

МЕДИЦИНА ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ СИТУАЦИЙ

Том 27 № 1 / 2025

EXTREMEMEDICINE.RU



ГЛАВНАЯ ТЕМА:

**ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ
КСЕНОБИОТИКОВ И ПРОДУКТОВ
ИХ БИОТРАНСФОРМАЦИИ**



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.

ПЕРЕВОДЧИК 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. Каспранский, 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. Рейнюк, 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. Сидоркевич, 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. Хаитов, д. м. н., профессор, член-корр. РАН (Москва, Россия)
С. М. Юдин, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

А. В. Аклев, 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 (Пятигорск, Россия)
Е. В. Казакевич, д. м. н., профессор (Архангельск, Россия)
В. П. Катунцев, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. А. Климанов, д. ф.-м. н., профессор (Москва, Россия)
Д. В. Клинов, к. ф.-м. н. (Москва, Россия)
И. П. Миннуллин, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)
И. Г. Мосягин, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)

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

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

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

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

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

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

Тираж: 100 экз. Цена свободная

Подписано в печать: 19.03.2025

Дата выхода в свет: 24.03.2025

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

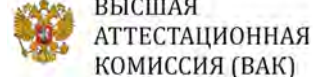
Контент доступен по лицензии Creative Commons Attribution International
CC BY 4.0.

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



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

TRANSLATOR Alexander Biryuzov

COVER DESIGN Elena Kondrateva

EDITORIAL BOARD

Bogomolov AV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Boyko AN, DSc, professor (Moscow, Russia)
Bolekhan 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)

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

Akleev 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)
Katuntsev 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)
Takhauov 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@cspsfmba.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: 19 Mar. 2025

Date of publication: 24 Mar. 2025

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



ГЛАВНАЯ ТЕМА: ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ КСЕНОБИОТИКОВ И ПРОДУКТОВ ИХ БИОТРАНСФОРМАЦИИ

Анализ факторов, влияющих на процессы апоптоза в периоде отдаленных последствий тяжелых острых отравлений нейротропными токсикантами

Е.Б. Шустов, М.В. Мельникова, К.В. Мастерова, В.Ф. Остров, Е.А. Золотоверхая, Л.Г. Кубарская, К.О. Танаянц, А.А. Козлов, Ю.О. Соколова, П.К. Потапов

Физико-химические критерии оценки опасности ЦНС-активных ксенобиотиков

Д.В. Криворотов, А.И. Николаев, А.С. Радилов, В.Р. Рембовский, В.А. Кузнецов

Новая one-pot методика получения потенциальных метаболитов индапамида путем окисления-конъюгации на МАЛДИ-мишени

О.А. Кельсиева, А.А. Афанасьева, С.К. Ильюшонок, А.С. Гладчук, А.Н. Арсеньев, А.С. Фролов, В.Н. Бабаков, К.А. Краснов, Е.П. Подольская

КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ**Теплоотдача испарением определяет знак влияния назального феназепама на тепловой стресс у крыс**

Ю.Ю. Ивницкий, О.А. Вакуненко, К.А. Краснов, С.С. Гафт, Н.В. Лапина

НЕВРОЛОГИЯ И ПСИХИАТРИЯ**Иммунный ответ на вирус Эпштейна-Барр как этиологический фактор и терапевтическая мишень при рассеянном склерозе**

В.С. Роговский, А.Д. Кукушкина, А.Н. Бойко

Лабораторные маркеры эндотелиальной деструкции и активации гемостаза у пациентов с инсультом и COVID-19

О.В. Лянг, М.А. Солдатов, Л.В. Климов, Т.В. Киселева, Н.А. Марская, Н.А. Шамалов

Шизофрения и нейровоспаление: патогенетические и терапевтические аспекты

Д.А. Чугунов, А.А. Шмилович, Д.В. Николаева, Т.В. Яшина, М.Р. Ларина, В.С. Роговский, А.А. Свиридова

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ**Сравнительный анализ нанопоровых секвенаторов MinION и Нанопорус в задаче идентификации нуклеиновых кислот патогенов**

Д.А. Григорян, И.Ф. Стеценко, Б.С. Гуков, А.Д. Мацвай, Г.А. Шипулин

ОНКОЛОГИЯ**Разработка и оценка набора реагентов для количественного определения уровня экспрессии мРНК химерного гена *BCR::ABL1***

М.А. Авдонина, Н.Г. Кукулина, А.А. Главатская, В.К. Дмитриев, А.С. Чегодарь, А.М. Данишевич, Н.А. Бодунова, И.С. Абрамов, Г.А. Шипулин

MAIN TOPIC: STUDY OF TOXIC EFFECTS OF XENOBIOTICS AND THEIR BIOTRANSFORMATION PRODUCTS**5 Analysis of factors influencing apoptotic processes during formation of long-term health effects of severe acute poisoning with neurotropic toxicants**

E.B. Shustov, M.V. Melnikova, K.V. Masterova, V.F. Ostrov, E.A. Zolotoverkhaja, L.G. Kubarskaya, K.O. Tanayants, A.A. Kozlov, Yu.O. Sokolova, P.K. Potapov

15 Physical and chemical criteria for hazard assessment of CNS-active xenobiotics

D.V. Krivorotov, A.I. Nikolaev, A.S. Radilov, V.R. Rembovsky, V.A. Kuznetsov

26 A new one-pot technique for obtaining potential indapamide metabolites by oxidation and conjugation on MALDI target

O.A. Keltseva, A.A. Afanasyeva, S.K. Ilyushonok, A.S. Gladchuk, A.N. Arseniev, A.S. Frolov, V.N. Babakov, K.A. Krasnov, E.P. Podolskaya

CLINICAL PHARMACOLOGY**37 Heat transfer by evaporation determines the effect of nasal phenazepam on thermal stress in rats**

Ju.Ju. Ivnitsky, O.A. Vakunenkova, K.A. Krasnov, S.S. Gaft, N.V. Lapina

NEUROLOGY & PSYCHIATRY**43 Immune response against Epstein-Barr virus as an etiologic factor and therapeutic target for multiple sclerosis**

V.S. Rogovskii, A.D. Kukushkina, A.N. Boyko

50 Laboratory markers of endothelial destruction and hemostasis activation in patients with acute cerebrovascular accident and COVID-19

O.V. Lyang, M.A. Soldatov, L.V. Klimov, T.V. Kiseleva, N.A. Marskaya, N.A. Shamalov

56 Schizophrenia and neuroinflammation: Pathogenetic and therapeutic aspects

D.A. Chugunov, A.A. Shmilovich, D.V. Nikolaeva, T.V. Yashina, M.R. Larina, V.S. Rogovsky, A.A. Sviridova

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY**64 Comparative evaluation of MinION and Nanopore nanopore sequencers in identification of pathogen nucleic acids**

D.A. Grigoryan, I.F. Stetsenko, B.S. Gukov, A.D. Matsvay, G.A. Shipulin

ONCOLOGY**74 Development and evaluation of a reagent set for quantitation of mRNA expression level of chimeric *BCR::ABL1* gene**

M.A. Avdonina, N.G. Kuklina, A.A. Glavatskaya, V.K. Dmitriev, A.S. Chegodar, A.M. Danishevich, N.A. Bodunova, I.S. Abramov, G.A. Shipulin

Изучение мутационного профиля больных Rh-негативными миелопролиферативными новообразованиями методом NGS

А.Н. Кириенко, Е.В. Мотыко, Е.В. Ефремова, Д.В. Кустова, Т.Н. Герт, И.В. Лепянен, В.А. Шуваев, И.С. Мартынкевич

РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА**Биосовместимые гели на основе хитозана и крахмала в качестве чернил для 3D-печати**

Е.А. Малик, Ю.А. Нащечкина, И.А. Барсук, К.П. Головкин, В.Е. Александров, В.Ю. Елоховский, В.Е. Юдин

Определение состава протеогликанов, синтезируемых *in vitro* хондроцитами различного генеза

П.А. Голубинская, Е.С. Ручко, А.С. Пикина, И.П. Смирнов, Т.В. Владимирова, В.Д. Гордеева, Г.П. Арапиди, А.В. Еремеев

КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА**Люминесцентная иммунохроматография на основе комплексных соединений Eu^{3+} для выявления патогенных микроорганизмов и бактериальных токсинов**

С.П. Ярков, С.И. Третьяков, И.В. Шиленко, Е.К. Шаулина, А. Мандажи, Д.А. Зенков, Ю.Н. Ишков, К.К. Стяжкин

СПОРТИВНАЯ МЕДИЦИНА**Эффективность консервативных методов лечения плантарного фасциита у спортсменов**

А.В. Сливин, В.В. Кармазин, К.А. Шлыков, С.А. Парастаев

КОСМИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА**Регионарный кожный кровоток у здоровых обследуемых в условиях 21-суточной антиортостатической гипокинезии**

Д.В. Пашкова, Ю.А. Попова, А.А. Федорович, А.В. Шпаков

ХИРУРГИЯ**Лапароскопический доступ для лечения заболеваний репродуктивной системы женщин при выраженном спаечном процессе**

Е.А. Соловьева, О.С. Филиппов, А.П. Урюпина, Н.А. Чугунова, Д.А. Иванова, А.М. Уткина

80 NGS analysis of the mutational profile of patients with Ph-negative myeloproliferative neoplasms

A.N. Kirienko, E.V. Motyko, E.V. Efremova, D.V. Kustova, T.N. Gert, I.V. Leppyanen, V.A. Shuvaev, I.S. Martynkevich

REGENERATIVE MEDICINE**88 Biocompatible chitosan- and starch-based gels for 3D printable inks**

E.A. Malik, Yu.A. Nashchekina, I.A. Barsuk, K.P. Golovko, V.N. Alexandrov, V.Y. Elokhevskiy, V.E. Yudin

97 Composition analysis of proteoglycans synthesized *in vitro* by chondrocytes of various origins

P.A. Golubinskaya, E.S. Ruchko, A.S. Pikina, I.P. Smirnov, T.V. Vladimirova, V.D. Gordeeva, G.P. Arapidi, A.V. Eremeev

CLINICAL LABORATORY DIAGNOSTICS**107 Luminescent immunochromatography based on Eu^{3+} coordination compounds for detection of pathogenic microorganisms and bacterial toxins**

S.P. Yarkov, S.I. Tretyakov, I.V. Shilenko, E.K. Shaulina, A. Mandaji, D.A. Zenkov, Yu.N. Ishkov, K.K. Styazhkin

SPORTS MEDICINE**115 Effectiveness of conservative methods for plantar fasciitis treatment in athletes**

A.V. Slivin, V.V. Karmazin, K.A. Shlykov, S.A. Parastaev

SPACE MEDICINE**124 Regional cutaneous blood flow in healthy subjects under conditions of 21-day head-down bed rest**

D.V. Pashkova, Ju.A. Popova, A.A. Fedorovich, A.V. Shpakov

SURGERY**131 Laparoscopic access in treatment of reproductive system diseases in women with multiple adhesions**

E.A. Soloveva, O.S. Filippov, A.P. Uryupina, N.A. Chugunova, D.A. Ivanova, A.M. Utkina

<https://doi.org/10.47183/mes.2024-247>

УДК 616-099:616-018:616-092.9



АНАЛИЗ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ПРОЦЕССЫ АПОПТОЗА В ПЕРИОДЕ ОТДАЛЕННЫХ ПОСЛЕДСТВИЙ ТЯЖЕЛЫХ ОСТРЫХ ОТРАВЛЕНИЙ НЕЙРОТРОПНЫМИ ТОКСИКАНТАМИ

Е.Б. Шустов¹✉, М.В. Мельникова¹, К.В. Мастерова¹, В.Ф. Остров¹, Е.А. Золотоверхая¹, Л.Г. Кубарская¹, К.О. Танаянц¹, А.А. Козлов¹, Ю.О. Соколова¹, П.К. Потапов^{1,2}

¹ Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

² Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Поражение нервной системы при действии нейротоксикантов характеризуется различными морфологическими изменениями, проявляющимися в основном дистрофическими и некротическими процессами. Ключевыми механизмами патогенеза постинтоксикационной астении, определяющимися спецификой токсиканта, являются активация апоптоза, нарушение трофики, активация перекисного окисления липидов (ПОЛ), недостаточность нейропептидного звена регуляции, нарушения ликвородинамики.

Цель. Количественная оценка вклада процессов апоптоза, оксидативного стресса и нейротрофиновой регуляции в формировании отдаленных последствий тяжелых острых отравлений нейротропными токсикантами.

Материалы и методы. Экспериментальное исследование выполнено на крысах-самцах. В качестве токсикантов использовались: фенилкарбамат (1,6 мг/кг м.т.), метанол (11,5 г/кг м.т.), ацетат свинца (300 мг/кг м.т.). Период формирования отдаленных последствий составил 30 суток. Уровень апоптоза нейронов височной коры головного мозга определяли методом TUNEL. Определение нейроспецифических белков в плазме крови осуществлялось ИФА-методом. Определение показателей ПОЛ и антиоксидантной системы проводили стандартными биохимическими методами.

Результаты. Воздействие веществ вызывало признаки токсического действия у крыс на 1–2-е сутки, причем у фенилкарбамата с максимальной выраженностью в первые, а у метанола и ацетата свинца — на вторые. К 5–7-м суткам у выживших животных (независимо от токсиканта) состояние нормализовалось. На 30-е сутки были выявлены нарушения, совокупность которых позволила разделить выживших животных на подгруппы по уровню сформированности функциональных признаков отдаленных последствий острых отравлений.

Выводы. Показано, что формирование отдаленных последствий тяжелых острых отравлений для исследуемых нейротоксикантов связано с повышением количества TUNEL-позитивных нейронов и снижением концентрации белка S100 в сыворотке. Процессы ПОЛ в тканях мозга в указанные сроки не играли существенной роли в активации апоптоза.

Ключевые слова: психоорганический синдром; антиоксидантная система; апоптоз; нейроспецифические белки; нейротоксиканты; отдаленные последствия отравлений; перекисное окисление липидов

Для цитирования: Шустов Е.Б., Мельникова М.В., Мастерова К.В., Остров В.Ф., Золотоверхая Е.А., Кубарская Л.Г., Танаянц К.О., Козлов А.А., Соколова Ю.О., Потапов П.К. Анализ факторов, влияющих на процессы апоптоза в периоде отдаленных последствий тяжелых острых отравлений нейротропными токсикантами. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2025;27(1):5–14. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-247>

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено комиссией по биоэтике ФГБУ «НКЦТ им. С.Н. Голикова» ФМБА России (протокол № 4/24 от 04.04.2024).

Финансирование: работа была выполнена в рамках Государственного задания Федерального медико-биологического агентства № 388-00071-24-00 (код темы 64.004.24.800).

Потенциальный конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

✉ Шустов Евгений Борисович shustov-msk@mail.ru

Статья поступила: 10.10.2024 После доработки: 16.12.2024 Принята к публикации: 20.12.2024 Online first: 13.02.2025

ANALYSIS OF FACTORS INFLUENCING APOPTOTIC PROCESSES DURING FORMATION OF LONG-TERM HEALTH EFFECTS OF SEVERE ACUTE POISONING WITH NEUROTROPIC TOXICANTS

Evgeny B. Shustov¹✉, Margarita V. Melnikova¹, Kristina V. Masterova¹, Vladimir F. Ostrov¹, Ekaterina A. Zolotoverkhaja¹, Larisa G. Kubarskaya¹, Ksenia O. Tanayants¹, Alexander A. Kozlov¹, Yulia O. Sokolova¹, Petr K. Potapov^{1,2}

¹ Golikov Research Center of Toxicology, St. Petersburg, Russia

² Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia

Background. The nervous system damage caused by neurotoxicants is characterized by various morphological changes, manifested mainly by dystrophic and necrotic processes. The key mechanisms of post-intoxication asthenia pathogenesis, determined by the specifics of the toxicant, involve activation of apoptosis, trophic disorder, lipid peroxidation (LPO), neuropeptide regulatory insufficiency, as well as cerebrospinal fluid dynamics disorders.

Objective. Quantification of the contribution of apoptosis, oxidative stress, and neurotrophin regulation processes to the formation of long-term health consequences of severe acute poisoning with neurotropic toxicants.

Material and methods. Experimental studies were performed in male rats. The following toxicants were used: phenylcarbamate (1.6 mg/kg bw), methanol (11.5 g/kg bw), lead acetate (300 mg/kg bw). The period of formation of long-term health effects was 30 days. The level of apoptosis of the brain temporal cortex neurons was evaluated by the TUNEL method. The identification of blood plasma neurospecific proteins was carried out by the ELISA method. Evaluation of LPO and antioxidant system was carried out by standard biochemical methods.

Results. Exposure to the substances caused the signs of toxic effects in rats on days 1–2. The maximum severity of poisoning with phenylcarbamate was on the first day, while the maximum severity of poisoning with methanol and lead acetate was manifested on the second day. By days 5–7, the survived animals showed a normalization in the status regardless of the toxicant. On day 30, violations were detected, the totality of which allowed the survived animals to be divided into subgroups according to the manifestation of functional signs of long-term health effects of acute poisoning.

© Е.Б. Шустов, М.В. Мельникова, К.В. Мастерова, В.Ф. Остров, Е.А. Золотоверхая, Л.Г. Кубарская, К.О. Танаянц, А.А. Козлов, Ю.О. Соколова, П.К. Потапов, 2024

Conclusions. The formation of long-term health effects of severe acute poisoning with the studied neurotoxicants was shown to be associated with an increase in the number of TUNEL positive neurons and a decrease in the S100 protein serum concentration. Lipid peroxidation in brain tissues during the specified period did not play a significant role in apoptosis activation.

Keywords: psychoorganic syndrome; antioxidant system; apoptosis; neuron-specific proteins; neurotoxicants, late effect of intoxication; lipid peroxidation

For citation: Shustov E.B., Melnikova M.V., Masterova K.V., Ostrov V.F., Zolotoverkhaja E.A., Kubarskaya L.G., Tanayants K.O., Kozlov A.A., Sokolova Yu.O., Potapov P.K. Analysis of factors influencing apoptotic processes during formation of long-term health effects of severe acute poisoning with neurotropic toxicants. *Extreme Medicine*. 2025;27(1):5–14. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-247>

Funding: the research was carried out within the state assignment of Russia's Federal Medical and Biological Agency No. 388-00071-24-00 (code 64.004.24.800).

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Golikov Research Clinical Center of Toxicology Bioethics Committee (protocol No. 4/24 dated 4 Apr. 2024).

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

✉ Evgeniy B. Shustov shustov-msk@mail.ru

Received: 10 Oct. 2024 **Revised:** 16 Dec. 2024 **Accepted:** 20 Dec. 2024 **Online first:** 13 Feb. 2025

ВВЕДЕНИЕ

Отдаленный период после тяжелых острых отравлений нейротропными токсикантами характеризуется развитием преимущественно неспецифических проявлений психоорганического синдрома, постинтоксикационной и цереброгенной астенией, токсическими полинейропатиями. Токсическое поражение нервной системы, как и других тканей организма, имеет различные морфологические изменения на клеточном и тканевом уровнях и проявляется в основном дистрофическими и некротическими процессами [1, 2]. Применение световой микроскопии позволяет установить наличие апоптоза нейронов, которое является следствием большинства токсических поражений нервной системы [3]. Для токсического повреждения ткани головного мозга наиболее характерны мелкие очаги некроза, часто электролитного, при котором повреждаются только отдельные элементы ткани (часть из них сохраняется); такие очаги проявляются разрежением нейрона и глиопенией. Морфологической основой психоорганического синдрома при нейроинтоксикациях является гибель нейронов и глиальных клеток, связанная как с прямым токсическим действием ксенобиотиков, так и с индукцией процессов апоптоза [4]. Ключевыми механизмами патогенеза постинтоксикационной астении, определяющимися спецификой токсиканта, являются активация апоптоза, нарушение трофики, активация перекисного окисления липидов (ПОЛ), недостаточность нейропептидного звена регуляции, нарушения ликвородинамики. Токсические нейропатии проявляются сегментарной демиелинизацией (токсической миелопатией) и аксональной дегенерацией (токсической дистальной аксонопатией).

К неспецифическим механизмам токсического действия, характерным для всех нейротропных ксенобиотиков, могут быть отнесены: угнетение активности ферментов за счет блокады сульфгидрильных, карбоксильных, амино- и других функционально активных структурных групп в составе пептидов и белков; формирование оксидативного стресса с последующей активацией процессов ПОЛ¹; угнетение митохондрий; нарушение гомеостаза кальция; эксайтотоксичность; экспрессия провоспалительных цитокинов, индукция воспалительных процессов в нервной ткани; гаптенная модификация белков

с приобретением ими антигенных свойств с индукцией аутоиммунных механизмов повреждения; угнетение высвобождения нейротрофинов, нейрогенеза и глиогенеза в сочетании с подавлением пролиферации и дифференциации новых нейронов и глиоцитов; усиление проницаемости гематоэнцефалического барьера; усиление процессов апоптоза клеток центральной и периферической нервной системы² [5–8].

В настоящее время актуальным и приоритетным является более углубленное исследование отдаленных последствий тяжелых острых отравлений нейротропными токсикантами.

Цель исследования — количественная оценка вклада процессов апоптоза, оксидативного стресса и нейротрофиновой регуляции в формировании отдаленных последствий тяжелых острых отравлений нейротропными токсикантами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальное исследование выполнено на 53 крысах-самцах аутбредной линии с массой тела на начало исследования 180–220 г, поступивших из НИЦ «Курчатовский институт» — питомник «Раполово», Ленинградская область.

Моделирование отдаленных последствий проводили путем однократного введения нейротропных токсикантов лабораторным животным в дозе ЛД₅₀. Период формирования отдаленных последствий составлял 30 суток. В качестве токсикантов были использованы:

- фенилкарбамат — обратимый ингибитор ацетилхолинэстеразы, синтезированный в лаборатории синтеза лекарственных препаратов Научно-клинического центра токсикологии имени академика С.Н. Голикова [9];
- метанол (АО «Вектон», Россия) — органический растворитель, реализующий свое токсическое действие за счет повреждения клеточных мембран;
- ацетат свинца (ООО АО «Реахим», Россия) — органическая соль тяжелого металла, подавляющая активность различных ферментов.

Лабораторные животные были распределены на 4 группы:

группа 1 — «Контроль» К ($n = 8$), проведено внутрижелудочное введение 0,5 мл физиологического раствора;

¹ МР ФМБА России. 12.08-2021. Клиника, диагностика и лечение хронических отравлений (воздействий) веществами нейротоксического действия. 2021.

² Бадалян А.В., Белова М.В., Брусин К.М. и др. Медицинская токсикология: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014.

группа 2 — «Фенилкарбамат» (ФК) ($n = 15$), проведено внутрибрюшинное введение в виде 0,1% водного раствора в дозе 1,6 мг/кг м.т.;

группа 3 — «Метанол» (М) ($n = 15$), проведено внутрибрюшинное введение в виде 75% водного раствора в дозе 11,5 г/кг м.т.;

группа 4 — «Ацетат свинца» (АС) ($n = 15$), проведено внутрибрюшинное введение в виде 5% водного раствора в дозе 300 мг/кг м.т.

Выявленные в результате наблюдения признаки токсического действия оценивали в баллах в соответствии со шкалой признаков интоксикации [10]. Ежедневно определяли динамику массы тела животных, потребление ими корма и воды.

Для оценки формирования фазы отдаленных последствий токсического действия на 7, 15, 21 и 28-е сутки проводили нейрофизиологическое тестирование животных в тестах «Открытое поле» («VideoMot 2», TSE, Германия), «Вращающийся стержень» («Rota-Rod Treadmills for rats 7700-7750», Ugo Basile, Италия), «Сила хвата» («Gripstrengthmeter 303500 series, TSE, Германия), «Исследование сенсорных реакций» («Startle Response System», TSE, Германия), «Оценка условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ)» (PACS-30, Columbus Instruments, США).

На 28-й день исследования у выживших животных ($n = 32$) осуществляли забор образцов крови и тканей головного мозга для последующего исследования.

Определение нейроспецифических белков (нейроспецифическая енолаза NSE, нейротрофический фактор мозга BDNF, основной белок миелина MBP и кальций-связывающий белок S100) в плазме крови животных осуществляли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов (Cloud-Clone Corp, США) согласно инструкции производителя. Показатели перекисного окисления липидов (диеновые конъюгаты (ДК), малоновый диальдегид (МДА)); антиоксидантной системы (АОС) (восстановленный глутатион (ВГ), активность глутатионтрансферазы (ГТ), глутатионпероксидазы (ГП), супероксиддисмутазы (СОД)), а также маркера энергетического обмена (активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ)) определяли в гомогенате ткани мозга, как описано ранее [11].

Оценку активности процессов апоптоза осуществляли путем определения количества TUNEL-позитивных (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) клеток в височной коре крыс. Выбор этого участка коры был обусловлен особенностями ее цитоархитектоники (высокая плотность нейронов, радиальное расхождение корковых колонок, наличие интернейронов 8 типов и проекций от слухового, статокинетического, вкусового и обонятельного анализаторов, таламуса, высокая их чувствительность к гипоксии, частые дисплазии и способность к эпипептогенезу). Подсчет апоптотических TUNEL-клеток проводился на 4–5 срезах исследуемой области головного мозга. Был использован коммерческий набор Elabscience® E-CK-A320 «Набор для изучения апоптоза TUNEL In Situ (Green, FITC), One-step TUNEL In Situ Apoptosis Kit». Изображения срезов головного мозга были получены с помощью микроскопа Nikon Eclipse 80i с цветной камерой Nikon DS-Fi1c при увеличении $\times 100$ для анализа и $\times 200$ для фотоматериалов в разрешении 1280 $\times$ 960 пикселей программой NIS-Elements AR 4.20.00. Подсчет апоптотических TUNEL-клеток проводился на 4–5 срезах исследуемой области головного мозга каждого животного.

Статистическая обработка полученных экспериментальных данных осуществлялась в процессоре электронных таблиц MS EXCEL с использованием пакета прикладных программ «Анализ данных» и специализированной программы статистического анализа Statistica v.10. Применялись методы частотного, дисперсионного, факторного и корреляционного анализов. Достоверность различий между группами оценивали с использованием рангового критерия Уайта, критерия метода точной вероятности Фишера для частотного анализа; F -критерия дисперсионного анализа ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наблюдение за животными в острый интоксикационный период показало, что признаки токсического действия (по сумме баллов, характеризующих особенности внешнего вида, мышечного тонуса, двигательной активности и реакции на взятие на руки) выявлены на 1–2-е сутки с быстрой нормализацией состояния к 5–7-м суткам у выживших животных (рис. 1).

В клинической картине острой интоксикации фенилкарбаматом преобладали признаки судорог и атаксии, при отравлении метанолом — снижение мышечного тонуса и двигательной активности, нарушения координации движений и позы, снижение чувствительности и рефлексов, при интоксикации ацетатом свинца — энтеропатогенный симптомокомплекс, раздражение брюшины, нарушения двигательной активности и дыхания. При этом для разных токсикантов была характерна разная скорость нарастания и снижения симптомов интоксикации (максимально быстрое и более выраженное проявление интоксикации, интенсивное снижение — для фенилкарбамата, более медленное снижение — для метанола). Для ацетата свинца было характерно более медленное нарастание симптомов отравления, что связано с особенностями его всасывания в организме.

В ходе динамического наблюдения у животных не были выявлены статистически значимые различия между контрольной группой и группами выживших после острой интоксикации животных по таким показателям, как масса тела, потребление корма, сила хвата лап, время удержания на вращающемся стержне, а также по отдельным показателям использованных нейрофизиологических методик (локомоторная активность, эмоциональная лабильность, агрессивность, груминг в тесте открытого поля; локомоторная активность и пребывание

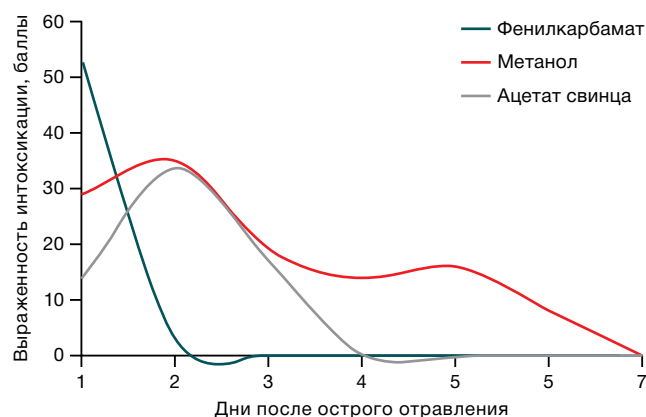


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 1. Динамика тяжести интоксикации после введения LD_{50} токсикантов

в освещенном секторе при проведении теста УРПИ; показатели рефлекторного ответа на резкий звук и характеристики латентностей в тесте Startle Response System), в связи с чем они не были отражены в последующих таблицах и рисунках.

На 30 сут исследования были выявлены признаки нарушений водно-пищевого поведения, воспроизведения УРПИ, координации движений, торможения в полисинаптических рефлекторных цепях, истощения активационных влияний (табл. 1), совокупность которых позволила разделить выживших после отравления животных на подгруппы по уровню сформированности функциональных признаков отдаленных последствий острых отравлений.

Данные таблицы 1 свидетельствуют, что в ранние сроки после острой интоксикации (7 сут) отмечали статистически значимое повышение объема потребления воды у животных, получивших фенилкарбамат и метанол, что необходимо для снижения концентрации токсиканта и ускорения его выведения из организма.

Вместе с тем отмечено снижение поисково-исследовательской активности у крыс-самцов в группе

воздействия метанола, $2,8 \pm 0,7$ ед. против $9,2 \pm 1,7$ ед. у контрольных животных, что является проявлением прямого токсического действия вещества.

Также было зарегистрировано нарушение воспроизведения выработанных условных рефлексов в тесте УРПИ, постстрессорный эффект у животных из группы фенилкарбамата, 33 ± 13 с против 4 ± 3 с в группе контроля; укорочение длительности реакции на вспышку света, 7 ± 1 мс против 13 ± 3 мс в группе контроля. В ходе работы в группе животных, получавших метанол, отмечали снижение амплитуды реакции в ответ на электрический стимул, 46 ± 15 ед., по сравнению с животными из контрольной группы, 224 ± 46 ед. Указанные признаки соответствуют пролонгированному периоду картины острой интоксикации.

В последующие сроки выраженность подобных изменений в основном нивелировалась. В конечной точке исследований (28-е сутки) у животных из группы ФК сохранялись повышенное потребление воды и нарушения воспроизведения условного рефлекса, отмечавшиеся на ранних сроках после интоксикации.

Таблица 1. Динамика нейрофизиологических показателей в постинтоксикационный период

Показатель, тест	Группа	Дни после интоксикации			
		7	15	21	28
Потребление воды, мл/сутки ¹	Контроль	26,9	25,6	27,5	28,1
	Фенилкарбамат	32,8*	32,2	33,3*	36,8*
	Метанол	32,0*	35,5*	21,1	20,0*
	Ацетат свинца	24,0	23,0	21,1	20,0*
Поисково-исследовательская активность, ед.	Контроль	$9,2 \pm 1,7$	$8,9 \pm 1,6$	$6,0 \pm 1,5$	$4,9 \pm 1,0$
	Фенилкарбамат	$11,4 \pm 1,1$	$10,2 \pm 1,2$	$6,2 \pm 1,3$	$5,6 \pm 1,3$
	Метанол	$2,8 \pm 0,7^*$	$3,1 \pm 0,8^*$	$4,5 \pm 0,4$	$4,9 \pm 1,0$
	Ацетат свинца	$14,6 \pm 0,9$	$12,4 \pm 2,0$	$8,2 \pm 2,0$	$9,2 \pm 1,2^*$
Длительность пребывания в темной камере, с	Контроль	29 ± 15	—	—	4 ± 3
	Фенилкарбамат	$75 \pm 11^*$	—	—	$33 \pm 13^*$
	Метанол	35 ± 14	—	—	24 ± 13
	Ацетат свинца	35 ± 23	—	—	$40 \pm 2,5^*$
Тредбан, доля выполнивших тест, %	Контроль	100	100	100	100
	Фенилкарбамат	89	100	78	33
	Метанол	100	0*	44	44
	Ацетат свинца	100	30	70	0*
Реакция на звук, амплитуда, ед.	Контроль	76 ± 34	123 ± 63	—	247 ± 113
	Фенилкарбамат	153 ± 72	271 ± 135	—	303 ± 134
	Метанол	61 ± 39	248 ± 33	—	159 ± 59
	Ацетат свинца	76 ± 31	112 ± 58	—	79 ± 25
Реакция на свет, длительность, мс	Контроль	13 ± 3	9 ± 2	—	15 ± 2
	Фенилкарбамат	14 ± 2	9 ± 4	—	16 ± 2
	Метанол	$7 \pm 1^*$	9 ± 1	—	$21 \pm 2^*$
	Ацетат свинца	20 ± 5	9 ± 4	—	$31 \pm 2^*$
Реакция на электрический стимул, амплитуда, ед.	Контроль	224 ± 46	293 ± 111	—	618 ± 80
	Фенилкарбамат	283 ± 67	358 ± 78	—	537 ± 145
	Метанол	$46 \pm 15^*$	337 ± 60	—	$315 \pm 63^*$
	Ацетат свинца	202 ± 70	360 ± 140	—	$221 \pm 74^*$

Таблица подготовлена авторами по собственным данным

Примечание: данные представлены в формате среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$); показатель «потребление воды» представлен в виде среднegrupпового значения; «—» — не исследовались; статистически значимые различия с группой контрольных животных: * $p < 0,05$; * $p < 0,01$; * $p < 0,001$.

У животных после воздействия метанола к 21-м суткам после первоначального увеличения потребления воды произошло снижение данного показателя. Наряду с этим отмеченное на ранних сроках увеличение длительности реакции на вспышку света и снижение амплитуды ответа на электрический стимул нивелировалось к концу эксперимента.

В группе животных, выживших после отравления ацетатом свинца, снижение потребления воды отмечали весь период наблюдения с нарастанием показателя к 28-м суткам, также зафиксированы нарушения воспроизведения условных рефлексов, реакций на свет (31 ± 2 мс против 15 ± 2 мс в контроле) и звук, причем более существенные, чем выявленные у крыс при воздействии метанолом. Кроме того, для этих животных оказалось невозможным выполнение теста бега на тредбане, а в тесте открытого поля у животных отмечалась некоторая суетливость, сопровождающаяся повышением поисково-исследовательской активности.

Анализ обнаруженной динамики признаков токсического действия и нейрофизиологических показателей позволил выявить признаки, чувствительные к формированию отдаленных последствий острых отравлений. К ним относятся следующие: нарушение водно-пищевое поведения и его эндокринной регуляции (снижение потребления воды), нарушение воспроизведения условных рефлексов, повышенная чувствительность к стрессу (время пребывания в темной камере в тесте УРПИ), невозможность выполнения теста бега на тредбане на высокой скорости движения ленты, торможение в полисинаптических путях (высокая длительность реакции на свет в тесте TSE Startle Response System) и недостаточность (истощение) активационных влияний (низкая амплитуда реакции на электрический стимул в тесте TSE Startle Response System). В совокупности эти признаки позволили на основе балльной системы оценки получить интегральную количественную величину уровня сформированности отдаленных последствий.

Отмечены отдельные сдвиги в исследуемых показателях метаболизма головного мозга, соответствующие данные представлены в таблице 2.

Анализ данных, представленных в таблице 2, показывает, что на 28-е сутки после отравления (период формирования отдаленных последствий острых отравлений) под влиянием острой интоксикации фенилкарбаматом

у выживших животных отмечается умеренное снижение белка S100 на 30% ($p \leq 0,05$).

В группе животных с отравлением метанолом отмечено статистически достоверное повышение активности СОД на 90% и Г-6-ФДГ на 37%, а также статистическая тенденция к снижению активности на 27% белка S100 при повышении активности ферментов антиоксидантной защиты (глутатионтрансферазы и глутатионпероксидазы на 20–21%), что может отражать компенсаторные процессы в ткани мозга в постинтоксикационном периоде.

После острой интоксикации ацетатом свинца у выживших животных на 28-е сутки наблюдалась статистическая тенденция к повышению маркера нейронального повреждения NSE на 94% и увеличение в 3 раза концентрации конечных продуктов ПОЛ диеновых конъюгатов при снижении активности глутатионтрансферазы на 10%, что отражает проявления нейротоксичности этого соединения. В то же время отмечается и более выраженное, по сравнению с другими токсикантами, статистически достоверное снижение активности на 46% белка S100 и основного белка миелина на 23%, повышение активности нейротрофического фактора мозга BDNF на 42%, а также умеренное повышение активности Г-6-ФДГ на 18%, что отражает высокую активность компенсаторно-приспособительных биохимических механизмов в этом периоде.

Необходимо отметить, что нейроспецифические белки, определяемые в сыворотке крови через 30 суток после острого отравления, оказались малоинформативными для выявления и оценки выраженности отдаленных последствий интоксикаций. Только для ацетата свинца были обнаружены метаболические признаки повреждения нейронов и, вероятно, повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера. Важным является тот факт, что для ацетата свинца типичным является и активация процессов ПОЛ на фоне снижения активности ферментативного звена антиоксидантной системы. Вероятно, эти данные могут быть соотнесены с известной для тяжелых металлов способностью угнетать ферментативную активность широкого круга ферментов за счет связывания с тиоловыми группами в активном центре.

Микрофотографии срезов височной коры головного мозга крыс для оценки влияния токсикантов на процессы апоптоза нейронов представлены на рисунке 2.

Таблица 2. Показатели метаболизма головного мозга выживших животных на 28-е сутки после острого отравления нейротоксикантами

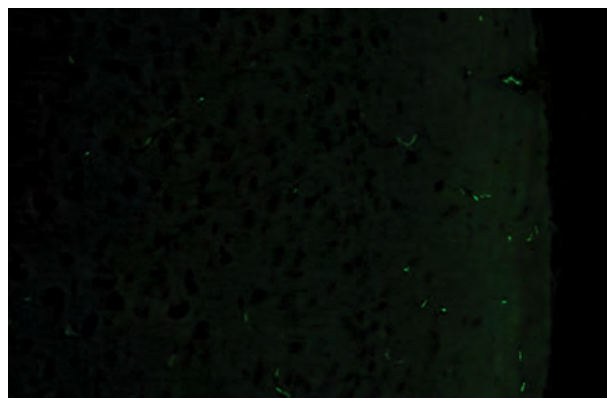
Показатель, ед. измерения	Контрольная ($n = 8$)	Фенилкарбамат ($n = 9$)	Метанол ($n = 10$)	Ацетат свинца ($n = 5$)
NSE, нг/мл	$0,71 \pm 0,11$	$0,65 \pm 0,07$	$0,99 \pm 0,17$	$1,38 \pm 0,39^*$
BDNF, нг/мл	$1,22 \pm 0,12$	$1,15 \pm 0,04$	$1,30 \pm 0,09$	$1,73 \pm 0,11^*$
MBP, нг/мл	$0,06 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$
S100, нг/мл	$0,120 \pm 0,011$	$0,084 \pm 0,007^*$	$0,087 \pm 0,012$	$0,064 \pm 0,006^*$
ВГ, ммоль/л	$2,00 \pm 0,05$	$1,95 \pm 0,04$	$1,91 \pm 0,04$	$1,94 \pm 0,05$
МДА, ммоль/л	$19,1 \pm 1,7$	$19,2 \pm 0,9$	$22,8 \pm 2,3$	$18,9 \pm 1,0$
ДК, ммоль/л	$65,3 \pm 1,6$	$98,7 \pm 36,0$	$126,7 \pm 52,9$	$197,2 \pm 80,6$
ГТ, Ед/г белка	$62,7 \pm 1,2$	$57,8 \pm 3,5$	$75,2 \pm 6,0$	$56,2 \pm 1,2$
ГП, Ед/г белка	$1,45 \pm 0,03$	$1,42 \pm 0,08$	$1,76 \pm 0,16$	$1,40 \pm 0,04$
Г-6-ФДГ, Ед/г белка	$35,8 \pm 2,3$	$38,2 \pm 3,2$	$49,2 \pm 5,0^*$	$42,4 \pm 2,3$
СОД, Ед/г белка	$21,5 \pm 5,3$	$24,2 \pm 5,7$	$50,0 \pm 5,4^*$	$20,5 \pm 5,4$

Таблица подготовлена авторами по собственным данным

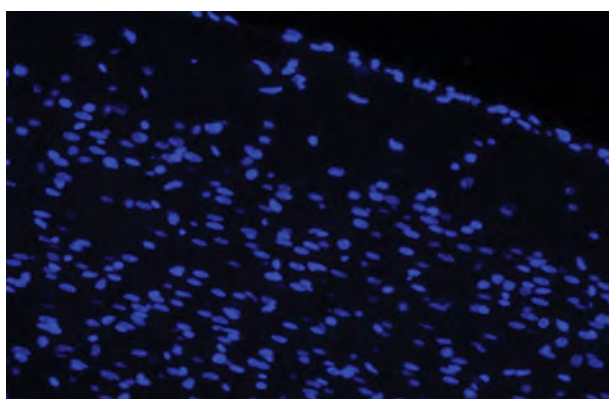
Примечание: данные представлены в формате среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$); статистически значимые различия с группой интактных животных: * $p \leq 0,05$.



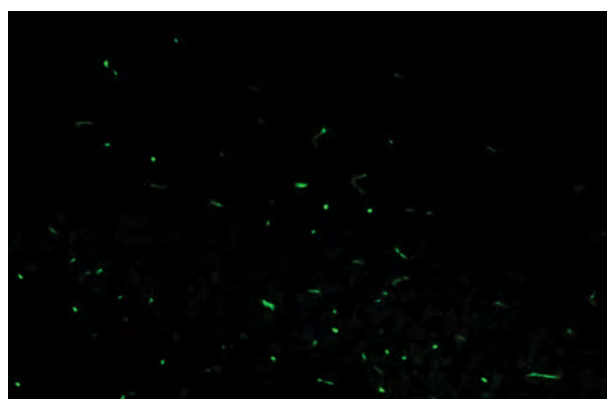
Контроль, DAPI — ядерные нейроны на срезе, ×200



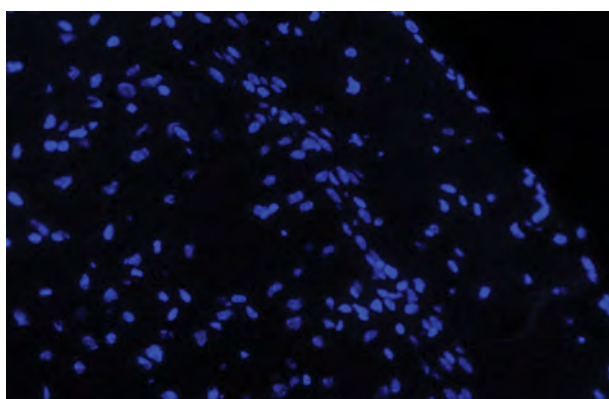
Контроль, TUNEL — апоптотические нейроны, ×200



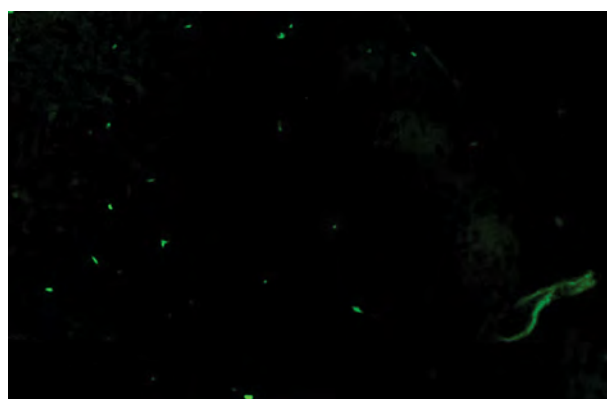
Фенилкарбамат, DAPI — ядерные нейроны на срезе, ×200



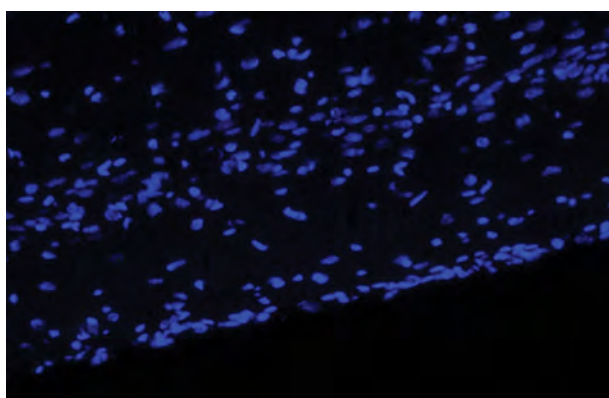
Фенилкарбамат, TUNEL — апоптотические нейроны, ×200



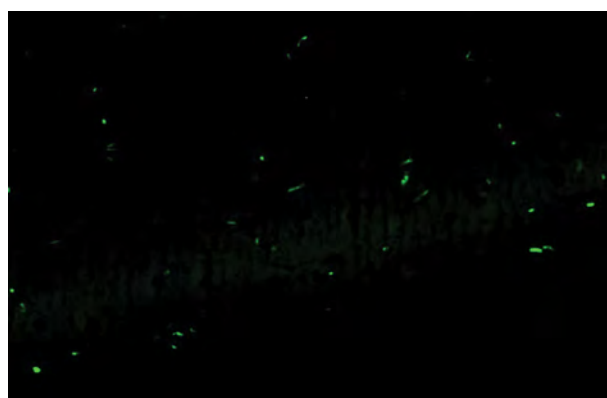
Метанол, DAPI — ядерные нейроны на срезе, ×200



Метанол, TUNEL — апоптотические нейроны, ×200



Ацетат свинца, DAPI — ядерные нейроны на срезе, ×200



Ацетат свинца, TUNEL — апоптотические нейроны, ×200

Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 2. Микрофотографии срезов височной коры головного мозга крыс

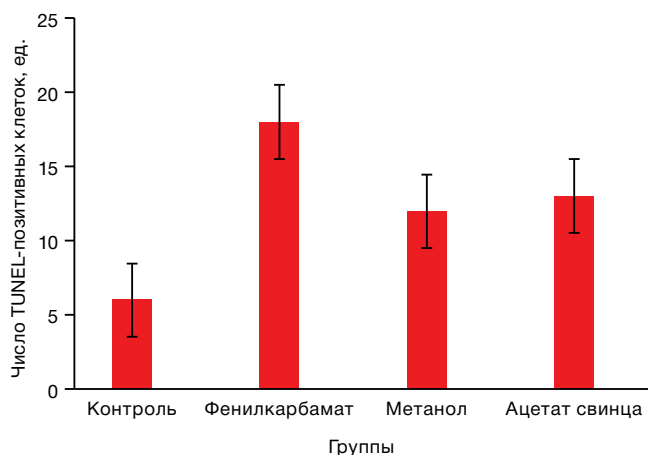


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 3. Активность процессов апоптоза в клетках височной коры головного мозга крыс на 28-е сутки после острого отравления нейротоксикантами
Примечание: * $p \leq 0,05$ — статистически значимые различия от группы контроля.

При практически одинаковом количестве окрашенных синим ядерных нейронов на срезе коры головного мозга (фотографии слева) под влиянием токсикантов у выживших животных существенно повышается количество апоптотических TUNEL-позитивных нервных клеток — зеленое свечение, правый ряд фотографий (рис. 2).

Результаты оценки активности процессов апоптоза представлены на рисунке 3.

Представленные на рисунке 3 данные показывают, что все изученные токсиканты, вне зависимости от механизмов их токсического действия, в 3–4 раза повышают количество нейронов в состоянии апоптоза, т.е. являются индукторами этого патологического процесса.

Дисперсионный факторный анализ показал, что выраженность апоптоза нейронов коры мозга крыс тесно связана с процессами формирования отдаленных последствий тяжелых острых отравлений нейротропными токсикантами: с ним связано более 20% всей вариативности оценки их сформированности ($R^2 = 0,47$, $p = 0,034$) у выживших животных. В связи с этим дальнейший анализ был сфокусирован на оценке значимости влияния исследуемых метаболических факторов на уровень активности процессов апоптоза нейронов.

Как следует из рисунка 3, на 28-е сутки в клетках головного мозга у выживших животных отмечается выраженная резкая активация процессов апоптоза, в большей степени характерная для фенилкарбамата. Дисперсионный факторный анализ показал, что контролируемый фактор «факт интоксикации» определяет 64% общей вариативности ($p = 5 \times 10^{-8}$) показателя апоптоза. Вид нейротоксиканта имеет еще большее значение в активации апоптоза (72% общей вариативности признака, $p = 2 \times 10^{-6}$), при этом для фенилкарбамата коэффициент детерминации $D = 0,97$ ($p = 5 \times 10^{-13}$), для метанола $D = 0,86$ ($p = 4 \times 10^{-8}$), для ацетата свинца $D = 0,80$ ($p = 4 \times 10^{-5}$).

Для оценки уровня активации апоптоза в период формирования отдаленных последствий острых отравлений методом частотного анализа и S-образного шкалирования были определены точки перегибов на кривых статистического распределения количества TUNEL-позитивных клеток на срезах (рис. 4), которые и являются границами уровней активации апоптоза. Если исследуемый показатель может быть охарактеризован как близкий к нормальному статистическому распределению, такими

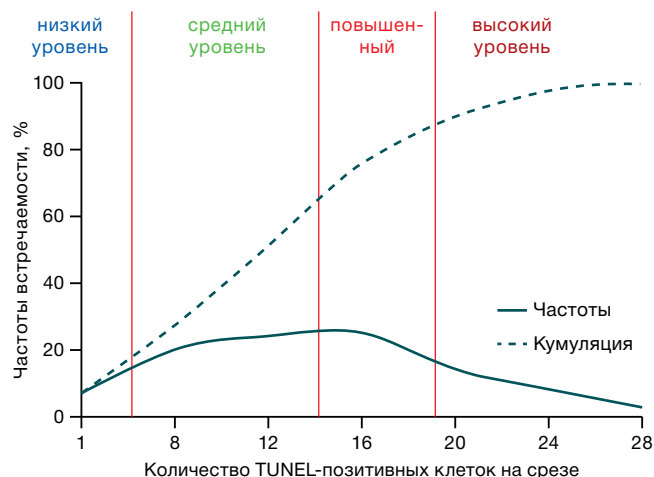


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 4. Частотные кривые распределения количества TUNEL-позитивных клеток на срезах височной коры головного мозга крыс

критериальными точками на кумулятивной кривой будут 16% (граница низкого и среднего уровня), 66% (граница среднего и повышенного уровня) и 84% (граница повышенного и высокого уровня). Обращает на себя внимание, что более выраженная (в 4 раза) индукция апоптоза зафиксирована при воздействии фенилкарбамата, в то время как апоптоз-индуцирующая активность метанола и ацетата свинца проявлялась слабее (примерно на 30%).

Границами диапазонов (рис. 4) являются: низкого уровня — 6 и менее TUNEL-позитивных клеток на срезе, среднего уровня — 7–10 клеток, повышенного — 14–18 клеток, высокого уровня — 19 и более клеток на срезе.

В анализируемых экспериментальных группах была выявлена следующая структура уровней активации апоптоза (табл. 3).

Данные, представленные в таблице 3, показывают, что фенилкарбамат является сильным индуктором апоптоза, вызывая преимущественно высокий уровень его активации, в то время как метанол и ацетат свинца вызывают умеренную по степени выраженности активацию программированной клеточной гибели нейронов.

После анализа роли отдельных компонентов метаболических систем мозга в активации процессов апоптоза под действием нейротоксикантов установлено, что исследованные в работе показатели метаболизма не играют существенной роли в процессе апоптоза клеток головного мозга на этапе формирования отдаленных последствий тяжелых острых отравлений нейротропными токсикантами, их коэффициенты детерминации находились в диапазоне от 0,02 до 0,11 и не были статистически значимыми. Для нейроспецифических белков, вероятно, это может быть связано как с особенностями токсического повреждения мозга на тканевом уровне, так и со сроками, прошедшими после острой интоксикации, запустившей активацию апоптоза. Так, известно, что NSE достигает максимума в ликворе через сутки после ишемического или геморрагического инсульта, снижается к 4–5 сут и более специфична фокальным повреждениям мозга, чем диффузным [12–15]. Для белка S100 также существуют типичные сроки повышения его концентрации — 2–7 сут. MBP является маркером аксональных повреждений и демиелинизации, которые к сроку 30 сут от момента острой интоксикации могут еще не сформироваться.

Таблица 3. Распределение животных по уровням активации процессов апоптоза при влиянии нейротоксикантов

Группа	Уровень активации апоптоза			
	низкий	умеренный	повышенный	высокий
Контрольная	88	12	–	–
Фенилкарбамат (1,6 мг/кг м.т.)	–	–	33	67
Метанол (11,5 г/кг м.т.)	–	100	–	–
Ацетат свинца (300 мг/кг м.т.)	–	80	–	20

Таблица составлена авторами по собственным данным

Примечание: данные представлены в виде % встречаемости в группе.

BDNF в большей степени гиперэкспрессируется при недостатке нейрональной пластичности, клинически более значимой является слабая реакция этого нейротрофина на повреждение мозговой ткани [17, 18].

