharmacotherapy*. 2023;19(35):42-9 (In Russ.). <https://doi.org/10.33978/2307-3586-2023-19-35-42-49>
- Ait-Aissa A, Aider M. Lactulose: production and use in functional food, medical and pharmaceutical applications. Practical and critical review. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2014;49(5):1245-53. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12465>
- Рябцева СА, Храмцов АГ, Будкевич РО, Анисимов ГС, Чукло АО, Шпак МА. Физиологические эффекты, механизмы действия и применение лактулозы. *Вопросы питания*. 2020;89(2):5-20. Ryabtseva SA, Khramtsov AG, Budkevich RO, Anisimov GS, Chuklo AO, Shpak MA. Physiological effects, mechanisms of action and application of lactulose. *Voprosy pitaniia*. 2020;89(2):5-20 (In Russ.). <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2020-10012>
- Killer J, Bunešová VN, Modráčková N, Vlková E, Pechar R, Šplíchal I. Lactulose in combination with soybean lecithin has a cryoprotective effect on probiotic taxa of bifidobacteria and Lactobacillaceae. *Lett Appl Microbiol*. 2023;76(2):ovad008. <https://doi.org/10.1093/lambo/ovad008>
- Сидоркевич СВ, Гришина ГВ, Ремизова МИ, Красильщикова ИВ, Юдина ВА, Колесов АА. Влияние отрицательных температур, криопротекторов и криоконсервантов на структурно-функциональное состояние клеток крови. *Трансфузиология*. 2022;4:374-88. Sidorkevich SV, Grishina GV, Remizova MI, Krasilshchikova IV, Yudina VA, Kolesov AA. Influence of negative temperatures, cryoprotectors and cryopreservatives on the structural and

- functional state of blood cells. *Transfusiology*. 2022;4:374-88 (In Russ.).
- EDN: [IKXPOP](#)
21. Dayal R, Beyls E, Vral A, Baeyens A. The Micronucleus Assay on Cryopreserved Whole Blood. *J Vis Exp*. 2024;204. <https://doi.org/10.3791/65855>
22. Blackwell AD, Garcia AR, Keivanfar RL, Bay S. A field method for cryopreservation of whole blood from a finger prick for later analysis with flow cytometry. *Am J Phys Anthropol*. 2021;174(4):670-85. <https://doi.org/10.1002/ajpa.24251>
23. Давыдкин ИЛ, Федорова ОИ, Захарова НО, Селезнев АВ. Компьютерная морфометрия лимфоцитов периферической крови у больных пневмонией различного возраста. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2010;12(7):1737-41.
- Davydkin IL, Fyodorova OI, Zaharova NO, Selezniov AV. Computer morphometry of peripheral blood lymphocytes at patients of different age with pneumonia. *Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*. 2010;12(7):1737-41 (In Russ.).
24. Кирьянова ГЮ, Волкова СД, Касьянов АД, Гришина ГВ, Голованова ИС, Чечеткин АВ. Криоконсервирование эритроцитов при температурах -40°C и -80°C. *Вестник Международной академии холода*. 2017;1:72-8.
- Kiryanova GYu, Volkova SD, Kasyanov AD, Grishina GV, Golovanova IS, Chechetkin AV. Cryopreservation of erythrocytes at -40°C and -80°C. *Bulletin of the International Academy of Cold*. 2017;1:72-8 (In Russ.). <https://doi.org/10.21047/1606-4313-2017-1-72-78>
25. Исаева НВ, Минаева НВ, Утемов СВ, Шерстнев ФС, Зорина НА, Змеева ЮС и др. Жизнеспособность ядрододержащих клеток в лейкоконцентратах на этапах их получения, замораживания и декриоконсервирования. *Бюллетень сибирской медицины*. 2023;22(2):46-52.
- Isaeva NV, Minaeva NV, Utemov SV, Sherstnev PhS, Zorina NA, Zmeeva YuS, et al. Viability of mononuclear cells in leukocyte concentrates at the stages of their preparation, freezing, and thawing. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2023;22(2):46-52 (In Russ.). <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-2-46-52>
26. Ветошкин КА, Утемов СВ, Шерстнев ФС, Князев МГ, Костяев АА. Результаты криоконсервирования донорских тромбоцитных концентратов при низких и ультраз низких температурах. *Трансфузиология*. 2015;2(16):22-7.
- Vetoshkin KA, Utemov SV, Sherstnev PhS, Knyazev MG, Kostyaev AA. Results of donors' blood platelets concentrates cryopreservation at low and ultra-low temperatures. *Transfusiology*. 2015;2(16):22-7 (In Russ.).
- EDN: [VVHTX](#)
27. Власов АА, Андрусенко СФ, Денисова ЕВ, Эльканова АБ, Каданова АА, Мельченко ЕА и др. Морфофункциональное состояние криоконсервированных форменных элементов крови при умеренно низких температурах. *Вестник РГМУ*. 2024;(5).
- Vlasov AA, Andrusenko SF, Denisova EV, Elkanova AB, Kadanova AA, Melchenko EA, et al. Morphofunctional state of cryopreserved blood cells at moderate low temperature. *Bulletin of RGMU*. 2024;(5) (In Russ.). <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2024.038>
28. Широких ИГ, Полежаева ТВ, Широких АА, Худяков АН, Сергушкина МИ, Назарова ЯИ и др. Криозащитные свойства полисахаридсодержащей фракции Hericium erinaceus БП 16. *Известия РАН. Серия биологическая*. 2020;1:5-11.
- Shirokikh IG, Polezhaeva TV, Shirokikh AA, Khudyakov AN, Sergushkina MI, Nazarova JI, et al. Cryoprotective Properties of the Polysaccharide Fraction of the Mushroom Hericium erinaceus BP 16. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences. Biological Series*. 2020;(1):5-11 (In Russ.). <https://doi.org/10.31857/s0002332920010129>
29. Murray A, Kilbride P, Gibson M. Trehalose in cryopreservation. Applications, mechanisms and intracellular delivery opportunities. *RSC Med. Chem*. 2024;15:2980-95. <https://doi.org/10.1039/D4MD00174E>
30. Андрусенко СФ, Власов АА, Рыбчинская ЭЕ, Сорокина УЕ. Криопротектор для цельной крови. Патент Российской Федерации № 2816446; 2024.
- Andrusenko SF, Vlasov AA, Rybchinskaya EE, Sorokina UE. Cryoprotector for whole blood. Patent of the Russian Federation № 2816446; 2024 (In Russ.).