В группе интактных животных уровень апоптоза не имел значимых корреляционных связей ни с нейроспецифическими белками, ни с показателями ПОЛ и антиоксидантной системы (АОС) и представлял собой спонтанно протекающий процесс. В группе животных, перенесших интоксикацию фенилкарбаматом, на уровень апоптоза оказывал умеренное влияние низкий уровень восстановленного глутатиона ($r = -0,53$). После интоксикации метанолом выявлена слабая корреляционная связь апоптоза и содержания основного белка миеллина ($r = +0,47$), вероятнее всего, отражающая наличие общего для них индуцирующего фактора. После интоксикации ацетатом свинца активность процессов апоптоза нейронов была связана с низкой активностью глутатионтрансферазы ($r = -0,66$) и СОД ($r = -0,47$). Следовательно, применение активаторов этих ферментов может быть полезно в комплексе средств профилактики отдаленных последствий отравлений органическими производными свинца.

NSE в группе интактных животных демонстрировала умеренные отрицательные связи с активностью глутатион-зависимых ферментов АОС: ГТ ($r = -0,63$) и ГП ($r = -0,57$), т.е. повышение содержания этого маркерного белка может отражать слабость ферментативного звена АОС. В то же время была выявлена положительная корреляционная связь с уровнем восстановленного глутатиона ($r = +0,75$). В совокупности эти связи могут означать, что повреждение тел нейронов может быть обусловлено нарушением способности утилизировать восстановленный глутатион в реакциях антиоксидантной защиты, так как при этом происходит одновременное повышение его уровня и снижение активности ферментов утилизации. Эта закономерность прослеживается и при отравлении фенилкарбаматом, однако при этом дополнительно отмечается снижение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы ($r = -0,67$) и положительная корреляционная связь с белком S100 ($r = +0,70$). После интоксикации метанолом также отмечается накопление неутилизованного восстановленного глутатиона ($r = +0,55$), но при этом оно сочетается с более низкими значениями BDNF ($r = -0,50$).

Своеобразная картина взаимосвязей NSE отмечается после интоксикации ацетатом свинца. Выявлена альтернативная активация экспрессии или NSE, или белка S100 (коэффициент корреляции между ними $r = -0,81$). Причем низкая активность АОС смещает систему в сторону повышения уровня белка S100. При интоксикации свинцом обнаружена выраженная положительная корреляционная связь (практически линейная) между уровнем NSE и активностью СОД ($r = +0,94$), что подразумевает единую

ответную реакцию на отравление свинцом. После отравления фенилкарбаматом этот маркер отрицательно коррелирует с активностью глутатион-зависимых ферментов АОС. При отравлении метанолом повышение количества этого белка в тканях мозга связано с накоплением МДА ($r = +0,61$) и компенсаторным субстратным повышением активности СОД ($r = +0,57$). Аналогичная корреляционная связь MBP с СОД была выявлена и после отравления ацетатом свинца ($r = +0,53$).

При отравлении фенилкарбаматом уровень BDNF коррелировал с диеновыми конъюгатами ($r = +0,61$), а после отравления метанолом — с дефицитом восстановленного глутатиона ($r = -0,60$). После отравления свинцом фиксируются нейропротекторные эффекты BDNF: снижение аксональных повреждений по маркеру белка S100 ($r = -0,66$) и улучшение показателей антиоксидантной защиты (снижение диеновых конъюгатов ($r = -0,62$), повышение активности глутатионтрансферазы ($r = +0,68$), глутатионпероксидазы ($r = +0,61$) и СОД ($r = +0,49$)).

Белок S100 в группе интактных животных и при отравлении метанолом имеет умеренную корреляционную связь с СОД ($r = +0,62$). После отравления фенилкарбаматом он коррелирует с уровнем NSE ($r = +0,70$), что может отражать процесс параллельного повреждения как тел нейронов, так и аксонов. После отравления ацетатом свинца уровень белка S100 повышается при недостаточности антиоксидантной системы — низком уровне восстановленного глутатиона ($r = -0,51$), ГТ ($r = -0,61$) и особенно ГП ($r = -0,84$) и СОД ($r = -0,75$).

В блоке показателей ПОЛ и АОС в тканях мозга интактных животных выделяется плотный кластер из положительно коррелирующих друг с другом показателей активности глутатион-зависимых ферментов (ГТ и ГП) и глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (коэффициенты корреляции в диапазоне от $+0,70$ до $+0,98$). При отравлении фенилкарбаматом и метанолом к этому кластеру присоединяется СОД, плотность корреляционных связей снижается незначительно. В то же время после отравления ацетатом свинца этот кластер распадается, ключевым антиоксидантным ферментом становится глутатионпероксидаза, а СОД оказывается соединен умеренной корреляционной связью с глюкозо-6-фосфат дегидрогеназой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что общим для анализируемых токсикантов было повышение количества нейронов, гибнущих путем апоптоза (наиболее выражено при интоксикации фенилкарбаматом), и снижение концентрации белка S100 в сыворотке крови (наиболее выражено при отравлении ацетатом свинца). Специфичной для отдаленных последствий отравления метанолом была умеренная активация ферментов

антиоксидантной защиты; возможно, как компенсаторная реакция на активацию процессов ПОЛ. Специфичными для отдаленных последствий отравления ацетатом свинца у выживших животных были повышение концентрации в сыворотке крови NSE и BDNF, снижение белка S100 и MBP, повышение уровня диеновых конъюгатов при снижении активности ГТ, умеренная активация глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы — ключевого фермента пентозофосфатного пути образования в тканях мозга восстановленных форм коферментов окисления субстратов энергетического обмена.

Установлено, что фенилкарбамат проявляет свойства сильного индуктора апоптоза клеток коры головного мозга, метанол и ацетат свинца являются индукторами с умеренной активностью.

Литература / References

1. Краснов ВН. Психоорганический синдром как предмет нейропсихиатрии. *Доктор.Ру*. 2011;(4):34–42. Krasnov VN. Psycho-organic syndrome as a subject of neuropsychiatry. *Doktor.Ru*. 2011;(4):34–42 (In Russ.). EDN: [OYYBSX](#)
2. Brendan L. McNeish, Noah Kolb. Toxic Neuropathies. *Continuum (Minneapolis)*. 2023;29(5):1444–68. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000001343>
3. Гайкова ОН, Козлов АА, Катрецакая ГГ, Мельникова МВ, Мелехова АС, Бондаренко АА. Морфологические характеристики токсического поражения головного мозга. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2024;26(2):13–9. Gaikova ON, Kozlov AA, Katretskaya GG, Melnikova MV, Melekhova AS, Bondarenko AA, et al. Morphological characteristics of toxic brain damage. *Extreme medicine*. 2024;26(2):13–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.47183/mes.2024.025>
4. Деев РВ, Билялов АИ, Жампеисов ТМ. Современные представления о клеточной гибели. *Гены и Клетки*. 2018;13(1):6–19. Deev RV, Bilyalov AI, Zhampeisov TM. Modern concepts of cell death. *Genes and Cells*. 2018; 13(1):6–19 (In Russ.). <https://doi.org/10.23868/201805001>
5. Кашуро ВА. Динамика содержания нейротрофических факторов головного мозга при экспериментальной коме у крыс. *Казанский медицинский журнал*. 2013;(94): 695–9. Kashuro VA. Dynamics of the content of neurotrophic factors of the brain in experimental coma in rats. *Kazan Medical Journal*. 2013;(94):695–9 (In Russ.). EDN: [RSHIDV](#)
6. Кострова ТА. Экспериментальная оценка изменений нейротрофических и апоптотических факторов в реализации отдаленных последствий острого тяжелого отравления тиопенталом натрия. *Токсикологический вестник*. 2019;(5):49–53. Kostrova TA. Experimental assessment of changes in neurotrophic and apoptotic factors in the long-term effects of acute severe sodium thiopental poisoning. *Toxicological bulletin*. 2019;(5):49–53 (In Russ.). <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2019-5-49-53>
7. Лужников ЕА. Особенности формирования и течения токсикогипоксической энцефалопатии при острых отравлениях веществами нейротоксического действия. *Анестезиология и реаниматология*. 2005;6:4–8. Luzhnikov EA. The specific features of the development and course of toxicohypoxic encephalopathy in acute poisoning by neurotoxic agents. *Anesthesiology and reanimatology*. 2005;6:4–8 (In Russ.). EDN: [HVKWSV](#)
8. Петров АН, Войцехович КО, Мелехова АС, Лисицкий ДС, Бельская АВ, Михайлова МВ, Гайкова ОН. Проблемы диагностики нейротоксических нарушений — последствий отравлений веществами судорожного действия. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2017;3(59):211–7. Petrov AN, Voytsekhovich KO, Melekhova AS, Lisitskiy DS, Bel'skaya AV, Mikhaylova MV, Gaykova ON. Problems of diagnostics of neurotoxic disorders — the effects of convulsive substances poisoning. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2017;3(59):211–7 (In Russ.). EDN: [ZOWOBD](#)
9. Беспалов АЯ, Прокопенко ЛИ, Горчакова ТЛ, Козлов ВК, Петров АН, Зайцева МА и др. Гидрохлориды замещенных 2-[(диметиламино)метил] арилдиметилкарбаматов, обладающие антихолинэстеразной активностью. Патент Российской Федерации № 2754133;2021. Bepalov AY, Prokopenko LI, Gorchakova TL, Kozlov VK, Petrov AN, Zaytseva MA, et al. Hydrochlorides of substituted 2-[(dimethylamino)methyl] aryl dimethyl carbamates with anticholinesterase activity. Patent of the Russian Federation No. 2754133;2021 (In Russ.).
10. Капанадзе ГД, Ревякин АО, Шустов ЕБ. Методика оценки системы детоксикации ксенобиотиков у лабораторных животных. *Биомедицина*. 2017;3:71–81. Kapanadze GD, Revyakin AO, Shustov EB. Methodology for evaluating the detoxification system of xenobiotics in laboratory animals. *Biomedicine*. 2017;3:71–81 (In Russ.). EDN: [ZHYWKB](#)
11. Кострова ТА, Батоцыренова ЕГ, Кашуро ВА, Долго-Сабуров ВБ, Степанов СВ, Золотоверхая ЕА. Оценка биохимических показателей в тканях головного мозга у крыс в отдаленный период после тяжелого отравления тиопенталом натрия. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2019;21(3):429–35. Kostrova TA, Batotsyrenova EG, Kashuro VA, Dolgo-Saburov VB, Stepanov SV, Zolotoverhaya EA, et al. Evaluation of biochemical parameters in the brain tissues of rats in the long-term period after severe sodium thiopental poisoning. *Medicine of Extreme Situations*. 2019;21(3):429–35 (In Russ.). EDN: [GGIEFQ](#)
12. Максимова МЮ, Ионова ВГ, Сыскина АА, Шабалина АА, Костырева МА, Сенектутова ОА. Нейроспецифические белки в оценке состояния ткани мозга при атеротромботическом инсульте (клинико-биохимическое исследование). *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2011;5(3):4–10. Maksimova MYu, Ionova VG, Syskina AA, Shabalina AA, Kostyрева MA, Senektutova OA. Neurospecific peptides in the assessment of brain damage in patients with atherothrombotic stroke. *Annals of Clinical and Experimental Neurology*. 2011;5(3):4–10 (In Russ.). EDN: [OOKEFR](#)
13. Wunderlich MT, Lins H, Skalej M, Wallesch C-W, Goertler M. Neuron-specific enolase and tau protein as neurobiochemical markers of neuronal damage are related to early clinical course and long-term outcome in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg*. 2006; 108(6):558–63. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2005.12.006>
14. Berger RP, Beers SR, Richichi R, Wiesman D, Adelson PD.

- Serum biomarker concentrations and outcome after pediatric traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*. 2007;(24):1793–1801.
<https://doi.org/10.1089/neu.2007.0316>
15. Vlasakova K, Tsuchiya T, Garfinkel IN, et al. Performance of biomarkers NF-L, NSE, Tau and GFAP in blood and cerebrospinal fluid in rat for the detection of nervous system injury. *Front Neurosci*. 2024;(17):1285359.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1285359>
 16. Клименко АЛ, Деев АИ, Баскаков ИС, Богданова МН, Забирова АХ, Мазикина АН. Класс нейроспецифических белков S100 и металлолигандный гомеостаз в этиопатогенезе ишемического инсульта. *Микроэлементы в медицине*. 2019;20(1):3–13.
 Klimentko AL, Deev AI, Baskakov IS, Bogdanova MN, Zabirowa AKh, Mazikina AN. Neurospecific proteins of s100 family and metal-ligand homeostasis in etiopathogenesis of ischemic stroke: a literature review. *Trace elements in medicine*. 2019;20(1):3–13 (In Russ.).
<https://doi.org/10.19112/2413-6174-2019-20-4-3-13>
 17. Левчук ЛА, Бохан НА, Иванова СА. Нейроспецифические белки как трансдиагностические маркеры аффективных расстройств. *Нейрохимия*. 2023;40(1):30–4.
 Levchuk LA, Bokhan NA, Ivanova SA. Neurospecific Proteins as Transdiagnostic Markers of Affective Disorders. *Neurochemistry*. 2023;40(1):30–4 (In Russ.).
<https://doi.org/10.31857/S1027813323010119>
 18. Lima Giacobbo B, Doorduyn J, Klein HC, Dierckx RAJO, Bromberg E, de Vries EFJ. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation. *Mol Neurobiol*. 2019;56(5):3295–3312.
<https://doi.org/10.1007/s12035-018-1283-6>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Е.Б. Шустов — научный замысел, статистическая обработка, интерпретация и обсуждение результатов; М.В. Мельникова, К.В. Мастерова, В.Ф. Остров — разработка экспериментальной модели, нейрофизиологическое исследование; Е.А. Золотоверхая, Л.Г. Кубарская, К.О. Танаянц — биохимические исследования крови и тканей; А.А. Козлов, Ю.О. Соколова — исследование апоптоза; П.К. Потапов — подготовка и редактирование рукописи статьи. Все авторы участвовали в написании разделов, обсуждении результатов и выводов.

ОБ АВТОРАХ

Шустов Евгений Борисович, д-р мед. наук

shustov-msk@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0001-5895-688X>

Мельникова Маргарита Викторовна

melnikova.m.v@toxicology.ru

<https://orcid.org/0000-0002-2996-5151>

Мастерова Кристина Вячеславовна

masterova.k.v@toxicology.ru

<https://orcid.org/0000-0002-5731-8146>

Остров Владимир Федорович, канд. биол. наук

ostrov.v.f@toxicology.ru

<https://orcid.org/0009-0008-1410-806X>

Золотоверхая Екатерина Андреевна, канд. биол. наук

e.zolotoverkhaja@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0002-9708-2596>

Кубарская Лариса Георгиевна, канд. биол. наук

larkub@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0001-7622-0390>

Танаянц Ксения Олеговна

tanayantsksenia@yandex.ru

<https://orcid.org/0009-0009-7594-0201>

Козлов Александр Александрович

AlexandrKozlov89@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0003-4168-0658>

Соколова Юлия Олеговна, канд. биол. наук

yulya_sokolova91@mail.ru

<https://orcid.org/0009-0002-8748-8426>

Потапов Петр Кириллович, канд. мед. наук

forwardspsb@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-4602-4468>

<https://doi.org/10.47183/mes.2025-265>

УДК 615.9+615.011



ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ ОПАСНОСТИ ЦНС-АКТИВНЫХ КСЕНОБИОТИКОВ

Д.В. Криворотов[✉], А.И. Николаев, А.С. Радилов, В.Р. Рембовский, В.А. Кузнецов

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

Введение. Судебно-медицинская экспертиза часто сталкивается с малоизученными, потенциально опасными психоактивными веществами. При этом информация о биологической активности таких веществ отрывочна и противоречива или вообще отсутствует. Поэтому разработка подходов к прогнозированию опасности ксенобиотиков является актуальной задачей медицины экстремальных ситуаций.

Цель. Изучение взаимосвязи физико-химических свойств и степени опасности представителей одного из классов ЦНС-активных веществ с использованием методов математического анализа и последующим научным обоснованием критериев предварительной оценки опасности наркотических средств.

Материалы и методы. В качестве модельных объектов исследования использовали известные структуры наркотических анальгетиков, разделенные на три группы по степени потенциальной опасности. В качестве факторов потенциальной опасности таких веществ рассматривали их физико-химические свойства, такие как: молекулярная масса, полярность, площадь полярной поверхности, коэффициенты распределения и константы основной диссоциации. Для выявления связи физико-химических свойств и степени опасности психоактивных веществ использовали линейный дискриминантный анализ.

Результаты. На примере представителей одного из классов ЦНС-активных веществ показана связь степени их опасности с физико-химическими свойствами, влияющими на перераспределение таких веществ из центрального кровотока в ткани центральной нервной системы. Для прогнозирования степени опасности психоактивных веществ предложены физико-химические критерии — классификационные функции, достаточно хорошо разделяющие группы модельных веществ между собой.

Выводы. Показали, что физико-химические свойства психоактивных веществ определяют особенности их токсического действия в не меньшей степени, чем сила их связывания с целевыми рецепторами. Сформулированные в работе классификационные функции, рассчитываемые на основании физико-химических свойств веществ, могут быть использованы для предварительной оценки степени опасности ксенобиотиков в ходе их выявления в биологических пробах.

Ключевые слова: ксенобиотики; биологические пробы; наркотические средства; гематоэнцефалический барьер; физико-химические свойства; молекулярная масса; полярность; константы диссоциации; коэффициенты распределения

Для цитирования: Криворотов Д.В., Николаев А.И., Радилов А.С., Рембовский В.Р., Кузнецов В.А. Физико-химические критерии оценки опасности ЦНС-активных ксенобиотиков. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2025;27(1):15–25. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-265>

Финансирование: исследование выполнено без спонсорской поддержки.

Потенциальный конфликт интересов: А.С. Радилов и В.Р. Рембовский — члены редакционной коллегии журнала «Медицина экстремальных ситуаций». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

✉ Криворотов Денис Викторович denis.krivorotov@bk.ru

Статья поступила: 21.10.2024 После доработки: 11.12.2024 Принята к публикации: 23.12.2024 Online first: 25.02.2025

PHYSICAL AND CHEMICAL CRITERIA FOR HAZARD ASSESSMENT OF CNS-ACTIVE XENOBIOTICS

Denis V. Krivorotov[✉], Anatoly I. Nikolaev, Andrey S. Radilov, Vladimir R. Rembovsky, Viktor A. Kuznetsov

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

Introduction. Forensic medical examinations frequently encounter poorly understood, potentially hazardous psychoactive substances. At the same time, information on the biological activity of such substances may be either fragmentary and contradictory or absent altogether. Therefore, the development of approaches to predicting the health hazard of xenobiotics is an urgent task of emergency medicine.

Objective. To study the relationship between physicochemical properties and the hazard rate of one class of CNS-active substances using the methods of mathematical analysis followed by scientific substantiation of criteria for preliminary hazard assessment of narcotic drugs.

Materials and methods. The study models included the known structures of narcotic analgesics, divided into three groups according to their potential hazard rate. The physicochemical properties of such substances, i.e., molecular weight, polarity, polar surface area, distribution coefficients, and basic dissociation constants were considered as potential hazard factors. Linear discriminant analysis was used to identify the relationship between the physicochemical properties of psychoactive substances and their hazard potential.

Results. The considered example of one class of CNS-active substances confirms the relationship between their hazard rate and the physicochemical properties affecting their redistribution from the central bloodstream to the central nervous system. Physicochemical criteria for predicting the hazard rate of psychoactive substances are proposed. These criteria serve as classification functions that distinguish groups of model substances.

Conclusions. The physicochemical properties of psychoactive substances and the strength of their binding to target receptors equally determine the characteristics of their toxic effect. The formulated classification functions, calculated based on the physicochemical properties of substances, can be used for a preliminary hazard assessment of xenobiotics during their detection in biological samples.

Keywords: xenobiotics; biological samples; narcotic drugs; blood-brain barrier; physicochemical properties; molecular weight; polarity; dissociation constants; distribution coefficients

For citation: Krivorotov D.V., Nikolaev A.I., Radilov A.S., Rembovsky V.R., Kuznetsov V.A. Physical and chemical criteria for hazard assessment of CNS-active xenobiotics. *Extreme Medicine*. 2025;27(1):15–25. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-265>

Funding: the study was carried out without sponsorship.

© Д.В. Криворотов, А.И. Николаев, А.С. Радилов, В.Р. Рембовский, В.А. Кузнецов, 2025

Potential conflict of interest: Andrey S. Radilov and Vladimir R. Rembovsky are the Editorial Board members of *Extreme Medicine*. Other authors declare no conflict of interest.

✉ Denis V. Krivorotov denis.krivorotov@bk.ru

Received: 21 Oct. 2024 **Revised:** 11 Dec. 2024 **Accepted:** 23 Dec. 2024 **Online first:** 25 Feb. 2025

ВВЕДЕНИЕ

В ходе судебно-медицинской экспертизы случаев отравлений психоактивными веществами используются целевые аналитические методы: ГХ-МС (масс-спектрометрия с газовой хроматографией) и ВЭЖХ-МС/МС (танDEMная масс-спектрометрия с жидкостной хроматографией), которые позволяют обнаруживать известные ксенобиотики и их метаболиты [1]. Для идентификации химической структуры новых веществ, появляющихся в незаконном обороте, применяют нецелевое тестирование с помощью технологий ВЭЖХ-HRMS (масс-спектрометрия высокого разрешения с жидкостной хроматографией). Идентифицируемые в биологических пробах вещества могут представлять значительную опасность [2–5]. Если безопасность лекарственного средства может быть измерена путем определения его терапевтического индекса, рассчитываемого как отношение максимальной дозы лекарственного средства, не проявляющей токсичности, к дозе, дающей нужный эффект (LD_{50}/ED_{50}), то для выявляемых в ходе экспертизы веществ такой подход невозможен. При этом информация об опасной фармакологической активности выявляемых ксенобиотиков либо отрывочна и противоречива, либо вообще отсутствует, чему есть ряд существенных причин:

- стремительное появление новых психоактивных химических веществ, которые незаконно поступают в оборот, при отсутствии стандартных образцов и методов их определения в биологических и иных средах [6];
- законодательные ограничения исследования наркотических средств, не имеющих медицинского применения [6];
- недостаточная стандартизация многочисленных методов исследования фармакологических свойств наркотических средств [7, 8];
- сложность межвидового переноса результатов доклинических исследований, приводящая к недооценке токсичности наркотических средств [9];
- невозможность сравнения по биологическому действию не стандартизированных по степени чистоты и изомерному составу наркотических средств [3].

Перечисленные причины делают затруднительной медико-биологическую оценку новых психоактивных веществ, рост случаев выявления которых в незаконном обороте в последнее время отмечается в России и в мире [4, 8–10]. Для прогнозирования опасности выявляемых веществ целесообразно иметь доступные для простого определения критерии, связанные с токсическим действием ЦНС-активных ксенобиотиков.

Известно, что токсичность многих наркотических анальгетиков связана с опиоид-индуцированной депрессией дыхания, способной привести к гибели пациента при отсутствии надлежащего лечения [11]. Центральным генератором паттернов дыхания в стволе головного мозга являются комплекс пре-Бетцингера (preBötzing

Complex) и ядро Келликера — Фузе (Kolliker–Fuse). В этих областях мозга за реакцию на повышение уровня углекислого газа (pCO_2) и снижение оксигенации крови (pO_2), необходимой для рефлекторного механизма дыхания, задействовано всего 70–140 нейронов [12]. Соответственно, механизм регуляции дыхательной деятельности крайне уязвим по отношению к веществам, способным селективно воздействовать на данные мишени в головном мозге. Можно предположить, что опасность ЦНС-активных ксенобиотиков, выраженная как их сила и быстродействие, опосредуется, во-первых, факторами, определяющими степень их влияния на целевые рецепторы в нейронах указанных областей головного мозга, и, во-вторых, факторами, определяющими перенос ксенобиотиков из центрального кровотока к их биологическим мишеням в головной мозг.

Силу действия наркотических анальгетиков часто связывают с величинами констант ингибирования опиоидных рецепторов [13]. Но в стандартизованных условиях морфин и фентанил, существенно различающиеся по силе анальгетического действия, имеют сравнимые константы ингибирования (K_i) μ -опиоидных рецепторов (MOR) (табл. 1) [5, 7].

При более глубоком рассмотрении прямой связи анальгетической активности опиоидов с силой их связывания с рецептором не просматривается, что подтверждается многочисленными примерами [14]. Так, по данным E. Boström et al., оксикодон, который более чем в 20 раз слабее связывается с опиоидными рецепторами, чем морфин (табл. 1), проявляет в 1,8 раза большую анальгетическую активность. Такой эффект объясняют его большей концентрацией в целевых тканях мозга, чем в крови, тогда как у морфина, напротив, достижимая концентрация в мозге у крыс в несколько раз ниже, чем в крови [15]. Таким образом, связывание «малых молекул» с опиоидными рецепторами в большинстве случаев является определяющим условием проявления анальгетической активности, но не главным фактором силы и скорости ее проявления (аналогично классическим работам Н.В. Лазарева о проявлении наркотических свойств у углеводов (неэлектролитов)) [16]. К не менее существенным факторам опасного действия опиоидных анальгетиков можно отнести их свойства, обуславливающие особенности поступления в целевые ткани, органы и мишени в центральной нервной системе через гематоэнцефалический барьер.

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) выполняет функцию фильтра, через который из кровеносного русла в головной мозг поступают питательные вещества, а в обратном направлении выводятся продукты жизнедеятельности нервной ткани. ГЭБ обеспечивает защиту мозга от циркулирующих в крови микроорганизмов, токсинов, клеточных и гуморальных факторов иммунной системы и ксенобиотиков. Препараты, действующие на мишени в ЦНС, должны обладать способностью проникать

Таблица 1. Константы ингибирования μ -опиоидных рецепторов некоторыми наркотическими анальгетиками

Низкоаффинные лиганды, $K_i > 100$ нМ		Морфиноподобные лиганды, $K_i = 1-100$ нМ		Высокоаффинные лиганды, $K_i < 1$ нМ	
Препарат	K_i (нМ) МОР	Препарат	K_i (нМ) МОР	Препарат	K_i (нМ) МОР
трамадол	1248,6	гидрокодон	41,58	буторфанол	0,76
кодеин	734,2	оксикодон	25,87	леворфанол	0,41
меперидин	450,1	дифеноксилат	12,37	оксиморфон	0,40
пропоксифен	120,2	алфентанил	7,39	гидроморфон	0,36
пентазоцин	117,8	метадон	3,37	бупренорфин	0,21
		налбуфин	2,11	суфентанил	0,13
		фентанил	1,34		
		морфин	1,16		

Таблица составлена авторами по данным источника [7]

через такой биологический барьер. В настоящее время рассматриваются три пути переноса малых молекул в ткани мозга: однонаправленное проникновение в мозг посредством пассивной и облегченной диффузии, обусловленное градиентом концентраций веществ и не требующее дополнительной энергии; активный перенос, требующий энергии (АТФ) для транспорта молекул против градиента концентраций; пассивная диффузия для умеренно липофильных препаратов и механизмы активного транспорта для проникновения через ГЭБ преимущественно полярных молекул [17, 18].

Каналом для диффузии органических молекул через клеточные слои гематоэнцефалического барьера выступают мембраны, разделяющие клетки слоев ГЭБ. Для движения через такой канал растворенная в крови молекула должна трансформироваться в ходе многоэтапного физико-химического процесса десольватации и потери заряда для нековалентного взаимодействия с фосфолипидным бислоем по аналогии взаимодействия «лиганд–рецептор», но с меньшими стерическими требованиями. Поэтому «малые молекулы» для проникновения в головной мозг должны обладать набором определенных свойств, таких как оптимальный геометрический размер, ионизационные свойства, гибкость и др. Так, первым параметром, хорошо коррелирующим с анальгетической силой анестетиков и анальгетиков, является липофильность, выражаемая в форме LogP [16], которая сейчас рассматривается как композитный дескриптор, описывающий вклад стерических межмолекулярных взаимодействий и вклад образования водородных связей [17]. Дескрипторами образования водородной связи выступают такие свойства молекул, как поляризуемость, площадь ее полярной поверхности, количество доноров и акцепторов водородных связей или гетероатомов, способных к их образованию. Полярные соединения с высоким потенциалом образования водородных связей, такие как пептиды, плохо проникают через гематоэнцефалический барьер. Поляризуемость лежит в основе ряда физических свойств веществ, включая поверхностное натяжение и растворимость, и характеризуется дипольным моментом. Площадь полярной поверхности определяется как сумма поверхностей всех полярных атомов или молекул, в первую очередь кислорода и азота. Препараты, действующие на ЦНС, имеют меньшие площади полярной поверхности (PSA), чем другие классы лекарственных препаратов, как правило, не более $90 \text{ \AA}^2$. Молекулы

с площадью полярной поверхности более $140 \text{ \AA}^2$ плохо проникают через клеточные мембраны.

Значение для диффузии через биологические мембраны имеют геометрические и стерические факторы, выражаемые молекулярным весом, молекулярным объемом и гибкостью молекулы. Для эффективного проникновения через ГЭБ молекулярный вес не должен превышать 400 Да . Молекулярный объем как функция молекулярного веса и структуры учитывает все конформации, доступные молекуле. Наличие у структур более десяти способных к вращению связей коррелирует со снижением их биодоступности и ЦНС-активности. Ограниченная гибкость и компактность молекул, имеющих на своей поверхности меньше полярных групп, способных функционировать в качестве доноров и акцепторов водородных связей, является преимуществом для веществ, действующих на центральную нервную систему, поэтому параметры, описывающие данные свойства, являются существенными факторами, связанными с ЦНС-активностью ксенобиотиков.

Большинство ЦНС-активных веществ имеют атом азота, способный к ионизации в плазме крови. Образующийся при этом заряд протонированной молекулы отрицательно сказывается на ее способности к диффузии через диэлектрические слои фосфолипидных мембран, которые лучше пропускают молекулы в нейтральной форме [18]. Но при этом наличие положительного заряда на атоме азота считается важным фактором для электростатического взаимодействия веществ с ключевыми аминокислотами целевых рецепторов [19]. Степень ионизации молекул в буферной системе крови и ликвора является дуалистическим фактором, как имеющим связь со скоростью поступления активных молекул в ткани ЦНС, так и оказывающим влияние на их способность к связыванию с целевыми мишенями в ЦНС [20, 21]. Таким образом, выраженность токсического действия ЦНС-активных веществ, обусловленная эффективностью их поступления в головной мозг, определяется суммой физико-химических факторов, связанных с их химическим строением. Эти факторы могут быть экспериментально оценены или рассчитаны.

Цель работы — изучение взаимосвязи физико-химических свойств и степени опасности представителей одного из классов ЦНС-активных веществ с использованием методов математического анализа и последующим научным обоснованием критериев предварительной оценки опасности наркотических средств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве модельных объектов исследования сформировали выборку из известных структур наркотических анальгетиков, представленных в таблице 2. Рассматриваемые объекты разделяли на три группы.

1. Группа 1 включала когда-либо используемые в медицине наркотические анальгетики [14] с учетом возможных побочных эффектов при их медицинском использовании; они рассматривались как вещества с возможным проявлением опасности.

2. Группа 2 включала наркотические вещества, не предназначенные для медицинского применения, но целенаправленно создаваемые для незаконного применения человеком, с учетом информации о случаях массовых отравлений такими веществами [22]; их рассматривали как вещества с возможным проявлением высокой опасности.

3. Группа 3 включала высокоактивные препараты, использование которых в медицине требует мер осторожности для их контролируемого дозирования, а также ветеринарные и исследовательские препараты, не предназначенные для употребления человеком [3, 14]; их рассматривали как вещества с возможным проявлением чрезвычайно высокой опасности.

В качестве потенциальных дескрипторов степени опасности ЦНС-активных ксенобиотиков рассматривали физико-химические свойства, которые могут быть измерены без проведения сложного эксперимента

и применения стандартных образцов контролируемых веществ; соответствующие данные представлены в таблице 3. Так, молекулярную массу веществ определяли в ходе хромато-масс-спектрометрического анализа, а величины констант распределения «октанол/вода» и кислотно-основной диссоциации коррелировали с величинами времени удерживания при высокоэффективной жидкостной хроматографии [21, 23]. В случае нахождения информации о структурной формуле ксенобиотика в масс-спектрометрических базах данных для определения его физико-химических свойств возможно применение методов компьютерного моделирования с использованием доступных и надежных алгоритмов расчета [24].

Расчет значений выбранных физико-химических показателей для обучающей выборки веществ проводили с использованием программного обеспечения ACD/Percepta [24]. Для математического анализа данных применяли методы описательной статистики и метод линейного дискриминантного анализа с использованием программы статистического анализа «Statistica» 6.0. Ранее нами была показана эффективность методов многомерной статистики (хеометрии), в частности линейного дискриминантного анализа и множественной регрессии для расчета по физико-химическим параметрам молекул токсических свойств хладонов [25], для оценки степени воздействия ксенобиотиков и неинвазивной диагностики ряда заболеваний по спектральным характеристикам биопроб¹ [26].

Таблица 2. Характеристика обучающей выборки модельных веществ

Группа	Модельные объекты	Источник информации	Количество структур	Оценка модельных объектов
1	Медицинские наркотические анальгетики	[7]	17	Вещества с риском проявления опасности
2	Немедицинские наркотические анальгетики	[22]	18	Вещества с риском проявления высокой опасности
3	Высокоактивные наркотические анальгетики	[3, 14]	18	Вещества с риском проявления чрезвычайно высокой опасности
Общее количество структур в обучающей выборке			53	

Таблица составлена авторами по данным источников [3, 7, 14, 22]

Таблица 3. Выбранные физико-химические дескрипторы степени опасности ЦНС-активных ксенобиотиков

Обозначение параметра	Описание параметра	Размерность	Возможность определения при идентификации ксенобиотика
$\text{Log}P / \text{Log}D_{7,4}$	Коэффициент распределения вещества в системе «октанол/вода» отражает липофильность веществ, способность растворяться в жирах, липидах и других средах при pH 7,0 ($\text{Log}P$) или при физиологическом pH ($\text{Log}D_{7,4}$) при распределении веществ в организме	-	ВЭЖХ экспериментально, расчетными методами
pK_b	Константа основной диссоциации определяет липофильность ионизируемых молекул	-	ВЭЖХ экспериментально, расчетными методами
MW	Молекулярная масса вещества отражает стерические факторы, влияющие на распределение веществ в организме	Да	ВЭЖХ-МС экспериментально, расчетными методами
TPSA	Топологическая площадь полярной поверхности (topological polar surface area) — расчетный параметр, связываемый со способностью веществ преодолевать водородные связи и преодолевать биологические мембраны	$\text{\AA}^2$ (10^{-16}cm^2)	расчетными методами
Polar	Поляризуемость (polarizability) — физическое свойство веществ приобретать электрический или магнитный дипольный момент во внешнем электромагнитном поле и связываемый со способностью веществ образовывать водородные связи и преодолевать биологические мембраны	$\text{\AA}^3$ (10^{-24}cm^3)	расчетными методами

Таблица составлена авторами

¹ Рембовский ВР, Радилов АС, Дулов СА, Николаев АИ. Оценка степени воздействия ксенобиотиков по спектральным характеристикам водно-белковых комплексов плазмы крови. Методические рекомендации 12.11. М.: ФМБА; 2012.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сформированная выборка содержала 53 обезличенные записи о расчетных значениях физико-химических свойств модельных ЦНС-активных веществ, описанных в литературных источниках, в соответствии с таблицей 2. Структуры модельных препаратов в данной работе имели значение только для расчета выбранных физико-химических величин, результаты которого приведены в таблице 4.

Средние значения величин физико-химических дескрипторов, использованных для построения регрессионных моделей и определяющих пределы их применимости, приведены в таблице 5.

Средние значения физико-химических величин, представленные в таблице 5, показали, что наибольшей липофильностью ($\text{Log}P$) обладают наркотические вещества группы 2. В то же время соотношение усредненных значений показателей липофильности групп препаратов в воде

Таблица 4. Результаты расчета физико-химических дескрипторов

№ п/п	Модельный объект	Номер группы	Рассчитанные физико-химические дескрипторы					
			$\text{Log}D_{7,4}$	$\text{Log}P$	MW	TPSA	Polar	pK_a
1	фентанил	1	3,32	4,08	336,47	23,55	41,09	8,08
2	бупренорфин	1	3,48	4,45	467,64	62,16	52,07	8,26
3	метадон	1	3,12	4,44	309,44	20,31	38,02	8,70
4	леворфанол	1	1,94	3,21	257,37	23,47	30,49	8,61
5	гидрокодон	1	0,57	1,31	299,36	38,77	32,32	8,06
6	пентазоцин	1	3,05	3,79	285,42	23,47	34,96	8,04
7	буторфанол	1	1,96	3,52	327,46	43,7	37,64	8,85
8	пропоксифен	1	3,97	4,85	339,47	29,54	40,58	8,23
9	меперидин	1	1,22	2,44	247,33	29,54	28,25	8,60
10	налбуфин	1	0,98	2,03	357,44	73,16	38,11	8,35
11	трамадол	1	0,71	2,54	263,37	32,7	30,90	9,24
12	гидроморфон®	1	0,53	1,29	285,33	49,77	30,41	8,03
13	кодеин	1	0,34	1,21	299,36	41,93	32,84	8,21
14	морфин	1	-0,18	0,69	285,33	52,93	30,93	8,16
15	оксикодон	1	0,16	0,91	315,36	59,00	32,95	8,06
16	дифеноксилат	1	5,42	5,72	452,58	53,33	52,93	7,40
17	оксиморфон	1	0,25	1,00	301,33	70,00	31,03	8,03
18	4-фтор-фентанил	2	3,11	3,87	354,46	23,55	41,09	8,07
19	фуранил-фентанил	2	3,35	4,12	374,47	36,69	44,25	8,08
20	3-метил-тиофентанил	2	2,96	4,09	356,52	51,79	42,32	8,50
21	β -гидрокси-тиофентанил	2	2,38	2,77	358,49	72,02	41,06	7,58
22	β -гидрокси-фентанил	2	2,87	3,07	352,47	43,78	41,70	7,15
23	α -метил-тиофентанил	2	3,15	4,04	356,52	51,79	42,25	8,23
24	α -метил-фентанил	2	2,75	4,09	350,49	23,55	42,89	8,73
25	асетил- α -метилфентанил	2	2,56	3,91	336,47	23,55	41,05	8,73
26	3-метил-бутирилфентанил	2	4,21	4,98	364,52	23,55	44,79	8,08
27	ремифентанил	2	1,77	1,85	376,44	76,15	40,06	6,70
28	4-метокси-бутирилфентанил	2	3,55	4,33	380,52	32,78	45,58	8,10
29	тиофентанил	2	2,66	3,79	342,49	51,79	40,45	8,50
30	4-фтор-бутирилфентанил	2	3,69	4,44	368,48	23,55	42,93	8,07
31	3-метилфентаил	2	3,36	4,13	350,49	23,55	42,96	8,08
32	акрилфентанил	2	2,99	3,75	334,45	23,55	40,98	8,08
33	ацетилфентанил	2	2,98	3,74	322,44	23,55	39,25	8,08
34	алфентанил	2	1,99	2,04	416,51	81,05	46,25	6,53
35	суфентанил (СФ)	2	2,91	3,77	386,55	61,02	44,80	8,20
36	пиррольный аналог СФ № 1	3	2,33	2,55	383,48	54,78	44,16	7,19
37	эторфин	3	2,30	3,09	411,53	62,16	45,51	8,07
38	гетероцикл, аналог КФ № 1	3	3,05	3,10	506,59	90,47	54,93	6,43
39	гетероцикл, аналог СФ № 1	3	1,80	2,67	462,58	65,45	53,43	8,20
40	гетероцикл, аналог СФ № 2	3	3,14	3,26	449,54	70,16	49,87	6,86

Продолжение таблицы 4

№ п/п	Модельный объект	Номер группы	Рассчитанные физико-химические дескрипторы					
			LogD _{7,4}	LogP	MW	TPSA	Polar	pK _b
41	гетероцикл, аналог КФ № 2	3	2,93	2,98	463,52	87,23	49,82	6,43
42	гетероцикл, аналог СФ № 3	3	2,59	2,81	435,55	53,09	49,82	7,23
43	гетероцикл, аналог КФ № 3	3	2,61	2,70	449,54	70,16	49,77	6,79
44	гетероцикл, аналог КФ № 4	3	2,53	2,65	483,60	87,23	52,76	6,90
45	пиррольный аналог КФ № 1	3	0,72	1,16	444,48	142,52	46,55	7,64
46	пиррольный аналог СФ № 2	3	1,59	2,46	370,48	50,6	43,21	8,20
47	пиррольный аналог КФ № 2	3	1,91	2,12	384,47	67,67	43,55	7,19
48	гетероцикл, аналог КФ № 5	3	2,26	2,86	415,55	90,98	45,91	7,86
49	охмефентанил	3	3,04	3,24	366,49	43,78	43,57	7,15
50	3-тиофен-КФ	3	3,01	3,61	400,53	78,09	44,75	7,86
51	винил-КФ	3	3,19	3,51	392,49	49,85	45,29	7,44
52	лофентанил	3	3,96	4,29	408,53	49,85	47,26	7,44
53	карфентанил (КФ)	3	3,17	3,49	394,50	49,85	45,39	7,44

Таблица составлена авторами по собственным данным

Таблица 5. Средние значения величин дескрипторов по группам

Группа веществ	Рассчитанные физико-химические дескрипторы					
	LogD _{7,4}	LogP	MW	TPSA	Polar	pK _b
Группа 1	1,46	2,49	300,7	40,79	34,04	8,35
Группа 2	3,16	4,08	355,6	33,88	42,55	8,25
Группа 3	2,51	2,83	414,9	69,86	46,58	7,28
Все вещества	2,38	3,07	365,0	51,43	41,78	7,86

Таблица составлена авторами по собственным данным

Таблица 6. Коэффициенты корреляции между физико-химическими дескрипторами

	LogD _{7,4}	LogP	MW	TPSA	Polar	pK _b	LogP — LogD _{7,4}
LogD _{7,4}	1,00	0,92	0,36	-0,31	0,58	-0,18	-0,21
LogP	0,92	1,00	0,10	-0,52	0,35	0,20	0,18
MW	0,36	0,10	1,00	0,64	0,96	-0,70	-0,68
TPSA	-0,31	-0,52	0,64	1,00	0,43	-0,56	-0,53
Polar	0,58	0,35	0,96	0,43	1,00	-0,60	-0,59
pK _b	-0,18	0,20	-0,70	-0,56	-0,60	1,00	0,97
LogP — LogD _{7,4}	-0,21	0,18	-0,68	-0,53	-0,59	0,97	1,00

Таблица составлена авторами по собственным данным

и плазме крови LogP и LogD_{7,4} показывает, что липофильность групп 1 и 2 существенно снижается при физиологическом pH. Высокоактивные вещества группы 3, имеющие меньшую величину константы основной ионизации, наоборот, демонстрируют высокую липофильность не только в воде, но и в плазме крови, что подчеркивает связь липофильности со способностью веществ к поступлению в ткани ЦНС при перераспределении в системе «кровь-мозг».

Для поиска физико-химических критериев, позволяющих проводить оценку степени опасности ЦНС-активных веществ, рассматривали коэффициенты парной корреляции между физико-химическими дескрипторами, приведенные в таблице 6. Как следует из таблицы 6, большинство дескрипторов слабо коррелируют друг с другом. Наиболее сильная корреляция наблюдается между величинами LogD_{7,4} и LogP, поскольку это очень близкие по природе параметры. Различие между ними связано

с величинами pH, при которых они определяются, и обусловлено степенью ионизации молекул веществ при этих pH. Об этом говорит очень сильная корреляция (R = 0,97) между вычисленной величиной (LogD_{7,4} — LogP) и величиной pK_b.

Сильная корреляция также наблюдается между величинами MW и Polar, что, вероятно, обусловлено пропорциональным увеличением интегральной поляризуемости молекулы, связанной с ростом числа поляризуемых фрагментов при возрастании массы. Рассмотрение полученных результатов корреляций между физико-химическими свойствами в обучающих группах ЦНС-активных веществ показало, что рассмотренные величины сами по себе и в парах не позволяют однозначно проводить распределение веществ к одной из трех групп опасных веществ.

Для анализа всего сформированного массива данных физико-химических свойств модельных веществ с целью

выявления их связи со степенью их опасного действия на организм использовали дискриминантный анализ. Дискриминантный анализ как раздел многомерного статистического анализа включает статистические методы классификации многомерных наблюдений в ситуации, когда исследователь *a priori* обладает так называемыми обучающими выборками (классификация с обучением). Дискриминантный анализ позволяет на основе измерения различных характеристик (признаков, дескрипторов) объекта классифицировать его, т.е. оптимальным способом отнести к одной из нескольких групп (классов). С помощью дискриминантного анализа определяли отличия совокупностей по среднему какой-либо переменной (или линейной комбинации переменных) для последующего использования этой переменной или линейной комбинации переменных в качестве критерия принадлежности новых их членов к той или иной группе.

Полученный массив данных подвергали процедуре линейного дискриминантного анализа (ЛДА) с пошаговым включением переменных. Как группирующая переменная выступала категория «Группа», а как независимые переменные — все остальные дескрипторы. Предварительно массив данных разбивался на 2 части: одна часть использовалась в качестве «обучающей» для построения математической модели классификации, а вторая часть выступала как контрольная для проверки полученной модели. В качестве контроля использовались последние три соединения в списке каждой группы.

В процессе ЛДА совокупности данных с пошаговым включением переменных определяли дискриминантные функции. На каждом шаге просматривали все переменные и находили ту из них, которая вносила наибольший вклад в различие между совокупностями. Эта переменная включалась в модель на данном шаге, и далее осуществляли переход к следующему шагу. Режим пошагового включения переменных позволял обойтись минимумом вовлеченных в анализ переменных. Дискриминантные функции, выражающие максимальную неоднородность групп между собой, представляли собой линейные комбинации переменных, оптимизированные так, чтобы наиболее эффективно дискриминировать группы между собой. Так как все дискриминантные функции ортогональны, они в совокупности образовывали фазовое пространство дискриминантных функций — n -мерную декартову систему координат, где n — число статистически значимых дискриминантных функций.

Дискриминантные функции являлись единственными для всей совокупности данных, вовлеченных в ЛДА, но значения корней каждой из дискриминантных функций

являлись строго специфичными для каждого вещества. Корни дискриминантных функций для каждого вещества рассчитывали путем матричного умножения вектора дескрипторов этого вещества на матрицу коэффициентов дискриминантных функций, и таким образом исходная матрица данных преобразовывалась в матрицу, содержащую вместо дескрипторов значения величин корней дискриминантных функций. Уникальные для каждого соединения значения корней, по сути, представляли собой координаты точек соответствующих соединений в фазовом пространстве дискриминантных функций. Средние значения этих корней для каждой группы определяли координаты центров групп (так называемые центроиды группы). Именно значения величин корней дискриминантных функций или координат объектов (веществ) в фазовом пространстве дискриминантных функций позволили провести классификацию объектов, т.е. соотносить конкретное вещество с какой-либо из групп по близости точки к центроиду группы.

В результате проведенного ЛДА обучающей выборки матрицы данных с дескрипторами для трех групп веществ получены две статистически значимые дискриминантные функции $dF1$ и $dF2$, полностью описывающие массив данных, из которых функция $dF1$ описывает 88% информации, содержащейся в данных, представленных в таблице 7.

Таким образом, полученные дискриминантные функции представляют собой следующие линейные комбинации значений дескрипторов:

$$dF1 = 0,051 \times MW + 2,599 \times \text{Log}P - 1,943 \times \text{Log}D_{7,4} - 0,643 \times \text{Polar} - 0,032 \times \text{TPSA} + 6,638$$

$$dF2 = 0,028 \times MW - 1,376 \times \text{Log}P - 0,845 \times \text{Log}D_{7,4} - 0,359 \times \text{Polar} + 7,010$$

Относительно близкие друг к другу по абсолютной величине и далекие от нуля стандартизованные коэффициенты для каждого дескриптора для функции $dF1$ свидетельствуют о важном вкладе всех без исключения рассмотренных физико-химических показателей в дискриминацию, выполняемую этой наиболее статистически значимой дискриминантной функцией. В принципе то же относится и к функции $dF2$, за исключением оказавшегося малозначимым показателя TPSA (топологическая площадь полярной поверхности).

Для всех модельных веществ из таблицы 4, включая контрольные, были рассчитаны значения корней дискриминантных функций $dF1$ и $dF2$. Значения корней, уникальные для каждого соединения, являются координатами

Таблица 7. Коэффициенты дискриминантных функций для групп модельных ксенобиотиков

Дескриптор	Нестандартизованные		Стандартизованные	
	$dF1$	$dF2$	$dF1$	$dF2$
MW	0,051	0,028	1,724	0,966
LogP	2,599	-1,376	2,190	-1,159
LogD _{7,4}	-1,943	0,845	-1,712	0,745
Polar	-0,643	-0,359	-2,329	-1,300
TPSA	-0,032	0,000	-0,611	-0,005
Constant	6,638	7,010	0	0
Eigenval	4,090	0,562	4,090	0,562
Cum Prop	0,879	1,000	0,879	1,000

Таблица составлена авторами по собственным данным

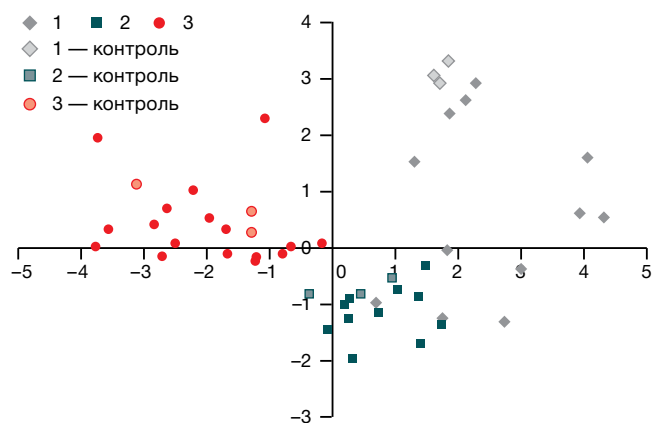


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 1. Значения корней дискриминантных функций $dF1$ и $dF2$ для групп 1, 2 и 3 модельных химических ксенобиотиков, включая контрольные соединения

точек соответствующих соединений в фазовом пространстве дискриминантных функций, представляющем собой плоскую систему координат с осями $dF1$ и $dF2$. На рисунке 1 показано расположение точек, соответствующее конкретным образцам веществ из трех групп, в фазовом пространстве функций $dF1$ и $dF2$.

Из рисунка 1 видно, что все группы хорошо отделяются друг от друга, все контрольные точки определялись в своих группах.

Для всех трех групп модельных веществ были найдены средние значения корней дискриминантных функций $dF1$ и $dF2$, которые являются координатами центроидов групп в фазовом пространстве функций $dF1$ и $dF2$ (табл. 8 и 9). Полученные дискриминантные функции, согласно данным классификационной матрицы (табл. 9), обладают высокой дискриминирующей мощностью, позволяя достаточно четко разделить группы рассматриваемых веществ между собой. В таблице 9 приведены результаты классификации

методом ЛДА как для веществ обучающей выборки, так и для всех веществ, включая контрольные.

В целом вещества были классифицированы правильно, за исключением веществ № 1, 2 и 8 из группы 1, которые уже на первых шагах ЛДА были четко отнесены к группе № 2. Это говорит о том, что математическая модель на основе физико-химических свойств, классифицирующая вещества из класса опиоидных анальгетиков по группам, построена удовлетворительно.

Таким образом, для определения принадлежности новых соединений, не входящих в исследовательский список, к одной из трех групп, необходимо:

- определить значения величин всех дескрипторов;
- рассчитать величины корней дискриминантных функций $dF1$ и $dF2$, соответствующие координатам точки данного соединения в фазовом пространстве функций $dF1$ и $dF2$;
- выбрать наименьшее расстояние от данной точки до центров каждой из групп (расстояние находится по правилам геометрии по формуле Пифагора), которое и будет указывать на принадлежность к этой группе.

Может сложиться так, что точка не будет принадлежать ни к одной из трех групп, если будет находиться относительно далеко от всех центроидов.

Для прямого вычисления показателя классификации с целью отнесения оцениваемых соединений к одной из трех групп можно использовать функции классификации CF1–CF3, предназначенные для определения, к какой группе наиболее вероятно может быть отнесен ксенобиотик. Имеется столько же функций классификации, сколько групп:

$$CF1 = 0,276 \times MW + 22,406 \times \text{Log}P - 23,622 \times \text{Log}D_{7,4} + 0,906 \times \text{Polar} - 0,160 \times \text{TPSA} - 66,585$$

$$CF2 = 0,137 \times MW + 20,566 \times \text{Log}P - 21,906 \times \text{Log}D_{7,4} + 2,657 \times \text{Polar} - 0,105 \times \text{TPSA} - 88,554$$

$$CF3 = 0,034 \times MW + 11,248 \times \text{Log}P - 15,200 \times \text{Log}D_{7,4} + 3,963 \times \text{Polar} + 0,013 \times \text{TPSA} - 97,835$$

Таблица 8. Средние значения корней дискриминантных функций $dF1$ и $dF2$ для групп модельных ксенобиотиков

Группа веществ	$dF1$	$dF2$
Группа 1	$2,485 \pm 1,225$	$0,675 \pm 1,368$
Группа 2	$0,797 \pm 0,716$	$-1,176 \pm 0,485$
Группа 3	$0,797 \pm 0,716$	$0,255 \pm 0,809$

Таблица подготовлена авторами по собственным данным

Таблица 9. Матрица классификации, полученная для веществ обучающей выборки и для всех веществ, включая контрольные

Только обучающая выборка	Группа	% правильной классификации	Группа 1	Группа 2	Группа 3
	1	75	9	3	0
	2	100	0	11	0
	3	100	0	0	19
	Итого	92,9	9	14	19
Все вещества	Группа	% правильной классификации	Группа 1	Группа 2	Группа 3
	1	80	12	3	0
	2	100	0	14	0
	3	100	0	0	22
	Итого	94,1	12	17	22

Таблица подготовлена авторами по собственным данным

Для каждого нового либо известного соединения рассчитываются все три функции, и соединение относят к той группе, для которой классификационная функция имеет наибольшее значение.

При выявлении новых ЦНС-активных веществ и ксенобиотиков на основании предложенных физико-химических критериев они могут быть отнесены к одной из трех групп: вещества с риском проявления опасности, вещества с риском проявления высокой опасности и вещества с риском проявления чрезвычайно высокой опасности.

Оценку работоспособности созданной математической модели проводили с помощью классификации веществ обучающей выборки. Полученные результаты классификации веществ, отличные от изначального отнесения к группам в обучающей выборке, приведены в таблице 10.

По результатам проведенной классификации для десяти из пятидесяти трех модельных веществ была спрогнозирована потенциально большая опасность, чем предполагалось изначально. Работоспособность предложенной модели оценки потенциальной опасности ЦНС-активных веществ продемонстрировал пример лекарственного препарата пропоксифен: изначально его отнесли к группе 1, но в результате анализа он был четко распределен в группу 2 — веществ с риском проявления высокой опасности. И действительно, данный препарат начиная с 2009 года в ряде стран обозначен как опасный и снят с производства из-за высокого риска наступления смертельных передозировок и сердечных аритмий². Приведенные в таблице 10 результаты также показывают, что отдельные лекарственные препараты и выявляемые в незаконном обороте вещества могут нести в себе определенные риски при неконтролируемом применении, что согласуется с литературными данными об их токсическом действии [22].

Лекарственные препараты дифеноксилат и бупренорфин, отнесенные по итогу классификации в группы 2 и 3 соответственно, могут рассматриваться как фармакологические исключения. Дифеноксилат используют при желудочно-кишечных расстройствах, и его действие направлено на опиоидные рецепторы, расположенные в кишечнике. Поэтому чрезмерно высокая липофильность дифеноксилата препятствует его действию на ЦНС [23]. Бупренорфин, относящийся к семейству высокоактивных «соединений Бентли», — мощное лекарственное

средство, которое могло быть так же опасно, как и родственный ему эторфин. Но фармакологически он проявляет свойства агониста-антагониста опиоидных рецепторов и не представляет выраженной опасности для жизни человека. Полученные результаты подчеркивают, что разработанная модель, основанная на физико-химических свойствах веществ, не может учитывать особенности их влияния на целевые мишени в центральной нервной системе, такие как рецепторы, ферменты, и в получаемых решениях возможны ложноположительные и ложноотрицательные результаты. В то же время верное отнесение большинства модельных соединений к группам по степени их опасности показывает определяющее влияние физико-химических свойств на токсическое действие наркотических анальгетиков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На примере представителей одного из классов ЦНС-активных веществ показана связь потенциальной опасности наркотических анальгетиков и их физико-химических свойств, определяющих перераспределение таких веществ из центрального кровотока в ткани центральной нервной системы. Молекулярная масса, липофильность, способность к кислотно-основной диссоциации, полярность и поляризуемость ЦНС-активных веществ влияют на особенности их токсического действия в не меньшей степени, чем способность к связыванию с целевыми рецепторами. Поэтому такие физико-химические свойства могут выступать критериями, обуславливающими степень опасности ЦНС-активных ксенобиотиков.

Методом линейного дискриминантного анализа с пошаговым включением переменных обучающей выборки представителей одного из классов ЦНС-активных веществ — опиоидных анальгетиков, разделенных на три группы по степени опасности, построена математическая модель классификации психоактивных веществ на основании их физико-химических свойств. Модель включала в себя две дискриминантные функции $dF1$ и $dF2$ как линейные комбинации значений физико-химических дескрипторов и позволила достаточно полно разделить рассмотренные группы наркотических анальгетиков между собой по критерию потенциальной опасности. Для отнесения новых соединений к той или иной группе вычислены функции классификации $CF1$ – $CF3$.

Таблица 10. Результаты классификации веществ, отличные от обучающей выборки

№ п/п	Модельный объект	Изначальная группа	Результат расчета классификационных функций			Определенная группа
			CF1	CF2	CF3	
1	фентанил	1	72,67	75,38	72,13	2
2	бупренорфин	1	117,08	122,51	122,32	2
3	пропоксифен	1	74,24	75,65	69,24	2
4	дифеноксилат	1	97,91	107,42	109,98	3
5	β -гидрокси-тиофентанил	2	64,01	67,06	73,06	3
6	β -гидрокси-фентанил	2	62,37	66,13	70,84	3
7	ремифентанил	2	61,15	60,83	68,69	3
8	алфентанил	2	76,10	81,34	93,42	3
9	суфентанил	2	86,61	90,79	91,79	3

Таблица подготовлена авторами по собственным данным

² Gander A. Physicians Say Good Riddance to Worst Drug in History. 2011. <https://www.medscape.com/viewarticle/736718?src=mp&spon=25&form=fpf> (дата обращения: 16.01.2024).

Работоспособность предложенной математической модели оценки степени опасности ЦНС-активных ксенобиотиков продемонстрирована на примере классификации обучающей выборки веществ. Результат показал правильное отнесение для сорока четырех веществ из пятидесяти трех, для семи веществ отнесение к группам было уточнено по итогам классификации, и два вещества оказались фармакологическими исключениями.

Вычисленные классификационные функции можно легко встроить в виде формул в табличные редакторы или специализированное программное обеспечение и базы данных для автоматической классификации новых и известных соединений. При условии определения количественного выражения силы и быстроты действия на организм опиоидных анальгетиков и других параметров

молекул вполне возможно проведение математического анализа с целью установления количественной связи характеристик их биологической активности и структуры QSAR (quantitative structure-activity relationship — количественных соотношений «структура-активность»). Существенный интерес представляет применимость полученных в исследовании результатов к другим классам ЦНС-активных веществ.

Без сомнения, при всем совершенстве любых предиктивных методов их результаты требуют подтверждения традиционными токсикологическими методами, но показанная возможность оперативного выявления потенциально опасных ксенобиотиков будет полезна для профилактики массовых отравлений при попадании таких ЦНС-активных веществ в незаконный оборот.

Литература / References

1. Заикина ОЛ, Лодягин АН, Шилов ВВ. Гамма-оксибутират и производные фентанила: химико-токсикологическое подтверждение отравлений. *Судебная медицина*. 2016;2(2):112–3. Zaikina OL, Lodjagin AN, Shilov VV. Gamma-hydroxybutyrate and fentanyl derivatives: chemical and toxicological confirmation of poisoning. *Russian Journal of Forensic Medicine*. 2016;2(2):112–3 (In Russ.). EDN: [YHZMBF](#)
2. Stanley TH, Egan TD, Aken HVan. A. Tribute to Dr. Paul A. J. Janssen: Entrepreneur Extraordinaire, Innovative Scientist, and Significant Contributor to Anesthesiology. *Anesth. Analg.* 2008;106(2):451–62. <https://doi.org/10.1213/ane.0b013e3181605add>
3. Lindsay CD, Riches JR, Timperley CM. Chemical Warfare Toxicology. Management of Poisoning Chemical Defence Against Fentanyl. *The Royal Society of Chemistry*. 2016;259–313. <https://doi.org/10.1039/9781782628071-00259>
4. Соснов АВ, Семченко ФМ, Тохмахчи ВН, Соснова АА и др. Критерии выбора соединений для разработки сильнодействующих анальгетиков и других лекарств центрального действия. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;3(24):42–56. Sosnov AV, Semchenko FM, Tohmahchi VN, Sosnova AA, et al. Selection criteria of compounds for development of high-potent analgesics and other CNS drugs. *Drug development & registration*. 2018;3(24):42–56 (In Russ.). EDN: [QYVYND](#)
5. Kelly E, Sutcliffe K., Cavallo D, Ramos-Gonzalez N, Alhosan N, et al. The anomalous pharmacology of fentanyl. *Br J Pharmacol*. 2023;180(7):797–812. <https://doi.org/10.1111/bph.15573>
6. Соснов АВ, Голубев СС, Пункевич БС, Садовников СВ, Загребин ЕМ и др. Стандартные образцы контролируемых сильнодействующих компонентов препаратов анальгетиков. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;1(14):216–23. Sosnov AV, Golubev SS, Punkevich BS, Sadovnikov SV, Zagrebina EM, et al. Reference standards of active ingredients of potent analgesic drugs. *Drug development & registration*. 2016;1(14):216–23 (In Russ.). EDN: [WBODLX](#)
7. Volpe DA, McMahon Tobin GA, Mellon RD et al. Uniform assessment and ranking of opioid μ receptor binding constants for selected opioid drugs. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2011;59(3):385–90. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2010.12.007>
8. Уйба ВВ, Криворотов ДВ, Забелин МВ, Радилов АС, Рембовский ВР и др. Антагонисты опиоидных рецепторов. От настоящего к будущему. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2018;20(3):356–70. EDN: [YPHKPZ](#)
9. Skolnick P. Treatment of overdose in the synthetic opioid era. *Pharmacol. Ther.* 2022;233:108019. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.108019>
10. Головкин АИ, Ивницкий ЮЮ, Рейнюк ВЛ и др. Причины высокой летальности при передозировках наркотических средств из группы синтетических опиоидов. *Medline.ru. Российский биомедицинский журнал*. 2020;21:141–56. Golovko AI, Ivitsky Yu.Yu., Rejniuk VL, et al. Reasons for high lethality in overdose of drugs from the group of synthetic opioids. *Medline.ru*. 2020;21:141–56 (In Russ.). EDN: [CMQERC](#)
11. Hill R, Santhakumar R, Dewey W, Kelly E, Henderson G. Fentanyl depression of respiration: Comparison with heroin and morphine. *Br J Pharmacol*. 2020;177(2):254–66. <https://doi.org/10.1111/bph.14860>
12. Bachmutsky I, Wei XP, Kish E, Yackel K. Opioids depress breathing through two small brainstem sites. *Elife*. 2020;19:9:e52694. <https://doi.org/10.7554/eLife.52694>
13. Vardanyan RS, Hruby VJ. Vardanyan RS, Hruby VJ. Fentanyl-related compounds and derivatives: current status and future prospects for pharmaceutical applications. *Future Med Chem*. 2014;6(4):385–412. <https://doi.org/10.4155/fmc.13.215>
14. Bagley JR, Thomas SA, Rudo FG, Spencer HK, Doorley BM et al. New 1-(heterocyclylalkyl)-4-(propionanilido)-4-piperidinyl methyl ester and methylene methyl ether analgesics. *J Med Chem*. 1991;34(2):827–41. <https://doi.org/10.1021/jm00106a051>
15. Boström E, Hammarlund-Udenaes M, Simonsson US. Blood-brain barrier transport helps to explain discrepancies in in vivo potency between oxycodone and morphine. *Anesthesiology*. 2008;108(3):495–505. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e318164cf9e>
16. Лазарев НВ. Наркотики. Л.: Ин-т гигиены труда и профзаболеваний Ленгорздраводела. 1940. Lazarev NV. Narcotic drugs. Leningrad: *In-t'gigieny truda i profzabolevanij Lengorzdravotdela*. 1940 (In Russ.).
17. Раевский ОА, Солодова СЛ, Раевская ОЕ, Манхольд Р. Количественная взаимосвязь структуры органических соединений и их способности проникать через гематоэнцефалический барьер. *Химико-фармацевтический журнал*. 2012;46(3):3–8. Raevsky OA, Solodova SL, Raevskaya OE, Mannhold R. Quantitative relationship between the chemicals structure and BBB-crossing ability of organic compounds. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2012;46(3):3–8 (In Russ.). <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2012-46-3-3-8>
18. Pajouhesh H, Lenz GR. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *NeuroRx*. 2005;2(4):541–53. <https://doi.org/10.1602/neurorx.2.4.541>

19. Noha SM, Schmidhammer H, Spetea M. Molecular docking, molecular dynamics, and structure-activity relationship explorations of 14-oxygenated N-methylmorphinan-6-ones as potent μ -opioid receptor agonists. *ACS Chem Neurosci*. 2017;8(6):1327–37.
<https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.6b00460>
20. Sugano K, Kansy M, Artursson P, Avdeef A, Bendels S, et al. Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(8):597–614.
<https://doi.org/10.1038/nrd3187>
21. Šegan S, Jevtić I, Tosti T, Penjišević J, Šukalović V et al. Determination of lipophilicity and ionization of fentanyl and its 3-substituted analogs by reversed-phase thin-layer chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2022;1211:123481.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123481>
22. Suzuki J, El-Haddad S. A review: Fentanyl and non-pharmaceutical fentanyl. *Drug Alcohol Depend*. 2017;171:107–16.
<https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2016.11.033>
23. Криворотов ДВ, Кочура ДМ, Дулов СА, Радилов АС. Экспериментальное сравнение липофильности антагонистов опиоидов. *Токсикологический вестник*. 2022;30(3):149–57.
Krivorotov DV, Kochura DM, Dulov SA, Radilov AS. Experimental comparing of lipophilicity of opioid antagonists. *Toxicological Review*. 2022;30(3):149–57 (In Russ.).
<https://doi.org/10.47470/0869-7922-2022-30-3-149-157>
24. Janicka M, Janicka M, Sztanke M, Sztanke K. Reversed-phase liquid chromatography with octadecylsilyl, immobilized artificial membrane and cholesterol columns in correlation studies with in silico biological descriptors of newly synthesized antiproliferative and analgesic active compounds. *J Chromatogr A*. 2013;1318:92–101.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.09.060>
25. Николаев АИ, Шкаева ИЕ, Солнцева СА, Никулина ОС. Расчет токсических свойств галогензамещенных углеводородов нормального строения по физико-химическим параметрам молекулы. *Химическая промышленность*. 2019;96(4):205–11.
Nikolaev AI, Shkaeva IE, Solnceva SA, Nikulina OS. Calculation of the toxic properties of halogenated hydrocarbons of normal structure according to the physico-chemical parameters of the molecule. *Russian Chemical Industry*. 2019;96(4):205–11 (In Russ.).
EDN: [TOOJXY](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.09.060)
26. Николаев АИ, Антонова ИН, Донская ОС, Владимиров ЛГ. Алгоритм анализа ЛК-спектров для неинвазивной диагностики заболеваний по образцам ротоглоточного смыва. *Медицинский алфавит*. 2019;4(35):23–7.
Nikolaev AI, Antonova IN, Donskaja OS, Vladimirova LG. LC-spectra analysis algorithm for non-invasive diagnostics by oropharyngeal washout samples. *Medical alphabet*. 2019;4(35):23–7 (In Russ.).
[https://doi.org/10.33667/2078-5631-2019-4-35\(410\)-23-27](https://doi.org/10.33667/2078-5631-2019-4-35(410)-23-27)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Д.В. Криворотов — составление проекта работы, существенный вклад в дизайн работы, сбор и анализ данных; А.И. Николаев — математическая обработка и интерпретация данных; А.С. Радилов — проект работы, критический анализ материалов на предмет важного интеллектуального содержания, утверждение версии для публикации; В.Р. Рембовский — критический анализ работы на предмет важного интеллектуального содержания; В.А. Кузнецов — дизайн работы, оценка научной новизны исследования.

ОБ АВТОРАХ

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

Николаев Анатолий Иванович, канд. хим. наук
<https://orcid.org/0009-0007-1405-8683>
ainikolaev1956@gmail.com

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

Рембовский Владимир Романович, д-р мед. наук, профессор
niigpech@rihophe.site

Кузнецов Виктор Анатольевич, канд. хим. наук
niigpech@rihophe.site

<https://doi.org/10.47183/mes.2025-27-1-26-36>

УДК 615.9



НОВАЯ ONE-POT МЕТОДИКА ПОЛУЧЕНИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ИНДАПАМИДА ПУТЕМ ОКИСЛЕНИЯ-КОНЬЮГАЦИИ НА МАЛДИ-МИШЕНИ

О.А. Кельцьева^{1,2}, А.А. Афанасьева¹, С.К. Ильюшонок^{2,3}, А.С. Гладчук^{1,2,3}, А.Н. Арсеньев², А.С. Фролов², В.Н. Бабаков³, К.А. Краснов^{1✉}, Е.П. Подольская²

¹ Научно-клинический центр токсикологии имени академика С. Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

² Институт аналитического приборостроения Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

³ Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека Федерального медико-биологического агентства, Ленинградская обл., Россия

Введение. Метаболическая активация ксенобиотиков, в том числе лекарственных средств, считается одним из основных механизмов развития идиосинкразических реакций. Соответственно, потенциальная биоактивация ксенобиотика должна быть тщательно оценена на ранних этапах разработки лекарств. В связи с этим поиск новых быстрых и эффективных методик скрининга реакционноспособных метаболитов ксенобиотиков является актуальным.

Цель. Разработка новой методики моделирования процессов биотрансформации ксенобиотиков *in vitro* для выявления потенциальных метаболитов индапамида.

Материалы и методы. В качестве методов сравнения были выбраны такие неферментативные инструментальные методы, как электрохимическое окисление (ЭХО) и фотокаталитическое окисление (ФКО) в объеме. Моделирование второй фазы метаболизма осуществлялось путем инкубации продуктов окисления индапамида с улавливающим агентом (глутатион, GSH). Продукты окисления, а также их конъюгаты с GSH затем анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией. В основе новой one-pot методики моделирования метаболизма лежит проведение УФ-индуцированного ФКО ксенобиотика в присутствии GSH на функционализированной диоксидом титана поверхности мишени с последующей регистрацией продуктов с помощью масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией.

Результаты. В случае ЭХО было обнаружено 5 метаболитов и 3 аддукта с GSH, а при использовании ФКО в объеме было выявлено 7 метаболитов и 1 аддукт с GSH. При использовании новой one-pot методики было найдено 8 аддуктов с GSH. Помимо ряда выявленных известных метаболитов индапамида и их конъюгатов с GSH, в совокупности тремя методами для индапамида было зафиксировано по 4 ранее не изученных метаболита и аддукта с GSH.

Выводы. По сравнению с ЭХО и ФКО в объеме предложенный аналитический подход к моделированию метаболизма индапамида показал более высокую информативность в сочетании с простотой и экспрессностью, что делает его перспективным для использования в доклинических исследованиях лекарственных препаратов при прогнозировании метаболизма и токсичности объектов фармацевтической разработки, а также при изучении процессов биотрансформации различных ксенобиотиков.

Ключевые слова: индапамид, МАЛДИ масс-спектрометрический анализ, аддукты, электрохимическое окисление, глутатион, фотокаталитическое окисление, ксенобиотик, реактивные метаболиты

Для цитирования: Кельцьева О.А., Афанасьева А.А., Ильюшонок С.К., Гладчук А.С., Арсеньев А.Н., Фролов А.С., Бабаков В.Н., Краснов К.А., Подольская Е.П. Новая one-pot методика получения потенциальных метаболитов индапамида путем окисления-конъюгации на МАЛДИ-мишени. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2025;27(1):26–36. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-27-1-26-36>

Финансирование: исследование выполнено в рамках государственного задания № 388-00072-23-00, НИР шифр «Мишень».

Благодарности: авторы выражают благодарность за техническую поддержку ресурсному центру «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка СПбГУ за возможность работы с МАЛДИ масс-спектрометрическим оборудованием.

Потенциальный конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

✉ Краснов Константин Андреевич krasnov_tox@mail.ru

Статья поступила: 29.09.2024 После доработки: 03.02.2025 Принята к публикации: 13.02.2025

A NEW ONE-POT TECHNIQUE FOR OBTAINING POTENTIAL INDAPAMIDE METABOLITES BY OXIDATION AND CONJUGATION ON MALDI TARGET

Olga A. Keltsieva^{1,2}, Anna A. Afanasyeva¹, Semyon K. Ilyushonok^{2,3}, Alexey S. Gladchuk^{1,2,3}, Alexander N. Arseniev², Alexander S. Frolov², Vladimir N. Babakov³, Konstantin A. Krasnov^{1✉}, Ekaterina P. Podolskaya²

¹ Golikov Research Center of Toxicology, St. Petersburg, Russia

² Institute of Analytical Instrumentation RAS, St. Petersburg, Russia

³ Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Leningrad region, Russia

Introduction. Metabolic activation of xenobiotics, including pharma drugs, is considered to be one of the main mechanisms for the development of idiosyncratic reactions. Accordingly, the potential bioactivation of a xenobiotic should be carefully evaluated in the early stages of drug development. In this regard, the search for new rapid and effective screening techniques for reactive metabolites of xenobiotics presents particular interest.

Objective. Development of a new technique for modeling the processes of xenobiotic biotransformation *in vitro* to identify potential metabolites of indapamide.

Materials and methods. Non-enzymatic instrumental methods, such as electrochemical oxidation (ECO) and photocatalytic oxidation (PCO) in volume, were used as comparison methods. The second phase of metabolism was modeled by incubating the oxidation products of indapamide with a trapping agent (glutathione, GSH). The oxidation products, as well as their conjugates with GSH, were then analyzed by high-performance liquid chromatography–tandem

© О.А. Кельцьева, А.А. Афанасьева, С.К. Ильюшонок, А.С. Гладчук, А.Н. Арсеньев, А.С. Фролов, В.Н. Бабаков, К.А. Краснов, Е.П. Подольская, 2025

mass spectrometry (HPLC–MS/MS). The developed one-pot technique for metabolism modeling is based on a UV-induced PCO of a xenobiotic in the presence of GSH on the surface of a target functionalized with titanium dioxide followed by detection of the products by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI).

Results. In use of ECO resulted in the detection of 5 metabolites and 3 adducts with GSH, while the use of PCO in the volume allowed detection of 7 metabolites and 1 adduct with GSH. The new one-pot technique detected 8 adducts with GSH. In addition to the detection of a number of known indapamide metabolites and their conjugates with GSH, a total of 4 previously unstudied metabolites and adducts with GSH were each detected for indapamide by the three methods.

Conclusions. In comparison with ECO and PCO in volume, the proposed analytical technique for modeling indapamide metabolism showed its higher informativity combined with simplicity and rapidity, which makes it a promising candidate for use in preclinical studies of drugs in predicting the metabolism and toxicity of pharmaceutical objects, as well as in studying the biotransformation processes of various xenobiotics.

Keywords: indapamide; MALDI mass spectrometric analysis; adducts; electrochemical oxidation; glutathione; photocatalytic oxidation; xenobiotics; reactive metabolites

For citation: Keltsieva O.A., Afanasyeva A.A., Ilyushonok S.K., Gladchuk A.S., Arseniev A.N., Frolov A.S., Babakov V.N., Krasnov K.A., Podolskaya E.P. A new one-pot technique for obtaining potential indapamide metabolites by oxidation and conjugation on MALDI target. *Extreme Medicine*. 2025;27(1):26–36. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-27-1-26-36>

Funding: the work was carried out within the framework of the State task of the Federal Medical-Biological Agency № 388-00072-23-00, scientific research work code: "Mishen".

Acknowledgements: the Research Resource Center for Molecular and Cellular Technologies of the Research Park of St. Petersburg State University is acknowledged for technical support with MALDI-MS instrumentation

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

✉ Konstantin A. Krasnov krasnov_tox@mail.ru

Received: 29 Sep. 2024 **Revised:** 3 Feb. 2025 **Accepted:** 13 Feb. 2025

ВВЕДЕНИЕ

Индапамид (ИПМ), представляющий собой сульфаниламидное производное индольного ряда, рассматривается как одно из наиболее эффективных диуретических средств, применяемых при артериальной гипертензии и застойной сердечной недостаточности¹.

ИПМ, структура которого приведена на рисунке 1, является галогенсодержащим соединением с брутто-формулой $C_{16}H_{16}ClN_3O_3S$ (m/z $[M-H]^-$ 364,05).

Применение ИПМ может сопровождаться рядом побочных эффектов, среди которых отмечены реакции гиперчувствительности: сыпь и фоточувствительность [2–4].

Возникновение идиосинкразических реакций на чужеродные для организма химические соединения (ксенобиотики) во многом определяется их метаболической биотрансформацией². В этом плане ИПМ, который активно метаболизирует в организме человека, представляет интересным объектом для углубленного изучения продуктов его биотрансформации, идентификация которых может быть весьма полезной для отслеживания механизмов возникновения кожных реакций и иных проявлений индивидуальной непереносимости лекарственных препаратов и ксенобиотиков.

Процессы превращений ксенобиотиков в организме подразделяются на три основные фазы. Первая — химическая трансформация под действием окислительно-восстановительных или гидролитических ферментов с образованием первичных метаболитов, как правило, обогащенных полярными функциональными группами. Это повышает гидрофильность молекул, благодаря чему они эффективнее выводятся из организма [5]. В ходе второй фазы первичные метаболиты могут вступать в реакции конъюгации с эндогенными молекулами, образуя стабильные (ковалентные) аддукты [6]. Во время третьей фазы

продукты метаболизма выводятся из организма, что происходит обычно при участии транспортных белков [7].

Следует отметить, что наибольшую опасность для организма представляют короткоживущие метаболиты ксенобиотиков, так как они за счет своей высокой реакционной способности вступают в реакции с белками, нарушая тем самым их функциональную активность. Непосредственно детектировать реактивные метаболиты в организме непросто, однако возможно их косвенное определение через аддукты с биомолекулами. По сравнению со свободными метаболитами такие аддукты (конъюгаты) являются более информативными биомаркерами воздействия на организм экзогенного соединения в связи с более длительным пребыванием в организме [8]. Одним из важнейших конъюгирующих агентов в организме служит восстановленный глутатион (GSH) — трипептид, имеющий ключевое значение для защиты клеток от токсического повреждения ксенобиотиками [9]. В процессе метаболизма ксенобиотиков GSH реагирует с такими субстратами, как эпоксиды, галогениды, активные непредельные соединения, после чего образующиеся аддукты выводятся из организма с желчью или мочой [10]. В связи с этим GSH используют в модельных экспериментах в качестве низкомолекулярной ловушки для выявления реакционноспособных продуктов метаболизма

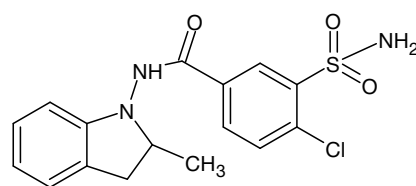


Рисунок подготовлен по данным [1]

Рис. 1. Структурная формула индапамида

¹ Машковский МД. Лекарственные средства. М.: Новая Волна; 2024.

² Граник ВГ. Метаболизм экзогенных соединений. Лекарственные средства и другие ксенобиотики. М.: Вузовская книга; 2015.

ксенобиотиков. Такие исследования являются важным этапом фармацевтической разработки, поскольку позволяют предсказать токсичность и оценить безопасность потенциального лекарственного препарата [11].

Традиционно для моделирования метаболизма ксенобиотиков применяют биохимические методы с использованием клеток или субклеточных фракций. К последним относятся микросомы печени, содержащие ферменты первой фазы метаболизма (цитохром P450), цитозоль, обогащенную ферментами второй фазы (трансферазами), или фракцию S9, содержащую полный набор метаболических ферментов I и II фаз биотрансформации ксенобиотиков [5, 12, 13]. Однако биохимические методы имеют ряд недостатков, среди которых можно отметить низкую производительность, высокую трудозатратность, сложность выделения индивидуальных метаболитов из биологических матриц и другие.

В связи с этим в последнее время активно разрабатываются альтернативные подходы к моделированию метаболизма на основе неферментативных инструментальных методов, не требующих использования биологических матриц, что позволяет существенно сократить время и затраты на исследование [14]. Чаще всего для этого используют такие методы, как электрохимическое окисление (ЭХО) [15] или фотокаталитическое окисление (ФКО) [16].

В методе ЭХО окисление ксенобиотиков проводят в электрохимическом реакторе, где окислителем выступают активные формы кислорода [17, 18]. Сопряжение электрохимической ячейки с масс-спектрометром [19] или хромато-масс-спектрометром [20] позволяет регистрировать продукты ЭХО в режиме реального времени. Этот способ позволяет моделировать не только первую, но и вторую фазу метаболизма, если после ЭХО проводят обработку улавливающими агентами, такими как GSH или цистеин [21]. Как показано на примере N-деалкилирования имипрамина и диазепама в исследовании Shono T. et al. [22], применение ЭХО обеспечивает больший выход метаболитов по сравнению с микросомальной фракцией.

В другом методе моделирования метаболизма ФКО, реакции окисления ксенобиотиков инициируются под действием светового излучения в присутствии катализаторов [23]. Диоксид титана (TiO_2) является одним из наиболее активно используемых фотокатализаторов благодаря своим оптическим и фотохимическим свойствам, а также низкой стоимости [24]. Кроме того, в работе Ruokolainen M. et al. [25] было показано, что индуцированное ультрафиолетовым излучением фотокаталитическое окисление в суспензии диоксида титана (УФ/TiO_2 -ФКО) позволяет воспроизводить больше реакций первой фазы метаболизма, происходящих в микросомах печени человека, чем при использовании ЭХО или реакции Фентона.

Несмотря на развитие новых подходов к моделированию биотрансформации ксенобиотиков, исследование метаболизма в каждом новом случае, тем не менее представляет сложную и трудоемкую задачу. В связи с этим разработка более простой и эффективной методики получения и идентификации метаболитов ксенобиотиков является актуальной.

Цель исследования — разработка новой методики моделирования процессов биотрансформации ксенобиотиков *in vitro* для выявления потенциальных метаболитов индапамида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Электрохимическое окисление индапамида и получение аддуктов с глутатионом

При разработке методики ЭХО ИГМ опирались на данные, полученные в работе [26], с использованием аналогичной системы для ЭХО. В пробирку объемом 15 мл помещали 10 мг субстанции ИГМ (analytical standard; Merck, Германия) и добавляли 10 мл метанола (HPLC grade; Merck, Германия), после чего интенсивно перемешивали с помощью перемешивающего устройства типа «вортекс» BR-2000 Vortexer (Bio-Rad, США) до растворения субстанции. Для получения рабочего раствора ИГМ stock-раствор (1 мг/мл в метаноле) разбавляли 75% (об./об.) водным ацетонитрилом (HPLC grade; Merck, Германия) с добавлением формиата аммония (10 mM; pH 7,4; чистота 97%; Merck, Германия) до концентрации 50 мкг/мл.

Трехэлектродную электрохимическую ячейку μ -PrepCell™ (объем 0,7 мкл, слой электролита 50 мкм, рабочий электрод — Glassy carbon) в составе ROXY™ EC system (Antec, Нидерланды) предварительно промывали 5 мл дистиллированной воды с помощью автоматического шприцевого насоса Harvard (702212B, Harvard Apparatus, США) со скоростью потока 100 мкл/мин. После этого через ячейку пропускали 5 мл 50% (об./об.) водного раствора ацетонитрила со скоростью потока 100 мкл/мин.

Для проведения ЭХО через ячейку пропускали 100 мкл рабочего раствора ИГМ со скоростью 15 мкл/мин. Электролиз проводили при 37 °C и постоянном напряжении 2,4 В. Продукты окисления ИГМ собирали в микропробирку, раствор метаболитов разбавляли пятикратно деионизованной водой и помещали в вials для последующего ВЭЖХ-МС/МС анализа.

При исследовании аддуктов с GSH (чистота >98%; Merck, Германия) раствор, прошедший через электрохимическую ячейку, собирали в пробирку, содержащую 100 мкл водного раствора GSH (1 мг/мл), и инкубировали в течение часа при температуре 37 °C. Затем полученную смесь с GSH разбавляли в 25 раз деионизованной водой и переносили в вials для последующего анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС).

Индукцированное ультрафиолетовым излучением фотокаталитическое окисление индапамида в присутствии наночастиц диоксида титана в микропробирке и получение аддуктов с глутатионом

При разработке методики УФ/TiO_2 -ФКО ИГМ опирались на ранее предложенный подход, описанный в работе [27]. В пробирку объемом 1,5 мл помещали 10 мг субстанции ИГМ и добавляли 1 мл метанола, после чего интенсивно перемешивали с помощью перемешивающего устройства типа «вортекс» BR-2000 Vortexer до растворения субстанции. Для получения рабочего раствора stock-раствор ИГМ (10 мг/мл в метаноле) разбавляли деионизованной водой до концентрации 1 мг/мл.

В микропробирку объемом 2 мл добавляли 10 мг наночастиц диоксида титана TiO_2 (соотношение полиморфных модификаций анатаз: рутил = 80/20; «Плазмотерм», Россия) и 2 мл деионизованной воды. После чего помещали суспензию в ультразвуковую ванну на 10 мин.

Полученную суспензию (5 мг/мл) использовали сразу после приготовления.

В микропробирку объемом 0,2 мл добавляли 12,5 мкл раствора ИПМ (1 мг/мл в 10% (об./об.) водном метаноле), 12,5 мкл суспензии TiO_2 (5 мг/мл), 150 мкл деионизованной воды. Затем открытую микропробирку помещали в пластиковый держатель и накрывали изготовленной в лаборатории панелью для ультрафиолетового облучения (светодиоды BL-L522VC ($\lambda_{\text{max}} = 405 \text{ нм}$; Betlux Electronics, Китай), закрепленные на непроводящей подложке), выдерживали в течение 30 мин. При поиске аддуктов с GSH после завершения облучения к суспензии добавляли 5 мкл водного раствора GSH (5 мг/мл) и инкубировали в течение часа при температуре 37 °C.

Для очистки от TiO_2 использовали центрифужные фильтры Costar® Spin-X® (размер пор — 0,22 мкм, нейлоновая мембрана; Corning, США). В фильтр добавляли 150 мкл суспензии с продуктами окисления ИПМ и 150 мкл деионизованной воды, после чего центрифугировали в течение 5 мин при 10 000 г с использованием центрифуги MiniSpin (Eppendorf, Германия). Фильтрат переносили в другую микропробирку, а к использованному фильтру добавляли 300 мкл ацетонитрила с 0,1% (об./об.) муравьиной кислотой (чистота 98%; Merck, Германия) и снова центрифугировали в течение 5 мин при 10 000 г. Данный фильтрат объединяли с полученным ранее и упаривали с помощью центрифужного испарителя SpeedVac (Eppendorf, Германия). К осадку добавляли 5% (об./об.) водный ацетонитрил с 0,1% (об./об.) муравьиной кислотой до итоговой концентрации GSH 20 мкг/мл, полученный раствор затем помещали в вial для последующего ВЭЖХ-МС/МС анализа.

Индуктированное ультрафиолетовым излучением фотокаталитическое окисление индапамида в присутствии наночастиц диоксида титана и получение аддуктов с глутатионом на поверхности МАЛДИ-мишени

В качестве подложки использовали полированную МАЛДИ-мишень из нержавеющей стали. На поверхность ячеек МАЛДИ-мишени наносили по 2 мкл суспензии TiO_2 (2 мг/мл) и высушивали при комнатной температуре.

На ячейки мишени, функционализированные TiO_2 , наносили:

- 10 мкл деионизованной воды (контроль);
- 9 мкл деионизованной воды и 1 мкл водного раствора GSH (100 мкг/мл) (контроль);
- 7 мкл деионизованной воды, 2 мкл раствора ИПМ (50 мкг/мл) и 1 мкл раствора GSH (100 мкг/мл) (определение аддуктов GSH с продуктами окисления).

Мишень с нанесенными образцами накрывали ранее описанной панелью для ультрафиолетового облучения и облучали в течение 30 мин. После завершения облучения отбирали по 1 мкл из каждой капли и переносили на соседнюю ячейку, после чего добавляли 1 мкл раствора (20 мг/мл в 80% (об./об.) водном ацетонитриле с 0,1% (об./об.) трифторуксусной кислотой (чистота 99%; Merck, Германия)) матрицы 2,5-дигироксibenзойной кислоты (DHB; Bruker Daltonik GmbH, Германия). Мишень высушивали при комнатной температуре перед анализом методом МАЛДИ масс-спектрометрии.

Анализ продуктов окисления индапамида и их аддуктов с глутатионом методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией

Для проведения ВЭЖХ-МС/МС анализа использовали аналитическую систему, состоящую из жидкостного хроматографа Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies, США) и масс-спектрометра типа «ионная ловушка» AmaZon ETD (Bruker Daltonik GmbH, Германия) с источником ионов с ионизацией электрораспылением. Экспериментальные данные регистрировали и обрабатывали с помощью программного пакета DataAnalysis 5.0 (Bruker Daltonik GmbH, Германия).

Хроматографическое разделение осуществляли при следующих условиях: колонка — ZORBAX Eclipse Plus C18 Rapid Resolution High Definition (2,1×150 мм, 1,8 мкм; Agilent Technologies, США); температура колонки 40 °C; скорость потока подвижной фазы 200 мкл/мин; объем вводимой пробы 5 мкл; фаза А — 0,1% (об./об.) водный раствор муравьиной кислоты; фаза Б — 0,1% (об./об.) раствор муравьиной кислоты в 90% (об./об.) водном ацетонитриле; режим элюирования — градиентный: 5% Б (0–2 мин), 5–60% Б (2–30 мин), 60% Б (30–31 мин), 60–5% Б (31–32 мин), 5% Б (32–37 мин).

Масс-спектрометрический анализ осуществляли при следующих условиях работы масс-спектрометра: напряжение на капилляре 4,5 кВ; давление небулайзера 2,2 бар; осушающий газ — азот; скорость потока осушающего газа 9 л/мин; температура осушающего газа 280 °C; режим работы — Auto MS/MS; режим сканирования — Auto MS/MS; диапазон m/z 100–1000; скользящая средняя — отключена; частота спектров 4 Гц; тип фрагментации — диссоциация, активированная соударениями; газ для соударений — гелий; число ионов-предшественников — 3; окно изоляции иона-предшественника — 3,5 m/z . Метаболиты ИПМ анализировали в режиме регистрации отрицательных ионов, а аддукты с GSH — в режиме регистрации положительных ионов. Калибровку масс-спектрометра проводили с использованием 1 mM раствора формиата натрия (чистота 97%; Merck, Германия) в 90% (об./об.) водном изопропанолe (HPLC grade; Merck, Германия).

МАЛДИ масс-спектрометрический анализ

Масс-спектрометрический анализ реактивных метаболитов ИПМ и их аддуктов с GSH проводили с помощью тандемного времяпролетного масс-спектрометра UltrafleXtreme (Bruker Daltonik GmbH, Германия), оснащенного Nd:YAG лазером ($\lambda = 355 \text{ нм}$), на базе ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка СПбГУ.

Регистрацию масс-спектров осуществляли в режиме рефлектор с детектированием положительных ионов при следующих параметрах работы масс-спектрометра: диапазон m/z — 300–1100; напряжение на первом источнике 19,0 кВ; напряжение на втором источнике 16,8 кВ; напряжение на линзах 7,0 кВ; напряжение на первом отражателе 20,5 кВ; напряжение на втором отражателе 10,5 кВ; задержка импульсной экстракции ионов 90 нс. Для получения одного спектра было использовано 10 000 актов облучения образца лазером при мощности лазера 60% и частоте облучения 2000 Гц. Для регистрации

и интерпретации масс-спектров были использованы программные продукты Flex Control и Flex Analysis (Bruker Daltonik GmbH, Германия).

Тандемный масс-спектрометрический анализ проводили в режиме индуцированной лазером диссоциации при следующих параметрах работы масс-спектрометра: окно селектора иона-предшественника 2 m/z; напряжение на первом источнике 7,6 кВ; напряжение на втором источнике 6,9 кВ; напряжение на линзах 3,5 кВ; напряжение на первом отражателе 29,4 кВ; напряжение на втором отражателе 14,1 кВ; LIFT 1 (19,0 кВ); LIFT 2 (3,2 кВ); задержка импульсной экстракции ионов 90 нс.

Калибровку масс-спектрометра осуществляли с использованием калибровочной смеси Peptide calibration standard II (Bruker Daltonik GmbH, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе изучения метаболизма ИГМ было проведено сравнение двух наиболее распространенных неферментативных подходов для получения продуктов окисления ксенобиотиков *in vitro*: электрохимическое окисление (ЭХО) и УФ-индуцированное фотокаталитическое окисление в присутствии наночастиц диоксида титана (УФ/TiO₂-ФКО). Согласно литературным данным [28] для ИГМ известно пять метаболитов (M1–M5), каждый из которых способен вступать в реакцию с GSH. Выбор GSH в качестве улавливающего агента обусловлен его важной ролью в метаболизме ксенобиотиков в организме человека (является одной из основных биомолекул, участвующих в связывании реактивных продуктов метаболизма ксенобиотиков), а также его способностью вступать в реакции конъюгации с молекулами, в составе которых есть группы хиноидного типа (присутствие таких групп характерно для ряда метаболитов ИГМ).

Схема проведения эксперимента с использованием ЭХО представлена на рисунке 2А.

Окисление осуществляли с использованием электрохимической системы Roxu Exceed, оснащенной электрохимическим реактором μ -PrepCell. Часть реакционной смеси затем отбирали для последующего анализа, остальное смешивали с раствором GSH и инкубировали в течение часа при 37 °С.

По результатам ВЭЖХ-МС/МС анализа было выявлено наличие 3 известных метаболитов ИГМ (M1, M4, M5), а также 2 метаболитов с m/z 381,93 (ПМ2) и m/z 429,96 (ПМ6), которые в литературе ранее описаны не были; соответствующие данные представлены на рисунке 3А. Кроме того, ВЭЖХ-МС/МС анализ инкубационной смеси продуктов окисления ИГМ и GSH позволил обнаружить 3 сигнала, которые по наличию изотопного распределения, характерного для соединений, содержащих в своем составе атом хлора, и результатам тандемного масс-спектрометрического анализа были отнесены к аддуктам GSH с 2 известными (M2, M4) и 1 необнаруженным (ПМ7) метаболитами ИГМ; соответствующие данные представлены на рисунке 3Б. Сведения об обнаруженных продуктах ЭХО ИГМ, а также аддуктах с GSH представлены в таблице 1.

Таким образом, метод ЭХО позволяет получать метаболиты ИГМ, однако обладает рядом недостатков:

- невозможность одновременного проведения нескольких экспериментов;
- необходимость очистки электрохимической ячейки после каждого использования;
- большой расход реактивов и исследуемых ксенобиотиков.

Учитывая вышеперечисленное, констатировали, что моделирование метаболизма ксенобиотиков методом ЭХО является длительным и затратным.

На следующем этапе исследования нами были смоделированы процессы метаболизма ИГМ методом УФ/TiO₂-ФКО. Схема проведения УФ/TiO₂-ФКО приведена на рисунке 2Б. На первом этапе осуществлялось облучение УФ-излучением пробирки с инкубационной смесью

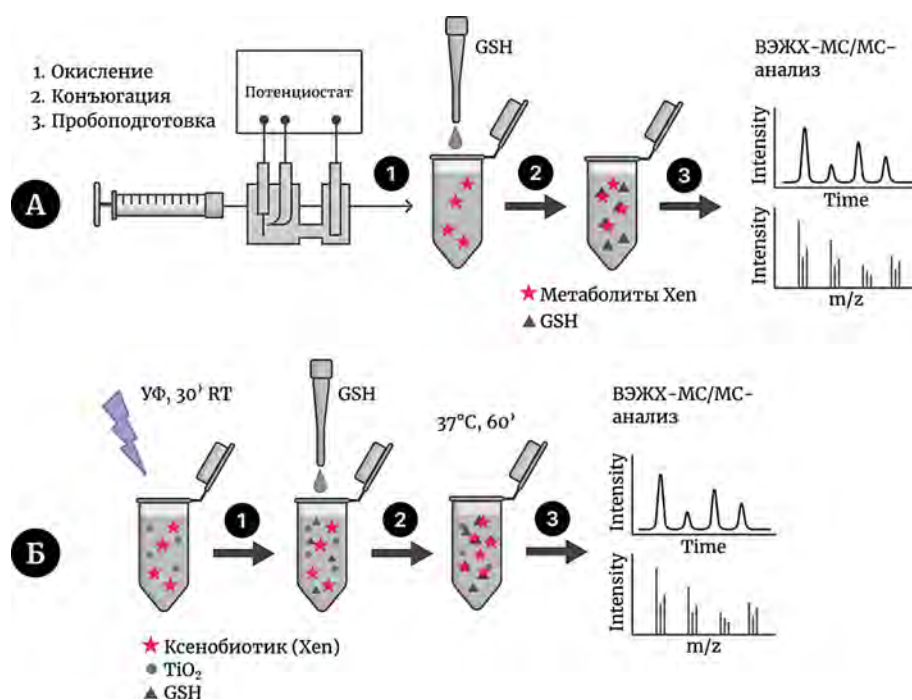


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 2. Алгоритм получения продуктов окисления ксенобиотика методом ЭХО (А) или УФ/TiO₂-ФКО (Б) с последующей конъюгацией с GSH и ВЭЖХ-МС/МС анализом (на примере ИГМ)

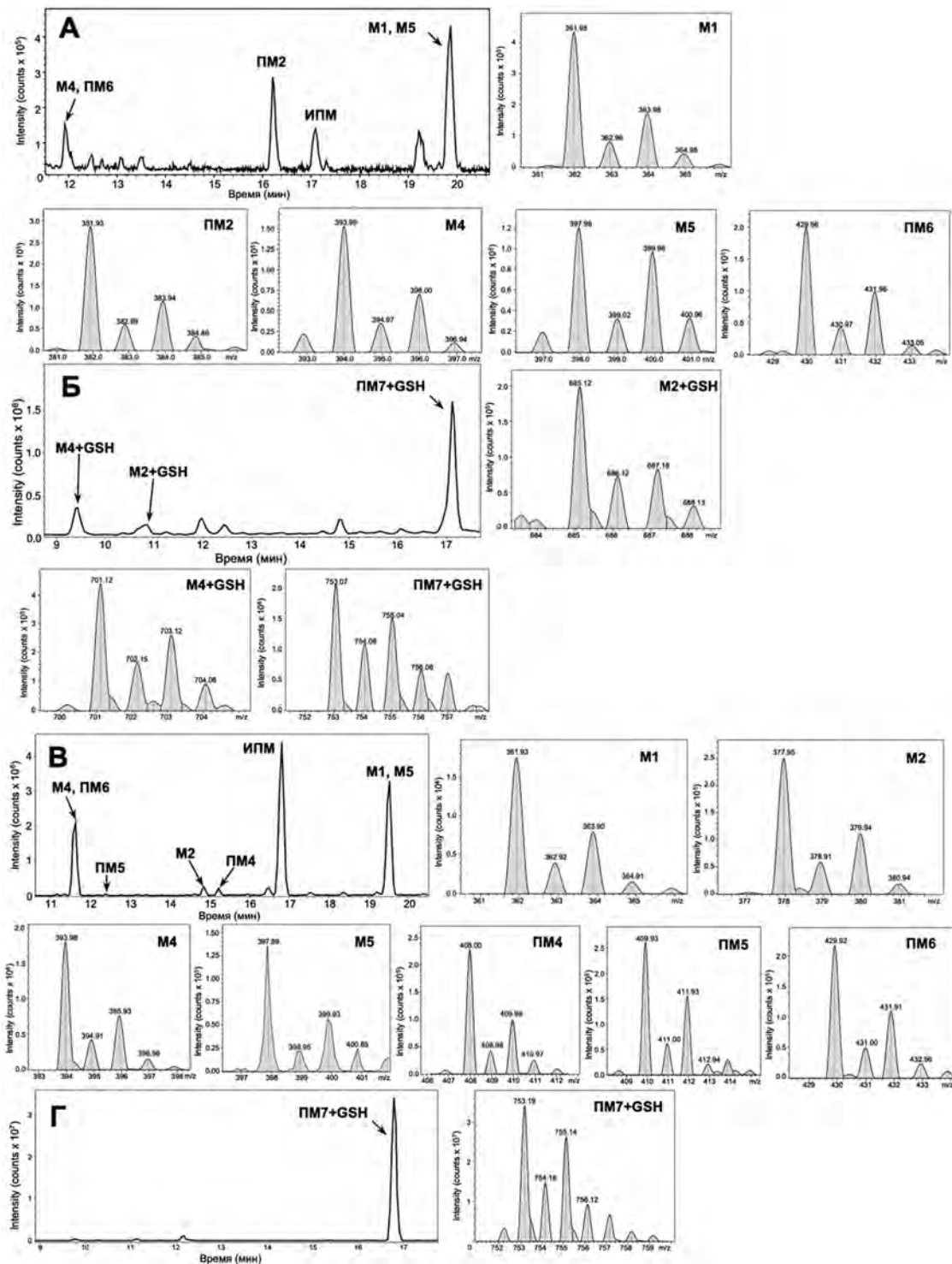


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 3. Масс-хроматограммы метаболитов ИПМ, полученных методом ЭХО (А), и их аддуктов с GSH (Б), а также полученных методом УФ/ TiO_2 -ФКО (В) и их аддуктов с GSH (Г)

Примечание: на рисунке представлены фрагменты масс-спектров с указанием обнаруженных метаболитов ИПМ и их аддуктов с GSH.

(водная суспензия наночастиц TiO_2 , содержащая ИПМ), после завершения облучения в пробирку добавляли GSH и осуществляли процедуру конъюгации улавливающего агента с продуктами УФ/ TiO_2 -ФКО ИПМ. Этапы окисления и конъюгации длятся в сумме 90 мин, как и в случае ЭХО. Однако преимуществом УФ/ TiO_2 -ФКО является возможность параллельного проведения нескольких экспериментов, что значительно экономит время при подборе условий окисления. В целом по сравнению с ЭХО метод

УФ/ TiO_2 -ФКО является более экономичным с точки зрения расходов как реактивов, так и исследуемых веществ. Однако при этом для дальнейшего проведения ВЭЖХ-МС/МС анализа возникает необходимость проведения пробоподготовки, включающей удаление частиц диоксида титана во избежание их попадания в хроматографическую систему.

По результатам ВЭЖХ-МС/МС анализа продуктов УФ/ TiO_2 -ФКО ИПМ (рис. 3В) было установлено образование

Таблица 1. Молекулярные массы и вероятные структуры метаболитов ИПМ и их m/z аддуктов с GSH, обнаруженных тремя способами

Метаболит	Структурная формула	Методы моделирования биотрансформации				
		ЭХО		УФ/TiO ₂ -ФКО		УФ/TiO ₂ -ФКО/ММ
		m/z метаболита [M-H] ⁻	m/z аддукта с GSH [M+H] ⁺	m/z метаболита [M-H] ⁻	m/z аддукта с GSH [M+H] ⁺	m/z аддукта с GSH [M+H] ⁺
M1		361,98	-	361,93	-	669,10 671,10
M2		(378)	685,12	377,95	-	685,09
M3		(380)	-	-	-	687,11
M4		393,99	701,12	393,98	-	701,09
M5		397,96	-	397,89	-	705,09
ПМ1		-	-	-	-	657,09
ПМ2		381,93	-	-	-	-
ПМ3		-	-	-	-	703,10
ПМ4		-	-	408,00	-	-
ПМ5		-	-	409,93	-	-
ПМ6		429,96	-	429,92	-	-
ПМ7		-	753,07	-	753,19	-

Таблица составлена авторами по собственным данным

Примечание: в скобках приведены значения m/z метаболитов, описанных в литературе, но не обнаруженных в рамках выполненных экспериментов; УФ/TiO₂-ФКО/ММ — УФ/TiO₂-ФКО на МАЛДИ-мишени.

4 известных метаболитов ИПМ (M1, M2, M4, M5), а также 3 ранее не описанных метаболитов с m/z 408,00 (ПМ4), m/z 409,93 (ПМ5) и m/z 429,92 (ПМ6). Следует отметить, что метаболит M2, как и предполагаемые метаболиты ПМ4 и ПМ5, не был обнаружен при использовании метода ЭХО.

При анализе продуктов взаимодействия GSH с метаболитами ИПМ был зафиксирован только один сигнал, который по наличию характерного изотопного распределения и результатам tandemного масс-спектрометрического анализа был отнесен к аддукту GSH с потенциальным метаболитом ПМ7 (рис. 3Г). ПМ7-GSH стал единственным обнаруженным аддуктом, в то время как методом ЭХО было идентифицировано 3 аддукта.