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: А.А. Власов — проведение экспериментов, статистический анализ данных, написание текста рукописи, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации; С.Ф. Андрусенко — планирование экспериментов, написание текста рукописи, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации; О.И. Анфиногенова — анализ и интерпретация данных; А.Б. Эльканова — анализ и интерпретация данных; А.А. Каданова — критический обзор на предмет важного интеллектуального содержания; У.Е. Сорокина — проведение экспериментов; Э.Е. Рыбчинская — проведение экспериментов; Д.А. Доменюк — участие в техническом редактировании рукописи, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

ОБ АВТОРАХ

Власов Александр Александрович, канд. мед. наук
<https://orcid.org/0000-0002-4598-8994>
alecs-aspirini@yandex.ru

Андрусенко Светлана Федоровна, канд. биол. наук, доцент
<https://orcid.org/0000-0002-9588-6902>
svet1677@yandex.ru

Анфиногенова Оксана Ивановна, канд. биол. наук, доцент
<https://orcid.org/0000-0001-6629-5647>
zaxana@bk.ru

Эльканова Айшат Борисовна, канд. мед. наук
<https://orcid.org/0000-0001-8707-515X>
aishat.elkanowa@yandex.ru

Каданова Анна Анатольевна
<https://orcid.org/0000-0003-1517-345X>
varnina82@mail.ru

Сорокина Ульяна Евгеньевна
<https://orcid.org/0009-0000-4336-4021>
ulianasorokina100920@gmail.com

Рыбчинская Эльвира Евгеньевна
<https://orcid.org/0009-0000-0865-2554>
rybchinskaya_elvira@mail.ru

Доменюк Дмитрий Анатольевич, д-р. мед. наук, профессор
<https://orcid.org/0000-0003-4022-5020>
domenyukda@mail.ru



Научно-практический рецензируемый журнал
ФМБА России
extrememedicine.ru