Результаты, полученные методами ЭХО и УФ/ TiO_2 -ФКО для ИПМ, в целом сопоставимы, но оба метода имеют ряд недостатков, которые делают их весьма трудоемкими и времязатратными. Можно сформулировать ряд сложностей, которые должны быть решены при разработке более производительной методики скрининга реактивных метаболитов ксенобиотиков:

1. Времязатратность. Большая часть времени уходит на проведение конъюгации (1 час) и ВЭЖХ-МС анализа (~40 мин).

2. Трудозатратность. Удаление частиц TiO_2 при УФ/ TiO_2 -ФКО или промывка электрохимической ячейки после каждого ксенобиотика.

3. Поэтапное проведение окисления и конъюгации может приводить к потере короткоживущих метаболитов.

4. Возможности параллельного проведения нескольких экспериментов ограничены.

5. Большой расход реактивов и исследуемых веществ.

Дальнейшая работа была направлена на разработку методики моделирования метаболизма ИПМ, в которой перечисленные недостатки были бы устранены или значительно уменьшены.

Среди методов определения метаболитов ксенобиотиков и их аддуктов широкое применение получила масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ). Данный метод отличается экспрессностью и высокой производительностью, так как процедура анализа включает в себя стадию нанесения всех необходимых образцов на одну твердую подложку (мишень) с последующей регистрацией сигналов аналитов без дополнительной пробоподготовки.

Мы установили, что если на ячейку МАЛДИ-мишени, функционализированную TiO_2 , нанести ксенобиотик с добавкой улавливающего агента (GSH), то образующиеся в ходе проведения УФ/ TiO_2 -ФКО реактивные метаболиты могут *in situ* связываться с тиольной группой пептида, и последующий МС анализ позволяет детектировать короткоживущие продукты окисления в форме аддуктов.

Исходя из этого был предложен алгоритм проведения УФ/ TiO_2 -ФКО ИПМ на МАЛДИ-мишени (УФ/ TiO_2 -ФКО/ММ), представленный на рисунке 4.

Для выбора оптимального времени окисления проводили поиск аддуктов после 1, 5, 10, 20 и 30 мин УФ-облучения. Полученные масс-спектры представлены на рисунке 5.

Из результатов масс-спектрометрического анализа следует, что после 5 мин облучения сигналы аддуктов GSH с метаболитами ИПМ еще не обнаруживаются. На 10 мин УФ/ TiO_2 -ФКО были зафиксированы три сигнала, один из которых (m/z 687,12) принадлежит продукту

конъюгации GSH с известным метаболитом ИПМ (M3), а другой (m/z 703,11) можно отнести к аддукту GSH с ранее не изученным продуктом метаболизма ИПМ (ПМ3). Для образцов, отобранных после 20 мин облучения, в масс-спектрах наблюдался рост интенсивности вышеуказанных сигналов.

Наиболее полную информацию об аддуктах GSH с метаболитами ИПМ предоставлял масс-спектр, соответствующий выдерживанию образцов под УФ-облучением в течение 30 мин. Помимо идентифицированных ранее продуктов конъюгации, были обнаружены сигналы со значениями m/z 669,10, 685,09, 701,09 и 705,10, соответствующие аддуктам с известными метаболитами ИПМ (M1, M2, M4, M5), а также сигнал с m/z 657,09, принадлежащий аддукту с потенциальным метаболитом ПМ1. Сведения о выявленных аддуктах представлены в таблице 1. Следует отметить, что наибольшее внимание с точки зрения опасности для организма заслуживают, с нашей точки зрения, метаболиты M3, ПМ1 и ПМ3, которые регистрируются только в виде аддуктов с GSH, причем только методом УФ/ TiO_2 -ФКО/ММ в условиях конъюгации *in situ*, что свидетельствует об их высокой реакционной способности.

В отличие от методик ЭХО и УФ/ TiO_2 -ФКО, в этом случае в масс-спектрах было обнаружено значительное количество сигналов, отнесенных к аддуктам GSH с продуктами окисления ИПМ, как показано на диаграмме (рис. 6), что позволяет сделать вывод о перспективности предложенного подхода.

В совокупности тремя методами для ИПМ было идентифицировано по 4 ранее не изученных метаболита (m/z

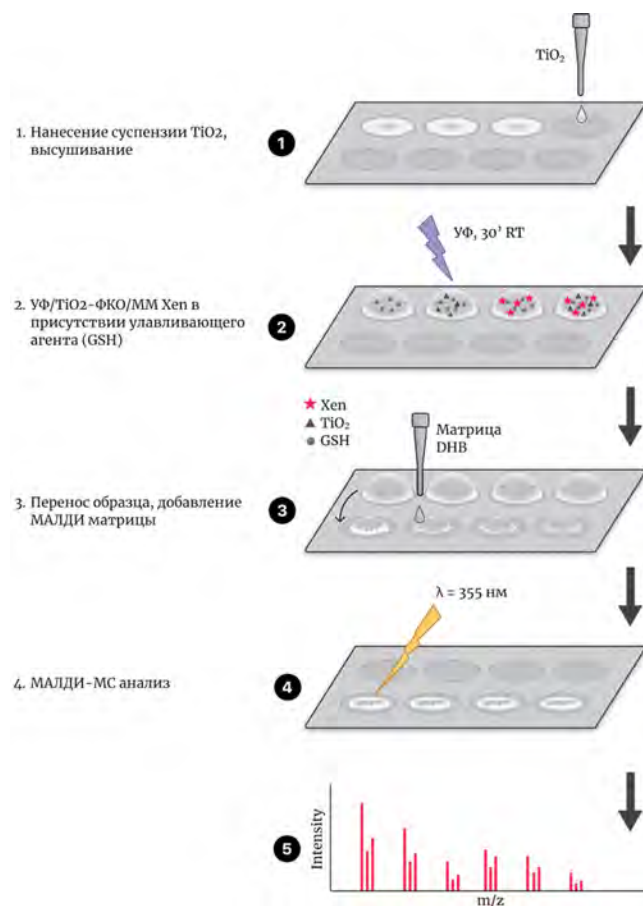


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 4. Алгоритм получения метаболитов ИПМ и их аддуктов с GSH методом УФ/ TiO_2 -ФКО/ММ

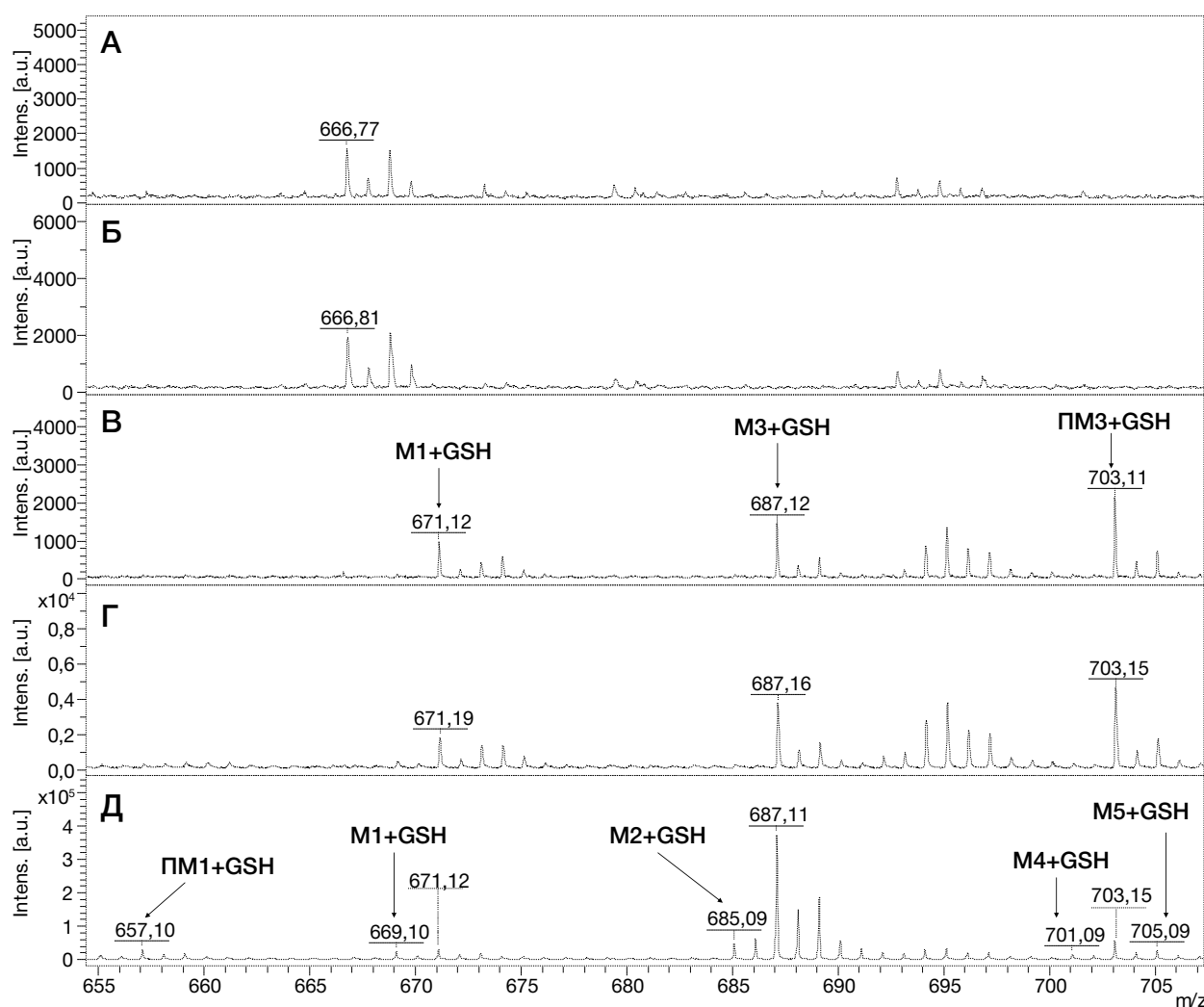


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 5. МАЛДИ масс-спектры аддуктов GSH с метаболитами ИПМ при проведении УФ/TiO₂-ФКО/ММ при УФ-облучении инкубационной смеси в течение 0 мин (А), 5 мин (Б), 10 мин (В), 20 мин (Г), 30 мин (Д)

[M-H]⁻: 381,93; 408,00; 409,93; 429,96) и аддукта с GSH (m/z [M+H]⁺: 657,09; 671,10; 703,10; 753,19).

Следует отметить, что рассмотренные в работе неферментативные методы моделирования биотрансформации ксенобиотиков (ЭХО, УФ/TiO₂-ФКО) не могут выступать в качестве полноценной альтернативы классическим

биологическим системам (микросомальная или S9 фракции печени, первичные гепатоциты и др.), так как каждый из методов не может полностью воспроизвести полный набор ферментативных реакций, происходящих в ходе первой фазы метаболизма. В то же время данные инструментальные подходы позволяют быстро и относительно дешево получать продукты окисления в чистом растворе без необходимости трудоемкого процесса очистки от биологической матрицы, что особенно актуально при проведении скрининговых исследований потенциальной токсичности ксенобиотика

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения работы было проведено исследование потенциальных метаболитов ИПМ, полученных с помощью таких неферментативных методов моделирования процессов первой фазы биотрансформации ксенобиотиков, как ЭХО и УФ/TiO₂-ФКО в объеме. Моделирование второй фазы метаболизма осуществлялось путем инкубации продуктов окисления индапамида с улавливающим агентом (GSH).

По результатам ВЭЖХ-МС/МС анализа метаболитов и их конъюгатов с GSH в случае ЭХО было обнаружено

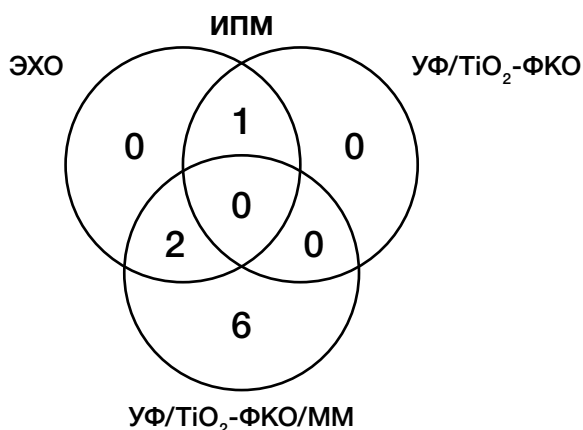


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 6. Численное сопоставление обнаруженных аддуктов GSH с продуктами окисления ИПМ, полученных тремя различными методами

5 метаболитов и 3 аддукта с GSH, а при использовании УФ/TiO₂-ФКО в объеме было обнаружено 7 метаболитов и 1 аддукт с GSH. Кроме того, была разработана новая методика *in vitro* выявления реактивных метаболитов ксенобиотиков, основанная на проведении УФ/TiO₂-ФКО в присутствии улавливающего агента (GSH) на поверхности МАЛДИ-мишени, функционализированной диоксидом титана, с последующим МАЛДИ

масс-спектрометрическим анализом продуктов окисления и их конъюгатов. Продемонстрировано, что разработанная методика выявления реактивных метаболитов ксенобиотиков в случае ИГПМ превосходит общепринятые подходы как по производительности, так и по информативности, позволяя обнаруживать большее число потенциально опасных метаболитов (обнаружено 8 аддуктов с глутатионом).

Литература / References

1. Wojnarowska Z, Grzybowska K, Hawelek L, Dulski M, Wrzalik R, Gruszka I et al. Molecular dynamics, physical stability and solubility advantage from amorphous indapamide drug. *Mol Pharm*. 2013;10(10):3612–27. <https://doi.org/10.1021/mp400116g>
2. Sanz-Muñoz C, Martínez-Morán C, Torrero-Antón MV, Miranda-Romero A. Indapamide-Associated Stevens-Johnson Syndrome. *Actas Dermosifiliogr*. 2008;99(4):321–2.
3. Mourad SS, Barary MA, El-Yazbi AF. Sensitive “release-on-demand” fluorescent genosensors for probing DNA damage induced by commonly used cardiovascular drugs: Comparative study. *Int J Biol Macromol*. 2024;269(1):131821. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131821>
4. Rutherford T, Sinclair R. Photo-onycholysis due to indapamide. *Australas J Dermatol*. 2007;48(1):35–6.
5. Liu L, Cui H, Huang Y, Hao Y, Zhou Y, Wan Y. Molecular docking and *in vitro* evaluations reveal the role of human cytochrome P450 3A4 in the cross-coupling metabolism of phenolic xenobiotics. *Environ Res*. 2023;220:115256. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115256>
6. Shang J, Coe KJ, Lim HK, Chen L, Khatri BB, Salter R et al. Application of Covalent Binding Body Burden in the HuREL Human Hepatocyte Coculture Model for Reactivity Risk Assessment of Metabolically Low Turnover Drugs. *Chem Res Toxicol*. 2024;37(4):540–4. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.4c00046>
7. Norman BH. Drug Induced Liver Injury (DILI). Mechanisms and Medicinal Chemistry Avoidance/Mitigation Strategies. *J Med Chem*. 2020;63(20):11397–419. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00524>
8. Савельева ЕИ, Корягина НЛ, Орлова ОИ. Определение аддуктов отравляющих веществ с биомолекулами как биомаркеров экспозиции/эффекта. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2018;20(3):451–63. Savelyeva EI, Koryagina NL, Orlova OI. Determination of toxic substances adducts with biomolecules as biomarkers of the exposure/effect. *Medicine of Extreme Situations*. 2018;20(3):451–63 (In Russ). EDN: YPHKSL
9. Gasmi A, Nasreen A, Lenchyk L, Lysiuk R, Peana M, Shapovalova N et al. An Update on Glutathione's Biosynthesis, Metabolism, Functions, and Medicinal Purposes. *Curr Med Chem*. 2024;31(29):4579–601. <https://doi.org/10.2174/0109298673251025230919105818>
10. Gupta PK. *Fundamentals of Toxicology: Essential Concepts and Applications*. New York: Academic Press; 2016.
11. Pognan F, Beilmann M, Boonen HCM, Czich A, Dear G, Hewitt P et al. The evolving role of investigative toxicology in the pharmaceutical industry. *Nat Rev Drug Discov*. 2023;22(4):317–35. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00633-x>
12. Medina D, Omanakuttan B, Nguyen R, Alwarsh E, Walgama C. Electrochemical Probing of Human Liver Subcellular S9 Fractions for Drug Metabolite Synthesis. *Metabolites*. 2024;14(8):429. <https://doi.org/10.3390/metabo14080429>
13. Peeters L, Vervliet P, Foubert K, Hermans N, Pieters L, Covaci A. A comparative study on the *in vitro* biotransformation of medicagenic acid using human liver microsomes and S9 fractions. *Chem Biol Interact*. 2020;328:109192. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109192>
14. Sun H, Scott DO. Structure-based Drug Metabolism Predictions for Drug Design. *Chem Biol Drug Des*. 2010;7(5):3–17. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2009.00899.x>
15. Faber H, Vogel M, Karst U. Electrochemistry/mass spectrometry as a tool in metabolism studies. *Anal Chim Acta*. 2014;8(34):9–21. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.05.017>
16. Gawlik M, Skibiński R, Trawiński J, Komsta Ł. Photocatalysis combined with chromatographic methods as a new promising tool in drug metabolism studies. *Acta Chromatogr*. 2018;30(1):1–8. <https://doi.org/10.1556/1326.2016.00202>
17. Álvarez-Lueje A, Pérez M, Zapata C. Electrochemical Methods for the *In Vitro* Assessment of Drug Metabolism. *Topics on Drug Metabolism. InTech*. 2012; <https://doi.org/10.5772/28647>
18. Nikzad N, Rafiee M. Electrochemical study of drug metabolism. *Curr Opin Electrochem*. 2024;44:101446. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2024.101446>
19. Mielczarek P, Smoluch M, Kotlińska JH, Labuz K, Gotszalk T, Babij M et al. Electrochemical generation of selegiline metabolites coupled to mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2015;1389:96–103. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.049>
20. Lohmann W, Hayen H, Karst U. Covalent protein modification by reactive drug metabolites using online electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem*. 2008;80:9714–9. <https://doi.org/10.1021/ac801699g>
21. Bussy U, Chung-Davidson YW, Li K, Li W. Phase I and phase II reductive metabolism simulation of nitro aromatic xenobiotics with electrochemistry coupled with high resolution mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406(28):7253–60. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8171-3>
22. Shono T, Toda T, Oshino N. Preparation of N-dealkylated drug metabolites by electrochemical simulation of biotransformation. *Drug Metab Dispos*. 1981;9:481–2. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8171-3>
23. Gawlik M, Trawiński J, Skibiński R. Photocatalysis as a tool for *in vitro* drug metabolism simulation: multivariate comparison of twelve metal oxides on a set of twenty model drugs. *Catalysts*. 2020;10:26. <https://doi.org/10.3390/catal10010026>
24. Ruokolainen M, Valkonen M, Sikanen TM, Kotiaho T, Kostianen R. Imitation of phase I oxidative metabolism of anabolic steroids by titanium dioxide photocatalysis. *Eur J Pharm Sci*. 2014;65:45–55. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.08.009>
25. Ruokolainen M, Gul T, Permentier H, Sikanen T, Kostianen R, Kotiaho T. Comparison of TiO₂ photocatalysis, electrochemically assisted Fenton reaction and direct electrochemistry for simulation of phase I metabolism reactions of drugs. *Eur J Pharm Sci*. 2016;83:36–44. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.12.012>
26. Faber H, Melles D, Brauckmann C, Wehe CA, Wentker K, Karst U. Simulation of the oxidative metabolism of diclofenac by electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2012;403:345–54. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5665-0>
27. Gladchuk AS, Gorbunov AY, Keltsieva OA, Ilyushonok SK, Babakov VN, Shilovskikh VV et al. Coating of a MALDI target with metal oxide nanoparticles by droplet-free electrospraying — a versatile tool for *in situ* enrichment of human globin adducts of halogen-containing drug metabolites. *Microchem J*. 2023;191:108708. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108708>

28. Sun H, Moore C, Dansette PM, Kumar S, Halpert JR, Yost GS. Dehydrogenation of the indoline-containing drug 4-chloro-N-(2-methyl-1-indoliny)-3-sulfamoylbenzamide (indapamide)

by CYP3A4: correlation with in silico predictions. *Drug Metab Dispos.* 2009;37(3):672–84.
<https://doi.org/10.1124/dmd.108.022707>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: О.А. Кельцьева — ВЭЖХ-МС анализ; А.А. Афанасьева — отработка методики фотокаталитического окисления-конъюгации индапамида на МАЛДИ-мишени; С.К. Ильюшонок — отработка методики электрохимического окисления индапамида; А.С. Гладчук — оформление и подготовка материала к печати; А.Н. Арсеньев — отработка методики фотокаталитического окисления-конъюгации индапамида в микропробирке; А.С. Фролов — общее руководство исследованием; В.Н. Бабаков — сбор и анализ литературных данных; К.А. Краснов — интерпретация масс-спектров и определение структуры вероятных метаболитов индапамида; Е.П. Подольская — научный замысел и план исследования.

ОБ АВТОРАХ

Кельцьева Ольга Александровна
<https://orcid.org/0000-0002-4069-0355>
keltcieva@gmail.com

Афанасьева Анна Андреевна
afanasyeva.a.a.2000@yandex.ru

Ильюшонок Семен Кириллович
<https://orcid.org/0000-0003-1672-4583>
ilsemen21@mail.ru

Гладчук Алексей Сергеевич, канд. техн. наук
<https://orcid.org/0000-0002-4411-2069>
aleglad24@gmail.com

Арсеньев Александр Николаевич
star2361@mail.ru

Фролов Александр Станиславович
Alexander.S.Frolov@gmail.com

Бабаков Владимир Николаевич, канд. биол. наук
vbabakov@gmail.com

Константин Андреевич Краснов, д-р хим. наук
<https://orcid.org/0000-0003-1503-2243>
krasnov_tox@mail.ru

Подольская Екатерина Петровна, д-р техн. наук
ek.podolskaya@gmail.com

<https://doi.org/10.47183/mes.2024-245>

УДК 615.9.036.11.57.36



ТЕПЛООТДАЧА ИСПАРЕНИЕМ ОПРЕДЕЛЯЕТ ЗНАК ВЛИЯНИЯ НАЗАЛЬНОГО ФЕНАЗЕПАМА НА ТЕПЛОВОЙ СТРЕСС У КРЫС

Ю.Ю. Ивницкий[✉], О.А. Вакуненкова, К.А. Краснов, С.С. Гафт, Н.В. Лапина

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

Введение. Тепловой стресс — рост температуры тела вследствие преобладания теплоты, поступившей извне и освободившейся при метаболизме, над теплоотдачей. Коррекция теплопродукции возможна с использованием бензодиазепинов в дозах, недостижимых при однократном внутримышечном введении их официальных препаратов. Это ограничение преодолено с помощью прототипа препарата «Феназепам спрей назальный» (ФСН), содержащего 170 мг феназепама в 1 мл неводного раствора.

Цель. Экспериментальная оценка влияния ФСН на уровень метаболизма и тепловой баланс при тепловом стрессе.

Материалы и методы. Изучено влияние однократной интраназальной инстилляцией ФСН в объеме 10 мкл на интенсивность внешнего дыхания, потребление кислорода, а также повторных интраназальных введений ФСН 170 мг/мл в объеме по 10 мкл с интервалом 0,5 ч на динамику ректальной температуры, массы тела и летальность крыс при температуре воздуха 40 °С.

Результаты. Инстилляцией ФСН снижала потребление кислорода на величину, достаточную для уменьшения на 0,3 °С температуры тела за 0,5 ч. Введение ФСН замедляло повышение температуры тела у крыс, размещенных в restrainers при температуре воздуха 40 °С, но ускоряло рост температуры и способствовало повышению летальности при размещении крыс в вольерах. Под влиянием ФСН потеря влаги крысами, находившимися в вольерах, судя по динамике массы тела, уменьшалась.

Выводы. Результаты работы указывают на перспективность ФСН в качестве средства фармакотерапии теплового удара при высокой относительной влажности, пребывании в изолирующих средствах защиты кожи или при иммерсионной гипертермии. Требуется проверки возможность углубляющего влияния ФСН на тепловой стресс у человека при отсутствии физических препятствий для теплоотдачи испарением.

Ключевые слова: гипертермия; выживаемость; испарение; повышенная температура воздуха; температура тела; тепловой стресс; теплоотдача; теплопродукция; уровень метаболизма; феназепам спрей назальный

Для цитирования: Ивницкий Ю.Ю., Вакуненкова О.А., Краснов К.А., Гафт С.С., Лапина Н.В. Теплоотдача испарением определяет знак влияния назального феназепама на тепловой стресс у крыс. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2025;27(1):37–42. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-245>

Финансирование: исследование выполнено в рамках государственного контракта № 212438810013200000000000/64.019.21.9 от 01.11.2021.

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 «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова» Федерального медико-биологического агентства (№ 10/24 от 10.07.2024).

Потенциальный конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

✉ Ивницкий Юрий Юрьевич neugierig@mail.ru

Статья поступила: 29.09.2024 После доработки: 13.12.2024 Принята к публикации: 16.12.2024 Online first: 30.12.2024

HEAT TRANSFER BY EVAPORATION DETERMINES THE EFFECT OF NASAL PHENAZEPAM ON THERMAL STRESS IN RATS

Jury Ju. Ivnitsky[✉], Olga A. Vakunenkova, Konstantyn A. Krasnov, Semion S. Gaft, Natalja V. Lapina

Golikov Research Center of Toxicology, St. Petersburg, Russia

Introduction. Thermal stress is an increase in body temperature due to the predominance of heat received from outside or released during metabolism over heat losses by the body. Heat production can be regulated using benzodiazepines in doses unattainable with a single intramuscular injection of their official preparations. In this study, this limitation is overcome using a prototype of the Phenazepam nasal spray (PNS) preparation, containing 170 mg of phenazepam in 1 mL of a non-aqueous solution.

Objective. Experimental assessment of the PNS effect on the metabolic rate and thermal balance in thermal stress.

Materials and methods. The effect of a single 10 µL PNS intranasal instillation on the external respiration intensity, oxygen consumption, as well as 10 µL PNS intranasal instillations at 0.5 h intervals on the dynamics of rectal temperature, body weight, and lethality in rats at an air temperature of 40 °C was studied.

Results. PNS instillations reduced oxygen consumption by an amount sufficient to decrease body temperature by 0.3 °C in 0.5 h. PNS administration declined the rate of body temperature rise when placing rats in restrainers at an air temperature of 40 °C; however, PNS administration accelerated body temperature rise and increased lethality when placing rats in cages. Due to PNS, moisture loss by rats in cages decreased, judged by the dynamics of body weight.

Conclusions. The study confirmed the prospects of PNS as a pharmacotherapy for heat stroke at a high relative humidity, exposure to insulating skin protectors, or with immersion hyperthermia. The possibility of the aggravating effect of PNS on human thermal stress in the absence of physical obstacles to heat transfer by evaporation requires additional verification.

Keywords: hyperthermia; survival; evaporation; elevated air temperature; body temperature; heat stress; heat loss; heat production; metabolic rate; phenazepam nasal spray

For citation: Ivnitsky Ju.Ju., Vakunenkova O.A., Krasnov K.A., Gaft S.S., Lapina N.V. Heat transfer by evaporation determines the effect of nasal phenazepam on thermal stress in rats. *Extreme Medicine*. 2025;27(1):37–42. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-245>

Funding: the research was carried out within the state assignment (No. 212438810013200000000000/64.019.21.9 dated 1 Nov. 2021).

© Ю.Ю. Ивницкий, О.А. Вакуненкова, К.А. Краснов, С.С. Гафт, Н.В. Лапина, 2024

Compliance with ethical principles: the study was carried out in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Research and Other Scientific Purposes. The research was approved by the Golikov Research Center of Toxicology Biomedical Ethics Committee. (No. 10/24 dated 10 July 2024).

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

✉ Jury Ju. Ivnitsky neugierig@mail.ru

Received: 29 Sep. 2024 **Revised:** 13 Dec. 2024 **Accepted:** 16 Dec. 2024 **Online first:** 30 Dec. 2024

ВВЕДЕНИЕ

Тепловой стресс — рост температуры «ядра» тела вследствие превышения алгебраической суммы значений тепловой энергии, поступившей извне и освободившейся в процессах метаболизма, суммы значений тепловой энергии, потерянной испарением, излучением, конвекцией и теплопроводением. Совокупность наиболее тяжелых клинических проявлений теплового стресса, обозначаемая термином «тепловой удар» [1], является критическим состоянием организма с летальностью 27% [2]. Актуальность проблемы определяется тем, что повышенному риску теплового удара подвержены не только дети и пожилые люди, но и экономически активная часть населения, чья деятельность связана с физическим напряжением или работой в условиях, препятствующих теплоотдаче: военнослужащие, сотрудники полиции, пожарные, работники горячих цехов, спортсмены.

Ведущий принцип первой и медицинской помощи при тепловом ударе — скорейшее снижение температуры тела. В соответствии с действующим стандартом скорой медицинской помощи¹ для этого применяют физиотерапевтические средства увеличения теплоотдачи: охлаждающие жидкости и аппликации. Из медикаментов предусмотрено применение солевых растворов, нестероидных противовоспалительных средств и диазепама. Судя по суточной или курсовой дозе последнего (10 мг), подразумевается его назначение в разовой дозе 5 мг в качестве седативного средства. В литературе отсутствуют данные о влиянии диазепама, применяемого в таком режиме, на тепловое состояние организма. Однако при парентеральном введении бензодиазепинов в дозах более 20 мг, аналогичных применяемым для купирования судорожного синдрома химической этиологии [3], такое влияние представляется вероятным.

Внутримышечное введение бензодиазепинов на догоспитальном этапе, осуществляемое, как правило, с целью купирования судорожного синдрома, — вынужденная альтернатива их внутривенному введению, проблематичному на фоне судорог. Ввиду низкой водорастворимости фармацевтических субстанций бензодиазепиновой группы их концентрация в официальных инъекционных препаратах (сибазон, мидазолам) не превышает 5 мг/мл. Поэтому одномоментная доставка в организм человека бензодиазепинов в дозах более 20 мг требует внутримышечного введения таких препаратов в объемах более 4 мл, что не всегда возможно. Ранее мы предложили подход к преодолению этого ограничения, основанный на использовании неводного раствора бензодиазепина [4] и его назальной лекарственной формы [5]. Создан прототип препарата «Феназепам спрей назальный» (ФСН),

содержавший 170 мг феназепама в 1 мл. При двукратном впрыске по 140 мкл ФСН в каждый носовой ход доза феназепама превышала высшие разовые дозы диазепама или мидазолама, вводимых в виде официальных инъекционных препаратов, в 4,8 и в 6,4 раза соответственно. Необходимость таких доз определялась изначальным требованием к ФСН как к средству купирования судорожного синдрома химической этиологии. Однако увеличение дозы открывает возможность проявления у феназепама и других фармакологических свойств, некоторые из которых, предположительно, полезны в условиях теплового стресса. В этой связи заслуживает внимания факт снижения бензодиазепинами потребления кислорода как головным мозгом [6], так и организмом в целом [7]. Сопряженное с этим уменьшение теплопродукции могло бы замедлить рост температуры тела в условиях, способствующих перегреванию организма, а значит, и повысить переносимость тепловой нагрузки. Однако имеется предпосылка и к противоположному эффекту: нарушение поведенческих паттернов, направленных на увеличение теплоотдачи. У крыс, кожа которых, исключая подошвенную поверхность конечностей, лишена потовых желез, к таковым гипотетически относится груминг с нанесением на шерстный покров слюны и ее последующим испарением — терморегуляторная реакция, аналогичная поотделению у человека [8].

Цель исследования — экспериментальная оценка влияния ФСН на уровень метаболизма и тепловой баланс при тепловом стрессе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено с использованием беспородных крыс-самцов альбиносов (191–210 г), приобретенных в Филиале НИЦ «Курчатовский институт» — ПИЯФ — ПЛЖ «Рапполово». Животные получали стандартный корм для крыс и питьевую воду *ad libitum*. Проведено две серии экспериментов.

В первой серии экспериментов использовали 16 животных по 8 особей в каждой группе (контроль, опыт). Изучали динамику интенсивности функции внешнего дыхания и потребления кислорода организмом после однократной интраназальной инстилляцией изотонического 0,9% и раствора хлорида натрия контрольным животным и ФСН 170 мг/мл в объеме 10 мкл (по 5 мкл в каждый носовой ход) животным из опытной группы, что соответствует средней дозе фармацевтической субстанции феназепама® 8,5 мг/кг и биоэквивалентно дозе 100 мг (четыре впрыскивания по 140 мкл ФСН) для человека. Для введения растворов использовали дозаторы переменного объема. Острая токсичность ФСН в указанной

¹ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 1115н. Стандарт скорой медицинской помощи при тепловом и солнечном ударе; 20.12.2012.

дозе характеризовалась данными доклинического исследования его опытного промышленного образца, в котором интраназальное введение крысам ФСН в 20 раз большей дозе (пятикратно по 40 мкл с интервалом 10 мин) не вызывало гибели животных. Потребление кислорода организмом определяли в аппарате Миропольского с респирометрической камерой емкостью 2 л, к которой животных приучали в течение 2 мин до начала каждого измерения. Интенсивность потребления кислорода организмом Q_{O_2} , мл/(кг×мин) находили из уравнения:

$$Q_{O_2} = V \times F / (m \times \Delta t), \quad (1)$$

где V — объем манометрической жидкости, поступившей в бюретку, мл;

F — коэффициент для приведения объема кислорода к нормальным условиям;

m — масса тела, кг;

Δt — время пребывания крысы в герметизированной камере, мин.

Продолжительность измерения составляла 3 мин, его абсолютная погрешность — 0,1 мл ($\leq 2\%$ величины V). Животных не фиксировали, они свободно располагались в респирометрической камере. В это время у них подсчитывали частоту дыхательных движений (мин^{-1}). Измерения проводили с интервалом 10 мин.

Во второй серии экспериментов изучали влияние ФСН на динамику ректальной температуры, массы тела и летальность крыс, размещенных в термокамере в условиях, допускавших (размещение в вольерах) или исключающих (размещение в рестрейнерах) груминг. Формировали четыре рандомизированные группы: две контрольные и две опытные по 12–14 особей.

1-я группа ($n = 14$) — интраназальное введение 0,9% р-ра хлорида натрия в объеме 10 мкл; содержание животных в вольере;

2-я группа ($n = 14$) — интраназальное введение ФСН 170 мг/мл в объеме 10 мкл; содержание животных в вольере;

3-я группа ($n = 12$) — интраназальное введение 0,9% р-ра хлорида натрия в объеме 10 мкл; содержание животных в рестрейнерах;

4-я группа ($n = 12$) — интраназальное введение 0,9% р-ра ФСН 170 мг/мл в объеме 10 мкл; содержание животных в рестрейнерах.

Препараты вводили по 5 мкл в каждый носовой ход до помещения животных в термокамеру и далее каждые полчаса. Число инстилляций зависело от продолжительности жизни животных и варьировало от двух до семи; суммарная доза феназепама составляла при этом от 17 до 59,5 мг/кг.

Сразу после введения препаратов животных (одномоментно по 3 особи из каждой группы) помещали в термокамеру. Размер рестрейнеров не препятствовал дыхательным движениям, но исключал груминг. Климатические условия, способствовавшие перегреванию организма, моделировали в термокамере BMT Stericell SC 111 ECO (Чехия) емкостью 111 л с вытяжной вентиляцией $5 \text{ м}^3/\text{ч}$. Температуру воздуха $40 \pm 1^\circ\text{C}$, относительную влажность 46% поддерживали автоматически. Тепловой баланс организма оценивали по динамике ректальной температуры, которую измеряли с интервалом 30 мин электрическим термометром с датчиком для крыс RET-2 (WPI, КНР), наконецник термометра вводили в *rectum* на глубину 3 см.

Потерю организмом влаги оценивали по изменению массы тела, измеряемой с получасовым интервалом.

Результаты представляли в виде среднего значения и его ошибки ($M \pm m$). Для проверки нормальности распределения использовали критерий Шапиро — Уилка. Для оценки влияния тепловых условий и вводимых веществ на регистрируемые количественные показатели проводили многомерный дисперсионный анализ. При наличии значимого влияния какого-либо фактора выполняли одномерный дисперсионный анализ. В случаях экспериментальных планов с повторными измерениями использовали модели со смешанными эффектами. Межгрупповое сравнение средних величин выполняли методом линейных контрастов, выбранных априорно, либо с помощью апостериорных критериев Тьюки. Для выявления межгрупповых различий функций дожития использовали критерий Гехана — Вилкоксона, частоты встречаемости альтернативных признаков — точный метод Фишера. Критический уровень значимости α принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии экспериментов через 2–3 мин после однократной интраназальной инстилляцией ФСН 170 мг/мл 10 мкл двигательная активность крыс снижалась, животные выглядели заторможенными. Результаты изучения влияния ФСН на потребление кислорода и внешнее дыхание представлены на рисунке 1.

Как видно из данных, представленных на рисунке 1, через 10 мин после применения ФСН потребление кислорода животными опытной группы снижалось на 33%, а частота дыхательных движений — на 32% по сравнению со значениями в группе контроля. Газообменная эффективность внешнего дыхания, оцениваемая по потреблению кислорода в расчете на дыхательный цикл, существенно не изменялась. В последующие 20 мин потребление кислорода у крыс, интраназально однократно получавших ФНС, оставалось на 9–20% более низким, чем в контроле, хотя и имело тенденцию к частичной нормализации. Таким образом, продолжительность гипометаболического действия однократной инстилляцией ФСН составляла не менее получаса.

Во второй серии экспериментов при изучении влияния ФСН 170 мг/мл в объеме 10 мкл на состояние теплового обмена у крыс отмечено, что пребывание животных в термокамере приводило к статистически значимому повышению ректальной температуры. У животных, помещенных в рестрейнеры, в течение часа она возрастала на $5,5 \pm 0,3^\circ\text{C}$ против $3,3 \pm 0,3^\circ\text{C}$ у животных, свободно располагавшихся в вольерах. В эти же сроки применение ФСН на 15% ускоряло прирост температуры тела у крыс, располагавшихся в вольерах, но на 11% замедляло его у находившихся в рестрейнерах (рис. 2а). При размещении в вольерах у получивших солевой раствор животных наблюдался активный груминг, чего не было у получивших ФСН. Через 120 мин после помещения в вольеры оцениваемая по убыли массы тела потеря организмом влаги на фоне применения ФСН была на 1% от исходной массы тела меньшей, чем в контроле (рис. 2б). Продолжительность жизни крыс в вольерах была большей, чем в рестрейнерах. При расположении в вольерах применение ФСН снижало продолжительность жизни, а при размещении в рестрейнерах имела тенденция к ее продлению (рис. 2в).

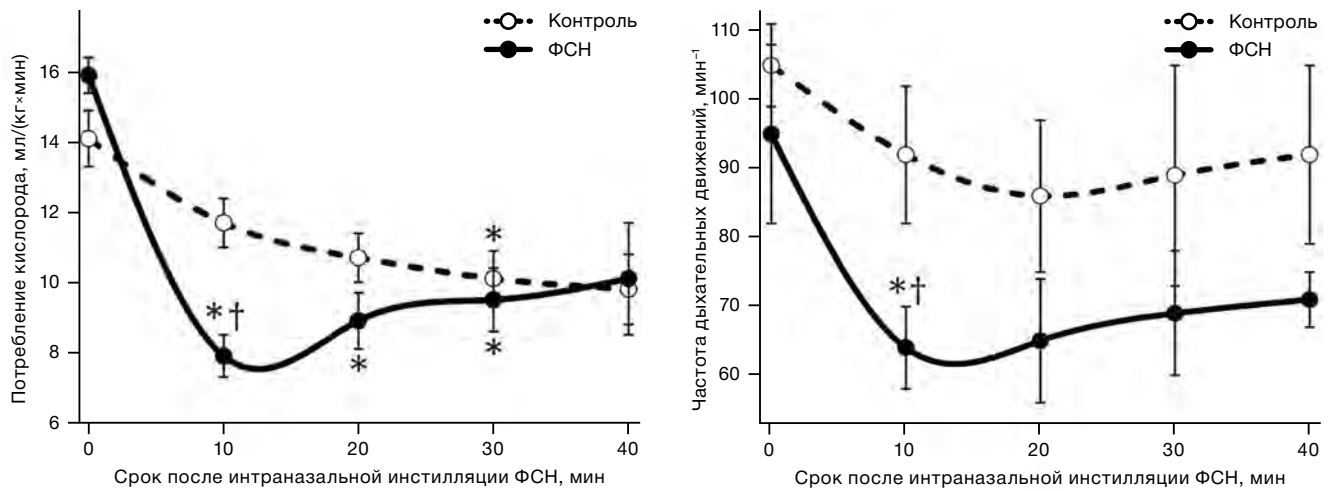


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 1. Динамика потребления кислорода (слева) и частоты дыхательных движений (справа) у крыс самцов после однократной интраназальной инстилляци ФСН

Примечание: данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$); * — статистически значимое отличие от исходного уровня; † — статистически значимое отличие от группы контроля.

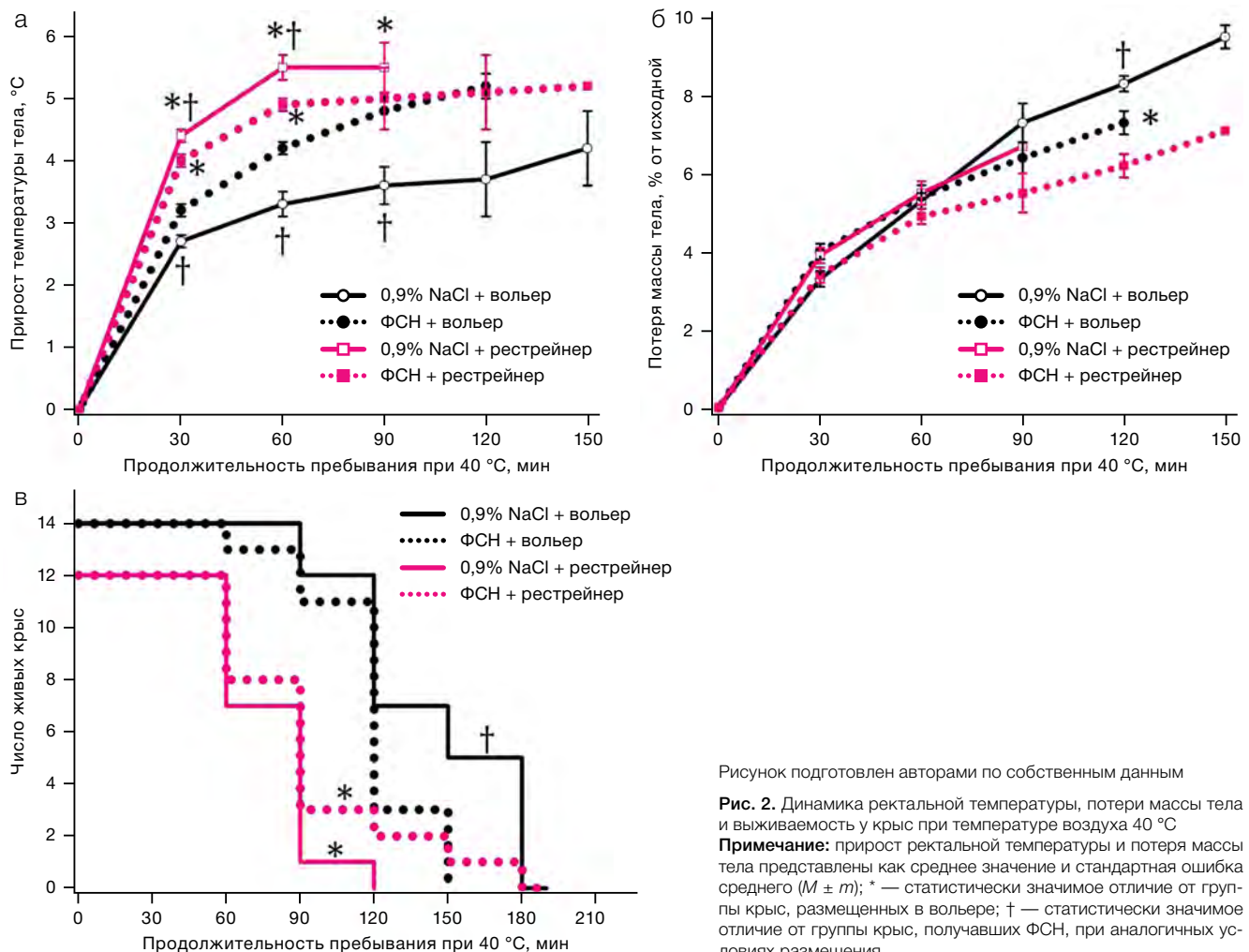


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 2. Динамика ректальной температуры, потери массы тела и выживаемость у крыс при температуре воздуха 40 °C

Примечание: прирост ректальной температуры и потеря массы тела представлены как среднее значение и стандартная ошибка среднего ($M \pm m$); * — статистически значимое отличие от группы крыс, размещенных в вольтер; † — статистически значимое отличие от группы крыс, получавших ФСН, при аналогичных условиях размещения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При однократной инстилляци 10 мкл ФСН доза феназепама для крыс составляла 8,5 мг/кг м.т., что биоэквивалентно 100 мг для взрослого человека. Это пятикратно превышало высшую разовую дозу диазепама 20 мг, которая при внутривенном введении снижала потребление

кислорода человеком на 8% [9]. Поэтому наблюдавшийся в настоящем исследовании вчетверо больший гипометаболический эффект ФСН был обусловлен дозой бензодиазепамина, при экстраполяции на человека пятикратно превышавшей высшую разовую дозу. Продолжительность этого эффекта была близка к полчаса, что указывает на необходимость повторных назначений ФСН

для достижения более длительного гипометаболического действия.

Как следовало из роста температуры тела, пребывание в термокамере вызывало у крыс тепловой стресс. В силу невозможности грюминга у крыс, помещенных в рестрейнеры, затруднялось распределение влаги (предположительно слюны) по шерстному покрову, а следовательно, и потеря тепла ее испарением. Это делало сопоставимыми условия теплоотдачи для помещенных в рестрейнеры животных, получавших интраназальные инстилляции ФСН или раствора хлорида натрия. Поэтому вероятной причиной уменьшения теплового стресса крыс, располагавшихся в рестрейнерах, на фоне применения ФСН было не повышение теплоотдачи, а снижение теплопродукции.

Оценка снижения теплопродукции у животных, перед помещением в термокамеру получивших ФСН, возможна с использованием калорического эквивалента кислорода, который при рационе с преобладанием углеводов близок к 21 Дж/мл [10]. В течение ближайших 30 мин после инстилляций ФСН потребление кислорода животными было в среднем на 2,06 мл/(кг×мин) меньшим, чем в контроле, что отвечает на 1294 Дж/кг меньшей теплопродукции. При близости значений удельной теплоемкости биотканей и воды 4187 кал/(кг×°C) это могло вести к уменьшению на 0,3 °C прироста температуры тела за ближайшие 30 мин после помещения крыс в термокамеру, что и наблюдалось в настоящей работе. Таким образом, при повышенной температуре воздуха и невозможности испарения влаги с большей части поверхности тела введение ФСН замедляло формирование теплового стресса у крыс, снижая теплопродукцию. Для экстраполяции этих данных на человека представляет интерес изучить влияние ФСН на температуру тела в условиях, препятствующих теплоотдаче испарением: при высокой относительной влажности [11], пребывании в изолирующих средствах защиты кожи [12] или при иммерсионной гипертермии [13]. Способность диазепамов, вводимого внутривенно в дозах 10 или 20 мг, снижать температуру тела человека [14] позволяет ожидать ее снижения и на фоне применения ФСН.

Оптимальная относительная влажность и достаточная скорость воздухообмена в термокамере благоприятствовали потере тепла путем испарения влаги крысами, имевшими возможность наносить ее на поверхность тела. Поэтому при их расположении в вольерах температура тела повышалась медленнее, чем в рестрейнерах. Однако введение ФСН сглаживало это различие: препарат ускорял повышение температуры тела. Через 120 мин после помещения в вольеры потеря массы тела, в основном обусловленная испарением воды, на фоне применения ФСН была на 10 г/кг меньшей, чем при введении солевого раствора. При удельной теплоте парообразования воды 2260 Дж/г это соответствовало накоплению в теле животных на 22 600 Дж/кг большего количества теплоты, чем в контроле. При удельной теплоемкости биотканей, близкой к 4187 Дж/(кг×°C), этой энергии было достаточно для повышения температуры тела на 5,4 °C; в действительности же у получивших ФСН крыс она была лишь на 2 °C выше, чем в контроле. Это говорит о влиянии на температуру тела получивших ФСН крыс противоположно направленных факторов, в том числе уменьшения теплоотдачи и показанного выше снижения теплопродукции. Как видно, у животных, не имевших физических препятствий к увлажнению поверхности тела, влияние ФСН на теплоотдачу преобладало над его влиянием на теплопродукцию.

Определенную роль в снижении выживаемости крыс, перед свободным расположением в термокамере

получивших ФСН, могли играть неблагоприятные фармакологические эффекты бензодиазепинов: разобщающее действие на окислительное фосфорилирование [15], снижение артериального давления, частоты сердечных сокращений и коронарного кровотока [16]. Однако основным механизмом вызванного ФСН снижения выживаемости в условиях свободного расположения в термокамере было усугубление теплового стресса. На это указывает тот факт, что через 90 мин после помещения в термокамеру температура тела 43 °C, соответствующая порогу необратимого повреждения биотканей [17], достигалась у 21 и 71% животных, получавших солевой раствор и ФСН соответственно ($p < 0,05$). Экстраполяция этих данных на человека затруднена наличием у него потовых желез на всей поверхности кожного покрова, что обеспечивает теплоотдачу испарением даже на фоне гиподинамии. Вместе с тем нарушение теплоотдачи не исключено и у человека ввиду сообщений об антагонизме бензодиазепинов к мускариновым рецепторам [18], что требует учета климатических условий при разработке рекомендаций по применению ФСН.

Полученные результаты указывают на возможность смягчения применением ФСН теплового стресса при высокой относительной влажности, пребывании в изолирующих средствах защиты кожи или при иммерсионной гипертермии. Особую ценность такая возможность обретает при продолжающемся тепловом воздействии или недоступности физических средств охлаждения тела на догоспитальном этапе помощи пострадавшим.

ВЫВОДЫ

1. Однократная интраназальная инстиляция крысам феназепама в дозе 8,5 мг/кг м.т., что биоэквивалентно 100 мг для взрослого человека, снижала потребление кислорода организмом на величину, достаточную для уменьшения на 0,3 °C прироста температуры тела за 30 мин пребывания при температуре воздуха 40 °C. Продолжительность гипометаболического действия однократной инстиляции назального препарата феназепама (ФСН) составляла не менее получаса, что обеспечивало этот эффект у животных, получавших препарат с получасовым интервалом.

2. При температуре воздуха 40 °C и отсутствии условий для испарения влаги с поверхности тела введение крысам ФСН уменьшало тепловой стресс, снижая теплопродукцию и прирост ректальной температуры на 0,3 °C за 30 мин.

3. Открытое расположение крыс при температуре воздуха 40 °C в вольерах, не создававшее препятствий теплоотдаче путем испарения слюны, наносимой на шерстный покров, сопровождалось более медленным повышением температуры тела и меньшей летальностью, чем при расположении животных в рестрейнерах.

4. Введение ФСН способствовало повышению температуры тела и летальности у крыс, располагавшихся в вольерах при температуре воздуха 40 °C. Основным механизмом этих эффектов было снижение теплоотдачи испарением вследствие подавления ФСН видоспецифического терморегуляторного рефлекса: нанесения слюны на шерстный покров.

5. ФСН перспективен в качестве средства фармакотерапии теплового удара при высокой относительной влажности, пребывании в изолирующих средствах защиты кожи или при иммерсионной гипертермии. Требуется проверки возможности усугубляющего влияния ФСН на тепловой стресс у человека в условиях жаркого климата при беспрепятственной теплоотдаче испарением.

Литература / References

1. Cramer MN, Gagnon D, Laitano O, Crandall C. Human temperature regulation under heat stress in health, disease, and injury. *Physiol. Rev.* 2022;102(4):1907–89. <https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2021>
2. Garcia CK, Renteria LI, Leite-Santos G, Leon LR, Laitano O. Exertional heat stroke: pathophysiology and risk factors. *BMJ Ved.* 2022;1(1):e000239. <https://doi.org/10.1136/bmjmed-2022-000239>
3. Крюков ЕВ, ред. *Военно-полевая терапия*. СПб.: ООО «ГЭОТАР-Медиа 2023.
4. Kryukov EV, ed. *Military field therapy*. St. Petersburg: GEOTAR-Media LLC, 2023 (In Russ.).
4. Краснов КА, Ивницкий ЮЮ, Вакуненко ОА, Рейнюк ВЛ. Фармацевтическая композиция для устранения судорожного синдрома на основе никетамид и препаратов бензодиазепиновой группы. Патент Российской Федерации № 2801050;2023. KrasnovKA, Ivnitsky Yu Yu, Vakunenkova OA, Reinyuk VL. A pharmaceutical composition for the elimination of convulsive syndrome based on nicetamide and benzodiazepine group drugs. Patent of the Russian Federation No. 2801050;2023 (In Russ.).
5. Ивницкий ЮЮ, Рейнюк ВЛ, Краснов КА, Краснова АА, Шутаева КВ. Требования к медикаментозным средствам первой помощи при судорожном синдроме химической этиологии (обзор литературы). *Воен. мед. журн.* 2022;343(3):18–23. Ivnitsky Yu Yu, Reinyuk VL, Krasnova, Krasnova AA, Shataeva KV. Requirements for first aid medications for convulsive syndrome of chemical etiology (literature review). *Military Medical Journal.* 2022;343(3):18–23 (In Russ.). https://doi.org/10.52424/00269050_2022_343_3_18
6. Fleischer JE, Milde JH, Moyer TP, Michenfelder JD. Cerebral effects of high-dose midazolam and subsequent reversal with Ro 14-1788 in dogs. *Anesthesiol.* 1988;68(2):234–42. <https://doi.org/10.1097/00000542-198802000-00010>
7. Hostler D, Northington WE, Callaway CW. High-dose diazepam facilitates core cooling during cold saline infusion in healthy volunteers. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2009;4(4):582–6. <https://doi.org/10.1139/H09-011>
8. Attah AT, Negrón-Moreno PN, Amigo-Duran M, Zhang L, Kennigott M, Brecht M. et al. Sensory cues, behavior and fur-based drying in the rat wetness response. *Sci Rep.* 2024;14(1):24550. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-74900-9>
9. Griffe O, Griffe H, du Cailar J. Effects of diazepam on oxygen consumption. *Ann. Anesthesiol. Fr.* 1979;20(1):37–40.
10. Симбирцев ГС. Регулирующее влияние углекислого газа на потребление кислорода у спортсменов, развивающих выносливость, в свете математического анализа продукции энергии аэробного окисления. *Спортивная медицина: наука и практика.* 2019;9(3):12–24. Simbirtsev GS. The regulatory effect of carbon dioxide on oxygen consumption in athletes developing endurance in the light of a mathematical analysis of the production of aerobic oxidation energy. *Sports medicine: science and practice.* 2019;9(3):12–24 (In Russ.). <https://doi.org/10.17238/ISSN2223-2524.2019.3.12>
11. Wolf ST, Bernard TE, Kenney WL. Heat exposure limits for young unacclimatized males and females at low and high humidity. *J. Occup. Environ. Hyg.* 2022;19(7):415–24. <https://doi.org/10.1080/15459624.2022.2076859>
12. Zhao Y, Su M, Meng X, Liu J, Wang F. Thermophysiological and perceptual responses of amateur healthcare workers: impacts of ambient condition, inner-garment insulation and personal cooling strategy. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2022;20(1):612. <https://doi.org/10.3390/ijerph20010612>
13. Ким АЕ, Шустов ЕБ, Зайцева ИП, Лемешченко АВ. Патологические механизмы неблагоприятного взаимодействия гипоксии и температурных факторов в отношении физической работоспособности. *Пат. Физиол. Эксперим. Терап.* 2022;66(4):94–106. Kim AI, Shustov EB, Zaitseva IP, Lemeshchenko AV. Pathophysiological mechanisms of adverse interaction of hypoxia and temperature factors in relation to physical performance. *Pat. Physiol. Experiment. Therap.* 2022;66(4):94–106 (In Russ.). <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2022.04.94-106>
14. Hostler D, Northington WE, Callaway CW. High-dose diazepam facilitates core cooling during cold saline infusion in healthy volunteers. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2009;34(4):582–86. <https://doi.org/10.1139/H09-011>
15. Jeso F, Truscillo A, Martinotti G, di Jeso B, Magnani B, Martinotti A. Effect of diazepam on mitochondrial respiration. *C. R. Seances. Soc. Biol. Fil.* 1990;184(1):37–40.
16. Shintani R, Ichinomiya T, Tashiro K, Miyazaki Y, Tanaka T, Kaneko S, et al. Comparison of hemodynamic effects of remimazolam and midazolam during anesthesia induction in patients undergoing cardiovascular surgery: a single-center retrospective and exploratory study. *Cureus.* 2024;16(10):e72032. <https://doi.org/10.7759/cureus.72032>
17. Yarmolenko PS, Moon EJ, London C, Manzoor A, Hochman DW, Vigilanti L, Dewhirst MW. Thresholds for thermal damage to normal tissues: an update. *Int. J. Hyperthermia.* 2011;27(4):320–43. <https://doi.org/10.3109/02656736.2010.534527>
18. Hiroshi K, Naoko T, Mitsuru K, Mostofa J, Asuka I, Nagata K, et al. An autopsy case of heatstroke under the influence of psychotropic drugs. *Soud. Lek.* 2020;65(4):76–8.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Ю.Ю. Ивницкий — научный замысел, разработка плана исследования, семантика, трактовка данных; О.А. Вакуненко — руководство экспериментальной частью работы; К.А. Краснов — изготовление опытного образца раствора феназепама; С.С. Гафт — моделирование теплового стресса; Н.В. Лапина — разработка экспериментальной модели теплового стресса.

ОБ АВТОРАХ

Ивницкий Юрий Юрьевич, д-р мед. наук, профессор
<https://orcid.org/0000-0002-1057-5356>
neugierig@mail.ru

Вакуненко Ольга Александровна
<https://orcid.org/0009-0005-9665-9866>
volga-2303@yandex.ru

Краснов Константин Андреевич, д-р хим. наук
<https://orcid.org/0000-0003-1503-2243>
krasnov_tox@mail.ru

Гафт Семен Самуилович, канд. хим. наук
<https://orcid.org/0009-0008-5092-8161>
sgaft@yandex.ru

Лапина Наталья Вадимовна, канд. мед. наук
<https://orcid.org/0000-0002-3418-1095>
lapina2005@inbox.ru

<https://doi.org/10.47183/mes.2025-27-1-43-49>

УДК 616.8



ИММУННЫЙ ОТВЕТ НА ВИРУС ЭПШТЕЙНА-БАРР КАК ЭТИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКТОР И ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ МИШЕНЬ ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ

В.С. Роговский^{1,2}, А.Д. Кукушкина^{2,3}, А.Н. Бойко^{1,2}¹ Федеральный центр мозга и нейротехнологий Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия² Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия³ Городская клиническая больница имени М.Е. Жадкевича Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

Введение. Этиология рассеянного склероза (РС) остается неизвестной. Современное консенсусное мнение заключается в том, что восприимчивость к РС обусловлена комплексным взаимодействием между генетической предрасположенностью и многофакторным влиянием внешней среды, включая такие факторы, как недостаток витамина D, курение, приверженность воспалительной диете, инфекции, психоэмоциональный стресс. Что касается инфекционного компонента, на протяжении десятилетий РС ассоциировался с предшествующей инфекцией, вызываемой вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ). Однако вопрос о том, почему лишь небольшая доля популяции, инфицированной ВЭБ, заболевает РС, остается открытым.

Цель. Определение факторов взаимодействия иммунитета с ВЭБ, предрасполагающих к развитию РС, а также анализ возможностей их использования в качестве терапевтической мишени для профилактики и терапии данного заболевания.

Обсуждение. Результаты недавнего крупного эпидемиологического исследования привнесли новые доводы в пользу связи ВЭБ и РС. Было показано, что в крови носителей ВЭБ можно обнаружить антитела, перекрестно-специфичные к антигенам миелиновой оболочки. Несмотря на это, у большинства носителей ВЭБ РС не развивается. Вероятной причиной является своевременное удаление аутореактивных клеток. Особо важную роль в этом процессе играют NK-клетки. При РС нарушаются процессы NK-опосредованной элиминации аутореактивных В-клеток. В этой связи перспективна дополнительная терапия РС, направленная на контроль аутоиммунных реакций, вызванных ВЭБ.

Выводы. Среди факторов взаимодействия иммунной системы с ВЭБ, способствующих развитию РС, следует отметить сниженную цитотоксическую активность NK-клеток против клеток, проявляющих перекрестную реактивность к антигенам ВЭБ и компонентам миелиновой оболочки. В качестве дополнительной терапии РС может быть обоснованное применение средств, способных снижать представленность ВЭБ в организме и обладающих благоприятным профилем безопасности, в частности куркумина и кверцетина. Также перспективен поиск средств, способных усиливать иммунологический контроль над аутореактивными клетками. К таким средствам могут относиться соединения, способные усиливать активность NK-клеток, в частности уролитин А, куркумин, аллоферон.

Ключевые слова: рассеянный склероз; вирус Эпштейна-Барр; аутореактивные клетки; естественные киллеры; NK-клетки; полифенолы; куркумин

Для цитирования: Роговский В.С., Кукушкина А.Д., Бойко А.Н. Иммунный ответ на вирус Эпштейна-Барр как этиологический фактор и терапевтическая мишень при рассеянном склерозе. *Медицина экстремальных ситуаций.* 2025;27(1):43–49. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-27-1-43-49>

Финансирование: исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы «Изучение влияния полифенолов и их новых наночастиц на иммунный ответ при рассеянном склерозе» № 122022100106-9 (ФМБА).

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

✉ Роговский Владимир Станиславович qwer555@mail.ru

Статья поступила: 30.09.2024 После доработки: 07.02.2025 Принята к публикации: 17.02.2025

IMMUNE RESPONSE AGAINST EPSTEIN-BARR VIRUS AS AN ETIOLOGIC FACTOR AND THERAPEUTIC TARGET FOR MULTIPLE SCLEROSIS

Vladimir S. Rogovskii^{1,2}, Anna D. Kukushkina^{2,3}, Alexey N. Boyko^{1,2}¹ Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies, Moscow, Russia² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia³ Zhadkevich municipal clinical hospital, Moscow, Russia

Introduction. The etiology of multiple sclerosis (MS) remains unknown. According to the current consensus, susceptibility to MS is due to an elaborate interaction between genetic predisposition and multifactorial environmental factors, including vitamin D deficiency, smoking, inflammatory diet, psychoemotional stress, and infections. With regard to the infectious component, for decades, MS has been associated with a prior infection with the Epstein-Barr virus (EBV). However, it remains unclear why only a limited proportion of the numerous EBV-infected population develop MS.

Objective. To discuss the factors of interaction between the immune system and EBV that predispose to the development of MS, as well as to analyze the possibilities of their use as therapeutic targets for the prevention and treatment of MS.

Discussion. The results of a recent large epidemiologic study have provided new evidence for the association between EBV and MS. It has also been shown that cross-reacting antibodies to myelin sheath antigens can be detected in the blood of patients with EBV. However, most patients with EBV do not develop MS. This is probably due to the elimination of autoreactive cells. Natural killer (NK) cells play a particularly important role in this process. In MS, NK-mediated elimination of autoreactive B cells may be impaired. In this regard, an add-on therapy of MS aimed at controlling EBV-induced autoimmune responses appears promising.

Conclusions. Reduced cytotoxic activity of NK cells against cells that show cross-reactivity to EBV antigens and components of the myelin sheath is among the factors of interaction of the immune system with EBV that contribute to MS development. As an add-on therapy for MS, it may be reasonable to use agents that reduce the presence of EBV in the organism and have a favorable safety profile (e.g., curcumin and quercetin). The search for agents that can improve immunological control of autoreactive cells is also promising. Such agents may include compounds that are capable of enhancing the activity of NK cells, for instance, urolithin A, curcumin, and alloferon.

© В.С. Роговский, А.Д. Кукушкина, А.Н. Бойко, 2025

Keywords: multiple sclerosis; Epstein-Barr virus; autoreactive cells; natural killer cells; NK cells; polyphenols; curcumin

For citation: Rogovskii V.S., Kukushkina A.D., Boyko A.N. Immune response against Epstein-Barr virus as an etiologic factor and therapeutic target for multiple sclerosis. *Extreme Medicine*. 2025;27(1):43–49. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-27-1-43-49>

Funding: The study was carried out within the framework of scientific research “Study of the effect of polyphenols and their new nanoforms on the immune response in multiple sclerosis” No.122022100106-9 (FMBA).

Potential conflict of interest: Alexey N. Boyko is a member of the Editorial Board of *Extreme Medicine*. The other authors declare no conflict of interest.

✉ Vladimir S. Rogovskii gwer555@mail.ru

Received: 30 Sept. 2024 **Revised:** 7 Feb. 2025 **Accepted:** 17 Feb. 2025

ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) — хроническое аутоиммунное воспалительное демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы (ЦНС) неизвестной этиологии. Развитие РС связано с комплексным взаимодействием между генетической предрасположенностью и многофакторным влиянием внешней среды, включая такие факторы, как психоэмоциональный стресс, недостаток витамина D, курение, изменение микробиоты, инфекции [1–3]. Среди инфекционного компонента этиологии и патогенеза РС можно особо выделить связь РС с вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ). Около 100% пациентов с РС являются сероположительными в отношении ВЭБ [4]. С одной стороны, эта связь показана достаточно давно, с другой стороны, более 90% взрослого населения во всем мире хронически инфицированы вирусом ВЭБ, при этом РС развивается лишь у малой доли из них [1, 2].

Несмотря на обычно субклиническую активность, ВЭБ ассоциирован с различными опухолевыми и аутоиммунными заболеваниями. ВЭБ оказывает достаточно глубокое воздействие на иммунную систему, являясь наиболее распространенным возбудителем инфекционного мононуклеоза, а также некоторых фатальных лимфопролиферативных заболеваний при иммуносупрессивных состояниях. Все больше новых данных появляется об инфицировании ВЭБ как об одном из основных факторов риска развития ряда аутоиммунных заболеваний, в частности РС [5, 6]. Актуален вопрос, какие особенности иммунного ответа на ВЭБ определяют последующее развитие РС.

Цель работы — определение факторов взаимодействия иммунитета с ВЭБ, предрасполагающих к развитию РС, а также анализ возможностей их использования в качестве терапевтической мишени в профилактике и терапии данного заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поиск, систематический анализ и обзор научной литературы выполнен в электронных библиографических базах данных на русском (eLibrary) и английском (PubMed) языках. Поисковые запросы включали ключевые слова: рассеянный склероз, вирус Эпштейна-Барр, аутореактивные клетки, естественные киллеры, NK-клетки, полифенолы, куркумин (multiple sclerosis, Epstein-Barr virus, autoreactive cells, natural killer cells, NK-cells, polyphenols, curcumin). Глубина поиска составила 10 лет. Критерием включения было наличие данных о результатах когортных исследований, рандомизированных контролируемых исследований, доклинических исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Вирус Эпштейна-Барр в этиологии и патогенезе рассеянного склероза

Тесная взаимосвязь ВЭБ и РС обсуждается уже в течение многих лет, основываясь на данных о повышении риска развития РС после перенесенного инфекционного мононуклеоза (в виде симптоматической первичной ВЭБ-инфекции) и при высоких титрах антител к специфическим антигенам ВЭБ [7]. Результаты недавнего обширного эпидемиологического исследования привнесли новые доводы в пользу связи ВЭБ и РС. В ходе исследования Bjornevik et al. была проверена гипотеза о том, что РС вызывается ВЭБ в когорте, состоящей из более чем 10 млн молодых людей. Согласно результатам исследования риск РС увеличился в 32 раза после заражения ВЭБ, но не увеличился после заражения другими вирусами, включая цитомегаловирус (ЦМВ), передающийся аналогичным путем. Уровни сывороточных легких цепей нейтрофиламентов (показатель аксональной дегенерации, один из диагностических маркеров при РС) увеличились только после продукции антител к антигенам ВЭБ. Авторы считают, что эти результаты не могут быть объяснены каким-либо известным фактором риска РС и могут означать, «что ВЭБ является основной причиной РС» (перевод авторов) [8].

Последствия инфицирования ВЭБ различны и зависят от возраста и генетических факторов. Вероятно, риск развития инфекционного мононуклеоза и РС повышается, если первичная инфекция ВЭБ происходит в возрасте после 10 лет, когда негативная селекция аутореактивных Т-клеток замедляется, а клеточно-опосредованный ответ клеток Th-1 достигает своего пика. Большинство людей диагноз РС ставится в возрасте от 20 до 50 лет, через несколько лет после заражения ВЭБ. Персистенция ВЭБ повышает выживаемость В-клеток памяти и вызывает длительные изменения в цитокиновом ответе хозяина [5, 6].

Однако остается открытым вопрос, почему так много людей являются носителями ВЭБ, но только у небольшой части развивается РС. Более того, неясно, как именно ВЭБ вовлечен в этиологию и/или патогенез РС. При ответе на второй вопрос в литературе выделяют две основные гипотезы [9]. Во-первых, персистирующая инфекция и повторная реактивация вируса могут служить стимулом для хронического воспаления внутри и вне нервной системы либо напрямую, либо путем создания длительного пула провоспалительных В-лимфоцитов. Во-вторых, аутоиммунные реакции могут быть вызваны посредством молекулярной мимикрии антигенов, общих

для белков ВЭБ и антигенов ЦНС, что показано, в частности, для молекулы адгезии глиальных клеток (GlialCAM), основного белка миелина и других [9]. Как уже упоминалось, взаимосвязь между РС и ВЭБ была установлена довольно давно, но в последнее время появились ее более убедительные доказательства в контексте второй из упомянутых выше теорий.

Роль NK-клеток в обеспечении иммунной толерантности в условиях аутоиммунитета к антигенам ЦНС

Регуляторная роль NK-клеток (естественных киллеров — natural killer cells) описана более 20 лет назад [10]. В последние годы появляются новые данные о возможной роли NK-клеток в иммунологической толерантности и их протективном значении в отношении различных аутоиммунных заболеваний, включая РС. Особое внимание в контексте иммунорегуляторных свойств уделяется CD56^{bright} NK-клеткам, которые играют важную роль в контроле ответа Т-клеток и поддержании гомеостаза. Эта субпопуляция NK-клеток обязана своим названием высокой поверхностной экспрессии CD56 (молекула адгезии нервных клеток), также для нее характерна экспрессия CD16^{dim} и ингибиторного рецептора NKG2A и при этом отсутствие экспрессии иммуноглобулиноподобных рецепторов клеток-киллеров KIR (killer cell immunoglobulin-like receptors). CD56^{bright} NK-клетки обладают сниженной цитотоксичностью по сравнению с CD56^{dim} NK-клетками, что позволяет считать их регуляторными. Показано, что терапия различными препаратами, изменяющими течение рассеянного склероза (ПИТРС), повышает относительное количество NK-клеток, а также NK-опосредованные иммунорегуляторные функции [11].

NK-клетки CD56^{bright} экспрессируют рецепторы для различных цитокинов, таких как интерлейкин (ИЛ)-12, ИЛ-15 и ИЛ-18, которые продуцируются активированными антиген-презентирующими клетками. Ответ на эти цитокины может вызывать пролиферацию NK-клеток CD56^{bright} и продукцию ими, в свою очередь, ряда цитокинов, включая ИФН- γ , ИЛ-13 и ГМ-КСФ (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), а также регуляторный ИЛ-10 [10, 11].

Судя по данным литературы, не только CD56^{bright} NK-клетки опосредуют иммунорегуляторные функции. Так, была описана ассоциация ЦМВ-индуцированной экспансии NKG2C⁺ NK-клеток с более низким риском прогрессирования инвалидности при РС, что позволяет предположить влияние этих клеток на клиническое течение заболевания. NKG2C⁺ NK-клетки человека входят в популяцию CD56^{dim}, которая опосредует цитотоксичность и выработку цитокинов при взаимодействии с клетками-мишенями либо напрямую, либо опосредованно антителозависимой клеточной цитотоксичностью (в данном случае — взаимодействием IgG с CD16A на NK-клетках) [12, 13].

По данным недавно проведенного исследования Ding et al., после иммуносупрессорной терапии или терапии ПИТРС наблюдалось значительное увеличение соотношения NK-клеток CD56^{dim} к циркулирующим фолликулярным Т-хелперам. Это соотношение позволило в значительной степени дифференцировать пациентов с рецидивирующим РС от здоровых лиц и пациентов в ремиссии. Авторы предполагают, что это соотношение может стать новым предиктором активности заболевания и оценки эффективности лечения [14].

В 2024 году в работе Dal et al. показано, что более низкое относительное содержание NK-клеток через 3 месяца после анти-CD20-терапии (ритуксимаб и окрелизумаб) коррелирует с наличием активности заболевания через 6 месяцев после терапии, что соответствует возможной защитной роли NK-клеток при РС. Также, по сравнению с исходными значениями, терапия анти-CD20 антителами привела к абсолютному и относительному снижению уровней В-лимфоцитов и повышению абсолютного и относительного уровня NK-клеток через 3 и 5 месяцев после терапии [15].

Механизмы контроля перекрестно-активированных иммунных клеток к антигенам вируса Эпштейна-Барр

У здоровых доноров, имеющих антитела к ядерному антигену вируса Эпштейна-Барр (EBNA^{386–405}), и у пациентов с РС показана их перекрестная активность в отношении антигена миелиновой оболочки GlialCAM^{370–389} (молекула адгезии глиальных клеток). Более того, данная перекрестная активность способна вызывать иммунный ответ и у пациентов с РС, и у здоровых доноров [9, 16]. В связи с этим в недавней работе Vietzen et al. был проведен обширный поиск различий в иммунном ответе на антигены ВЭБ у пациентов с РС и здоровых доноров. Были проанализированы когорты из 270 EBNA-1-серопозитивных пациентов с РС и 270 EBNA-1-серопозитивных здоровых доноров, сопоставленных по полу, возрасту и времени с момента сероконверсии к антигенам ВЭБ и возникновения инфекционного мононуклеоза. Все пациенты с РС имели высокий уровень антител к EBNA^{386–405}. Из группы здоровых доноров часть имела низкий уровень антител к EBNA^{386–405} (группа EBNA^{low}, 162 человека), а часть — высокий уровень (группа EBNA^{high}, 108 человек). Примечательно, что и пациенты с РС, и здоровые доноры группы EBNA^{high} показали значительно более высокие уровни иммунных клеток, специфичных к EBNA^{386–405}, в частности плазматических CD4⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток, по сравнению с группой EBNA^{low} [17].

Таким образом, здоровые доноры из группы EBNA^{high} также имеют иммунологические предпосылки к аутоиммунному поражению миелиновой оболочки. Однако этого не происходит, вероятно, вследствие наличия защитных факторов, препятствующих аутоиммунной реакции.

Результаты работы Vietzen et al. предполагают, что одним из важных факторов, позволяющим избежать развития РС, является уничтожение аутоиммунных GlialCAM^{370–389}-специфичных клеток с помощью цитотоксических NK-клеточных реакций. При этом у пациентов с РС эффективность этого процесса снижена. Так, в указанной работе выявлен ряд отличий между группой пациентов с РС, имеющими антитела к GlialCAM^{370–389}, и здоровыми носителями ВЭБ, также имеющими антитела к GlialCAM^{370–389}. В частности, у здоровых носителей ВЭБ с аутоантителами к GlialCAM^{370–389} обнаружена существенно более высокая представленность NK-клеток типа NKG2D⁺ (NKG2D⁺ NK-клеток) с высокоактивным гомозиготным генотипом — NKG2D^{HNK/HNK}. В популяции здоровых носителей аутоантител к GlialCAM^{370–389} частота высокоактивных NKG2D⁺ NK-клеток была примерно в 5 раз выше, чем в популяции носителей аутоантител к GlialCAM^{370–389} страдающих РС. Уровень NKG2C⁺ NK-клеток в контрольных группах также был значительно выше, чем у пациентов с РС [17].

Вероятно, у пациентов с РС аутореактивные клетки эффективно избегают регуляторных и цитотоксических иммунных реакций за счет ингибирования NK-клеток. Один из механизмов этого ингибирования — увеличение представленности HLA-E на поверхности В-клеток, что индуцируется определенными типами ВЭБ. В норме HLA-E, связанный с нормальными пептидами от HLA класса I, сигнализирует NK-клеткам, что клетка не изменена и ее не нужно элиминировать [18]. Однако при РС этот механизм может становиться чрезмерно активным, препятствуя NK-опосредованной элиминации аутореактивных В-клеток. HLA-E может играть важную роль в иммунном уклонении инфицированных ВЭБ клеток от естественных киллеров: известно, что связывание HLA-E с NKG2A⁺ на NK-клетках ингибирует их функцию [19].

HLA-E стабилизируется пептидом, полученным из ВЭБ, LMP-1 (Epstein-Barr virus latent membrane protein 1), экспрессирующимся в латентно инфицированных ВЭБ клетках [20]. LMP-1 является полиморфным пептидом: различные варианты ВЭБ могут иметь различные варианты LMP-1. Обнаружено, что определенные варианты LMP-1 (GGDPHLPTL и GGDPPLPTL) приводили к стабильному повышению уровня HLA-E на поверхности В-клеток, специфичных к GlialCAM₃₇₀₋₃₈₉. Показано, что почти все пациенты с РС являются носителями вышеуказанных вариантов ВЭБ, повышающих экспрессию HLA-E. Усиленная реактивация ВЭБ и последующая экспрессия ИЛ-27 коррелируют с повышенной экспрессией HLA-E и ингибированием NKG2A⁺ эффекторных клеток у пациентов с РС [17]. ИЛ-27 является членом семейства ИЛ-12, важным в патогенезе аутоиммунных расстройств [21], а рецептор NKG2A — один из ингибирующих рецепторов NK-клеток [22].

Таким образом, согласно работе Vietzen et al., среди факторов, ассоциированных с высоким риском РС у носителей ВЭБ, можно отметить низкий или отсутствующий NKG2C⁺ NK-клеточный ответ (OR 41,3), варианты GGDPHLPTL и GGDPPLPTL пептида LMP-1 у ВЭБ (OR 39,6), низкоактивный генотип NKG2D^{LNK} (OR 8,9) и HLA-E*01:01 (OR 4,3). При этом комбинация трех и более факторов риска приводит к увеличению риска РС у носителей аутореактивных антител к ядерному антигену ВЭБ примерно в 180 раз. Также инфицирование ВЭБ с рисковым вариантом LMP в сочетании с генотипом HLA-E*01:01 увеличивает риск развития РС примерно в 260 раз [17]. Важно, что значение NK-клеток в удалении аутореактивных клеток показано и в других исследованиях. Стоит отметить, что данные о роли определенного снижения NK-активности в патогенезе РС согласуются с тем фактом, что психоэмоциональный стресс является одним из важнейших факторов риска в этиологии РС. Функция NK-клеток в особенной степени нарушается при психоэмоциональном стрессе [23, 24].

Перспективы дополнительной терапии РС, направленной на контроль перекрестных вирус Эпштейна-Барр-индуцированных иммунных реакций

В связи с описанием вероятных иммунологических механизмов, обеспечивающих защиту от развития РС при наличии аутоантител к антигенам ЦНС, целесообразно проанализировать возможные варианты профилактики и терапии, направленные на усиление этих механизмов. Эти варианты можно подразделить на направленные на усиление иммунорегулирующих реакций, обеспечивающих удаление аутореактивных клеток, а также

направленные непосредственно на снижение представленности ВЭБ в организме. Мы рассмотрим с этой точки зрения свойства ряда средств, предлагаемых в качестве дополнительной терапии РС.

Средства, направленные на снижение представленности ВЭБ в организме

ВЭБ-инфекции отводится одна из центральных ролей с точки зрения запуска срыва механизмов иммунной толерантности. Однако до сих пор не разработаны противовирусные препараты или вакцины для лечения и профилактики данной инфекции. Поэтому представляется перспективным поиск различных соединений, направленных на контроль перекрестных ВЭБ-индуцированных иммунных реакций. В свете поиска средств для дополнительной терапии РС, обладающих благоприятным профилем безопасности, представляет интерес тот факт, что различные соединения природного происхождения, в особенности полифенолы и терпеноиды, такие как куркумин, эпигаллокатехин галлат, ресвератрол, мороновая кислота и андрографолид, обладают противовирусной активностью против ВЭБ [25].

Некоторые биологически активные соединения, выделенные из лекарственных растений, ингибируют ранние стадии инфекции ВЭБ. Так, полифенольное соединение кверцетин (выделяемый, в частности, из корня солодки), препятствует распознаванию рецепторов ВЭБ и, следовательно, блокирует проникновение ВЭБ в клетки [26]. В другом исследовании показана способность кверцетина подавлять экспрессию EBNA-1 и LMP-2, что может способствовать уменьшению перекрестных реакций на антигены ВЭБ [27].

Показано, что куркумин обладает значительным противовирусным эффектом, в частности в отношении вирусов простого герпеса 1-го и 2-го типа, ЦМВ, герпесвируса, ассоциированного с саркомой Капоши, ВЭБ и бычьего герпесвируса 1. Механизмы противовирусных эффектов куркумина связаны с его способностью препятствовать целому ряду клеточных и молекулярных процессов, которые необходимы для экспрессии и репликации вирусных генов. Куркумин (10 мкМ) увеличивает долю плазматической мембраны, принимающей конформацию липидного рафта, что подтверждает данные о том, что куркумин может модулировать липидный бислой [28]. Липидные рафты — это динамические ансамбли белков и липидов, которые свободно плавают в жидком неупорядоченном бислое клеточных мембран, но также могут объединяться в большие упорядоченные платформы. Эти структуры важны для регулирования различных мембранных функций в эукариотических клетках [29]. Куркумин подавляет пролиферацию клеток носоглоточной карциномы человека, ассоциированной с ВЭБ, путем ингибирования экспрессии ядерного антигена 1 вируса Эпштейна-Барр. Так, 50%-ные ингибирующие концентрации куркумина составляли 12,4 и 3,3 мкМ для 24-часовой и 48-часовой обработки куркумином соответственно [30].

Стоит отметить, что вышеуказанные соединения проявляют противовирусную активность в исследованиях *in vitro* в относительно высоких концентрациях: обычно несколько микромоляр (мкМ) и более, что многократно превышает их концентрации в плазме крови. В последние годы появились данные ряда клинических исследований о различных способах повышения биодоступности липофильных соединений, таких как использование

различных наночастиц, липосомальных форм, мицеллярных форм, а также использование комбинаций различных веществ. В частности, использование мицеллярных форм куркумина позволило достигнуть уровней этого соединения в плазме крови, сопоставимых с его концентрациями в исследованиях *in vitro* [31, 32].

Средства, направленные на усиление иммунных реакций, обеспечивающих удаление аутореактивных клеток

Как было отмечено выше, защита от развития РС у лиц, имеющих аутореактивные антитела, во многом опосредована активацией эффекторного звена иммунитета в отношении аутореактивных клеток. В основном речь идет об определенных субпопуляциях NK-клеток и CD8⁺ Т-клеток. Средства, обладающие мягким иммуностимулирующим действием, могут быть перспективны для усиления иммунорегуляторных реакций, обеспечивающих удаление аутореактивных клеток. Так, эффект ряда ПИТРС связан с усилением NK-активности. В частности, у пациентов, принимающих диметилфумарат (ПИТРС 1-й линии), общее количество лимфоцитов снизилось в зависимости от времени воздействия. Количество же NK-клеток показало неоднородную тенденцию, в итоге увеличившись примерно на 86% после 2 лет лечения [33]. Применение высокоактивных средств с целью иммуномодуляции и повышения NK-активности, таких как терапия антителами, может быть связано с рядом побочных эффектов, вынуждающих порой отменять использование уже одобренных средств [34].

Среди средств с благоприятным профилем безопасности, обладающих иммуностимулирующими и нейропротекторными эффектами, подходящих для дополнительной терапии РС, также существуют соединения, способные оказывать иммуностимулирующий эффект. Уролитин А (полифенольный метаболит кишечной микробиоты) обладает противовоспалительным эффектом в отношении хронического воспаления, с одной стороны, и усиливает персистенцию и эффекторные функции CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов, усиливает активность NK-клеток, с другой стороны [35–37].

Кверцетин, уже упоминавшийся нами полифенол, в экспериментах *in vivo* при введении мышам в дозе 1 мг/кг каждые 2 дня в течение 30 дней увеличивал долю NK-клеток при отсутствии влияния на популяции Т- и В-клеток. Также за счет связывания с белком MYH9 (основной компонент цитоскелета, играющий важную роль в сохранении и поддержании функциональности гемопоэтических стволовых клеток) данный полифенол повышал количество и стимулировал созревание NK-клеток [38]. Однако есть исследования, где прием полифенолов не оказывал существенного влияния на NK-активность. Так, прием 500–1000 мг кверцетина не оказал существенного влияния на активность NK-клеток у здоровых взрослых женщин [39]. Возможно, подобные результаты могут быть связаны с уже упоминавшейся ранее низкой биодоступностью полифенолов.

Кверцетин, как и многие другие полифенолы, содержится в различных продуктах природного происхождения (таких, как виноградные косточки, лук, чеснок, чай и прочие). Например, свежий лук содержит около 30–45 мг/100 г кверцетина и 4,5 мг/100 г кемпферола [40]. Ввиду низкой биодоступности полифенолов, как уже было отмечено выше, может быть перспективным применение

их комбинаций с другими веществами, способными увеличивать их суммарную биодоступность. С этой точки зрения применение натуральных экстрактов, содержащих целый спектр активных веществ, может быть эффективным для усиления результирующей биодоступности. Так, показана способность различных растительных экстрактов усиливать активность NK-клеток [41].

Согласно результатам недавнего рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого исследования применение экстракта луковой шелухи (1000 мг экстракта в день в течение 8 недель) улучшает активность NK-клеток у пациентов с умеренными симптомами заболеваний верхних дыхательных путей без каких-либо существенных побочных эффектов [42]. Эти клинические результаты соответствуют результатам, полученным *in vitro*, согласно которым инкубация мононуклеарных клеток периферической крови (МНПК) с экстрактами лука (*Allium cepa*) привела к существенному увеличению частоты CD16⁺ NK-клеток [43]. Пероральное введение крысам комбинированного экстракта *Sargassum coreanum* (в дозировках 30 мг/кг, 100 мг/кг или 300 мг/кг в течение 4 недель) и *Curcuma longa* (5 мг/кг, 4 недели) также вызывало повышение активности NK-клеток [44].

В работе Focaccetti et al. были получены интересные данные *in vitro* использования комбинации куркумина и ресвератрола. В культуре МНПК человека комбинация этих полифенолов (в концентрациях 5 мкМ), с одной стороны, увеличивала продукцию ИЛ-10 Т-регуляторными клетками. С другой стороны, эта комбинация усиливала активность NK-клеток за счет повышения и понижения регуляции активирующих и ингибирующих рецепторов соответственно, а также повышения уровня экспрессии CD68 на моноцитах/макрофагах [45].

Использование куркумина в качестве дополнительной терапии РС активно изучается, в том числе в клинических исследованиях. К настоящему моменту имеются результаты ряда клинических исследований дополнительной терапии куркумином при РС, свидетельствующие о ее перспективности, в особенности при использовании форм с повышенной биодоступностью [46–48].

Аллоферон, противомикробный цитокиноподобный пептид, также способен стимулировать NK-активность и увеличивать продукцию NKG2D в NK-клетках, при этом обладая противовоспалительными свойствами, что делает его перспективным для изучения в качестве дополнительной терапии РС [49, 50].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные в течение последних лет, свидетельствуют о важной роли иммунного ответа на ВЭБ в этиологии и патогенезе РС. Вероятно, удаление аутореактивных клеток, перекрестно-специфичных к антигенам ВЭБ, с помощью цитотоксических CD8⁺ Т-клеток и в особенности NK-клеток является одним из основных механизмов, препятствующих развитию аутоиммунных поражений ЦНС при РС. В последние годы выявлен ряд факторов риска, связанных с иммунным ответом на ВЭБ, которые могут увеличивать вероятность развития РС. К этим факторам риска относятся: низкий или отсутствующий NKG2C⁺ NK-клеточный ответ, варианты GGDPHPLTL и GGDPPLPLTL пептида LMP-1 у ВЭБ, низкоактивный генотип NKG2D^{LNK} и HLA-E*01:01. Полученные данные открывают перспективы для появления новых подходов в профилактике и терапии РС. Так, в качестве

терапевтической мишени перспективным может быть использование определенных компонентов иммунного ответа на ВЭБ, таких как активность НК-клеток.

Средства для дополнительной терапии РС, обладающие благоприятным профилем безопасности, могут быть подходящими для этих целей. Эффективность данных средств, особенно природного происхождения, может быть обусловлена сочетанием противовирусной активности, противовоспалительной с иммуностимулирующей, направленной на усиление иммунологических механизмов, способных элиминировать аутореактивные клетки.

Литература / References

- Wong Y, Meehan MT, Burrows SR, Doolan DL, Miles JJ. Estimating the global burden of Epstein-Barr virus-related cancers. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2022;148(1):31–46. <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03824-y>
- Laderach F, Munz C. Epstein Barr Virus Exploits Genetic Susceptibility to Increase Multiple Sclerosis Risk. *Microorganisms*. 2021;9(11):2191. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112191>
- Hatami A, Ahmadi-Khorram M, Keykhaei F, Esfehiani AJ, Nemati M. Association Between the Risk of Multiple Sclerosis and Dietary Proinflammatory/Anti-Inflammatory Food Intake and Dietary Diversity: A Case-Control Study. *Clin Nutr Res*. 2024;13(1):61–73. <https://doi.org/10.7762/cnr.2024.13.1.61>
- Lehikoinen J, Nurmi K, Ainola M, Clancy J, Nieminen JK, Jansson L, et al. Epstein-Barr Virus in the Cerebrospinal Fluid and Blood Compartments of Patients With Multiple Sclerosis and Controls. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2024;11(3):e200226. <https://doi.org/10.1212/NXI.000000000000200226>
- Soldan SS, Lieberman PM. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Nat Rev Microbiol*. 2023;21(1):51–64. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00770-5>
- Xu Y, Hiyoshi A, Smith KA, Piehl F, Olsson T, Fall K, et al. Association of Infectious Mononucleosis in Childhood and Adolescence With Risk for a Subsequent Multiple Sclerosis Diagnosis Among Siblings. *JAMA Netw Open*. 2021;4(10):e2124932. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.24932>
- Bjornevik K, Munz C, Cohen JL, Ascherio A. Epstein-Barr virus as a leading cause of multiple sclerosis: mechanisms and implications. *Nat Rev Neurol*. 2023;19(3):160–71. <https://doi.org/10.1038/s41582-023-00775-5>
- Bjornevik K, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y, et al. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*. 2022;375(6578):296–301. <https://doi.org/10.1126/science.abj8222>
- Rommer P, Puchhammer-Stöckl E, Lassmann H, Berger T, Vietzen H. Ineffective control of Epstein-Barr virus infection is seen in MS: What is next? *Clinical and Translational Medicine*. 2024;14(2):e1596. <https://doi.org/10.1002/ctm2.1596>
- Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56^{bright} subset. *Blood*. 2001;97(10):3146–51. <https://doi.org/10.1182/blood.V97.10.3146>
- Gross CC, Schulte-Mecklenbeck A, Wiendl H, Marcenaro E, Kerlero de Rosbo N, Uccelli A, et al. Regulatory Functions of Natural Killer Cells in Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2016;7:606. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00606>
- Moreira A, Alari-Pahissa E, Munteis E, Vera A, Zabalza A, Llop M, et al. Adaptive Features of Natural Killer Cells in Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2019;10:2403. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02403>
- Martínez-Rodríguez JE, Cobo-Calvo A, Villar LM, Munteis E, Blanco Y, Rasal R, et al. Adaptive natural killer cell response to cytomegalovirus and disability progression in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2016;22(6):741–52. <https://doi.org/10.1177/1352458515601215>
- Ding J, Yan X, Zhao C, Zhao D, Jia Y, Ren K, et al. The ratio of circulating CD56(dim) NK cells to follicular T helper cells as a promising predictor for disease activity of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Heliyon*. 2024;10(10):e31533. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e31533>
- Dal Bello S, Lorenzini S, Saccomano E, Tereshko Y, Gigli GL, Pucillo CE, et al. NK Cell Levels Correlate with Disease Activity in Patients with Multiple Sclerosis on Ocrelizumab/Rituximab Therapy. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2024;17(2):150. <https://doi.org/10.3390/ph17020150>
- Xie C, Sun C, Zeng MS. Navigating Epstein-Barr virus autoimmunity: role of NK cells and T cells in multiple sclerosis. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1):48. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01774-8>
- Vietzen H, Berger SM, Kühner LM, Furlano PL, Bsteh G, Berger T, et al. Ineffective control of Epstein-Barr-virus-induced autoimmunity increases the risk for multiple sclerosis. *Cell*. 2023;186(26):5705–18.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.11.015>
- Huisman BD, Guan N, Ruckert T, Garner L, Singh NK, McMichael AJ, et al. High-throughput characterization of HLA-E-presented CD94/NKG2x ligands reveals peptides which modulate NK cell activation. *Nat Commun*. 2023;14(1):4809. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40220-1>
- Fisher JG, Doyle ADP, Graham LV, Khakoo SI, Blunt MD. Disruption of the NKG2A:HLA-E Immune Checkpoint Axis to Enhance NK Cell Activation against Cancer. *Vaccines (Basel)*. 2022;10(12):1993. <https://doi.org/10.3390/vaccines10121993>
- Mbiribindi B, Pena JK, Arvedson MP, Moreno Romero C, McCarthy SR, Hatton OL, et al. Epstein-Barr virus peptides derived from latent cycle proteins alter NKG2A⁺ NK cell effector function. *Sci Rep*. 2020; 10(1):19973. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76344-3>
- Meka RR, Venkatesha SH, Dudics S, Acharya B, Moudgil KD. IL-27-induced modulation of autoimmunity and its therapeutic potential. *Autoimmun Rev*. 2015;14(12):1131–41. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.08.001>
- Yu H, Li C, Wang X, Duan J, Yang N, Xie L, et al. Techniques and Strategies for Potential Protein Target Discovery and Active Pharmaceutical Molecule Screening in a Pandemic. *J Proteome Res*. 2020;19(11):4242–58. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00372>
- Fernandes SB, Patil ND, Meriaux S, Theresine M, Muller CP, Leenen FAD, et al. Unbiased Screening Identifies Functional Differences in NK Cells After Early Life Psychosocial Stress. *Front Immunol*. 2021;12:674532. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.674532>
- Wyman PA, Moynihan J, Eberly S, Cox C, Cross W, Jin X, et al. Association of family stress with natural killer cell activity and the frequency of illnesses in children. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2007;161(3):228–34. <https://doi.org/10.1001/archpedi.161.3.228>
- Eladwy RA, Vu HT, Shah R, Li CG, Chang D, Bhuyan DJ. The Fight against the Carcinogenic Epstein-Barr Virus: Gut Microbiota, Natural Medicines, and Beyond. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(2). <https://doi.org/10.3390/ijms24021716>
- Lee M, Son M, Ryu E, Shin YS, Kim JG, Kang BW, et al. Quercetin-induced apoptosis prevents EBV infection. *Oncotarget*. 2015;6(14):12603–24. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3687>
- Lee HH, Lee S, Shin YS, Cho M, Kang H, Cho H. Anti-Cancer Effect of Quercetin in Xenograft Models with EBV-Associated

- Human Gastric Carcinoma. *Molecules*. 2016;21(10):21101286 <https://doi.org/10.3390/molecules21101286>
28. Zhu L, Ding X, Zhang D, Yuan C, Wang J, Ndegwa E, et al. Curcumin inhibits bovine herpesvirus type 1 entry into MDBK cells. *Acta Virol*. 2015;59(3):221–7. <https://doi.org/10.4149/av.2015.03.221>
 29. Simons K, Ehelalt R. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest*. 2002;110(5):597–603. <https://doi.org/10.1172/JCI16390>
 30. Liu L, Yang J, Ji W, Wang C. Curcumin Inhibits Proliferation of Epstein-Barr Virus-Associated Human Nasopharyngeal Carcinoma Cells by Inhibiting EBV Nuclear Antigen 1 Expression. *Biomed Res Int*. 2019;2019:8592921. <https://doi.org/10.1155/2019/8592921>
 31. Grafeneder J, Derhaschnig U, Eskandary F, Buchtele N, Sus N, Frank J, et al. Micellar Curcumin: Pharmacokinetics and Effects on Inflammation Markers and PCSK-9 Concentrations in Healthy Subjects in a Double-Blind, Randomized, Active-Controlled, Crossover Trial. *Mol Nutr Food Res*. 2022;66(22):e2200139. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202200139>
 32. Gayathri K, Bhaskaran M, Selvam C, Thilagavathi R. Nano formulation approaches for curcumin delivery- a review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2023;82:104326. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104326>
 33. Marastoni D, Buriani A, Pisani AI, Crescenzo F, Zuco C, Fortinguerra S, et al. Increased NK Cell Count in Multiple Sclerosis Patients Treated With Dimethyl Fumarate: A 2-Year Longitudinal Study. *Front Immunol*. 2019;10:1666. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01666>
 34. Rommer PS, Berger K, Ellenberger D, Fneish F, Simbrich A, Stahmann A, et al. Management of MS Patients Treated With Daclizumab — a Case Series of 267 Patients. *Front Neurol*. 2020;11:996. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00996>
 35. Ma S, Wu Q, Wu W, Tian Y, Zhang J, Chen C, et al. Urolithin A Hijacks ERK1/2-ULK1 Cascade to Improve CD8(+) T Cell Fitness for Antitumor Immunity. *Adv Sci (Weinh)*. 2024;11(18):e2310065. <https://doi.org/10.1002/advs.202310065>
 36. Rogovskii VS, Matyushin AI, Shimanovskii NL. Urolithin A influences cytokine production by various cancer cell lines. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2023;57(4):17–21. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2023-57-4-17-21>
 37. Rogovskii V, Murugin VV, Vorobyev N, Popov S, Sturov N, Krasheninnikov A, et al. Urolithin A increases the natural killer activity of PBMCs in patients with prostate cancer. *Front Pharmacol*. 2024;15:1503317. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1503317>
 38. Su T, Shen H, He M, Yang S, Gong X, Huang C, et al. Quercetin promotes the proportion and maturation of NK cells by binding to MYH9 and improves cognitive functions in aged mice. *Immun Ageing*. 2024;21(1):29. <https://doi.org/10.1186/s12979-024-00436-1>
 39. Heinz SA, Henson DA, Nieman DC, Austin MD, Jin F. A 12-week supplementation with quercetin does not affect natural killer cell activity, granulocyte oxidative burst activity or granulocyte phagocytosis in female human subjects. *Br J Nutr*. 2010;104(6):849–57. <https://doi.org/10.1017/S000711451000156X>
 40. Savitha S, Bhatkar N, Chakraborty S, Thorat BN. Onion quercetin: As immune boosters, extraction, and effect of dehydration. *Food Bioscience*. 2021;44:101457. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101457>
 41. Shabsoug B, Khalil R, Abuharfeil N. Enhancement of natural killer cell activity *in vitro* against human tumor cells by some plants from Jordan. *J Immunotoxicol*. 2008;5(3):279–85. <https://doi.org/10.1080/15376510802312027>
 42. Cho H, Kim S, Lee SH, Park Y. Effect of onion (*Allium cepa* L.) peel extract on natural killer cell and cytokines in a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutr Res Pract*. 2024;18(1):33–45. <https://doi.org/10.4162/nrp.2024.18.1.33>
 43. Lisanti A, Formica V, Ianni F, Albertini B, Marinozzi M, Sardella R, et al. Antioxidant activity of phenolic extracts from different cultivars of Italian onion (*Allium cepa*) and relative human immune cell proliferative induction. *Pharm Biol*. 2016; 54(5):799–806. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1080733>
 44. Park YM, Lee HY, Shin DY, Kim SH, Yoo Y, Kim MJ, et al. Augmentation of NK-cell activity and immunity by combined natural polyphenols and saccharides *in vitro* and *in vivo*. *Int J Biol Macromol*. 2024;268(Pt 2):131908. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131908>
 45. Focacetti C, Palumbo C, Benvenuto M, Carrano R, Melaiu O, Nardozi D, et al. The Combination of Bioavailable Concentrations of Curcumin and Resveratrol Shapes Immune Responses While Retaining the Ability to Reduce Cancer Cell Survival. *Int J Mol Sci*. 2023;25(1). <https://doi.org/10.3390/ijms25010232>
 46. Petraccia M, Quarantelli M, Moccia M, Vacca G, Satelliti B, D'Ambrosio G, et al. Prospective study to evaluate efficacy, safety and tolerability of dietary supplement of Curcumin (BCM95) in subjects with Active relapsing Multiple Sclerosis treated with subcutaneous Interferon beta 1a 44 mcg TIW (CONTAIN): A randomized, controlled trial. *Mult Scler Relat Disord*. 2021;56:103274. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2021.103274>
 47. Dolati S, Ahmadi M, Rikhtegar R, Babaloo Z, Ayromlou H, Aghebati-Maleki L, et al. Changes in Th17 cells function after nanocurcumin use to treat multiple sclerosis. *Int Immunopharmacol*. 2018;61:74–81. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.05.018>
 48. Kukushkina A, Rogovskii V, Ponevezhskaya E, Lysogorskaia E, Boyko A. Curcumin as an add-on therapy for multiple sclerosis in patients receiving interferon-beta therapy. *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*. 2024;16(4):10. <https://doi.org/10.14412/2074-2711-2024-2S-4-10>
 49. Appiah C, Chen S, Pori AI, Retyunskiy V, Tzeng C, Zhao Y. Study of alloferon, a novel immunomodulatory antimicrobial peptide (AMP), and its analogues. *Front Pharmacol*. 2024;15:1359261. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1359261>
 50. Zhang X, Retyunskiy V, Qiao S, Zhao Y, Tzeng CM. Alloferon-1 ameliorates acute inflammatory responses in lambda-carrageenan-induced paw edema in mice. *Sci Rep*. 2022;12(1):16689. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20648-z>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Роговский В.С. — концепция и дизайн исследования, сбор, анализ и обработка материала, написание текста; Кукушкина А.Д. — дизайн исследования, сбор, анализ и обработка материала, написание текста, редактирование; Бойко А.Н. — концепция исследования, написание текста, редактирование.

ОБ АВТОРАХ

Роговский Владимир Станиславович, канд. мед. наук
<https://orcid.org/0000-0002-3682-6571>
qwer555@mail.ru

Кукушкина Анна Дмитриевна
<https://orcid.org/0000-0001-9964-8103>
dr_kukushanna@mail.ru

Бойко Алексей Николаевич, д-р мед. наук
<https://orcid.org/0000-0002-2975-4151>
boiko.a@fccps.ru

<https://doi.org/10.47183/mes.2025-266>

УДК 616-092.6



ЛАБОРАТОРНЫЕ МАРКЕРЫ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДЕСТРУКЦИИ И АКТИВАЦИИ ГЕМОСТАЗА У ПАЦИЕНТОВ С ИНСУЛЬТОМ И COVID-19

О.В. Лянг^{1,2✉}, М.А. Солдатов¹, Л.В. Климов¹, Т.В. Киселева^{1,3}, Н.А. Марская¹, Н.А. Шамалов¹¹Федеральный центр мозга и нейротехнологий Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия²Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы (РУДН), Москва, Россия³Научно-исследовательский институт организации здравоохранения и медицинского менеджмента Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия**Введение.** Выраженность эндотелиальной деструкции у пациентов с COVID-19 может быть взаимосвязана с риском развития острого нарушения мозгового кровообращения.**Цель.** Изучение роли маркеров активации системы гемостаза и повреждения сосудистой стенки в развитии острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) у пациентов с новой коронавирусной инфекцией.**Материалы и методы.** В исследование были включены 38 пациентов с новой коронавирусной инфекцией и ОНМК и 40 пациентов с новой коронавирусной инфекцией без ОНМК. Всем пациентам определяли: антитела к бета-2 гликопротеину, антитела к кардиолипину, ингибитор активатора плазминогена 1-го типа (ИАП-1), α 2-антиплазмин, молекулу межклеточной адгезии 1-го типа (ICAM-1), фактор Виллебранда, гомоцистеин.**Результаты.** По уровню антифосфолипидных антител не было выявлено статистически значимых различий между группами, однако повышенные относительно референтного интервала антитела к бета-2 гликопротеину чаще встречались в группе без ОНМК. По уровню ИАП-1 были выявлены значимые различия между группой с ОНМК и группой сравнения ($p < 0,001$), в группе сравнения концентрация ИАП-1 была в 1,6 раза выше. По уровню α 2-антиплазмينا, ICAM-1 и фактора Виллебранда значимых различий между группами выявлено не было. Статистически значимые различия по гомоцистеину были выявлены между группой с ОНМК и группой сравнения ($p < 0,001$), концентрация в группе сравнения была в 1,8 раза выше.**Выводы.** Развитие ОНМК у пациентов с более низкими концентрациями гомоцистеина и ИАП-1, вероятно, можно объяснить более слабыми компенсаторными механизмами, направленными на репарацию сосудистой стенки и гармонизацию взаимодействия звеньев системы гемостаза, что в конечном счете приводит к повреждению сосудистой стенки.**Ключевые слова:** ишемический инсульт; геморрагический инсульт; коронавирус; гомоцистеин; антифосфолипидные антитела; ингибитор активатора плазминогена**Для цитирования:** Лянг О.В., Солдатов М.А., Климов Л.В., Киселева Т.В., Марская Н.А., Шамалов Н.А. Лабораторные маркеры эндотелиальной деструкции и активации гемостаза у пациентов с инсультом и COVID-19. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2025;27(1):50–55. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-266>**Финансирование:** исследование выполнено в рамках НИР «Изучение особенностей патогенетических механизмов развития, диагностики, лечения и реабилитации неврологических осложнений у пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19», ЕГИСУ НИОКТР № 122022100115-1 от 15.02.2022.**Соответствие принципам этики:** исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации. Все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ ФЦМН ФМБА России (протокол № 14/25-04-22 от 25.04.2022).**Потенциальный конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.✉ Лянг Ольга Викторовна lyang@fccps.ru**Статья поступила:** 25.09.2024 **После доработки:** 19.12.2024 **Принята к публикации:** 25.12.2024 **Online first:** 25.02.2025

LABORATORY MARKERS OF ENDOTHELIAL DESTRUCTION AND HEMOSTASIS ACTIVATION IN PATIENTS WITH ACUTE CEREBROVASCULAR ACCIDENT AND COVID-19

Olga V. Lyang^{1,2✉}, Mikhail A. Soldatov¹, Leonid V. Klimov¹, Tatiana V. Kiseleva^{1,3}, Nataliya A. Marskaya¹, Nikolay A. Shamalov¹¹Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies, Moscow, Russia²Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia³Research Institute for Healthcare Organization and Medical Management of Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia**Introduction.** The severity of endothelial destruction in patients with the new COVID-19 new coronavirus infection may be correlated with the risk of developing acute cerebrovascular accident (ACVA).**Objective.** To study the role of hemostasis system activation markers and vascular wall damage markers in the development of stroke in patients with the new coronavirus infection.**Materials and methods.** The study included 38 patients with the new coronavirus infection and ACVA and 40 patients with the new coronavirus infection without ACVA. All patients were tested for antibodies to β 2-glycoprotein, antibodies to cardiolipin, plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1), α 2-antiplasmin, intercellular adhesion molecule type 1 (ICAM-1), von Willebrand factor, and homocysteine.**Results.** No statistically significant differences were found between the groups in terms of antiphospholipid antibody levels; however, increased antibodies to β 2-glycoprotein relative to the reference interval were more frequent in the group without ACVA. Significant differences in PAI-1 levels were found between the group with ACVA and the comparison group ($p < 0.001$), with the PAI-1 concentration being 1.6 times higher in the comparison group. No significant differences were observed between the groups in terms of α 2-antiplasmin, ICAM-1, and von Willebrand factor levels. Significant differences for homocysteine were found between the ACVA group and the comparison group ($p < 0.001$), with the concentration in the comparison group being 1.8 times higher.**Conclusions.** The development of acute cerebrovascular accident in patients with lower concentrations of homocysteine and PAI-1 may be explained by weaker compensatory mechanisms aimed at repairing of the vascular wall and harmonization of interaction of hemostasis system links, which eventually led to vascular wall damage.

© О.В. Лянг, М.А. Солдатов, Л.В. Климов, Т.В. Киселева, Н.А. Марская, Н.А. Шамалов, 2025

Keywords: ischemic stroke; hemorrhagic stroke; coronavirus; homocysteine; antiphospholipid antibodies; plasminogen activator inhibitor type 1

For citation: Lyang O.V., Soldatov M.A., Klimov L.V., Kiseleva T.V., Marskaya N.A., Shamalov N.A. Laboratory markers of endothelial destruction and hemostasis activation in patients with acute cerebrovascular accident and COVID-19. *Extreme Medicine*. 2025;27(1):50–55. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-266>

Funding: The research was carried out within R&D “Research of pathogenetic mechanisms features of development, diagnosis, treatment and rehabilitation of neurological complications in patients with the new coronavirus infection COVID-19” No. 122022100115-1 of 15 Feb. 2022.

Compliance with ethical standards: The research was carried out in accordance with the principles of the Helsinki declaration. The study protocol was approved by the Local Ethics Committee of the Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies (Protocol No. 14/25-04-22 of 25 Apr. 2022). The informed consent of the patients was obtained for conducting the studies.

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

✉ Olga V. Lyang lyang@fccps.ru

Received: 25 Sep. 2024 **Revised:** 19 Dec. 2024 **Accepted:** 25 Dec. 2024 **Online first:** 25 Feb. 2025

ВВЕДЕНИЕ

Новая коронавирусная инфекция (COVID-19) — острое инфекционное заболевание, вызываемое штаммом коронавируса SARS-CoV-2. Коронавирусы изначально не обладают нейротропностью, но могут воздействовать на нервную систему и нарушать ее функции. Один из механизмов воздействия — это респираторная гипоксия, сопровождающая тяжелую коронавирусную пневмонию [1]. Другим механизмом повреждения является цитокиновый шторм, при котором происходит повышение уровня провоспалительных цитокинов и активация Т-лимфоцитов, макрофагов и эндотелиальных клеток. Увеличивается проницаемость сосудистой стенки, активируется система комплемента и увеличиваются свертывающие свойства крови [2]. Также было показано, что при COVID-19 развивается сверхэкспрессия ингибитора активатора плазминогена-1 (ИАП-1) и тромбинактивируемого ингибитора фибринолиза, что приводит к подавлению фибринолиза и еще большей склонности к гиперкоагуляции [3].

В патогенезе активации системы гемостаза описана роль антифосфолипидных антител — антител к кардиолипину и к $\beta 2$ -гликопротеину. Они активируют эндотелиальные клетки, моноциты, нейтрофилы и тромбоциты, что приводит к трансформации антикоагулянтной поверхности эндотелия в прокоагулянтную форму [4]. В литературе описана взаимосвязь между формированием антифосфолипидных антител в результате инфекции с развитием ишемического инсульта [5]. Эндотелиопатия, как показывает опыт множества исследователей, наблюдается у большинства пациентов. Такие маркеры состояния эндотелия, воспаления и коагуляции, как IL-6, TNF- α , VWF, тканевой фактор, ингибитор тканевого фактора, D-димер, тромбин-антитромбиновый комплекс, фактор тромбоцитов P4, тромбоглобулин, P-селектин и адгезия тромбоцитов значительно увеличиваются при COVID-19 легкой и средней степени тяжести [6].

Повреждение эндотелиальной стенки и активация системы гемостаза, вызываемые вирусом SARS-CoV-2, могут быть причиной развития острых сосудистых событий, таких как геморрагический и ишемический инсульт. Причем вероятность их развития повышается у пациентов с повышенным риском сосудистых нарушений головного мозга к моменту заболевания новой коронавирусной инфекцией [7]. По данным госпитального регистра ТАРГЕТ-ВИП (г. Москва), частота ОНМК на фоне коронавирусной инфекции составила 0,8%, по данным зарубежных авторов — 2,4% [8, 9]. Роль COVID-19 как фактора

риска ишемического повреждения головного мозга подтверждается данными из регионального сосудистого центра ГКБ им. С.П. Боткина ДЗМ: в период пандемии на 2,2–6,1% увеличилось количество ишемических инсультов, при этом уменьшилась доля геморрагических инсультов и транзиторных ишемических атак [10].

Таким образом, выраженность эндотелиальной деструкции и сопровождающей ее активации системы гемостаза в сторону гиперкоагуляции у пациентов с новой коронавирусной инфекцией могут быть взаимосвязаны с развитием острого нарушения мозгового кровообращения. Ряд лабораторных маркеров, характеризующих состояние эндотелия и системы гемостаза, были исследованы при ишемическом инсульте. Так, крупный метаанализ показал, что повышение ингибитора активатора плазминогена 1-го типа (ИАП-1), регулирующего интенсивность фибринолиза в плазме, связано с летальным исходом, инфарктом миокарда или острым нарушением мозгового кровообращения [11]. При этом полностью непонятно, является ИАП-1 просто маркером риска или же этиологической причиной сосудистого события [12]. Белок острой фазы $\alpha 2$ -антиплазмин, ингибирующий главный фермент фибринолиза плазмин, во время острой ишемии усиливает повреждение головного мозга и гематоэнцефалического барьера, активируя матриксные металлопротеиназы. В экспериментах было показано, что терапевтическая инактивация $\alpha 2$ -антиплазмينا снижает микрососудистый тромбоз, ишемическое повреждение и отек головного мозга [13]. Экспрессирующаяся на эндотелии молекула межклеточной адгезии 1-го типа (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) значительно повышается у пациентов с инсультом, отображая повреждение гематоэнцефалического барьера [11].

Эндотелиальный гликопротеин фактор Виллебранда участвует в адгезии тромбоцитов в месте повреждения сосудистой стенки. Было показано, что повышенные уровни фактора Виллебранда взаимосвязаны с развитием первичного или повторного инсульта, а также с летальным исходом при инсульте [14, 15]. Маркером повреждения сосудистой стенки и активации системы гемостаза является гомоцистеин — метаболит аминокислот метионина и цистеина. Это один из наиболее изученных биомаркеров при инсульте: гипергомоцистеинемия ассоциирована с риском развития сердечно-сосудистых заболеваний, является предиктором степени тяжести неврологической симптоматики при инсульте и плохого функционального восстановления [16–18].

Антитела к бета-2 гликопротеину и к кардиолипину — это аутоантитела к фосфолипидам, являющиеся маркерами антифосфолипидного синдрома, основу которого составляет васкулопатия, связанная с невоспалительным и/или тромботическим поражением сосудов. В пожилом возрасте распространенность положительных антифосфолипидных антител может достигать 68% [19]. Было показано, что эти антитела могут принимать участие в патогенезе ишемического инсульта, а их уровни положительно коррелируют с риском развития инсульта [20, 21].

Цель исследования — изучение роли маркеров активации системы гемостаза и повреждения сосудистой стенки в развитии острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) у пациентов с новой коронавирусной инфекцией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Всего в исследовании приняли участие 78 пациентов: 35 женщин и 43 мужчины.

Пациенты были разделены на 2 группы: в исследуемую группу вошли 38 пациентов с новой коронавирусной инфекцией и ОНМК, поступивших в ФГБУ ФЦМН ФМБА России и в ГКБ им. Е.О. Мухина г. Москвы, из них у 4 во время госпитализации развился геморрагический инсульт (ГИ), у 34 — ишемический инсульт (ИИ). Таким образом, группа пациентов с ОНМК была разделена на 2 подгруппы: пациенты с ИИ и с ГИ. Группу сравнения составили 40 пациентов с новой коронавирусной инфекцией без ОНМК, поступивших в ФГБУ ФЦМН ФМБА России.

Группа 1 ($n = 38$) — пациенты с новой коронавирусной инфекцией + ОНМК;

группа 1.1 ($n = 4$) — пациенты с новой коронавирусной инфекцией + ОНМК (ГИ);

группа 1.2 ($n = 34$) — пациенты с новой коронавирусной инфекцией + ОНМК (ИИ);

группа 2 ($n = 40$) — пациенты с новой коронавирусной инфекцией.

Средний возраст исследуемой группы пациентов с ГИ составил $70,9 \pm 8,0$ года; пациентов с ИИ — $72,0 \pm 7,3$ года; группы сравнения — $58,2 \pm 16,7$ года. Критериями включения пациентов в исследование были возраст старше 18 лет, обнаружение РНК SARS-CoV-2 методом ПЦР, клинические признаки пневмонии (температура тела выше $38,5^\circ\text{C}$, частота дыхания более 22 в минуту, одышка при физической нагрузке, сатурация менее 95% на воздухе), признаки пневмонии при исследовании органов грудной клетки методом компьютерной томографии. Все участники подписывали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Среди сопутствующих заболеваний в общей выборке преобладала артериальная гипертензия (64%), хроническая сердечная недостаточность (39%), хроническая болезнь почек (25%), сахарный диабет (21%). Степень тяжести инсульта при поступлении по шкале National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) в исследуемой группе составила $10,4 \pm 5,7$ балла ($13,8 \pm 7,6$ балла у пациентов с ГИ; $9,9 \pm 5,3$ балла у пациентов с ИИ). Распределение по патогенетическим вариантам ишемического инсульта составило: атеротромботический — 5 пациентов (14,7%), кардиоэмболический — 11 (32,4%), лакунарный — 2 (5,9%), неуточненный — 16 (47,1%).

В начале госпитализации у 52,6% пациентов тяжесть поражения легких была установлена на уровне КТ-1

(77,5% у группы сравнения; 29,4% у пациентов с ИИ; пациентов с ГИ и КТ-1 не было). При этом дыхательная недостаточность 1-й степени была выявлена у 70,5% пациентов: у 85,0% из группы сравнения; у 58,8% у ИИ, у 25,0% с ГИ. Среднее время пребывания в стационаре пациентов исследуемой группы составило $11,0 \pm 4,7$ дня. Больничная летальность составила 5,2% (2 пациента), она была обусловлена ишемическим инсультом, непосредственной причиной смерти явился отек мозга. При выписке медиана по Шкале реабилитационной маршрутизации (ШРМ) составила 4,0 ($Q\ 3,0-4,3$) балла, по модифицированной шкале Рэнкина — 3,0 ($Q\ 3,0-3,3$) балла. Тяжесть неврологической симптоматики по NIHSS составила $8,9 \pm 7,2$ балла. По сопутствующим заболеваниям и тяжести коронавирусной инфекции группы были репрезентативны.

Для исследования с учетом биологической роли были выбраны антитела к бета-2 гликопротеину, антитела к кардиолипину, ингибитор активатора плазминогена 1-го типа (ИАП-1), $\alpha 2$ -антиплазмин, молекула межклеточной адгезии 1 типа (ICAM-1), фактор Виллебранда, гомоцистеин.

Венозную кровь в объеме 5 мл забирали в течение первых суток после госпитализации в пробирки с активатором свертывания и разделительным гелем (VACUTEST KIMA, Италия). Через 30 мин после взятия крови пробирки центрифугировали 15 мин при 1500 g на центрифуге ELMi CM-6MT, сыворотку крови аликвотировали и замораживали при -70°C . Далее методом иммуноферментного анализа (ИФА) в сыворотке определяли суммарные антитела к бета-2 гликопротеину (производитель Euroimmun, Германия), суммарные антитела к кардиолипину (производитель Euroimmun, Германия), ингибитор активатора плазминогена 1-го типа (ИАП-1) (производитель ABclonal, Китай), $\alpha 2$ -антиплазмин (производитель ABclonal, Китай), молекулу межклеточной адгезии 1 типа (ICAM-1) (производитель ABclonal, Китай), фактор Виллебранда (ФВ) (производитель ABclonal, Китай), гомоцистеин (производитель ABclonal, Китай) на иммуноферментном микропланшетном автоматическом анализаторе Infinite F50 с использованием лабораторного инкубатора Shellab G12-2, платформенного вибрационного шейкера Titramax 101 и анализатора для промывки микропланшетов HydroFlex.

Для каждого набора реагентов проводилось построение калибровочной кривой на основе измерения оптической плотности стандартных растворов. Пересчет оптической плотности в концентрацию в образцах сыворотки проводился при помощи программного обеспечения анализатора Infinite F50 с учетом данных калибровки.

Статистическую обработку данных проводили с применением пакетов программного обеспечения SPSS 25.0, Microsoft Excel 2016. Описательная статистика непрерывных количественных данных после анализа нормальности распределения представлена в виде среднего значения (M) и стандартного отклонения при нормальном распределении или в виде медианы (Med) и значений 25% нижнего и 75% верхнего квартилей с использованием знака Q [25–75%] при ненормальном распределении. Нормальным принималось распределение, у которого критерий отличия типа Колмогорова — Смирнова от теоретически нормального распределения был более 0,05. Аналитическая статистика выполнялась с помощью t -теста Стьюдента для количественных данных с нормальным распределением или критерия суммы рангов/знаков Уилкоксона, Манна — Уитни для количественных данных с распределением, отличным от нормального. Значение вероятности $p \leq 0,05$ демонстрировало статистическую значимость.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка нормальности распределения значений лабораторных маркеров показала, что большая часть маркеров не обладала нормальным распределением по совокупности факторов, вследствие чего были использованы непараметрические методы анализа. Также ограничения на выбор статистических методов были связаны с небольшим числом пациентов в подгруппе с ГИ. Следует отметить, что в задачи исследования не входил расчет референтных интервалов, которые производители реагентов предлагают рассчитывать каждой лаборатории самостоятельно посредством собственной выборки. Результаты измерения лабораторных показателей представлены в таблице.

По уровню антифосфолипидных антител не было выявлено статистически значимых различий между группами. При этом в исследуемой группе с ОНМК полностью отсутствовали (не определялись методом ИФА) антитела к бета-2 гликопротеину у 16 пациентов (42%), антитела к кардиолипину — у 34 (89%). В группе сравнения у 12 (30%) пациентов не определялись антитела к бета-2 гликопротеину и у 32 (80%) — антитела к кардиолипину. У 10 (26%) пациентов из группы ОНМК и у 15 (38%) из группы сравнения концентрация антител к бета-2 гликопротеину была выше референтного интервала, указанного в инструкции к набору (10 ОЕ/мл), то есть повышенные концентрации чаще наблюдались в группе сравнения. Повышенные относительно референтного интервала концентрации антител к кардиолипину (более 10 ОЕ/мл) встречались намного реже: у 1 (2,6%) пациента из группы ОНМК и у 1 (2,5%) пациента из группы сравнения. Бета-2-гликопротеин является сывороточным кофактором, он обладает антикоагулянтной активностью *in vivo*, а антитела к нему, помимо непосредственного подавления активности, индуцируют экспрессию Е-селектина на мембране эндотелиальных клеток и секрецию провоспалительных цитокинов и простагландина Е2, что может приводить к повреждению эндотелия и активации систе-

мы гемостаза в сторону гиперкоагуляции¹. Однократно измеренное повышение концентрации антифосфолипидных антител у части пациентов еще не говорит о развитии антифосфолипидного синдрома, но подтверждает данные других авторов о том, что появление антифосфолипидных антител связано именно с вирусной инфекцией, вызванной SARS-CoV-2 [22].

По уровню ИАП-1 были выявлены статистически значимые различия между группой с ОНМК и группой сравнения ($p < 0,001$) и между группой с ИИ и группой сравнения ($p < 0,001$), причем в группе сравнения концентрация ИАП-1 была в 1,6 раза выше, чем у пациентов с ОНМК. Возможно, более низкие уровни ИАП-1 в группе ОНМК обусловлены активацией процессов фибринолиза, которые запускаются после тромботического сосудистого события, и подавлением антифибринолитической активности крови.

По уровню $\alpha 2$ -антиплазмина, ICAM-1 и фактора Виллебранда статистически значимых различий между группами выявлено не было. При этом обращает на себя внимание тенденция к более высокому уровню эндотелиальной молекулы ICAM-1 у пациентов с ОНМК, что может быть вызвано повреждением гематоэнцефалического барьера вследствие инсульта.

Неожиданными оказались результаты измерения гомоцистеина в исследуемых группах. Так как для определения концентрации гомоцистеина использовались единицы измерения из инструкции к набору — нг/мл, а сам набор был предназначен строго для научного использования, мы не стали сравнивать уровень гомоцистеина в исследуемых группах с общепринятым пороговым уровнем² 11,4 мкмоль/л, расчет же собственного референтного интервала не входил в задачи нашего исследования. Статистически значимые различия были выявлены между группой с ОНМК и группой сравнения ($p < 0,001$), группой с ИИ и группой сравнения ($p < 0,001$), а также между группой с ГИ и группой сравнения ($p < 0,05$), причем концентрация в группе сравнения была в 1,8 раза выше, чем в группе с ОНМК, несмотря

Таблица. Измерения лабораторных показателей у пациентов основной группы и группы сравнения

Лабораторный показатель	Пациенты с ОНМК			Группа сравнения n = 40
	Суммарно пациенты группы ОНМК (ИИ + ГИ) n = 38	Пациенты с ИИ n = 34	Пациенты ГИ n = 4	
Антитела к бета-2 гликопротеину, ОЕ/мл	5,0 [0,0–11,0]	6,8 [0,0–11,5]	0,0 [0,0–9,0]	7,2 [0,0–14,5]
Антитела к кардиолипину, МЕ/мл	0,0 [0,0–0,0]	0,0 [0,0–0,0]	0,0 [0,0–0,0]	0,0 [0,0–0,0]
ИАП-1, пг/мл	332* [157–456]	318* [152–456]	362 [321–528]	543 [354–773]
$\alpha 2$ -антиплазмин, пг/мл	43 [19–90]	49 [19–90]	26 [21–44]	40 [27–81]
ICAM-1, пг/мл	45 [9–45]	37 [9–45]	45 [15–45]	15 [5–45]
Фактор Виллебранда, нг/мл	91 [110–138]	114 [91–140]	95 [87–122]	116 [77–131]
Гомоцистеин, нг/мл	22* [16–31]	22* [16–32]	24* [16–31]	39 [33–45]

Таблица подготовлена авторами по собственным данным

Примечание: данные представлены в виде медианы (Me) значений нижнего и верхнего квартилей [25–75%]; статистическая значимость различий с группой сравнения: * $p < 0,001$; * $p < 0,05$.

¹ Кудря АА. Определение антител к кардиолипину и $\beta 2$ -гликопротеину-I. Гомель: ГУ РНПЦ РМиЭЧ; 2020.

² Клиническое руководство Тица по лабораторным тестам. М.: Лабора; 2013.

на то что концентрация гомоцистеина имеет тенденцию к повышению с возрастом из-за снижения экскреторной функции почек, а возраст пациентов с ОНМК был выше, чем в группе сравнения. Мы ожидали получить противоположные результаты, с учетом повреждающего воздействия гомоцистеина на эндотелиальные клетки, его подавляющего действия на естественный антикоагулянт антитромбин III, прямого нейротоксического действия на нейроны головного мозга [23] и, следовательно, создания предпосылок для развития сосудистых событий. Однако полученные результаты заставляют по-новому взглянуть на патогенез ОНМК при коронавирусной инфекции.

Таким образом, полученные результаты подтверждают данные о том, что коронавирус может индуцировать образование антифосфолипидных аутоантител, которые были обнаружены более чем у половины исследованных пациентов. Такие пациенты подлежат дальнейшему наблюдению и обследованию на предмет исключения развития антифосфолипидного синдрома и тромботических осложнений. Подавление антифибринолитического звена у пациентов с ОНМК, проявляющееся снижением концентрации ИАП-1, может быть следствием компенсаторного усиления фибринолиза в ответ на тромботическое

событие, приведшее к инсульту. Более высокие уровни гомоцистеина у пациентов с коронавирусной инфекцией без ОНМК, вероятно, говорят об исходно более высоком протекторном потенциале эндотелиальной стенки и системы гемостаза, что снижает у таких пациентов риск развития ОНМК, однако данное предположение требует проведения дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие ОНМК у пациентов с более низкими концентрациями гомоцистеина и ИАП-1, вероятно, можно объяснить более слабыми компенсаторными механизмами, направленными на репарацию сосудистой стенки и гармонизацию взаимодействия звеньев системы гемостаза, что в конечном счете приводит к повреждению сосудистой стенки. Более точное понимание молекулярных механизмов возникновения инсульта при коронавирусной инфекции будет возможно при расширении панели лабораторных биомаркеров и увеличении выборки пациентов. Изучение механизма образования антифосфолипидных антител на фоне коронавирусной инфекции также, несомненно, является актуальной задачей в свете предотвращения тромботических осложнений.

Литература / References

1. Dinkin M, Gao V, Kahan J et al. COVID-19 presenting with ophthalmoparesis from cranial nerve palsy. *Neurology*. 2020;95(5):221–3. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000009700>
2. Mehta P, McAuley DF, Brown M et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet*. 2020;395(10229):1033–4. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30628-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30628-0)
3. Zuo Y, Warnock M, Harbaugh A et al. Plasma tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in hospitalized COVID-19 patients. *Sci Rep*. 2021;11(1):1580. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80010-z>
4. Pavoni V, Ganesello L, Horton A. Antiphospholipid antibodies in critically ill COVID-19 patients with thromboembolism: cause of disease or epiphenomenon? *J Thromb Thrombolysis*. 2021;52(2):542–52. <https://doi.org/10.1007/s11239-021-02470-y>
5. Zhang Y, Xiao M, Zhang S et al. Coagulopathy and Antiphospholipid Antibodies in Patients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2020;382(17):e38. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2007575>
6. Голубева МГ. Роль Р-селектина в развитии нарушений гемостаза при COVID-19. *Успехи современной биологии*. 2022;142(2):175–83. Golubeva MG. Role of P-Selectin in the Development of Hemostasis Disorders in COVID-19. *Biology Bulletin Reviews*. 2022;142(2):175–83 (In Russ.). <https://doi.org/10.31857/S004213242202003X>
7. Щербак СГ, Голота АС, Камилова ТА и др. Неврологические проявления у пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19. *Физическая и реабилитационная медицина, медицинская реабилитация*. 2022;4(3):154–80. Scherbak SG, Golota AS, Kamilova TA et al. Neurological manifestations in patients with new coronavirus infection COVID-19. *Physical and Rehabilitation Medicine, Medical Rehabilitation*. 2022;4(3):154–80 (In Russ.). <https://doi.org/10.36425/rehab109952>
8. Лукьянов ММ, Андреев ЕЮ, Марцевич СЮ и др. Исходы за двухлетний период наблюдения больных после госпитального лечения по поводу COVID-19 (данные регистра ТАРГЕТ-ВИП). *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2023;22(10):3757. Lukyanov MM, Andreenko EYu, Martsevich SYu et al. Two-year outcomes in patients after hospitalization for COVID-19: data from the TARGET-VIP registry. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2023;22(10):3757 (In Russ.). <https://doi.org/10.15829/1728-8800-2023-3757>
9. Wong-Chew RM, Rodríguez Cabrera EX, Rodríguez Valdez CA et al. Symptom cluster analysis of long COVID-19 in patients discharged from the temporary COVID-19 Hospital in Mexico City. *Ther Adv Infect Dis*. 2022;9:20499361211069264. <https://doi.org/10.1177/20499361211069264>
10. Комарова АГ, Плоскирева АА, Литвиненко АС и др. Динамика структуры острых нарушений мозгового кровообращения в период пандемии COVID-19. *Фармакология & Фармакотерапия*. 2022;(5):74–8. Komarova AG, Ploskireva AA, Litvinenko AS et al. Evolution of the structure of cerebrovascular accidents with COVID-19. *Pharmacology & Pharmacotherapy*. 2022;(5):74–8 (In Russ.). https://doi.org/10.46393/27132129_2022_5_74
11. Fang C, Lou B, Zhou J, et al. Blood biomarkers in ischemic stroke: Role of biomarkers in differentiation of clinical phenotype. *European Journal of Inflammation*. 2018;16:1–10. <https://doi.org/10.1177/2058739218780058>
12. Jung RG, Motazedian P, Ramirez FD, et al. Association between plasminogen activator inhibitor-1 and cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *Thromb J*. 2018;16:12. <https://doi.org/10.1186/s12959-018-0166-4>
13. Reed GL, Hounq AK, Singh S, Wang D. α 2-Antiplasmin: New Insights and Opportunities for Ischemic Stroke. *Semin Thromb Hemost*. 2017;43(2):191–9. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1585077>
14. Buchtele N, Schwameis M, Gilbert JC, et al. Targeting von Willebrand Factor in Ischaemic Stroke: Focus on Clinical Evidence. *Thromb Haemost*. 2018;118(6):959–78. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1648251>
15. Kawano T, Gon Y, Sakaguchi M, et al. Von Willebrand Factor Antigen Levels Predict Poor Outcomes in Patients With Stroke and Cancer: Findings From the Multicenter, Prospective, Observational SCAN Study. *J Am Heart Assoc*. 2024;13(3):e032284. <https://doi.org/10.1161/JAHA.123.032284>
16. Lu SS, Xie J, Su CQ, et al. Plasma homocysteine levels and intracranial plaque characteristics: association and clinical relevance in ischemic stroke. *BMC Neurol*. 2018;18(1):200. <https://doi.org/10.1186/s12883-018-1203-4>

17. Fan YL, Zhan R, Dong YF, et al. Significant interaction of hypertension and homocysteine on neurological severity in first-ever ischemic stroke patients. *J Am Soc Hypertens*. 2018;12(7):534–41. <https://doi.org/10.1016/j.jash.2018.03.011>
18. Markišić M, Pavlović AM, Pavlović DM. The Impact of Homocysteine, Vitamin B12, and Vitamin D Levels on Functional Outcome after First-Ever Ischaemic Stroke. *Biomed Res Int*. 2017;2017:5489057. <https://doi.org/10.1155/2017/5489057>
19. Биденко МА, Калягин АН, Новохатко ОИ. Антифосфолипидный синдром как причина возникновения инсульта. *Сибирский медицинский журнал*. 2007;6:87–90. Bidenko MA, Kaljagin AN, Novohatko OI. Antiphospholipid syndrome as a cause of stroke. *Siberian Scientific Medical Journal*. 2007;6:87–90 (In Russ.).
20. Cojocaru IM, Cojocaru M, Muşuroi C, Botezat M. Study of anti-cardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies in patients with ischemic stroke. *Rom J Intern Med*. 2003;41(2):189–204. PMID: 15526503
21. Dong S, Pei B, Xie W, et al. Anticardiolipin antibody and anti-β2 glycoprotein I antibody are potential risk markers of ischaemic stroke in Chinese adults. *Rheumatology (Oxford)*. 2020;59(8):1834–41. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kez551>
22. Полушин ЮС, Гаврилова ЕГ, Шлык ИВ и др. Катастрофический антифосфолипидный синдром при COVID-19. *Вестник анестезиологии и реаниматологии*. 2021;18(1):17–26. Polushin YuS, Gavrilova EG, Shlyk IV, Lapin SV, Tkachenko OYu. Catastrophic antiphospholipid COVID-19 syndrome. *Messenger of anesthesiology and resuscitation*. 2021;18(1):17–26 (In Russ.). <https://doi.org/10.21292/2078-5658-2021-18-1-17-26>
23. Зобова ДА, Козлов СА. Роль гомоцистеина в патогенезе некоторых заболеваний. *Известия вузов. Поволжский регион. Медицинские науки*. 2016;3(39):132–44. Zobova DA, Kozlov SA. The role of homocysteine in pathogenesis of certain diseases. *Izvestiya vuzov. Povolzhskij region. Medical Sciences*. 2016;3(39):132–44 (In Russ.). <https://doi.org/10.21685/2072-3032-2016-3-15>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: О.В. Лянг — проведение лабораторных исследований, подготовка обзора литературы, написание текста статьи; М.А. Солдатов — ведение базы данных по пациентам, сбор биоматериала, описание клинической характеристики пациентов; Л.В. Климов — ведение базы данных по пациентам, написание текста статьи; Т.В. Киселева — статистическая обработка результатов, написание текста статьи; Н.А. Марская — ведение базы данных по пациентам, написание текста статьи; Н.А. Шамалов — идея и план исследования, редактирование и подготовка итоговой версии статьи.

ОБ АВТОРАХ

Лянг Ольга Викторовна, д-р мед. наук
<https://orcid.org/0000-0002-1023-5490>
lyang@fccps.ru

Солдатов Михаил Анатольевич
<https://orcid.org/0000-0002-5294-5706>
soldatov1477@gmail.com

Климов Леонид Владимирович, канд. мед. наук
<https://orcid.org/0000-0003-1314-3388>
dr.klimov@mail.ru

Киселева Татьяна Владимировна
<https://orcid.org/0000-0003-4913-351X>
tatiana-kis17@yandex.ru

Марская Наталия Андреевна
<https://orcid.org/0000-0002-0789-4823>
marskaya@fccps.ru

Шамалов Николай Анатольевич, д-р. мед. наук
<https://orcid.org/0000-0001-6250-0762>
shamalov@fccps.ru

<https://doi.org/10.47183/mes.2025-27-1-56-63>

УДК 616.89



ШИЗОФРЕНИЯ И НЕЙРОВОСПАЛЕНИЕ: ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Д.А. Чугунов^{1,2}, А.А. Шмилович², Д.В. Николаева^{1,2}, Т.В. Яшина^{1,2}, М.Р. Ларина², В.С. Роговский^{1,2}, А.А. Свиридова^{1,2,3}

¹Федеральный центр мозга и нейротехнологий Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

²Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

Введение. Шизофрения — это сложное психическое расстройство с гетерогенной симптоматикой, включающей в себя психотические, негативные, когнитивные, аффективные и психомоторные симптомы. Несмотря на то что патогенез шизофрении главным образом связывают с дисбалансом нейротрансмиттеров, исследования последних лет указывают на большое значение нейровоспаления в патогенезе этого заболевания.

Цель. Изучение роли нейровоспаления в патогенезе шизофрении с оценкой вовлечения клеток врожденного, адаптивного иммунного ответа и функционирования гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) в возникновении заболевания, а также прогностическая оценка противовоспалительного эффекта антипсихотических средств при шизофрении.

Обсуждение. Современные данные свидетельствуют о значительной роли нейровоспаления в развитии и течении шизофрении. На начальных этапах заболевания повышается количество лимфоцитов, а также уровень нескольких провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО- α , ИЛ-1 β), которые могут снижаться на фоне антипсихотической терапии. Исследования на экспериментальной модели материнской иммунной активации (МИА) и данные иммуногистохимических и ПЭТ-исследований подтверждают аномальную активацию микроглии, что указывает на вовлечение клеток врожденного иммунитета. Клетки адаптивного иммунного ответа также могут играть существенную роль в развитии нейровоспаления при шизофрении (выявлено повышенное содержание Th17-клеток и увеличение продукции провоспалительных цитокинов, коррелирующих с тяжестью заболевания). Обсуждается роль нейромедиаторов в модуляции иммунновоспалительного ответа. Существующие данные позволяют предположить, что участие дофамина в патогенезе шизофрении может быть опосредовано его иммуномодулирующим эффектом. На роль нейровоспаления при шизофрении также указывает клиническая эффективность применения противовоспалительного лечения при данном заболевании. С другой стороны, установлен иммуномодулирующий эффект антипсихотиков, который, по крайней мере частично, может опосредовать их клиническую эффективность при шизофрении.

Выводы. Ввиду значимости нейровоспаления в патогенезе шизофрении перспективны дальнейшие исследования как противовоспалительных свойств антипсихотиков, так и клинической эффективности противовоспалительных препаратов при шизофрении с целью дальнейшей рационализации терапии данного заболевания.

Ключевые слова: шизофрения; воспаление; нейроиммунные взаимодействия; антипсихотики; нейролептики; дофамин

Для цитирования: Чугунов Д.А., Шмилович А.А., Николаева Д.В., Яшина Т.В., Ларина М.Р., Роговский В.С., Свиридова А.А. Шизофрения и нейровоспаление: патогенетические и терапевтические аспекты. *Медицина экстремальных ситуаций.* 2025;27(1):56–63. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-27-1-56-63>

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта № 24-25-00409.

Потенциальный конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

✉ Свиридова Анастасия Алексеевна anastasiya-ana@yandex.ru

Статья поступила: 03.10.2024 **После доработки:** 10.02.2025 **Принята к публикации:** 14.02.2025

SCHIZOPHRENIA AND NEUROINFLAMMATION: PATHOGENETIC AND THERAPEUTIC ASPECTS

Dmitry A. Chugunov^{1,2}, Andrey A. Shmilovich², Daria V. Nikolaeva^{1,2}, Tamara V. Yashina^{1,2}, Mariya R. Larina², Vladimir S. Rogovsky^{1,2}, Anastasia A. Sviridova^{1,2,3}

¹Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russia

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Introduction. Schizophrenia is a complex mental disorder with heterogeneous symptoms, including psychotic, negative, cognitive, affective, and psychomotor symptoms. Although the pathogenesis of schizophrenia is mainly associated with neurotransmitter imbalance, recent studies have suggested the importance of neuroinflammation in the pathogenesis of this disease.

Objective. To study the involvement of neuroinflammation in the pathogenesis of schizophrenia and a prognostic assessment of the potential anti-inflammatory effect of antipsychotic medications.

Discussion. Current data indicate a significant role of neuroinflammation in the development and course of schizophrenia. At the initial stages of its development, the number of lymphocytes and the level of some proinflammatory cytokines (IL-1, IL-6, TNF- α , IL-1 β) increase, which can be decreased by antipsychotic therapy. Studies involving experimental models of maternal immune activation (MIA) and data obtained by immunohistochemical and PET studies confirm an abnormal activation of microglia, indicating the involvement of innate immune cells. Adaptive immune response cells can also play a significant role in the development of neuroinflammation in schizophrenia. Thus, an increased level of Th17 cells and an increase in the production of proinflammatory cytokines, correlating with the disease severity, were revealed. The role of neurotransmitters in modulating the immune-inflammatory response is discussed. Available data suggest that the participation of dopamine in the schizophrenia pathogenesis can be mediated by its immunomodulatory effect. The role of neuroinflammation in schizophrenia is also indicated by the clinical effectiveness of anti-inflammatory treatment in this disease. On the other hand, the immunomodulatory effect of antipsychotics has been established, which, at least in part, may mediate their clinical effectiveness in schizophrenia.

Conclusions. Given the importance of neuroinflammation in the schizophrenia pathogenesis, further studies into both the anti-inflammatory properties of antipsychotics and the effects of anti-inflammatory drugs in schizophrenia are promising in order to further optimize the treatment of this disease.

Keywords: schizophrenia; inflammation; neuroimmune interactions; antipsychotics; neuroleptics; dopamine

For citation: Chugunov D.A., Shmilovich A.A., Nikolaeva D.V., Yashina T.V., Larina M.R., Rogovsky V.S., Sviridova A.A. Schizophrenia and neuroinflammation: Pathogenetic and therapeutic aspects. *Extreme Medicine*. 2025;27(1):56–63. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-27-1-56-63>

Funding: the research was supported by the Russian Science Foundation (project No. 24-25-00409).

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

✉ Anastasia A. Sviridova anastasiya-ana@yandex.ru

Received: 3 Oct. 2024 **Revised:** 10 Feb. 2025 **Accepted:** 14 Feb. 2025

ВВЕДЕНИЕ

Шизофрения — прогредиентное психическое заболевание с гетерогенной симптоматикой, включающей продуктивные, негативные, аффективные, когнитивные и психомоторные симптомы, имеющее непрерывное или приступообразное течение и приводящее к специфическим изменениям личности в виде дезинтеграции психики, аутизма, расстройств мышления, эмоционально-волевого снижения и снижения когнитивных функций [1].

Шизофрения является наиболее сложной и социально значимой проблемой в современной психиатрии, что определяется широкой распространенностью, постоянной тенденцией к прогрессированию заболевания, а также, при отсутствии адекватного лечения, тяжелой инвалидизацией больных, преимущественно молодых людей, ведущих активную социальную и трудовую деятельность [2]. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, шизофрения является 8-й по значимости причиной инвалидизации во всем мире в возрастной группе 15–44 года. При этом больные шизофренией теряют в среднем 15 лет от возможной продолжительности жизни, преимущественно по причине суицида (риск самоубийства от 5 до 10%), а также из-за наличия сопутствующих заболеваний, включая злоупотребление психоактивных веществ с уровнем распространенности до 41% [3]. Кроме того, неупорядоченный образ жизни, нездоровое питание, отсутствие физической активности и побочные эффекты антипсихотической терапии способствуют увеличению заболеваемости метаболическим синдромом, сердечно-сосудистыми и легочными заболеваниями [4]. Среди психических расстройств шизофрения является наибольшим социально-экономическим бременем, составляющим около 54,5 % от общего бремени психических расстройств, и это бремя удвоилось за последние годы [5]. Таким образом, лечение больных шизофренией является одной из наиболее актуальных задач практической психиатрии.

Согласно классической теории в основе патогенеза шизофрении лежит нарушение обмена биогенных аминов, в особенности дофамина, рецепторы которого являются ключевой мишенью для препаратов патогенетической терапии заболевания (антипсихотические средства). В частности, большинство используемых в терапии шизофрении антипсихотиков являются преимущественно антагонистами дофаминовых рецепторов D2-группы (D2-, D3- и D4-рецепторы). Однако, несмотря на купирование ряда клинических симптомов, антипсихотические препараты не способны существенно замедлить прогрессирование заболевания, что позволяет предположить дополнительные патогенетические механизмы шизофрении [6].

Так, исследования последних лет показали, что наряду с нарушением функционирования нейротрансмиттеров нейровоспаление также может иметь существенное значение в патогенезе шизофрении [6, 7]. Показано, что на начальных этапах шизофрении повышается количество лимфоцитов и уровень некоторых провоспалительных цитокинов: интерлейкина-1 (ИЛ-1), ИЛ-6, фактора некроза опухоли α (ФНО- α) и других, которые могут снижаться на фоне антипсихотической терапии [8]. В пользу участия нейровоспаления в патогенезе шизофрении также свидетельствует более высокая частота аутоиммунных заболеваний центральной нервной системы (ЦНС) у пациентов с шизофренией [9, 10]. Общие механизмы для этих заболеваний включают активацию микроглии, повышение продукции провоспалительных цитокинов, нарушение гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [10].

Цель исследования — изучение роли нейровоспаления в патогенезе шизофрении с оценкой вовлечения клеток врожденного, адаптивного иммунного ответа и функционирования ГЭБ в возникновении заболевания, а также прогностическая оценка противовоспалительного эффекта антипсихотических средств при шизофрении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поиск научной литературы выполнен в электронных библиографических базах данных на русском (eLibrary, CyberLeninka) и английском (Web of Science, Scopus, PubMed) языках. Поисковые запросы включали в себя слова: шизофрения, воспаление, нейроиммунные взаимодействия, антипсихотики, нейролептики, дофамин. Глубина поиска составила 10 лет. Критериями включения было наличие данных о результатах когортных исследований, рандомизированных контролируемых исследований, доклинических исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Роль врожденного иммунного ответа в развитии нейровоспаления при шизофрении

Длительное время развитие иммунного ответа в ЦНС считалось маловероятным, что связывали с «изоляцией» ЦНС от иммунной системы посредством ГЭБ, а также отсутствием лимфатического дренажа и другими механизмами естественной иммунологической толерантности («иммуопривилегированный» статус ЦНС) [11]. Однако в настоящее время широко известно о наличии резидентных иммунных клеток в ЦНС, а также путях сообщения ЦНС с глубокими шейными лимфатическими узлами посредством лимфатических сосудов твердой мозговой

оболочки и лимфатической системы. Кроме того, была установлена способность клеток как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа мигрировать в ЦНС из периферии, в связи с чем изучение роли нейровоспаления в патогенезе различных заболеваний ЦНС привлекает все большее внимание [12].

Среди клеток врожденного иммунного ответа в контексте нейровоспаления наибольшее внимание привлекает микроглия — резидентные макрофаги ЦНС. Показано, что микроглия способна участвовать как в развитии нейровоспаления путем выработки провоспалительных цитокинов и индукции Th17- и Th1-иммунного ответа (M1-микроглия), так и поддержании иммунологической толерантности путем продукции противовоспалительных факторов и индукции регуляторных T-клеток (Treg) (M2-микроглия) [6].

Изменения микроглии при шизофрении описаны, главным образом, на экспериментальной модели шизофрении у животных — МИА, которая воспроизводится путем введения беременным грызунам агонистов рецепторов врожденного иммунного ответа (в частности, толл-подобных рецепторов TLR-3 и TLR-4). У взрослых потомков таких грызунов развиваются нейроанатомические, нейрохимические и поведенческие изменения, часть которых соответствуют таковым при шизофрении (гиперактивность дофаминергической системы, увеличение желудочков мозга, поведенческие и когнитивные нарушения) [13, 14].

В частности, было показано увеличение подвижности, плотности, а также способности микроглии продуцировать цитокины при МИА, индуцированной агонистом TLR-4 липополисахаридом (ЛПС) [13]. Также провоспалительные функции микроглии при МИА повышаются при индуцировании МИА путем введения агониста TLR-3 (полиинозиновая-полицитидиловая кислота (PolyI:C)) [14]. Полученные к настоящему времени результаты исследования свидетельствуют о провоспалительном профиле микроглии в подростковом возрасте при МИА.

Кроме того, подтверждением участия микроглии в патогенезе шизофрении является связь между подавлением ее функций и снижением выраженности симптомов заболевания на фоне противовоспалительной терапии, в частности миноциклином, оказывающим модулирующий эффект на микроглию [15].

Данные по аномальной активации микроглии, показанные в нескольких посмертных иммуногистохимических исследованиях и в исследованиях позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) *in vivo* у больных шизофренией, противоречивы [16, 17]. Дополнительную неясность при посмертном иммуногистохимическом исследовании может вносить собственно влияние длительной терапии антипсихотическими средствами на активацию микроглии, которое подтверждается данными ПЭТ [18, 19]. В то же время исследования с использованием ПЭТ у лиц с ультравысоким риском развития шизофрении или у пациентов с шизофренией, не принимавших патогенетической терапии, до сих пор остаются неоднозначными. Так, согласно одним исследованиям показано снижение или отсутствие увеличения связывания белка-транслокатора (TSPO, маркер активации микроглии *in vivo*), что говорит о снижении активации микроглии [20, 21]. Вместе с этим в некоторых исследованиях указывалось, напротив, на увеличение связывания этого лиганда во всем сером веществе [22].

При первом психотическом эпизоде шизофрении наблюдается снижение концентрации противовоспалитель-

ных цитокинов ИЛ-10 и ИЛ-4, в то время как концентрация провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-6 и ФНО- α , напротив, повышается [23, 24]. Согласно Halstead et al., при шизофрении в периферической крови (плазма/сыворотка) показано повышение концентрации ИЛ-1 β , антагониста рецептора ИЛ-1 (IL-1RA), растворимого рецептора ИЛ-2 (pИЛ-2R), ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ФНО- α и С-реактивного белка по сравнению с контрольной группой. Уровни ИЛ-2 и интерферона- γ (ИФН- γ) были значительно повышены в остром эпизоде шизофрении, тогда как уровни ИЛ-4, ИЛ-12 и ИФН- γ , напротив, были существенно снижены при хронической форме [25]. Метаанализ исследований по изучению содержания цитокинов в спинномозговой жидкости показал схожие данные: повышение ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ИЛ-8 у больных шизофренией [26].

Была показана повышенная продукция ИЛ-8 и ИЛ-1 β мононуклеарными клетками периферической крови (МНКПК), стимулированными ЛПС, у пациентов с шизофренией, подтверждая роль клеток врожденного иммунного ответа в патогенезе шизофрении [27]. Эти данные также согласуются с результатами оценки уровней экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО- α) в МНКПК больных шизофренией [28]. Кроме того, было установлено, что сыворотка крови больных шизофренией, не получавших патогенетическую терапию, способна активировать микроглию *in vitro* [29].

Сообщается о потенциальной роли периваскулярных макрофагов в патогенезе шизофрении. В частности, иммуногистохимическое окрашивание коры лобной доли головного мозга больных шизофренией выявило повышенное содержание CD163⁺-макрофагов [30, 31].

У больных шизофренией показано повышенное количество циркулирующих в периферической крови M1- и M2-моноцитов, обладающих про- и противовоспалительными функциями соответственно. Важно, что по мере прогрессирования заболевания соотношение таких функциональных типов моноцитов может изменяться: преобладание M1-моноцитов на ранней стадии заболевания сменяется преобладанием M2-моноцитов на более позднем этапе [32]. Участие провоспалительных M1-моноцитов в патогенезе шизофрении подтверждается данными и других исследований [33]. Более того, сообщалось об увеличении уровня растворимого CD14 (маркер моноцитов) в крови людей, у которых впоследствии развилась шизофрения; это позволяет предположить активацию моноцитов в качестве раннего предиктора заболевания [34].

Установлено повышение продукции ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α стимулированными моноцитами больных шизофренией по сравнению со здоровыми донорами *in vitro* [35, 36]. В сыворотке крови больных шизофренией установлено повышение уровня хемокинов (CCL2, CCL4, CCL22), необходимых для миграции моноцитов, в том числе через эндотелиальные барьеры, включая ГЭБ [37].

Роль адаптивного иммунного ответа в развитии нейровоспаления при шизофрении

Исследования последних лет показали, что наряду с врожденным иммунным ответом клетки адаптивного иммунного ответа также могут играть существенную роль в развитии нейровоспаления при шизофрении. Было установлено, что при остром эпизоде шизофрении в ЦНС повышается количество активированных T-клеток. Также обсуждается связь риска развития шизофрении

с уровнем NK-клеток, Т-хелперов (CD4⁺ Т-клетки), В-лимфоцитов [38].

Среди клеток адаптивного иммунного ответа, положительно участвующих в патогенезе шизофрении, наибольшее внимание привлекают Т-хелперы 17-го типа (Th17-клетки). Th17-клетки дифференцируются из наивных Т-клеток или Т-клеток памяти при участии цитокинов ИЛ-6, трансформирующего ростовой фактор- β (ТРФ- β), ИЛ-1 β и ИЛ-23. Th17-клетки вырабатывают провоспалительные цитокины ИЛ-17, ИЛ-21, ИЛ-22, гранулоцитарный, а также гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующие факторы (Г-КСФ и ГМ-КСФ). Иммунный ответ по Th17-типу носит, как правило, выраженный воспалительный характер. Наибольшее значение отводят их участию в патогенезе аутоиммунных и нейровоспалительных заболеваний [39]. Значение Th17-клеток в развитии нейровоспаления связывают, главным образом, с их способностью мигрировать в ЦНС через ГЭБ. Установлено, что С-С хемокиновый рецептор 6 (CCR6; CD196) является отличительным рецептором Th17-клеток, благодаря которому Th17-клетки способны проникать через ГЭБ. Хемокиновый рецептор CCR6 связывается с соответствующим лигандом CCL20, который экспрессируется на эндотелиальных барьерах, в том числе ГЭБ. Дополнительным фактором, способствующим миграции Th17-клеток в ЦНС, может являться дестабилизирующее влияние ИЛ-17 (ключевого продукта Th17-клеток) на проницаемость ГЭБ. Роль нейровоспаления и Th17-клеток в патогенезе шизофрении исследуется относительно недавно. Полагают, что в основе иммунопатогенеза шизофрении может лежать хронический воспалительный процесс, поддерживаемый взаимодействием Th17-клеток и микроглии, активируемой ИЛ-17 [39].

В ряде исследований было установлено, что у больных шизофренией отмечается более высокое содержание циркулирующих Th17-клеток, а также ИЛ-17-продуцирующих CD4⁺-Т-клеток по сравнению с группой здоровых доноров [40]. Zheng et al. показали, что количество CD4⁺-Т-лимфоцитов в периферической крови больных шизофренией в острой фазе, не получающих патогенетическую терапию, выше, чем в контрольной группе [41]. Также сообщается об активации Th17-клеток у больных с первым эпизодом шизофрении. У таких больных было показано нарушение ГЭБ, инфильтрация мозга Т-клетками и активация микроглии. При первом эпизоде шизофрении отмечали изменение распределения субпопуляций Т-клеток в спинномозговой жидкости (СМЖ) и более высокие плотности Т-лимфоцитов в гиппокампе больных [42]. Проникнув в ЦНС, Th17-клетки продуцируют провоспалительные цитокины ИЛ-17 и ИЛ-22, что приводит к нейровоспалению и нейродегенерации [39]. Эти данные также согласуются с повышенной концентрацией ИЛ-17, ИЛ-22, ИЛ-6, ИЛ-23 в плазме крови больных шизофренией по сравнению с группой здоровых доноров [43]. Повышенные уровни в плазме ИЛ-17, ТРФ- β и ИЛ-23 (цитокинов, необходимых для дифференцирования Th17-клеток) у пациентов с шизофренией коррелируют с тяжестью заболевания, агрессивным поведением и апатией [44]. Была установлена повышенная продукция ИЛ-6, ИЛ-17А, ФНО- α в культуре мононуклеарных клеток периферической крови (МНКПК) больных шизофренией по сравнению со здоровыми донорами [45].

Выявлено нарушение функционирования Т-регуляторных клеток (Treg), оказывающих противовоспалительный эффект и препятствующих аутоиммунному

нейровоспалению. У больных шизофренией, не получающих патогенетическое лечение, обнаружено снижение количества циркулирующих Treg, а также снижение экспрессии в них гена *Foxp3*, определяющего их супрессорные свойства [45].

Иммуномодулирующие эффекты биогенных аминов и антипсихотиков при шизофрении

Основная теория патогенеза шизофрении связана с нарушением обмена биогенных аминов, в особенности дофамина, рецепторы которого являются одной из ключевых мишеней для патогенетической терапии этого заболевания. В связи с нарастающим интересом к роли нейровоспаления в патогенезе шизофрении участие дофамина в нейроиммуномодуляции привлекает все большее внимание. В настоящее время хорошо известно, что биогенные амины, рецепторы которых экспрессируются клетками как нервной, так и иммунной систем, являются прямыми медиаторами нейроиммунного взаимодействия. Препараты, воздействующие на эти рецепторы, рассматриваются как потенциальные нейроиммуномодуляторы [46, 47].

Среди нейротрансмиттеров, обладающих иммунным эффектом, дофамин является наиболее изученным. Вполне возможно предположить, что участие дофамина в патогенезе шизофрении, по крайней мере частично, может быть опосредовано его иммуномодулирующим эффектом. Известно, что рецепторы к дофамину экспрессируются Т- и В-лимфоцитами, макрофагами, моноцитами, эозинофилами, нейтрофилами, дендритными клетками, NK-клетками и микроглией.

Установлено, что у больных шизофренией процент CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих D₂-дофаминовый рецептор (CD8⁺D₂R⁺ Т-клетки), повышен по сравнению со здоровыми донорами, тогда как процент CD4⁺D₂R⁺ Т-клеток, напротив, снижен. Обнаружена положительная связь оценок по шкалам BPRS (краткая психиатрическая рейтинговая шкала) и PANSS (шкала положительных и отрицательных синдромов шизофрении) с количеством CD8⁺D₂R⁺ Т-клеток [48].

Также показано влияние препаратов патогенетической терапии на функции иммунных клеток при шизофрении. Так, было установлено, что при лечении больных шизофренией, у которых наблюдался метаболический синдром, антипсихотиками второго поколения (АВП) (рисперидон, оланзапин, кветиапин и арипипразол) после 6 недель терапии уровни ряда провоспалительных цитокинов, таких как ИФН- α 2, ИЛ-1 α и ИЛ-7, у пациентов с метаболическим синдромом был повышен. В то же время у пациентов без метаболического синдрома уровни ИФН- γ , ИЛ-1 β , ИЛ-12p40, ИЛ-17А, ИЛ-6 и ФНО- α были снижены [49].

При 28-дневном лечении шизофрении арипипразолом выявлено значительное снижение уровня С-реактивного белка, инсулина, ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО- α , sФНО-R1, ИЛ-12, ИЛ-23, ИЛ-1Ra, ТРФ- β 1, ИЛ-4, ИФН- γ и значительное повышение ИЛ-10 [50].

Из отдельных препаратов, используемых в качестве монотерапии у пациентов с первым эпизодом психоза, рисперидон был связан со статистически значимой активацией 11 генов иммунной системы, включая цитокины и цитокиновые рецепторы, паттерн-распознающие рецепторы (TLR-1, TLR-2, TLR-6) и молекулы, участвующие в апоптозе (FAS). Следует отметить, что рисперидон обладал сильными иммуномодулирующими свойствами,

влияя главным образом на компоненты врожденного иммунитета у данной категории пациентов, тогда как наблюдаемые эффекты кветиапина и оланзапина были лишь незначительными [51].

Также было показано, что АВП рисперидон снижает уровень хемотаксического цитокина моноцитарного хемотаксического протеина-1 (MCP-1), что может свидетельствовать о некотором противовоспалительном эффекте [52]. В подробном обзоре литературы по иммунным эффектам АВП приводятся данные о том, что большинство этих препаратов вызывают лейкопению, лимфопению, нейтропению, тромбоцитопению и агранулоцитоз, а также снижают уровни провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-17, ИЛ-21, ИЛ-23 и С-реактивного белка у пациентов с расстройствами шизофренического спектра [53].

Относительно возможности наличия хронического воспаления у пациентов с шизофренией стоит отметить, что уровень ИЛ-6 и его растворимого рецептора (ИЛ-6R) в плазме значительно выше у пациентов с шизофренией, однако снижается после лечения антипсихотиками [54].

Все антипсихотики первого поколения (АПП), особенно хлорпромазин и галоперидол, снижают уровень ИЛ-6 и ИЛ-6R у пациентов с шизофренией. Метаанализ использования антипсихотиков в лечении первого психотического эпизода при шизофрении показал, что антипсихотическая терапия ассоциируется со снижением концентрации провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИФН- γ , ФНО- α , а также противовоспалительных цитокинов ИЛ-4, ИЛ-10. С другой стороны, уровни провоспалительных ИЛ-2 и ИЛ-17 остаются неизменными [55].

У пациентов с шизофренией все антипсихотики демонстрируют определенный эффект на Treg. Treg повышены в крови пациентов с шизофренией, стабильно получающих терапию. В то же время была выявлена отрицательная корреляция между Treg-клетками и негативными симптомами [56]. Было показано снижение уровня Th17-клеток в группе пациентов с первым эпизодом шизофрении после 4-недельного курса лечения рисперидоном, помимо этого, была выявлена значительная положительная взаимосвязь между скоростью изменения общего балла PANSS и изменением процента Th17-клеток. Однако неясно, были ли данные результаты связаны с лечением рисперидоном или же естественным течением заболевания, так как в исследование не была включена контрольная группа, принимающая плацебо [40]. Однако в более позднем исследовании у 113 пациентов, которые ранее не принимали антипсихотики (или принимали их менее двух недель за всю жизнь), а также у которых появились симптомы шизофрении не более пяти лет назад, терапия рисперидоном не вызвала значимых изменений ИЛ-17 в крови [57].

В другом исследовании было изучено влияние антипсихотических препаратов на экспрессию генов *STAT3* и *RORC*, участвующих в развитии и дифференцировке Th17-клеток, у 27 пациентов с шизофренией, не принимавших ранее антипсихотики. Кроме того, оценивали влияние антипсихотических препаратов в плазме на уровни пяти цитокинов, связанных с Th17-клетками. Было обнаружено значительное снижение экспрессии гена *STAT3* и уровней ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ИЛ-17A в плазме крови после 3 месяцев приема антипсихотических препаратов [58].

При изучении применения АВП при других заболеваниях, в частности при рассеянном склерозе, было показано, что все исследования сходятся в эффективности

АВП для снижения тяжести симптомов на животной модели рассеянного склероза, экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите (ЭАЭ) и задержки его начала, при этом подавляя выработку различных провоспалительных цитокинов. Клозапин продемонстрировал схожий, но более интенсивный эффект, чем рисперидон, кветиапин и оланзапин, значительно снижая инфильтрацию CD4⁺-Т-лимфоцитов и активацию миелоидных клеток, одновременно повышая уровень Treg. Клозапин также снижал уровень хемокинов, ответственных за миграцию иммунных клеток в ЦНС, и вызывал повышение уровня дофаминовых рецепторов в мозге мышей с ЭАЭ [59].

В то же время сообщается, что антипсихотики способны повышать уровень ИЛ-17 в экспериментах *in vitro* (в стимулированных образцах крови здоровых женщин) [60].

На экспериментальной модели шизофрении показан ингибирующий эффект на ИФН- γ -индуцированную микроглиальную активацию на линии мышиных микроглиальных клеток многих АПП и АВП (рисперидон, арипипразол, кветиапин, zipрасидон) [61].

Фенг и соавт. была предпринята попытка изучить возможную корреляцию уровня воспалительных маркеров в крови пациентов с шизофренией с уровнем психопатологических симптомов. Были исследованы маркеры воспаления и психопатологические симптомы у пациентов с шизофренией после 3, 6 и 12 месяцев терапии антипсихотиками. Наблюдалось значимое снижение уровней моноцитов, уровня межклеточных молекул адгезии и адипонектина между исходным уровнем и 12 месяцами. Более высокий исходный уровень ИЛ-6 в крови предсказывал большее снижение общего балла по шкале PANSS через 3 и 6 месяцев, а также субшкалы PANSS для негативных симптомов через 3 месяца. Более высокий исходный уровень лептина в крови предсказывал большее снижение общего балла и балла по субшкале негативных симптомов PANSS через 6 месяцев. В ходе *post-hoc* анализа ассоциации между исходным уровнем ИЛ-6 и редукцией симптомов были наиболее сильными у пациентов, получавших АВП zipрасидон или кветиапин. Полученные результаты служат дополнительным подтверждением того, что измерение маркеров воспаления в крови может иметь значение для клинического ведения пациентов с шизофренией. В частности, эти маркеры могут помочь в выборе антипсихотической терапии для более персонализированного подхода к лечению пациентов с шизофренией [62].

Интересно, что в связи с установленной ролью нейровоспаления в патогенезе шизофрении, помимо иммуномодулирующего эффекта антипсихотиков, также обсуждается потенциальный терапевтический эффект противовоспалительных препаратов при шизофрении. Jeppesen et al. представили данные метаанализа, согласно которым добавление противовоспалительных препаратов к базисной терапии антипсихотиками снижает клинические проявления шизофрении (согласно шкале PANSS) [55].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обширные данные, полученные к настоящему моменту, свидетельствуют о важной роли воспаления в патогенезе шизофрении. Более того, на основе данных литературы можно предположить, что в ряде случаев хроническое воспаление как на системном уровне, так и на уровне ЦНС является не только патогенетическим,

но и этиологическим фактором шизофрении. В этой связи противовоспалительная терапия может выступать важным компонентом в ведении пациентов с расстройствами шизофренического спектра. Также актуален анализ существующей классической антипсихотической терапии на предмет ее противовоспалительных эффектов.

Многочисленные исследования, изучавшие действие антипсихотиков первого и второго поколений на разных группах пациентов, свидетельствуют в основном

об общем противовоспалительном векторе действия этих препаратов. Однако имеется и много неоднозначных и противоречивых данных. В связи с этим необходимы дальнейшие исследования с целью уточнения противовоспалительных эффектов антипсихотиков, которые могут привести к открытию новых механизмов действия, с помощью которых можно будет эффективно влиять на нейровоспаление, более рационально используя данные препараты в терапевтических целях.

Литература / References

- Huxley P, Krayner A, Poole R, Prendergast L, Aryal S, Warner R. Schizophrenia outcomes in the 21st century: A systematic review. *Brain Behav.* 2021;11(6):e02172. <https://doi.org/10.1002/brb3.2172>
- Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet.* 2016;388(10053):1545–602. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31678-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31678-6)
- McCutcheon RA, Reis Marques T, Howes OD. Schizophrenia: An Overview. *JAMA Psychiatry.* 2020;77(2):201–10. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2019.3360>
- Orsolini L, Pompili S, Volpe U. Schizophrenia: A Narrative Review of Etiopathogenetic, Diagnostic and Treatment Aspects. *J Clin Med.* 2022;11(17):5040. <https://doi.org/10.3390/jcm11175040>
- Kotzeva A, Mittal D, Desai S, Judge D, Samanta K. Socioeconomic burden of schizophrenia: a targeted literature review of types of costs and associated drivers across 10 countries. *J Med Econ.* 2023;26(1):70–83. <https://doi.org/10.1080/13696998.2022.2157596>
- Pedraz-Petrozzi B, Elyamany O, Rummel C, Mulert C. Effects of inflammation on the kynurenine pathway in schizophrenia — a systematic review. *J Neuroinflammation.* 2020;17(1):56. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-1721-z>
- Juckel G, Freund N. Microglia and microbiome in schizophrenia: can immunomodulation improve symptoms? *J Neural Transm (Vienna).* 2023;130(9):1187–93. <https://doi.org/10.1007/s00702-023-02605-w>
- Pillinger T, D'Ambrosio E, McCutcheon R, Howes OD. Is psychosis a multisystem disorder? A meta-review of central nervous system, immune, cardiometabolic, and endocrine alterations in first-episode psychosis and perspective on potential models. *Mol Psychiatry.* 2019;24(6):776–94. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0058-9>
- Szoke A, Pignon B, Godin O, Ferchiou A, Tamouza R, Leboyer M, et al. Multimorbidity and the Etiology of Schizophrenia. *Curr Psychiatry Rep.* 2024;26(5):253–63. <https://doi.org/10.1007/s11920-024-01500-9>
- Vallée A. Neuroinflammation in Schizophrenia: The Key Role of the WNT/ β -Catenin Pathway. *Int J Mol Sci.* 2022;23(5):2810. <https://doi.org/10.3390/ijms23052810>
- Bechmann I, Galea I, Perry VH. What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol.* 2007;28(1):5–11. <https://doi.org/10.1016/j.it.2006.11.007>
- Mogensen FL, Delle C, Nedergaard M. The Glymphatic System (En)during Inflammation. *Int J Mol Sci.* 2021;22(14):7491. <https://doi.org/10.3390/ijms22147491>
- Mousaviyan R, Davoodian N, Alizadeh F, Ghasemi-Kasman M, Mousavi SA, Shaerzadeh F, et al. H. Zinc Supplementation During Pregnancy Alleviates Lipopolysaccharide-Induced Glial Activation and Inflammatory Markers Expression in a Rat Model of Maternal Immune Activation. *Biol Trace Elem Res.* 2021;199(11):4193–204. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02553-6>
- Esslinger M, Wachholz S, Manitz MP, Plumper J, Sommer R, Juckel G, et al. Schizophrenia associated sensory gating deficits develop after adolescent microglia activation. *Brain Behav Immun.* 2016;58:99–106. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.05.018>
- Xia Y, Zhang Z, Lin W, Yan J, Zhu C, Yin D, et al. Modulating microglia activation prevents maternal immune activation induced schizophrenia-relevant behavior phenotypes via arginase 1 in the dentate gyrus. *Neuropsychopharmacology.* 2020;45(11):1896–908. <https://doi.org/10.1038/s41386-020-0743-7>
- Trépanier MO, Hopperton KE, Mizrahi R, Mechawar N, Bazinet RP. Postmortem evidence of cerebral inflammation in schizophrenia: a systematic review. *Mol Psychiatry.* 2016;21(8):1009–26. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.90>
- van Kesteren CF, Gremmels H, de Witte LD, Hol EM, Van Gool AR, Falkai PG, et al. Immune involvement in the pathogenesis of schizophrenia: a meta-analysis on postmortem brain studies. *Transl Psychiatry.* 2017;7(3):e1075. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.4>
- Cotel MC, Lenartowicz EM, Natesan S, Modo MM, Cooper JD, Williams SC, et al. Microglial activation in the rat brain following chronic antipsychotic treatment at clinically relevant doses. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2015; 25(11):2098–107. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.08.004>
- Holmes SE, Hinz R, Drake RJ, Gregory CJ, Conen S, Matthews JC, et al. In vivo imaging of brain microglial activity in antipsychotic-free and medicated schizophrenia: a [11 C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Mol Psychiatry.* 2016;21(12):1672–9. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.180>
- Iliopoulou SM, Tsartalis S, Kaiser S, Millet P, Tournier BB. Dopamine and Neuroinflammation in Schizophrenia — Interpreting the Findings from Translocator Protein (18kDa) PET Imaging. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2021;17:3345–57. <https://doi.org/10.2147/NDT.S334027>
- Di Biase MA, Zalesky A, O'keefe G, Laskaris L, Baune BT, Weickert CS, et al. PET imaging of putative microglial activation in individuals at ultra-high risk for psychosis, recently diagnosed and chronically ill with schizophrenia. *Transl Psychiatry.* 2017;7(8):e1225. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.193>
- Bloomfield PS, Selvaraj S, Veronese M, Rizzo G, Bertoldo A, Owen DR, et al. Microglial Activity in People at Ultra High Risk of Psychosis and in Schizophrenia: An [(11)C]PBR28 PET Brain Imaging Study. *Am J Psychiatry.* 2016;173(1):44–52. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2015.14101358>
- Klaus F, Nguyen TT, Thomas M., Liou SC, Soontornniyomkij B, Mitchell K, et al. Peripheral inflammation levels associated with degree of advanced brain aging in schizophrenia. *Front Psychiatry.* 2022;13:966439. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2022.966439>
- Łupták M, Michalíková D, Fišar Z, Kitzlerová E, Hroudová J. Novel approaches in schizophrenia-from risk factors and hypotheses to novel drug targets. *World J Psychiatry.* 2021;11(7):277–96. <https://doi.org/10.5498/wjp.v11.i7.277>
- Halstead S, Siskind D, Amft M, Wagner E, Yakimov V, Shih-Jung Liu Z, et al. Alteration patterns of peripheral concentrations of cytokines and associated inflammatory proteins in acute and chronic stages of schizophrenia: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet Psychiatry.* 2023;10(4):260–71. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(23\)00025-1](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(23)00025-1)

26. Wang AK, Miller BJ. Meta-analysis of Cerebrospinal Fluid Cytokine and Tryptophan Catabolite Alterations in Psychiatric Patients: Comparisons Between Schizophrenia, Bipolar Disorder, and Depression. *Schizophr Bull.* 2018;44(1):75–83. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbx035>
27. Reale M, Patruno A, De Lutiis MA, Pesce M, Felaco M, Di Giannantonio M, et al. Dysregulation of chemo-cytokine production in schizophrenic patients versus healthy controls. *BMC Neurosci.* 2011;12:13. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-12-13>
28. Boerrigter D, Weickert TW, Lenroot R, O'Donnell M, Galletly C, Liu D, et al. Using blood cytokine measures to define high inflammatory biotype of schizophrenia and schizoaffective disorder. *J Neuroinflammation.* 2017;14(1):188. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0962-y>
29. van Rees G, Lago S, Cox D, Tomasik J, Rustogi N, Weigelt K, et al. Evidence of microglial activation following exposure to serum from first-onset drug-naïve schizophrenia patients. *Brain Behav Immun.* 2018;67:364–73. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.10.003>
30. Cai HQ, Catts VS, Webster MJ, Liu D, O'Donnell M, Weickert TW, et al. Increased macrophages and changed brain endothelial cell gene expression in the frontal cortex of people with schizophrenia displaying inflammation. *Mol Psychiatry.* 2020;25(4):761–75. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0235-x>
31. Zhu Y, Webster MJ, Walker AK, Massa P, Middleton FA, Weickert CS. Increased prefrontal cortical cells positive for macrophage/microglial marker CD163 along blood vessels characterizes a neuropathology of neuroinflammatory schizophrenia. *Brain Behav Immun.* 2023;111:46–60. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2023.03.018>
32. Mazza MG, Capellazzi M, Lucchi S, Tagliabue I, Rossetti A, Clerici M. Monocyte count in schizophrenia and related disorders: a systematic review and meta-analysis. *Acta Neuropsychiatr.* 2020;32(5):229–36. <https://doi.org/10.1017/neu.2020.12>
33. Kübler R, Ormel PR, Sommer IEC, Kahn RS, de Witte LD. Gene expression profiling of monocytes in recent-onset schizophrenia. *Brain Behav Immun.* 2023;111:334–42. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2023.04.019>
34. Weber NS, Gressitt KL, Cowan DN, Niebuhr DW, Yolken RH, Severance EG. Monocyte activation detected prior to a diagnosis of schizophrenia in the US Military New Onset Psychosis Project (MNOPP). *Schizophr Res.* 2018;197:465–9. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2017.12.016>
35. Uranova NA, Bonartsev PD, Androsova LV, Rakhmanova VI, Kaleda VG. Impaired monocyte activation in schizophrenia: ultrastructural abnormalities and increased IL-1 β production. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2017;267(5):417–26. <https://doi.org/10.1007/s00406-017-0782-1>
36. Krause DL, Wagner JK, Wildenauer A, Matz J, Weidinger E, Riedel M, et al. Intracellular monocyte cytokine levels in schizophrenia show an alteration of IL-6. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2012;262(5):393–401. <https://doi.org/10.1007/s00406-012-0290-2>
37. Nikkilä HV, Müller K, Ahokas A, Rimón R, Andersson LC. Increased frequency of activated lymphocytes in the cerebrospinal fluid of patients with acute schizophrenia. *Schizophr Res.* 2001;49(1–2):99–105. [https://doi.org/10.1016/s0920-9964\(99\)00218-2](https://doi.org/10.1016/s0920-9964(99)00218-2)
38. Wang C, Zhu D, Zhang D, Zuo X, Yao L, Liu T, et al. Causal role of immune cells in schizophrenia: Mendelian randomization (MR) study. *BMC Psychiatry.* 2023;23(1):590. <https://doi.org/10.1186/s12888-023-05081-4>
39. Singh RP, Hasan S, Sharma S, Nagra S, Yamaguchi DT, Wong DT, et al. Th17 cells in inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2014;13(12):1174–81. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.08.019>
40. Ding M, Song X, Zhao J, Gao J, Li X, Yang G, et al. Activation of Th17 cells in drug naïve, first episode schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2014;51:78–82. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.01.001>
41. Zheng Y, Zhang Q, Zhou X, Yao L, Zhu Q, Fu Z. Altered levels of cytokine, T- and B-lymphocytes, and PD-1 expression rates in drug-naïve schizophrenia patients with acute phase. *Sci Rep.* 2023;13(1):21711. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-49206-x>
42. Debnath M, Berk M. Th17 pathway-mediated immunopathogenesis of schizophrenia: mechanisms and implications. *Schizophr Bull.* 2014;40(6):1412–21. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbu049>
43. Li H, Zhang Q, Li N, Wang F, Xiang H, Zhang Z, et al. Plasma levels of Th17-related cytokines and complement C3 correlated with aggressive behavior in patients with schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2016;246:700–6. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2016.10.061>
44. Miller BJ, Buckley P, Seabolt W, Mellor A, Kirkpatrick B. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biol Psychiatry.* 2011;70(7):663–71. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.04.013>
45. Sahbaz C, Zibandey N, Kurtulmus A, Duran Y, Gokalp M, Kırpınar I, Sahin F, Guloksuz S, Akkoc T. Reduced regulatory T cells with increased proinflammatory response in patients with schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl).* 2020;237(6):1861–71. <https://doi.org/10.1007/s00213-020-05504-0>
46. Boyko A, Melnikov M, Zhetishev R, Pashenkov M. The Role of Biogenic Amines in the Regulation of Interaction between the Immune and Nervous Systems in Multiple Sclerosis. *Neuroimmunomodulation.* 2016;23(4):217–23. <https://doi.org/10.1159/000449167>
47. Sviridova A, Rogovskii V, Kudrin V, Pashenkov M, Boyko A, Melnikov M. The role of 5-HT_{2B}-receptors in fluoxetine-mediated modulation of Th17- and Th1-cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2021;356:577608. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2021.577608>
48. Penedo MA, Rivera-Baltanás T, Pérez-Rodríguez D, et al. The role of dopamine receptors in lymphocytes and their changes in schizophrenia. *Brain Behav Immun Health.* 2021;12:100199. <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2021.100199>
49. Boiko AS, Mednova IA, Kornetova EG, Gerasimova VI, Kornetov AN, Loonen AJM, et al. Cytokine Level Changes in Schizophrenia Patients with and without Metabolic Syndrome Treated with Atypical Antipsychotics. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021;14(5):446. <https://doi.org/10.3390/ph14050446>
50. Sobiś J, Rykaczewska-Czerwińska M, Świętochowska E, Górczyca P. Therapeutic effect of aripiprazole in chronic schizophrenia is accompanied by anti-inflammatory activity. *Pharmacol Rep.* 2015;67(2):353–9. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.09.007>
51. Mantere O, Trontti K, García-González J, Balcells I, Saarnio S, Mäntylä T, et al. Immunomodulatory effects of antipsychotic treatment on gene expression in first-episode psychosis. *J Psychiatr Res.* 2019;109:18–26. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2018.11.008>
52. Lin Y, Peng Y, Zhu C, Su Y, Shi Y, Lin Z, et al. Pretreatment Serum MCP-1 Level Predicts Response to Risperidone in Schizophrenia. *Shanghai Arch Psychiatry.* 2017;29(5):287–94. <https://doi.org/10.11919/j.jissn.1002-0829.217093>
53. Alvarez-Herrera S, Escamilla R, Medina-Contreras O, Saracco R, Flores Y, Hurtado-Alvarado G, et al. Immunoendocrine Peripheral Effects Induced by Atypical Antipsychotics. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:195. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00195>
54. Maes M, Bosmans E, Calabrese J, Smith R, Meltzer HY. Interleukin-2 and interleukin-6 in schizophrenia and mania: effects of neuroleptics and mood stabilizers. *J Psychiatr Res.* 1995;29(2):141–52. [https://doi.org/10.1016/0022-3956\(94\)00049-w](https://doi.org/10.1016/0022-3956(94)00049-w)
55. Marcinowicz P, Więdołcha M, Zborowska N, et al. A Meta-Analysis of the Influence of Antipsychotics on Cytokines Levels in First Episode Psychosis. *J Clin Med.* 2021;10(11):2488. <https://doi.org/10.3390/jcm10112488>
56. Kelly DL, Li X, Kilday C, Feldman S, Clark S, Liu F, Buchanan RW, Tonelli LH. Increased circulating regulatory T cells in medicated

- people with schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2018;269:517–23. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2018.09.006>
57. Chen D, Li H, Zhao Q, Song J, Lin C, Yu J. Effect of risperidone treatment on insulin-like growth factor-1 and interleukin-17 in drug naïve first-episode schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2021;297:113717. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2021.113717>
 58. Subbanna M, Shivakumar V, Venugopal D, Narayanaswamy JC, Berk M, Varambally S, et al. Impact of antipsychotic medication on IL-6/STAT3 signaling axis in peripheral blood mononuclear cells of drug-naïve schizophrenia patients. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2020;74(1):64–9. <https://doi.org/10.1111/pcn.12938>
 59. Stamoula E, Ainatzoglou A, Stamatellos VP, Dardalas I, Sifas S, Matsas A, et al. Atypical antipsychotics in multiple sclerosis: A review of their in vivo immunomodulatory effects. *Mult Scler Relat Disord.* 2022;58:103522. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2022.103522>
 60. Himmerich H, Schönherr J, Fulda S, Sheldrick AJ, Bauer K, Sack U. Impact of antipsychotics on cytokine production in-vitro. *J Psychiatr Res.* 2011;45(10):1358–65. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2011.04.009>
 61. May M, Beauchemin M, Vary C, Barlow D, Houseknecht KL. The antipsychotic medication, risperidone, causes global immunosuppression in healthy mice. *PLoS One.* 2019;14(6):e0218937. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218937>
 62. Feng T, McEvoy JP, Miller BJ. Longitudinal study of inflammatory markers and psychopathology in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2020;224:58–66. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2020.10.003>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Д.А. Чугунов — сбор, анализ и обработка материала, написание текста; А.А. Шмилович — сбор материала, составление списка литературы; Д.В. Николаева — сбор материала, написание текста; Т.В. Яшина — сбор материала; М.Р. Ларина — сбор материала, написание текста; В.С. Роговский — дизайн исследования, редактирование текста; А.А. Свиридова — написание текста, анализ материала, редактирование, составление списка литературы.

ОБ АВТОРАХ

Чугунов Дмитрий Александрович, канд. мед. наук
<https://orcid.org/0000-0001-7173-3373>
dr.dmitry.83@gmail.com

Шмилович Андрей Аркадьевич, д-р мед. наук
<https://orcid.org/0000-0002-1060-5076>
shmilovich@bk.ru

Николаева Дарья Валерьевна
<https://orcid.org/0009-0008-0113-6555>
daniva0103@gmail.com

Яшина Тамара Викторовна
<https://orcid.org/0009-0001-0438-4983>
toma.yaschina@yandex.ru

Ларина Мария Руслановна
<https://orcid.org/0009-0007-6635-6914>
mimityan11@gmail.com

Роговский Владимир Станиславович, канд. мед. наук
<https://orcid.org/0000-0002-3682-6571>
qwer555@mail.ru

Свиридова Анастасия Алексеевна
<https://orcid.org/0000-0003-1086-9052>
anastasiya-ana@yandex.ru

<https://doi.org/10.47183/mes.2024-242>

УДК 616-71



СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НАНОПОРОВЫХ СЕКВЕНАТОРОВ MINION И НАНОПОРУС В ЗАДАЧЕ ИДЕНТИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ПАТОГЕНОВ

Д.А. Григорян[✉], И.Ф. Стеценко, Б.С. Гуков, А.Д. Мацвай, Г.А. Шипулин

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

Введение. Технологии нанопорового секвенирования стали рутинным инструментом в науке и медицине, широко применяются в исследовании разнообразия и распространения патогенов, играют ключевую роль в полевой эпидемиологии.

Цель. Проведение сравнительного анализа функциональных возможностей секвенаторов третьего поколения MinION и Нанопорус в задаче выявления патогенов в биологическом материале, включая сопоставление таксономического состава, определенного с их использованием, с результатами, полученными на референсной платформе второго поколения MiSeq (Illumina).

Материалы и методы. Проведено исследование 138 образцов архивной ДНК с известным таксономическим составом (исследованы 14 семейств, 20 родов и 43 вида патогенов вирусной и бактериальной природы, суммарно 169 возбудителей инфекций). В исследовании использовались нанопоровые секвенаторы MinION и Нанопорус с оригинальными проточными ячейками R9.4.1 и R10.4.1 от ONT, а также высокопроизводительная платформа MiSeq от Illumina для предварительной идентификации состава исследуемых образцов, содержащих различные титры нуклеиновых кислот возбудителей инфекций ряда таксономических групп. Сравнительный анализ полученных данных (количество последовательностей, средние показатели качества прочтений (Qscore) для каждого нуклеотида, GC-состав последовательностей, распределение длин последовательностей, уровень дупликаций прочтений) проводился биоинформатическим инструментом MultiQC (версия 1.20).

Результаты. В ходе проведенных исследований на приборах MinION и Нанопорус было идентифицировано 98,8 и 97,6% патогенов соответственно, включая малоизученные или новые вирусы. Применение последней версии проточной ячейки на обоих приборах значительно снизило долю низкокачественных прочтений. Полученные данные продемонстрировали высокую степень корреляции между результатами секвенаторов второго и третьего поколений, что подтверждает сопоставимость и взаимозаменяемость этих технологий в задаче идентификации нуклеиновых кислот патогенов.

Выводы. Результаты исследования демонстрируют потенциал нанопоровых секвенаторов MinION и Нанопорус для применения в эпидемиологическом надзоре. Приборы способны обеспечивать высокую точность идентификации патогенов различной природы и благодаря своей компактности и портативности могут существенно повысить скорость диагностики и мониторинга инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: нанопоровое секвенирование; NGS; Illumina; ONT; Нанопорус; MinION

Для цитирования: Григорян Д.А., Стеценко И.Ф., Гуков Б.С., Мацвай А.Д., Шипулин Г.А. Сравнительный анализ нанопоровых секвенаторов MinION и Нанопорус в задаче идентификации нуклеиновых кислот патогенов. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2025;27(1):64–73. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-242>

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства России № 388-00084-24-00 от 29.12.2023.

Соответствие принципам этики: исследование не требовало разрешения локального этического комитета. В ходе исследования не проводился сбор биологических образцов, эксперименты выполнены с использованием нуклеиновых кислот из состава коллекции лаборатории.

Потенциальный конфликт интересов: Г.А. Шипулин является членом редакционного совета журнала «Медицина экстремальных ситуаций». Остальные авторы декларируют отсутствие потенциального конфликта интересов.

✉ Григорян Диана Агароновна DGrigoryan@cspfbmba.ru

Статья поступила: 25.10.2024 **После доработки:** 03.12.2024 **Принята к публикации:** 06.12.2024 **Online first:** 30.12.2024

COMPARATIVE EVALUATION OF MINION AND NANOPORUS NANOPORE SEQUENCERS IN IDENTIFICATION OF PATHOGEN NUCLEIC ACIDS

Diana A. Grigoryan[✉], Ivan F. Stetsenko, Boris S. Gukov, Alina D. Matsvay, German A. Shipulin

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

Introduction. Nanopore sequencing technologies have become routine methods in science and medicine, being widely used in the study of pathogen diversity and distribution and playing a key role in field epidemiology.

Objective. Comparative evaluation of the functional capabilities of third-generation MinION and Nanoporus sequencers in the detection of pathogens in biological material, including comparison of the as-determined taxonomic composition with the results obtained using the second-generation MiSeq (Illumina) reference platform.

Materials and methods. A total of 138 archival DNA samples with known taxonomic composition (14 families, 20 genus, and 43 species of viral and bacterial pathogens; altogether 169 pathogens) were analyzed. MinION and Nanoporus nanopore sequencers with original R9.4.1 and R10.4.1 flow cells (ONT), as well as the high-performance MiSeq (Illumina) platform were used for preliminary identification of the composition of samples containing different titers of pathogen nucleic acids belonging to various taxonomic groups. Comparative evaluation of the obtained data (number of sequences, average read quality scores (Qscore) for each nucleotide, GC-content of sequences, sequence length distribution, read duplication level) was performed using the MultiQC bioinformatics tool (version 1.20).

Results. The MinION and Nanoporus devices identified 98.8% and 97.6% of pathogens, respectively, including understudied or new viruses. The use of the latest-version flow cell on both devices significantly reduced the share of low-quality reads. The findings demonstrate a high degree of correlation between the results obtained by the second- and third-generation sequencers, which confirms the comparability and interchangeability of these technologies for the purposes of pathogen nucleic acid identification.

Conclusions. The study results demonstrate the potential of MinION and Nanoporus nanopore sequencers for epidemiologic surveillance. These devices are capable of identifying pathogens of different nature with high accuracy and, due to their compactness and portability, facilitating the diagnostics and monitoring of infectious diseases.

© Д.А. Григорян, И.Ф. Стеценко, Б.С. Гуков, А.Д. Мацвай, Г.А. Шипулин, 2024

Keywords: nanopore sequencing; NGS; Illumina; ONT; Nanoporus; MinION

For citation: Grigoryan D.A., Stetsenko I.F., Gukov B.S., Matsvay A.D., Shipulin G.A. Comparative evaluation of MinION and Nanoporus nanopore sequencers in identification of pathogen nucleic acids. *Extreme Medicine*. 2025;27(1):64–73. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-242>

Funding: the work was carried out within the state assignment of the Centre for Strategic Planning, of the Federal Medical and Biological Agency (No. 388-00084-24-00 of 29 Dec. 2023).

Compliance with ethical principles: the study did not require approval from the local ethics committee. No biological samples were collected during the study; experiments were performed using nucleic acids from the laboratory collection.

Potential conflict of interest: G.A. Shipulin is a member Editorial Council of *Extreme Medicine*. The other authors declare no potential conflict of interest.

✉ Diana A. Grigoryan DGrigoryan@cspfmbsa.ru

Received: 25 Oct. 2024 **Revised:** 3 Dec. 2024 **Accepted:** 6 Dec. 2024 **Online first:** 30 Dec. 2024

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день технологии секвенирования вошли в список рутинных методов, применяемых во многих областях молекулярной биологии, что позволяет оперативно и достоверно выявлять мутации и генетические вариации вирусов, идентифицировать новые патогены, прогнозировать их эволюционные изменения, отслеживать динамику распространения в популяциях и анализировать филогенетические связи [1–3]. Нанопоровое секвенирование было впервые представлено компанией Oxford Nanopore Technologies (ONT) в 2014 году с устройством MinION [4]. Данная технология обладает множеством уникальных преимуществ, обуславливающих ее востребованность в современной медицине и науке [5]. Благодаря способности секвенировать длинные фрагменты ДНК и РНК стало возможным обнаружение структурных вариаций и эпигенетических модификаций [6–8]. Однако ключевым достоинством данного метода секвенирования является компактность нанопоровых секвенаторов, их способность работать посредством подключения к USB-интерфейсу ноутбука, а также низкие требования к оснащённости лаборатории, что открывает возможности применения данных приборов в различных условиях, включая полевые исследования [9].

Технология нанопорового секвенирования уже оказала значительное влияние на различные области медицины, включая диагностику и лечение генетических заболеваний [10, 11], персонализированную медицину [2, 12], исследование рака [6, 13, 14]. Благодаря своей скорости и мобильности нанопоровое секвенирование является значимым инструментом для эпидемиологического надзора и контроля за вспышками заболеваемости [9, 15–17]. В частности, в условиях пандемии COVID-19 нанопоровое секвенирование сыграло существенную роль в оперативной идентификации штаммов вирусов и выявлении новых генетических вариаций патогенов [12, 17, 18]. Также данная технология зарекомендовала себя в качестве надёжной альтернативы традиционным методам секвенирования полных геномов вирусов [15, 19]. Эти качества особенно значимы в условиях глобальных пандемий и вспышек новых инфекций, поскольку оперативно полученные данные играют решающее значение в процессе принятия решений в области общественного здравоохранения.

Помимо оригинальных платформ третьего поколения от компании Oxford Nanopore Technologies, на рынке присутствует аналогичное по функционалу устройство российского производства — Нанопорус. Данный прибор

предназначен для нанопорового секвенирования с использованием оригинальных проточных ячеек от Oxford Nanopore Technologies.

Цель исследования — проведение сравнительного анализа функциональных возможностей секвенаторов третьего поколения MinION и Нанопорус в задаче выявления патогенов в биологическом материале, включая сопоставление таксономического состава, определённого с их использованием, с результатами, полученными на референсной платформе второго поколения MiSeq (Illumina).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В рамках двух этапов исследования было проанализировано 138 образцов архивной ДНК из коллекции лаборатории с известным таксономическим составом и различным титром нуклеиновых кислот возбудителей инфекций ряда таксономических групп (исследованы 14 семейств, 20 родов и 43 вида патогенов вирусной и бактериальной природы, суммарно 169 возбудителей инфекций). Идентификация патогенного состава исследуемого материала была предварительно проведена посредством высокопроизводительного секвенирования на платформе MiSeq (Illumina). На основании данных локального выравнивания нуклеотидных и белковых последовательностей выполняли анализ показателей схожести с последовательностями из базы данных, применяемых для таксономической идентификации.

В ходе подготовки ампликонных ДНК-библиотек применяли следующие наборы реагентов: восстановление концов двуцепочечных фрагментов ДНК и безматричное аденилирование проведено набором реагентов NEBNext Ultra II End Repair/dA-Tailing Module (New England Biolabs), лигирование адаптерной последовательности из состава набора PCR Barcoding Expansion 1-96 (EXP-PBC096) (ONT) проводили с применением реагента Blunt/TA Ligase Master Mix (New England Biolabs), баркодирование библиотек осуществлялось набором баркодов PCR Barcoding Expansion 1-96 (EXP-PBC096) (ONT). Все наборы использовались согласно инструкции производителя.

Подготовку ДНК-библиотек для секвенирования на проточной ячейке R9.4.1 проводили с применением набора реагентов Ligation Sequencing Kit (SQK-LSK109) (ONT) с последующей загрузкой в проточную ячейку. Подготовку ДНК-библиотек для секвенирования на проточной ячейке R10.4.1 проводили набором реагентов Ligation Sequencing Kit V14 (SQK-NBD114) (ONT) с последующей загрузкой

в проточную ячейку. Последовательность применения секвенаторов определяли с учетом технических и методологических соображений. На первом этапе исследования, при первичном использовании проточной ячейки R9.4.1, секвенирование сначала проводили на секвенаторе MinION, который обеспечивал заведомо стабильную работу ячейки. Этот порядок был выбран для минимизации потенциальных рисков, связанных с возможным снижением стабильности или функциональности ячейки после ее применения на секвенаторе Нанопорус. На втором этапе с целью тестирования секвенатора Нанопорус на воздействие на функциональные характеристики ячейки для последующего использования в приборе MinION секвенирование проводили сначала на Нанопорусе, а затем на MinION.

Запись детектируемого сигнала с приборов осуществляли программным обеспечением MinKNOW версии 23.11.4; бейскалинг данных в формате pod5 проводили программой Dorado версии 7.2.13 (ONT). С целью обеспечения корректности сравнения качества секвенирования и таксономической идентификации тестируемыми приборами для каждого образца отбирали одинаковое количество прочтений, представляющих случайную выборку, сформированную посредством биоинформатического инструмента SeqKit (версия v2.8.0). Оценку качества прочтений в формате fastq осуществляли с применением биоинформатических инструментов Trimmomatic (версия 0.32), FastQC (версия v0.12.0). Сравнительный анализ полученных данных (количество последовательностей, средние показатели качества прочтений (Qscore) для каждого нуклеотида, GC-состав последовательностей, распределение длин последовательностей, уровень дупликаций прочтений) проводили биоинформатическим инструментом MultiQC (версия 1.20). Таксономическую идентификацию вирусного состава образцов проводили с использованием программного обеспечения PathogenID (ФМБА, Россия). В качестве референсного инструмента

для сопоставления результатов определения таксономического состава образцов использовались данные, полученные на платформе второго поколения (MiSeq, Illumina).

Для проведения сравнительного анализа тестируемых секвенаторов исследуемые инфекционные агенты разделяли на 5 групп в соответствии с показателем таксономической идентификации (% Identity), полученным в результате высокопроизводительного секвенирования. Группам вирусов присваивали следующие идентификаторы: Группа № 1 — 30 патогенов, 100–97% Identity, Группа № 2 — 29 патогенов, 96–94 % Identity, Группа № 3 — 39 патогенов, 93–90 % Identity, Группа № 4 — 35 патогенов, 89–80 % Identity, Группа № 5 — 24 патогена, 79–71 % Identity. Представленные группы патогенов моделируют анализ дивергентных групп патогенов, в частности новых штаммов, видов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнение стабильности передачи данных и качества секвенирования

С использованием программного обеспечения MinKNOW выполнена оценка стабильности передачи данных с прибора на управляющий компьютер. В ходе анализа графиков, полученных с приборов MinION и Нанопорус с использованием проточной ячейки R10.4.1, значительных флуктуаций и сбоев в передаче сигнала, а также отклонений от равномерного распределения скорости транслокации ДНК через пору не зарегистрировано (рис. 1 A2, B2). Графики поддержания температурного режима на протяжении всего процесса секвенирования указывали на отсутствие нарушений в работе секвенаторов, колебания температуры были незначительными и оставались в пределах допустимых значений, соответствующие данные представлены на рисунке 1 A1, B1.

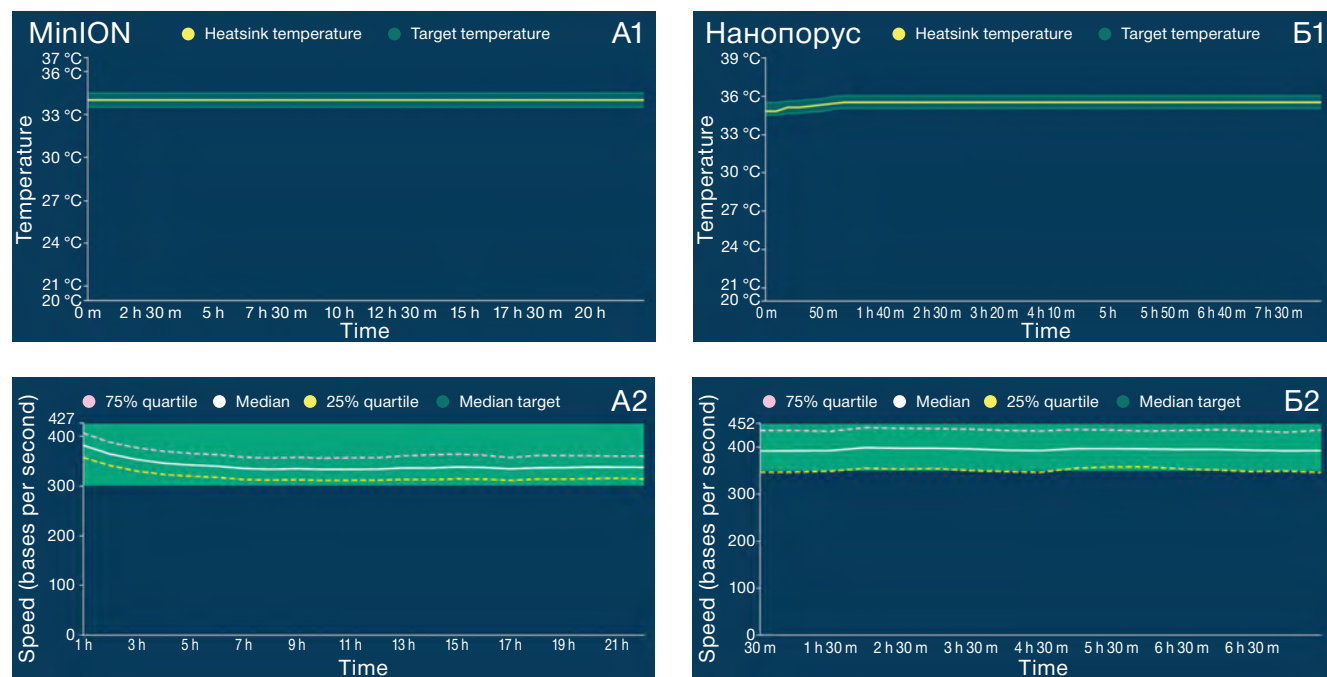


Рисунок подготовлен авторами

Рис. 1. Графическое представление ключевых параметров работы секвенаторов MinION и Нанопорус

Примечание: A1, B1 — поддержание температурного режима в ходе секвенирования; A2, B2 — скорость транслокации ДНК через пору. Графики получены с использованием программного обеспечения MinKNOW версии 23.11.4.

Проведено сравнение показателей качества прочтений, полученных с проточных ячеек как старого, так и нового типа для секвенаторов MinION и Нанопорус (рис. 2). Анализ представленных графиков установил увеличение значения параметра Qscore, отражающего точность идентификации оснований в прочтениях, и снижение уровня дубликаций при использовании проточной ячейки последней версии R10.4.1, также установлено соответствие всех представленных метрик оценки качества прочтений, полученных с двух сравниваемых нанопоровых секвенаторов.

Рассчитаны дополнительные показатели качества секвенирования, а именно метрики N50, N95, N5, а также процент ридов с качеством выше Q20 и Q30, соответствующие данные представлены в таблице 1. В ходе сравнительного анализа процента последовательностей с качеством выше Q20 и Q30 установлено, что при использовании проточной ячейки более ранней версии (R9.4.1) около 70% данных

имеют качество ниже Q20 и примерно 97,3% — ниже Q30 на обоих секвенаторах. В то время как при применении проточной ячейки последней версии R10.4.1, доля данных с качеством ниже Q20 составляет менее 55%, а ниже Q30 — менее 76%. Существенных различий в показателях N50, N95, N5, а также в проценте последовательностей с качеством выше Q20 и Q30 между двумя различными приборами третьего поколения не выявлено.

Анализ корреляции данных идентификации патогенов между приборами

Исследуемый материал содержал фрагменты геномов патогенов следующих семейств: *Pseudomonadaceae*, *Circoviridae*, *Adenoviridae*, *Coronaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Parvoviridae*, *Polyomaviridae*, *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Picornaviridae*, *Solemoviridae*, *Hepeviridae*, *Partitiviridae*, *Tymoviridae*.

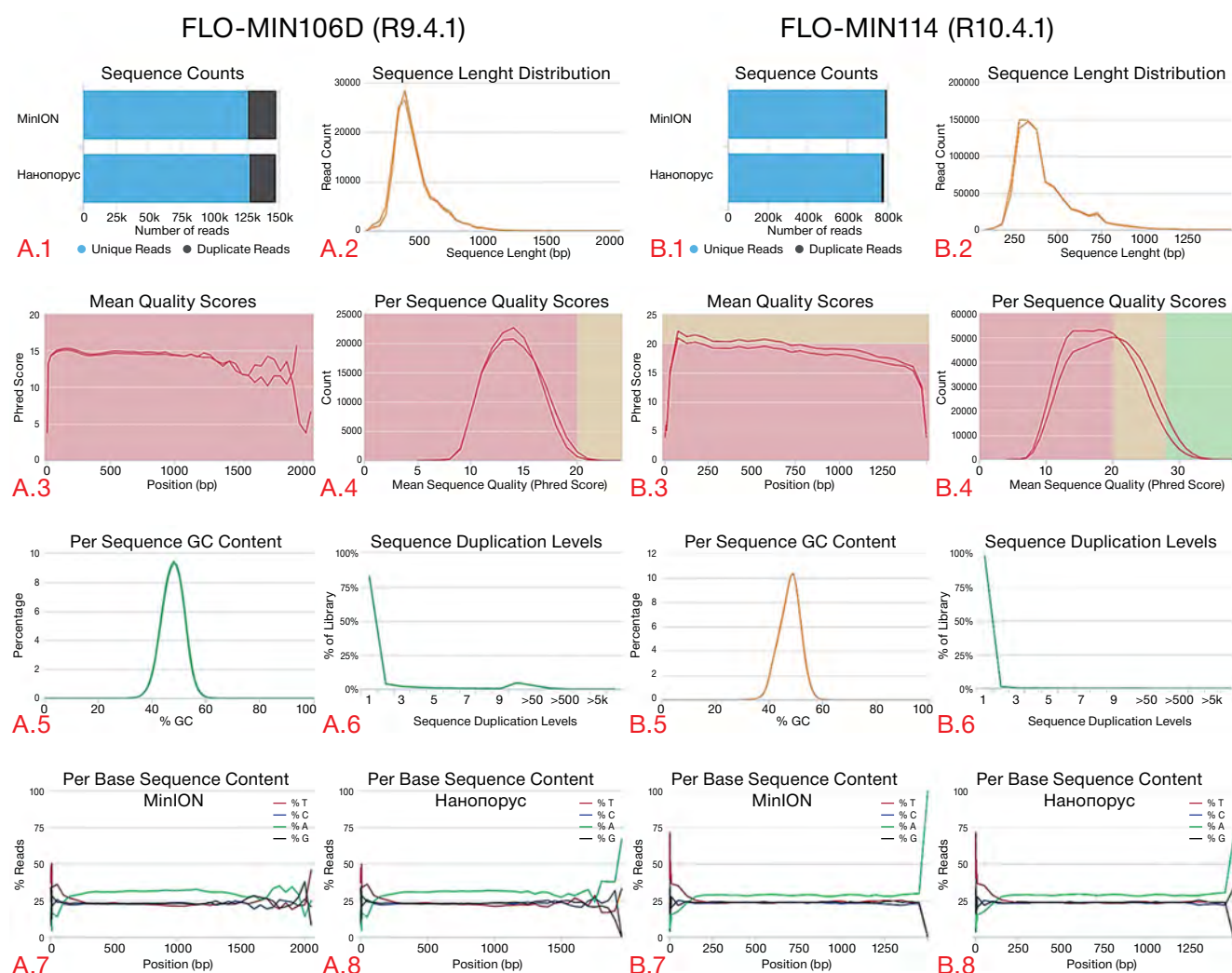


Рисунок подготовлен авторами

Рис. 2. Сравнение показателей качества прочтений, полученных с секвенаторов MinION и Нанопорус

Примечание: график A.1 — общее количество последовательностей, полученных с каждого прибора; график A.2 — распределение ридов по длине прочтений; график A.3 — средние значения качества прочтений (Qscore) для каждого нуклеотида; график A.4 — количество прочтений в зависимости от показателя качества (Qscore); график A.5 — содержание GC в последовательностях, выраженное в процентах; график A.6 — уровень дубликаций прочтений; график A.7 — нуклеотидный состав прочтений, полученных секвенатором MinION; график A.8 — нуклеотидный состав прочтений, полученных секвенатором Нанопорус.

Соответствующие данные для проточной ячейки R10.4.1 показаны на графиках Б.1–Б.8.

Графики соответствуют данным, зарегистрированным при использовании проточных ячеек R9.4.1 и R10.4.1.

Показатели качества прочтений получены биоинформатическим инструментом MultiQC (версия 1.20).

Таблица 1. Показатели качества секвенирования на оригинальных проточных ячейках R10.4.1 и R9.4.1 на секвенаторах третьего поколения Нанопорус и MinION

Параметры оценки качества прочтений	Проточная ячейка R10.4.1, секвенатор MinION	Проточная ячейка R10.4.1, секвенатор Нанопорус	Проточная ячейка R9.4.1, секвенатор MinION	Проточная ячейка R9.4.1, секвенатор Нанопорус
Средняя длина прочтения, ед. нуклеотидов	407,8	417,1	447	435
Максимальная длина прочтения, ед. нуклеотидов	1500	1500	1399	1388
N50	411	425	454	446
N5	250	256	289	275
N95	900	904	871	860

Таблица подготовлена авторами по собственным данным

Семейство *Adenoviridae* насчитывало 12 образцов и 5 видов патогенов с вирусной нагрузкой от 7,22 до 0,33% прочтений на образец по данным высокопроизводительного секвенирования. В результате обработки данных, полученных приборами MinION и Нанопорус, таксономический состав был подтвержден у 11 (92%) и 10 (83%) образцов соответственно. Семейство *Circoviridae* насчитывало 35 образцов и 11 различных видов патогенов с вирусной нагрузкой от 57,27 до 0,04% прочтений по данным секвенирования на платформе Illumina. В результате обработки данных с секвенаторов MinION и Нанопорус таксономический состав был подтвержден у 34 (97%) и 33 (94%) образцов соответственно. Несмотря на то что идентификация целевого патогена нанопоровыми секвенаторами была проведена не для 100% образцов, содержащих вирусы данных семейств (*Adenoviridae* и *Circoviridae*), в ходе выравнивания нуклеотидных последовательностей на референсные базы данных для ряда образцов было получено более детальное типирование вирусов нанопоровыми данными.

Согласно данным высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina семейство *Coronaviridae* насчитывало 70 образцов и 9 различных видов патогенов с вирусной нагрузкой от 49,52 до 0,15% прочтений; выборка образцов семейства *Orthomyxoviridae* насчитывала 6 образцов и 1 вид с вирусной нагрузкой от 28,97 до 1,32% прочтений; выборка образцов семейства *Pseudomonadaceae* насчитывала 12 образцов и 1 вид; тестируемая группа семейства *Parvoviridae* насчитывала 15 образцов и 11 видов патогенов с вирусной нагрузкой от 28,12 до 0,22% прочтений; семейство *Picornaviridae* насчитывало 4 образца и 4 вида патогенов с вирусной нагрузкой от 11,53 до 0,3% прочтений. И так же, как и у семейств *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Polyomaviridae*, *Solemoviridae*, *Tymoviridae*, *Partitiviridae* и *Herpeviridae*, насчитывающих единичные образцы, идентификация таксономического состава семейств *Coronaviridae*, *Parvoviridae*, *Picornaviridae* и *Orthomyxoviridae* проведена у 100% образцов в ходе секвенирования третьего поколения на приборах MinION и Нанопорус. Суммарно нанопоровыми секвенаторами MinION и Нанопорус было идентифицировано 167 (98,8%) и 165 (97,6%) патогенов соответственно.

Для наиболее представленных семейств вирусов проводили сравнение процента прочтений, приходящихся на целевой возбудитель инфекций. Для более доступной визуализации сопоставления данные взяты в логарифмической шкале и проанализированы для трех пар секвенаторов: MiSeq и MinION (А), MiSeq и Нанопорус (Б), а также MinION и Нанопорус (В) (рис. 3). На графиках отмечали возрастание уровня корреляции между результатами секвенирования по мере увеличения вирусной нагрузки

в образцах, в особенности между данными нанопорового секвенирования при уровне нагрузки более двух логарифмических единиц. При низкой вирусной нагрузке выявлены отклонения, в частности между данными, полученными на платформе Illumina, и данными секвенаторов третьего поколения.

Для оценки взаимосвязи показателей процентной вирусной нагрузки на трех приборах рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона. Анализ данных, собранных с обеих проточных ячеек, показал следующие результаты: коэффициент корреляции между платформами MiSeq и MinION составлял $r = 0,567$ ($p \leq 0,05$), что указывало на умеренную положительную зависимость. Между MiSeq и Нанопорус зафиксирован коэффициент $r = 0,544$ ($p \leq 0,05$), также свидетельствующий об умеренной положительной связи. Наивысшее значение корреляции наблюдалось между секвенаторами Нанопорус и MinION, равное $r = 0,993$ ($p \leq 0,05$), что указывало на практически полное совпадение результатов между этими двумя приборами.

В ходе исследования сравнивали группы инфекционных агентов, сформированные согласно диапазону таксономической идентичности (% Identity), по средним значениям показателей таксономической идентификации (e-value, % Identity, длина выравнивания (пары нуклеотидных оснований п.о.), процент прочтений целевого вируса), полученным на тестируемых приборах (рис. 4).

Для всех представленных групп патогенов показатели % Identity и e-value, полученные на платформе MiSeq, незначительно превышали аналогичные показатели, полученные на нанопоровых секвенаторах. В то же время показатель длины выравнивания последовательностей демонстрировали обратную зависимость. Гистограммы указывали на высокую степень соответствия показателей выявления инфекционных агентов между тремя приборами.

Для визуализации различий в достоверности таксономической идентификации, обеспечиваемой тестируемыми секвенаторами, проводили моделирование вариационного распределения вирусной нагрузки и процента идентичности на основании данных, полученных с трех приборов (рис. 5). По результатам первого этапа исследования (95 образцов) (А) наблюдали следующую модель распределения показателей: на платформе MiSeq основное скопление данных располагалось в диапазоне высокой идентичности (90–100%) и средней вирусной нагрузки (2–3 логарифмические единицы); при использовании проточной ячейки R9.4.1 платформа MinION демонстрировала плотное скопление данных в области с высокой идентичностью (более 90%) и относительно высокой вирусной нагрузкой (2–3 логарифмические единицы); данные с секвенатора Нанопорус распределялись шире по оси идентичности, однако основное дисперсионное скопление также находилось в пределах

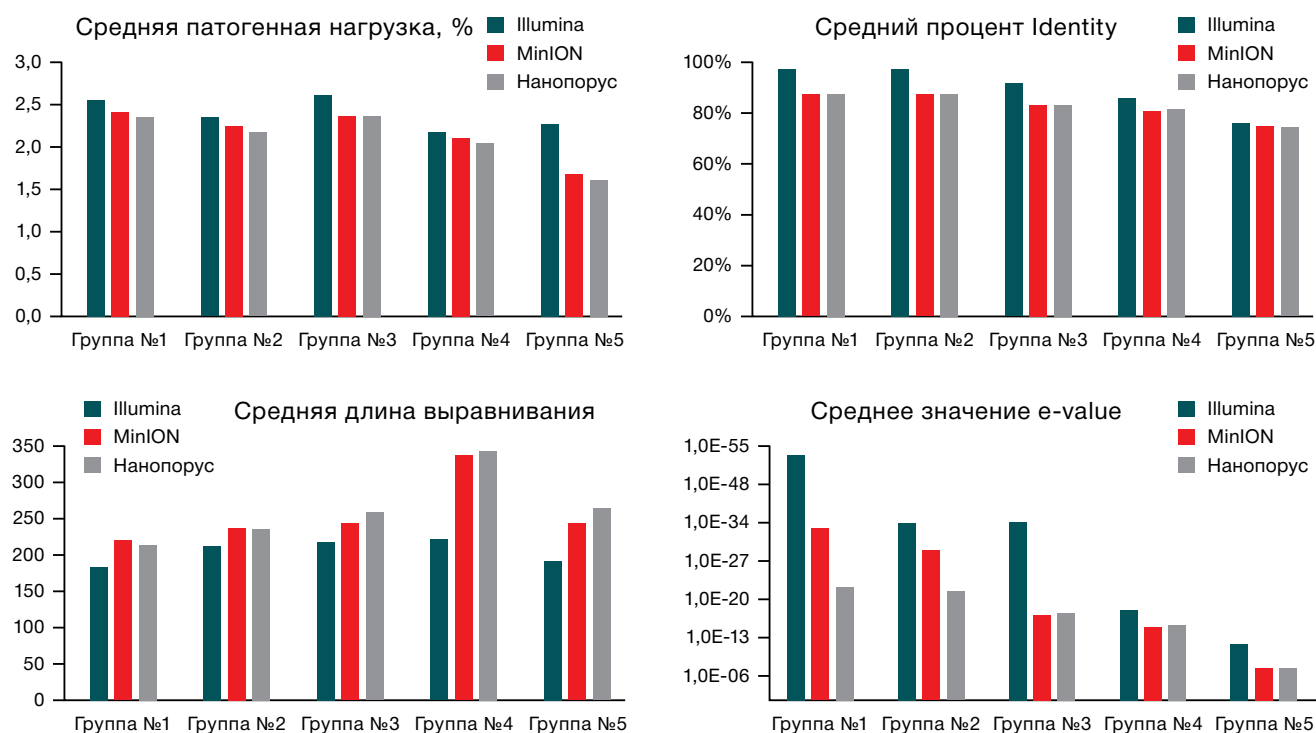
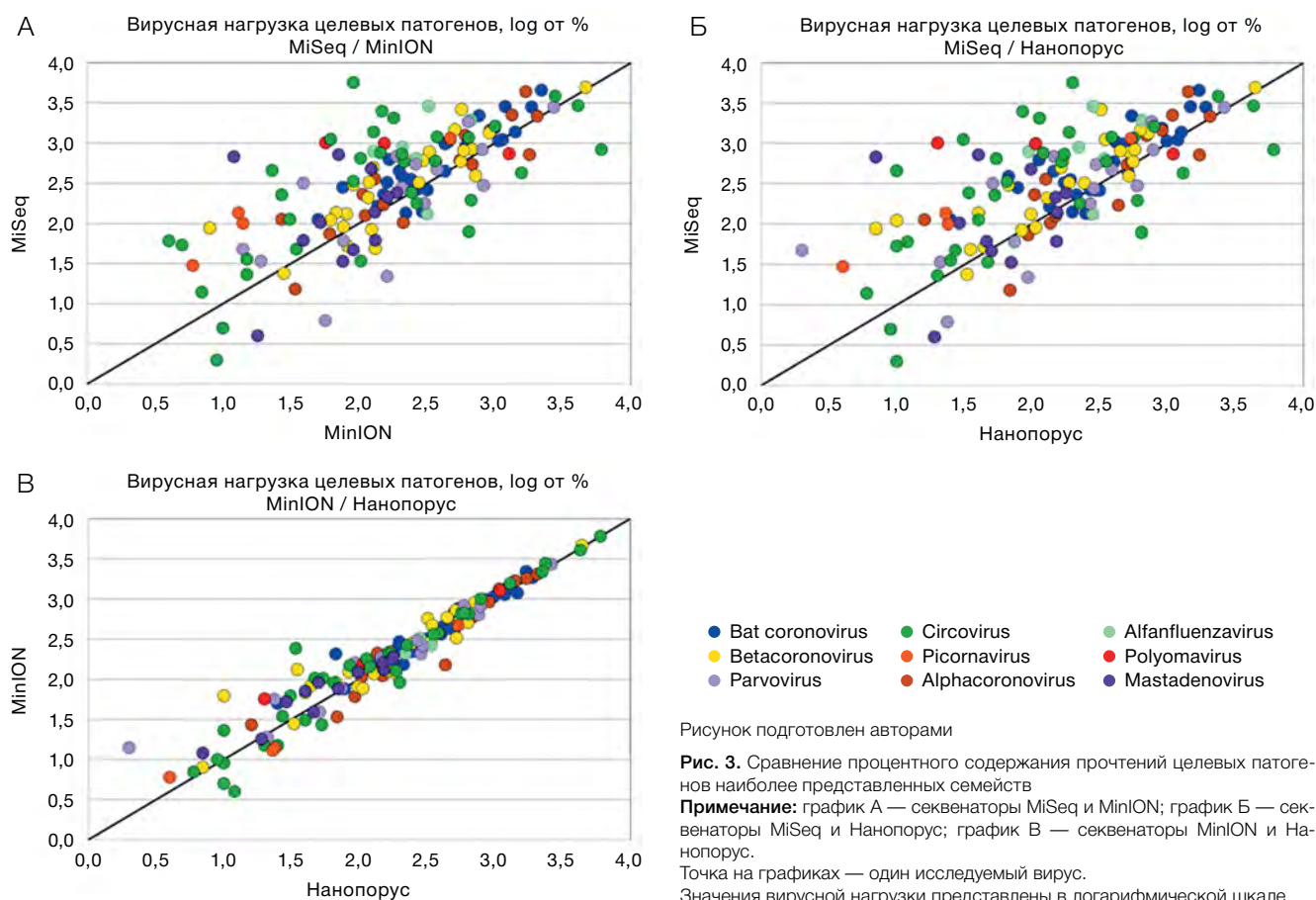


Рисунок подготовлен авторами

Рис. 4. Сравнение средних значений параметров таксономической идентификации (патогенная нагрузка, % Identity, длина выравнивания, e-value), полученных в результате секвенирования на приборах MiSeq, MinION и Нанопорус

Примечание: анализ выполнен на основании данных, полученных с проточных ячеек двух последних версий.

90% идентичности. По результатам второго этапа исследования (43 образца, предположительно содержащих нуклеиновые кислоты малоизученных патогенов) (Б) получили следующий профиль данных: на платформе MiSeq наблюдалось смещение плотности данных в сторону более низкой идентичности и вирусной нагрузки, что объясняется особенностями исследуемого материала; при использовании проточной ячейки R10.4.1 данные с MinION концентрировались в узком диапазоне 85% идентичности и относительно высокой вирусной нагрузки (2–3 логарифмические единицы); секвенатор Нанопорус демонстрировал менее плотное распределение данных относительно показателей своего аналога, но сопоставимую вирусную нагрузку.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Долгое время компания Oxford Nanopore Technologies (ONT) оставалась единственным разработчиком, предлагающим решения в области нанопорового секвенирования. Однако за последний год на рынок вышли несколько аналогичных платформ. В частности, сравнительно недавно были анонсированы китайские секвенаторы: QNome-3841 и QNome-3841hex от компании QitanTech, которые уже нашли применение в задачах судебно-меди-

цинской генетики и исследованиях полных бактериальных геномов [27, 28]; CycloneSEQ от компании MGI, показавший существенные результаты в сборке геномов *de novo*, а также в метагеномном и single-cell секвенировании согласно опубликованному разработчиками платформы исследованию [20]. На момент проведения исследования сравнительный анализ CycloneSEQ и Gnome с системами, такими как MinION, был невозможен ввиду недавнего анонса платформ. Нанопоровый секвенатор Нанопорус, представляющий собой аналог широко известного устройства MinION, был анонсирован в конце 2023 года и введен в коммерческое использование в начале 2024 года. На момент написания исследования авторам не удалось обнаружить в открытом доступе исследований, посвященных напрямую сопоставлению характеристик данных приборов, в связи с чем наши выводы основаны исключительно на собственных экспериментальных данных.

В ходе тестирования секвенатора Нанопорус нарушений или отклонений в работе выявлено не было. Подтверждена совместимость прибора с оригинальными проточными ячейками двух последних версий, наборами для подготовки библиотек и программным обеспечением от компании Oxford Nanopore Technologies. Данные о скорости транслокации ДНК через нанопоры не выявили

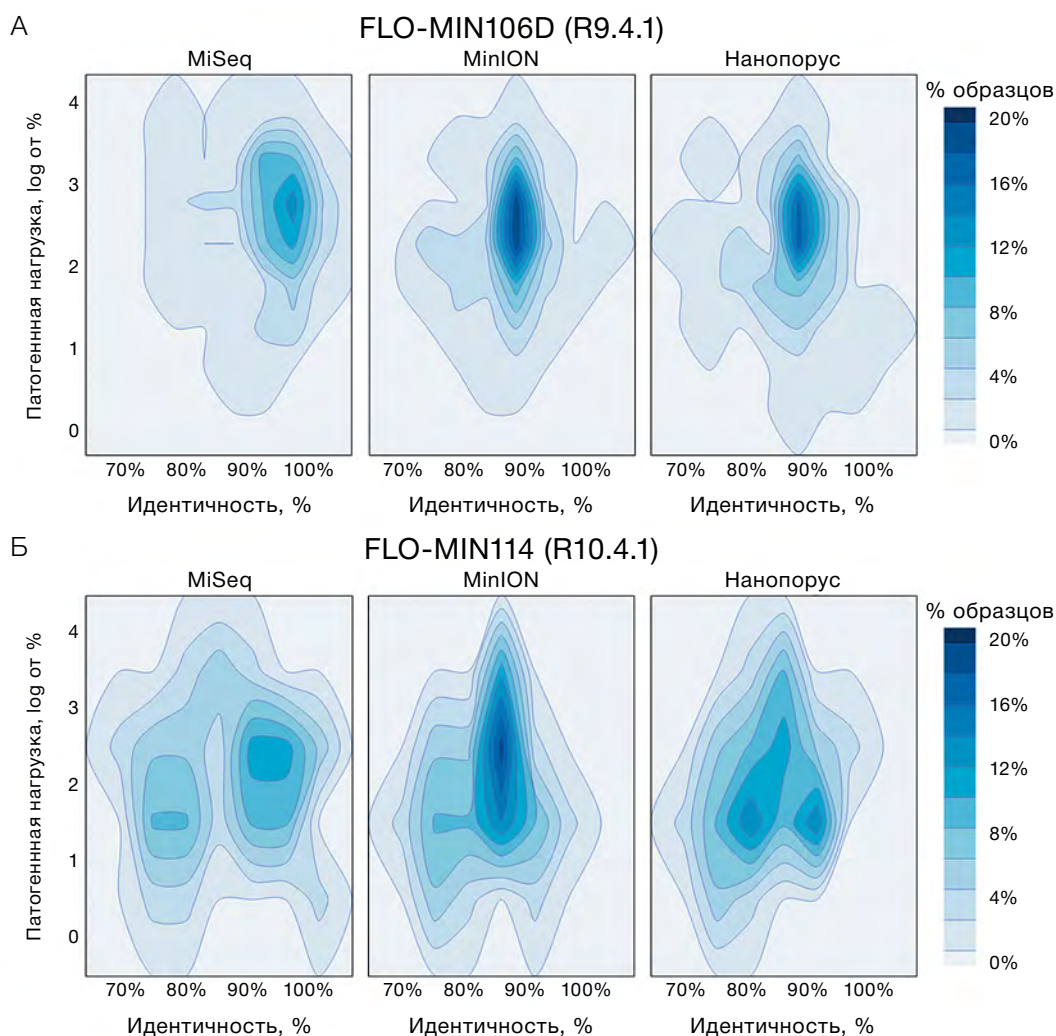


Рисунок подготовлен авторами

Рис. 5. Дисперсионное распределение патогенной нагрузки и процента идентичности для данных, полученных секвенаторами MiSeq, MinION и Нанопорус

Примечание: графики соответствуют данным, зарегистрированным при использовании проточных ячеек R9.4.1(А) и R10.4.1(Б).

искажений сигнала, что указывает на отсутствие существенных отклонений от ожидаемых показателей качества передачи информации на управляющий компьютер. Показатели устойчивости поддержания температурного режима нанопоровыми секвенаторами свидетельствуют о минимальных колебаниях температуры, что важно для стабильной работы нанопор, обеспечения точности секвенирования, предотвращения деградации библиотеки и поддержания оптимальных условий функционирования ферментов, участвующих в процессе секвенирования. В рамках данного анализа установлено соответствие оборудования заявленным характеристикам и функциональным требованиям.

Обновленная проточная ячейка R10.4.1 значительно улучшает точность и стабильность секвенирования, что подтверждается увеличением средних значений параметра Qscore на обеих нанопоровых платформах по сравнению с предыдущей версией проточной ячейки. Существующие исследования в данной области подтверждают, что последняя версия проточных ячеек от компании ONT обеспечивает значительное улучшение точности и качества прочтений [21]. Согласно предоставленным авторами данным процент пар оснований с качеством прочтений Q15 для проточной ячейки R10.4.1 в шесть раз выше, чем для версии R9.4.1; в случае проведения бактериальной сборки генома авторам удалось собрать 97% генома посредством более ранней версии проточной ячейки, а в случае R10.4.1 это значение увеличилось до 98%. В нашем исследовании наблюдается аналогичное улучшение: доля прочтений с качеством ниже Q20 и Q30 значительно уменьшается; количество низкокачественных прочтений ниже Q20 снижается с 70 до 55%, а ниже Q30 — с 97,3 до 76%. Это указывает на повышение точности и надежности секвенирования с использованием новой химии V14 и проточных ячеек R10.4.1 от ONT.

Секвенирование второго поколения признано высокоточным и достоверным методом детекции нуклеиновых кислот инфекционных агентов благодаря высокому качеству чтения нуклеотидов, что позволяет классифицировать его как ведущую технологию среди альтернативных методов молекулярной диагностики [22]. Однако технология нанопорового секвенирования (ONT) предлагает ряд уникальных преимуществ, таких как компактность и мобильность, что особенно выделяется на фоне сложных оптических систем, необходимых для секвенирования второго поколения. Эти характеристики ONT позволяют эффективно использовать технологию в условиях ограниченных ресурсов и оперативных полевых исследований, что является важным фактором для внедрения данного метода в процессы эпидемиологического надзора.

Ранее проведенные исследования продемонстрировали потенциал ONT в качестве альтернативы высокопроизводительным платформам второго поколения. В частности, в рамках исследования, оценивающего возможности идентификации патогенов бактериальной природы с использованием секвенаторов MinION и Illumina (тип прибора второго поколения не уточняется), на обоих приборах успешно выполнена идентификация вида, серотипов, MLST профилей и подтипов шига-токсина в изолятах *Escherichia coli* (STEC) [23]. В ходе другого исследования, посвященного идентификации бактериального состава эталонного образца, содержащего 8 различных патогенов, установлено, что производительность классификации на уровне семейства и рода преобладала

при использовании MinION. Тем не менее на уровне вида идентификация патогенов оказалась более точной на платформе MiSeq. Важно отметить, что для MinION использовалась проточная ячейка версии R9.4.1 [24]. Ряд других исследований, посвященных оценке эффективности применения разных поколений секвенирования для выявления вирусных патогенов, в частности представителей родов Alphavirus [25] и Adenovirus [26], также демонстрируют лишь незначительное преимущество платформ второго поколения по качеству идентификации в сравнении с результатами, полученными на нанопоровых секвенаторах. Наши данные подтверждают выводы, сделанные в вышеописанных исследованиях, демонстрируя высокую корреляцию между результатами детекции патогенов секвенаторами разных поколений. На приборах MinION и Нанопорус было идентифицировано 98,8 и 97,6% патогенов соответственно из числа инфекционных агентов, детектированных платформой MiSeq. Также установлено, что с увеличением патогенной нагрузки в образце наблюдается повышение уровня сходимости результатов секвенирования второго и третьего поколения. Особенно высокое соответствие отмечается между данными, полученными с платформ MinION и Нанопорус по мере превышения среднего значения титра нуклеиновых кислот патогенов в исследуемых образцах. В связи с этим st MinION и Нанопорус можно считать взаимозаменяемыми в контексте задач по идентификации и количественной оценке патогенов.

В ходе исследования проведена оценка способности нанопоровых секвенаторов выявлять новые или малоизученные вирусные вариации. В выборке исследуемого контрольного материала присутствовали образцы, для которых предварительная идентификация патогенного состава с использованием платформы MiSeq выполнена с низкими показателями качества выравнивания, что может свидетельствовать об ограниченной представленности данных вариаций патогенов в существующих базах данных или на полное отсутствие информации о них. Анализ дисперсионного распределения и параметров качества таксономической идентификации продемонстрировал значительное соответствие данных второго и третьего поколения. Это свидетельствует о способности нанопоровых секвенаторов MinION и Нанопорус выявлять ранее неизвестные или малоизученные вирусы на уровне, сопоставимом с высокопроизводительными платформами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Устройство Нанопорус продемонстрировало совместимость с проточными ячейками последних двух версий, наборами для подготовки библиотек и программным обеспечением компании Oxford Nanopore Technologies, что позволяет его интегрировать в существующие лабораторные процессы без необходимости значительных модификаций рабочих протоколов. Результаты сравнительного анализа подтвердили высокий уровень согласованности данных таксономической идентификации патогенного состава, полученных с использованием секвенаторов третьего поколения MinION и Нанопорус, с результатами, обеспечиваемыми платформой второго поколения MiSeq. На основании полученных данных ограничений для применения нанопоровых секвенаторов MinION и Нанопорус в лабораторных исследованиях по обнаружению патогенных микроорганизмов не выявлено.

Литература / References

1. Brown BL, Watson M, Minot SS, Rivera MC, Franklin RB. MinIONTM nanopore sequencing of environmental metagenomes: a synthetic approach. *GigaScience*. 2017;6(3):gix007. <https://doi.org/10.1093/gigascience/gix007>
2. Schmidt K, Mwaigwisya S, Crossman LC, Doumith M, Munroe D, Pires C. Identification of bacterial pathogens and antimicrobial resistance directly from clinical urines by nanopore-based metagenomic sequencing. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(1):104–14. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw397>
3. Ciuffreda L, Rodríguez-Pérez H, Flores C. Nanopore sequencing and its application to the study of microbial communities. *Comput Struct Biotechnol J*. 2021;19:1497–511. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.02.020>
4. Jain M, Olsen HE, Paten B, Akeson M. The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biol*. 2016;17(1):239. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1103-0>
5. Leggett RM, Clark MD. A world of opportunities with nanopore sequencing. *J Exp Bot*. 28 2017;68(20):5419–29. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx289>
6. Ahmed YW, Alemu BA, Bekele SA, Gizaw ST, Zerihun MF, Wabalo EK. Epigenetic tumor heterogeneity in the era of single-cell profiling with nanopore sequencing. *Clin Epigenetics*. 2022;14(1):107. <https://doi.org/10.1186/s13148-022-01323-6>
7. Searle B, Müller M, Carell T, Kellett A. Third-Generation Sequencing of Epigenetic DNA. *Angew Chem*. 2023;135(14):e202215704. <https://doi.org/10.1002/ange.202215704>
8. Parker MT, Knop K, Sherwood AV, Schurch NJ, Mackinnon K, Gould PD. Nanopore direct RNA sequencing maps the complexity of Arabidopsis mRNA processing and m6A modification. *Wan Y, Hardtke CS. eLife*. 2020;9:e49658. <https://doi.org/10.7554/eLife.49658>
9. Quick J, Loman NJ, Durauffour S, Simpson JT, Severi E, Cowley L. Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature*. 2016;530(7589):228–32. <https://doi.org/10.1038/nature16996>
10. Ameur A, Kloosterman WP, Hestand MS. Single-Molecule Sequencing: Towards Clinical Applications. *Trends Biotechnol*. 2019;37(1):72–85. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.07.013>
11. Sun X, Song L, Yang W, Zhang L, Liu M, Li X. Nanopore Sequencing and Its Clinical Applications. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2020;2204:13–32. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0904-0_2
12. Wang M, Fu A, Hu B, Tong Y, Liu R, Liu Z. Nanopore Targeted Sequencing for the Accurate and Comprehensive Detection of SARS-CoV-2 and Other Respiratory Viruses. *Small*. 2020;16(32):2002169. <https://doi.org/10.1002/sml.202002169>
13. Chen Z, He X. Application of third-generation sequencing in cancer research. *Med Rev*. 2021;1:000010151520210013. <https://doi.org/10.1515/mr-2021-0013>
14. Lau BT, Almeda A, Schauer M, McNamara M, Bai X, Meng Q. Single-molecule methylation profiles of cell-free DNA in cancer with nanopore sequencing. *Genome Med*. 2023;15(1):33. <https://doi.org/10.1186/s13073-023-01178-3>
15. Faizuloev E, Mintaev R, Petrusha O, Marova A, Smirnova D, Ammour Y. New approach of genetic characterization of group A rotaviruses by the nanopore sequencing method. *J Virol Methods*. 2021;292:114114. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114114>
16. Tombácz D, Dörmő Á, Gulyás G, Csabai Z, Prazsák I, Kakuk B. High temporal resolution Nanopore sequencing dataset of SARS-CoV-2 and host cell RNAs. *GigaScience*. 2022;11:giac094. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giac094>
17. Vacca D, Fiannaca A, Tramuto F, Cancila V, La Paglia L, Mazzucco W. Direct RNA Nanopore Sequencing of SARS-CoV-2 Extracted from Critical Material from Swabs. *Life*. 2022;12(1):69. <https://doi.org/10.3390/life12010069>
18. Gauthier NPG, Nelson C, Bonsall MB, Locher K, Charles M, MacDonald C. Nanopore metagenomic sequencing for detection and characterization of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Plos one*. 2021;16(11):e0259712. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259712>
19. Ben Chehida S, Filloux D, Fernandez E, Moubset O, Hoareau M, Julian C. Nanopore Sequencing Is a Credible Alternative to Recover Complete Genomes of Geminiviruses. *Microorganisms*. 2021;9(5):903. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050903>
20. Zhang, JY, Zhang, Y, Wang L, Guo F, Yun Q, Zeng T, Dong Y. A single-molecule nanopore sequencing platform. *bioRxiv*. 2024;08. <https://doi.org/10.1101/2024.08.19.608720>
21. Linde J, Brangsch H, Hölzer M, Thomas C, Elschner MC, Melzer F, et al. Comparison of Illumina and Oxford Nanopore Technology for genome analysis of Francisella tularensis, Bacillus anthracis, and Brucella suis. *BMC Genomics*. 2023;24(1):258. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09343-z>
22. Satam H, Joshi K, Mangrolia U, Waghoo S, Zaidi G, Rawool S, et al. Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. *Biology*. 2023;12(7):997. <https://doi.org/10.3390/biology12070997>
23. Greig DR, Jenkins C, Gharbia S, Dallman TJ. Comparison of single-nucleotide variants identified by Illumina and Oxford Nanopore technologies in the context of a potential outbreak of Shiga toxin-producing Escherichia coli. *GigaScience*. 2019;8(8):giz104. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz104>
24. Winand R, Bogaerts B, Hoffman S, Lefevre L, Delvoye M, Van Braekel J, et al. Targeting the 16S rRNA Gene for Bacterial Identification in Complex Mixed Samples: Comparative Evaluation of Second (Illumina) and Third (Oxford Nanopore Technologies) Generation Sequencing Technologies. *Int J Mol Sci*. 2020;21(1):298. <https://doi.org/10.3390/ijms21010298>
25. de Souza LM, de Oliveira ID, Sales FCS, da Costa AC, Campos KR, Abbud A, et al. Technical comparison of Minlon and Illumina technologies for genotyping Chikungunya virus in clinical samples. *J Genet Eng Biotechnol*. 2023;21:88. <https://doi.org/10.1186/s43141-023-00536-3>
26. Ye F, Han Y, Zhu J, Li P, Zhang Q, Lin Y, и др. First Identification of Human Adenovirus Subtype 21a in China With MinION and Illumina Sequencers. *Front Genet*. 2020. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00285>
27. Peng K, Yin Y, Li Y, Qin S, Liu Y, Yang X, et al. QitanTech Nanopore Long-Read Sequencing Enables Rapid Resolution of Complete Genomes of Multi-Drug Resistant Pathogens. *Frontiers in microbiology*. 2022;13:778659. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.778659>
28. Wang Z, Qin L, Liu J, Jiang L, Zou X, Chen X, et al. Forensic nanopore sequencing of microhaplotype markers using QitanTech's QNome. *Forensic science international. Genetics*. 2022;57:102657. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102657>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Д.А. Григорян — проведение исследования, визуализация результатов исследования и полученных данных, подготовка и написание статьи, анализ литературы; И.Ф. Стеценко — курирование данных, валидация результатов; Б.С. Гуков — обработка и интерпретация данных; А.Д. Мацвай — разработка методологии и концепции исследования, научное руководство; Г.А. Шипулин — получение финансирования, административное руководство исследовательским проектом, предоставление ресурсов.

ОБ АВТОРАХ

Григорян Диана Агароновна

<https://orcid.org/0000-0001-9763-9879>
DGrigoryan@cspfmmba.ru

Стеценко Иван Федорович

<https://orcid.org/0000-0003-0979-3409>
ISTecenko@cspfmmba.ru

Гуков Борис Сергеевич

<https://orcid.org/0000-0002-2587-0630>
BGukov@cspfmmba.ru

Мацвай Алина Дмитриевна, канд. биол. наук

<https://orcid.org/0000-0002-6301-9169>
AMatsvay@cspfmmba.ru

Шипулин Герман Александрович, канд. мед. наук

<https://orcid.org/0000-0002-3668-6601>
Shipulin@cspfmmba.ru

<https://doi.org/10.47183/mes.2024-244>

УДК 616.155.392.8:577.218



РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ мРНК ХИМЕРНОГО ГЕНА *BCR::ABL1*

М.А. Авдонина¹, Н.Г. Кукулина^{1,2}, А.А. Главацкая^{1,2}, В.К. Дмитриев³, А.С. Чегодарь³, А.М. Данишевич³, Н.А. Бодунова³, И.С. Абрамов³, Г.А. Шипулин¹

¹ Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² Научно-исследовательский институт медицины труда им. академика Н.Ф. Измерова, Москва, Россия

³ Московский клинический научный центр имени А.С. Логина, Москва, Россия

Введение. Хронический миелолейкоз (ХМЛ) — миелопролиферативное заболевание, ассоциированное с транслокацией t(9;22)(q34;q11), в результате которой образуется химерный ген *BCR::ABL1*. Одним из методов постановки диагноза, а также определения минимальной остаточной болезни является молекулярно-генетическое исследование, а именно количественное определение уровня экспрессии мРНК химерного гена *BCR::ABL1*.

Цель. Апробация разработанной мультиплексной тест-системы для одновременного количественного определения транскриптов e13a2 (b2a2) и e14a2 (b3a2) транслокации p210 в сравнении с зарегистрированным в России аналогом.

Материалы и методы. В качестве образцов использовали 50 проб периферической крови. Из них 39 проб принадлежали пациентам с установленным диагнозом ХМЛ, 11 образцов от здоровых участников использовались для подтверждения аналитической специфичности. В состав набора реагентов входят разработанные праймеры и флуоресцентно-меченые зонды, концентрация которых была подобрана экспериментально, а также оригинальные реагенты производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА (Россия). Статистический анализ проводился с использованием программы StatTech v.4.5.0 (разработчик — ООО «Статтех», Россия). Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Экспериментальные данные по определению аналитических и диагностических характеристик разработанного набора показали следующие результаты: относительная чувствительность, определяемая с помощью клеточных стандартов, составила 0,01%. Воспроизводимая аналитическая чувствительность составила 100 копий/мл (CV = 1,86%). При проверке аналитической специфичности было показано отсутствие ложноспецифических выходов. При тестировании реагентов тест-системы на клинических образцах было выявлено полное совпадение (100%) с результатами, полученными при использовании аналога зарегистрированного в России набора.

Выводы. Апробация разработанного нами набора реагентов продемонстрировала достаточно высокие показатели аналитической и диагностической чувствительности, что позволяет обнаруживать и выявлять количество мРНК химерного гена *BCR::ABL1* как для диагностики, назначения своевременной и точной терапии, так и для мониторинга минимальной остаточной болезни.

Ключевые слова: хронический миелолейкоз; химерный ген *BCR::ABL1*; молекулярно-генетический мониторинг

Для цитирования: Авдонина М.А., Кукулина Н.Г., Главацкая А.А., Дмитриев В.К., Чегодарь А.С., Данишевич А.М., Бодунова Н.А., Абрамов И.С., Шипулин Г.А. Разработка и оценка набора реагентов для количественного определения уровня экспрессии мРНК химерного гена *BCR::ABL1*. Медицина экстремальных ситуаций. 2025;27(1):74–79. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-244>

Финансирование: работа выполнена без спонсорской поддержки.

Соответствие принципам этики: исследование одобрено на заседании независимого этического комитета (выписка из протокола № 12/2019 от 16.12.2019). Все участники подписали добровольное информированное согласие на исследование.

Потенциальный конфликт интересов: Г.А. Шипулин является членом редакционного совета журнала «Медицина экстремальных ситуаций». Остальные авторы декларируют отсутствие потенциального конфликта интересов.

✉ Авдонина Мария Алексеевна MAvdonina@cspmz.ru

Статья поступила: 02.10.2024 После доработки: 09.12.2024 Принята к публикации: 12.12.2024 Online first: 30.12.2024

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF A REAGENT SET FOR QUANTITATION OF MRNA EXPRESSION LEVEL OF CHIMERIC *BCR::ABL1* GENE

Mariia A. Avdonina¹, Natalia G. Kuklina^{1,2}, Arina A. Glavatskaya^{1,2}, Vladislav K. Dmitriev³, Anzhelika S. Chegodar³, Anastasia M. Danishevich³, Natalia A. Bodunova³, Ivan S. Abramov³, German A. Shipulin¹

¹ Centre for Strategic Planning, of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russia

² Izmerov Research Institute of Occupational Health, Moscow, Russia

³ Loginov Moscow Clinical Scientific Centre, Moscow, Russia

Introduction. Chronic myeloid leukemia is a myeloproliferative disease associated with a t(9;22)(q34;q11) translocation resulting in a chimeric *BCR::ABL1* gene. Molecular genetic studies are used as a diagnostic method and for determination of minimal residual disease by quantification of the mRNA expression level of the chimeric *BCR::ABL1* gene.

Objective. To validate the developed multiplex test system for simultaneous quantitative determination of e13a2 (b2a2) and e14a2 (b3a2) transcripts of translocation p210 in comparison with the analog system registered in Russia.

Materials and methods. In total, 50 peripheral blood samples were used. Of these, 39 belonged to patients diagnosed with CML; 11 blood samples from healthy people were used to confirm analytical specificity. The reagent kit includes the specifically developed primers and fluorescently labeled probes, the concentration of which was selected experimentally, as well as original reagents manufactured by the Centre for Strategic Planning, Federal Medical and Biological Agency (Russia). Statistical analysis was performed using the StatTech v.4.5.0 software (developed by StatTech, Russia). Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results. The conducted analytical and diagnostic characterization of the developed kit showed the following results. The relative sensitivity determined using cell standards was 0.01 %. The reproducible analytical sensitivity was 100 copies/mL (CV = 1.86 %). In analytical specificity testing, the absence of false results was shown. When testing the reagents of the test system on clinical samples, the complete convergence (100 %) with the results obtained using the reference kit was revealed.

© М.А. Авдонина, Н.Г. Кукулина, А.А. Главацкая, В.К. Дмитриев, А.С. Чегодарь, А.М. Данишевич, Н.А. Бодунова, И.С. Абрамов, Г.А. Шипулин, 2024

Conclusions. Approbation of the developed reagent set showed its sufficiently high analytical sensitivity and diagnostic sensitivity. This set can be used for identification and quantitative determination of the mRNA of the chimeric *BCR::ABL1* gene for the purposes of diagnosis, timely and accurate therapy, and monitoring of minimal residual disease.

Keywords: chronic myeloid leukemia; chimeric *BCR::ABL1* gene; molecular genetic monitoring

For citation: Avdonina M.A., Kuklina N.G., Glavatskaya A.A., Dmitriev V.K., Chegodar A.S., Danishevich A.M., Bodunova N.A., Abramov I.S., Shipulin G.A. Development and evaluation of a reagent set for quantitation of mRNA expression level of chimeric *BCR::ABL1* gene. *Extreme Medicine*. 2025;27(1):74–79. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-244>

Funding: the work was carried out without sponsorship.

Compliance with the principles of ethics: the study was approved by the Ethics committee (Protocol No. 12/2019 dated 16 Dec. 2019). All participants signed a voluntary informed consent for the study.

Potential conflict of interest: G.A. Shipulin is a member of the Editorial Council of *Extreme Medicine*. Other authors declare no potential conflict of interest.

✉ Mariia A. Avdonina MAvdonina@cspmpz.ru

Received: 2 Oct. 2024 **Revised:** 9 Dec. 2024. **Accepted:** 12 Dec. 2024. **Online first:** 30 Dec. 2024

ВВЕДЕНИЕ

Хронический миелолейкоз (ХМЛ) представляет собой клональное опухолевое миелопролиферативное новообразование, обусловленное злокачественным перерождением стволовых гемопоэтических клеток и характеризующееся усилением пролиферации гранулоцитарного ростка без потери способности к дифференцировке, гиперплазией миелоидной ткани, миелоидной метаплазией кроветворных органов, ассоциированное с хромосомной аномалией — транслокацией t(9;22)(q34;q11) так называемой филадельфийской хромосомы, в результате которой образуется химерный ген *BCR::ABL1* [1]. Данное слияние является наиболее частой цитогенетической аномалией у взрослых пациентов с хроническим миелолейкозом (ХМЛ) — в 95% случаев, а также с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) — в 30% у взрослых и примерно в 5% у детей¹ [1].

По данным статистики за 2022 год в России было выявлено 1087 новых случаев заболевания ХМЛ; среди них 54% случаев у женщин и 47% случаев у мужчин. Указанная нозология чаще всего (в 28,9% случаев) регистрируется у лиц в возрасте 60–69 лет, в 16,5% случаев ХМЛ выявлен у людей в возрастах 50–59 и 70–79 лет, частота встречаемости ХМЛ в возрасте 30–39 лет составляет 12% [2].

Диагностика транслокации осуществляется с помощью цитогенетического исследования (кариотип) костного мозга либо молекулярно-цитогенетического исследования (FISH-метод), а также определением количественного уровня экспрессии мРНК *BCR::ABL1* p210 для транскриптов e13a2 или e14a2².

Целью современной терапии является достижение большого молекулярного ответа (БМО > 3,0), глубокого молекулярного ответа (МО ≥ 4,0) и последующего предотвращения появления опухолевых клонов [3, 4]. Для мониторинга ответа на лечение ингибиторами тирозинкиназ (ИТК) используются несколько методов оценки: полный гематологический ответ, определяемый путем исследования полного количества клеток крови, дифференцированный, выполняемый с помощью проточной цитометрии, и полный цитологический ответ, оцениваемый с использованием аспирата костного мозга и образцов биопсии на основании изучения молекулярного ответа с помощью количественной ПЦР [5].

Наиболее чувствительным методом оценки минимальной остаточной болезни является ПЦР, однако в большинстве лабораторий используются наборы реагентов различных производителей, вследствие чего возникает высокая межлабораторная вариабельность полученных результатов, что может привести к несоответствию сравниваемых показателей и повлиять на выбор тактики в лечении пациентов. Согласно рекомендациям Европейской сети по лейкемии и Национальной комплексной онкологической сети (National Comprehensive Cancer Network), с целью гармонизации молекулярного мониторинга ХМЛ необходимо контролировать уровни мРНК *BCR::ABL1* с использованием международной шкалы (IS), которая основана на стандартизированном базовом уровне транскрипта, представленном в исследовании Международного рандомизированного исследования интерферона и STI571 (International Randomized Study of Interferon and STI571–IRIS) [3]. По результатам проведенного исследования было предложено оценивать логарифмическое снижение *BCR::ABL1* (отношение IS) во время терапии по сравнению с исходным соотношением IRIS при постановке диагноза [6, 7]. Для применения данной Международной шкалы каждая лаборатория должна откалибровать полученные результаты, используя коэффициент преобразования (CF), числовое значение которого необходимо умножать на количественные показатели, полученные в конкретной лаборатории. С целью определения коэффициента преобразования, индивидуального для каждой лаборатории, Всемирная организация здравоохранения создала международную генетическую панель для количественной оценки транскриптов *BCR::ABL1* с помощью ПЦР, содержащую четыре различных варианта (10, 1, 0,1, 0,01%), с использованием клеточной линии K562, разведенной в клеточной линии, не имеющей слияния *BCR::ABL1* [9].

По рекомендациям Международных руководств для диагностики экспрессии мРНК *BCR::ABL1* и мониторинга минимальной остаточной болезни необходимо использовать количественный метод ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с чувствительностью обнаружения ниже, чем МО 4,5 (0,0032% IS) [4, 9]. Использование реагентов с недостаточной чувствительностью может привести к получению некорректных результатов анализов и, как следствие, к преждевременному прекращению

¹ Клинические рекомендации. Хронический миелоидный лейкоз. С92.1. Возрастная группа: Взрослые.

² Там же.

лечения и дальнейшему развитию заболевания [6]. Согласно Клиническим рекомендациям определен порядок периодического мониторинга уровня экспрессии: при уровне экспрессии мРНК *p210 BCR::ABL1* ниже БМО количественная ПЦР в реальном времени проводится каждые 3 месяца, по достижении БМО — каждые полгода [10, 11]. В этой связи актуальными являются разработка, апробация и внедрение в клинко-лабораторную практику отечественных высокочувствительных специфичных диагностических наборов реагентов для определения уровня транскриптов *BCR::ABL1* с помощью ПЦР.

Цель работы — разработка и оценка набора реагентов для количественного определения уровня экспрессии мРНК химерного гена *BCR::ABL1* в образцах периферической крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 50 человек в возрасте от 20 до 80 лет, среди них 28 мужчин и 22 женщины. В основную группу были включены 39 пациентов с установленным клиническим диагнозом ХМЛ. Для проверки аналитической специфичности на отсутствие ложноположительных результатов были использованы образцы крови 11 практически здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту с основной группой пациентов.

Образцы периферической крови были получены в МКНЦ им. Логинава после информационного согласия. Забор крови осуществляли в вакуумные пробирки с K2 ЭДТА (Китай, РУ № РЗН 2013/921 от 25.05.2018). Для подтверждения диагноза ХМЛ и определения уровня экспрессии мРНК химерного гена *BCR::ABL1* использовали набор реагентов для выявления и количественного определения мРНК химерного гена *bcr-abl* (вариант М-bcr) и мРНК гена *abl* в клиническом материале методом ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени АмплиСенс® Лейкоз Квант М-bcr-FRT (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, РУ ФСР 2007/00579) согласно инструкции производителя.

Выделение РНК осуществлялось с помощью набора реагентов АмплиТест® РИБО-преп (ФГБУ «ЦСП» ФМБА, Россия) согласно инструкции. Эффективность выделения мРНК определяли с помощью флуориметра Qubit 4 (Thermo Scientific, США).

В состав разработанного набора реагентов входят специфичные праймеры и флуоресцентно-меченные зонды, наличие которых позволяет проводить одновременное обнаружение экспрессии химерного гена *BCR::ABL1* и гена *ABL1*. Олигонуклеотиды для выявления экспрессии химерного гена были подобраны на основании рекомендаций международной группы Europe Against Cancer (ЕАС) 2003 г. и позволили выявлять 2 наиболее часто встречающихся химерных транскрипта: *e13a2 (b2a2)* и *e14a2 (b3a2)*. Контроль взятия материала, выделение РНК, прохождение реакции обратной транскрипции и ПЦР осуществляли с помощью эндогенного внутреннего контроля, в качестве которого были использованы специфично подобранные праймеры и зонд на ген *ABL1*.

Концентрации праймеров и флуоресцентно-меченных зондов были подобраны экспериментально.

Реакционную смесь готовили с использованием следующих реагентов (производство ФГБУ «ЦСП» ФМБА, Россия): 5х ПЦР-буфер (5 мкл), 10 mM dNTP (0,5 мкл), Taq-полимераза (0,5 мкл), ревертаза MMLV (0,25 мкл).

Условия ПЦР амплификации: обратная транскрипция при 50 °С (30 мин), предварительный прогрев 95 °С (15 мин), далее 45 циклов: денатурация 95 °С (10 сек) и отжиг 60 °С (60 сек). Детекция флуоресцентного сигнала по каналу FAM и HEX.

Интерпретацию результатов проводили только при правильных результатах для отрицательного контрольного образца (ОКО) и положительного контрольного образца (ПКО) при каждой постановке. В качестве ОКО была использована стерильная деионизованная вода, ПКО представляет собой смесь бактериофаговых препаратов, содержащих последовательности мРНК транслокации *p210* химерного гена *BCR::ABL1* и мРНК контрольного гена *ABL1*.

В качестве калибраторов использовались плазмиды, содержащие последовательности мРНК транслокации *p210* химерного гена *BCR::ABL1* и мРНК контрольного гена *ABL1* с известной концентрацией. Концентрация плазмид была измерена с помощью системы QX200 для цифровой ПЦР (Bio-Rad, США). Плазмиды использовали в пяти 10-кратных разведениях примерно от 10 до 1×10^6 копий/мл для определения линейности и эффективности ОТ-ПЦР. Реакция одностадийной ОТ-ПЦР проводилась на амплификаторе ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия).

Для установления предела обнаружения специфичности и чувствительности разработанного набора использовалась РНК, выделенная из клеточной линии K562 (*BCR::ABL1* — положительная) и HeLa (образцы дикого типа), а также образцы от пациентов с ХМЛ и здоровых доноров. Для определения относительной чувствительности были приготовлены клеточные стандарты с определенными концентрациями 10, 1, 0,1, 0,01% согласно процедуре, описанной White et al., 2010 г [8]. Количество клеток подсчитывали с помощью автоматического счетчика Countess II FL Automated Cell Counter (Thermo FS). Полученные стандарты были калиброваны согласно протоколу WHO [12].

Оценка относительного уровня экспрессии мРНК химерного гена *BCR::ABL1* проводилась на основании расчетов в отношении *BCR::ABL1/ABL1* по следующей формуле:

$$\frac{\text{количество копий } BCR::ABL1}{\text{количество копий } ABL1} \times 100\%.$$

Статистический анализ проводился с использованием программы StatTech v.4.5.0 (разработчик — ООО «Статтех», Россия). Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате апробации разработанного нами набора реагентов были получены следующие результаты. Параметры ПЦР в реальном времени: эффективность в пределах 95–105%, коэффициент корреляции $r = 0,99$. По данным экспериментальных работ с использованием клеточных стандартов относительная чувствительность разработанного набора составила 0,01%, что соответствует уровню ПМО (полного молекулярного ответа)³. Воспроизводимая чувствительность по контрольным плазмидам и на РНК, выделенной из культуры клеток K562, — 100 копий/мл (CV% = 1,86).

³ Клинические рекомендации. Хронический миелоидный лейкоз. С92.1. Возрастная группа: Взрослые.

Проверка аналитической специфичности показала отсутствие ложноположительных результатов при тестировании образцов, полученных от здоровых пациентов, при этом определялся только сигнал внутреннего контроля по каналу HEX и отсутствовал сигнал детекции мРНК химерного гена *BCR::ABL1* по каналу FAM.

В исследовании была проанализирована случайная выборка образцов периферической крови больных с клиническим диагнозом ХМЛ. В основной группе экспрессия мРНК транслокации p210 химерного гена *BCR::ABL1* была выявлена во всех 39 образцах. Количество положительных результатов среди мужчин составляло 21 (53,8%), среди женщин — 18 (46,2%). Частота встречаемости транслокации в возрастной категории 20–29 лет составила 3,2%, в категории от 30 до 49 лет — 12,9% случаев, в возрастной группе 50–59 лет — 9,6%, в возрастах 60–69 и 70–79 лет — 19,3% пациентов, 6,4% случаев встречаемости транслокации зарегистрировано в возрастной категории от 80 лет, что согласуется со статистическими данными.

Наибольшее количество пациентов с отмеченными изменениями регистрировали в возрастных категориях 60–69 и 70–79 лет, что также согласуется со статистическими данными по России [2]. Пациенты моложе 20 лет представлены не были; это связано с небольшой выборкой и заболеваемостью в этом возрасте: около 1% по стране. ХМЛ одинаково распространен как у мужчин, так и у женщин [13, 14].

Относительная экспрессия гена *BCR::ABL1* (белок p210, варианты b3a2 или b2a2) по результатам тестирования в образцах периферической крови больных с клиническим диагнозом ХМЛ составила от 2,3 до 100%. При этом количество копий гена *ABL1* находилось в диапазоне от 2200 до 17 595 440 копий/мл в группе с диагнозом ХМЛ и от 11 675 896 до 18 634 577 копий/мл в группе здоровых.

Согласно Лабораторным рекомендациям по диагностике и лечению хронического миелоидного лейкоза (European LeukemiaNet) минимальное количество референтных генных транскриптов независимо от того, обнаружен *BCR::ABL1* или нет, должно быть не менее 10 000 *ABL1* для MR 4, 32 000 для MR 4,5, 100 000 для MR 5 в том же объеме кДНК, в котором тестируется образец на *BCR::ABL1* [4]. Количество полученных транскриптов референтного гена соответствует международным стандартам, и результаты могут быть включены в клинические отчеты.

Во время тестирования пациентов из группы с клиническим диагнозом ХМЛ было выявлено 8 образцов $IS \leq 1\%$ *BCR::ABL1* (MR 2), 9 образцов $IS \leq 0,1\%$ (MR 3), 7 образцов $IS \leq 0,01\%$ (MR 4), 7 образцов $IS \leq 0,0032\%$ (MR 4,5). Объектом исследования были образцы крови случайных пациентов. Критерием включения в основную группу пациентов было наличие подтвержденного диагноза ХМЛ, установленного с использованием зарегистрированного в России аналога «АмплиСенс® Лейкоз Квант М-bcr-FRT».

Апробация разработанного набора реагентов на образцах периферической крови с известным уровнем экспрессии химерного гена *BCR::ABL1* продемонстрировала полное совпадение с результатами, полученными при использовании набора реагентов «АмплиСенс® Лейкоз Квант М-bcr-FRT».

При установлении диагноза ХМЛ для выявления химерного гена *BCR::ABL1* применяют молекулярно-генетическое исследование (FISH-метод), а также определение экспрессии мРНК *BCR::ABL1* p210 (количественное) для химерных транскриптов e13a2 или e14a2 методом ПЦР [15]. Данный метод также используют при оценке уровня ответа на лечение пациентов с помощью ингибиторов тирозинкиназы (ИТК) и определении уровня минимальной остаточной болезни, когда количество остаточных лейкоэмических клеток ниже уровня чувствительности цитогенетических исследований [16].

В настоящее время на рынке существует ряд отечественных тест-систем, направленных на выявление мРНК химерного гена *BCR::ABL1*. Например, «АмплиСенс® Лейкоз Квант М-bcr-FRT» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), ОНКОСКРИН 1-1-Q (ООО «ГеноТехнология»), имеющие регистрационные удостоверения, так и без регистрационных удостоверений: «Миелоскрин BCR-ABL» («Формула гена»), BCR-ABL1 MbcR RQ Kit® (ООО «Иноген»).

Аналитическая чувствительность набора «АмплиСенс® Лейкоз Квант М-bcr-FRT» по количеству воспроизводимых копий ниже в 2 раза по сравнению с анализируемым нами набором и составляет 237 копий/мл vs 100 копий/мл⁴. Во время проведения анализа с использованием набора «АмплиСенс® Лейкоз Квант М-bcr-FRT» предполагает постановку первоначально изолированной реакции обратной транскрипции, а далее проведение ПЦР в реальном времени, что довольно трудозатратно. В отличие от набора сравнения, в разработанном комплекте использовали смесь, позволяющую детектировать экспрессию мРНК *BCR::ABL1* p210 в одной пробирке.

Результаты количественной оценки мРНК *BCR::ABL1*, полученные с использованием тестируемого набора, совпали с результатами, зарегистрированными с помощью набора «АмплиСенс® Лейкоз Квант М-bcr-FRT», во всех образцах. Оба набора могут идентифицировать по крайней мере 4,5-кратное снижение отношения IS.

С помощью набора «BCR/ABL МУЛЬТИТЕСТ» возможно одновременное выявление химерных транскриптов p210, p190 и p230 гена *BCR::ABL1* с применением мультиплексного формата ОТ-ПЦР, что экономически целесообразно при проведении первичного скрининга [17].

Н. Kitamura et al. в 2019 г. представили новый высокочувствительный двухэтапный набор реагентов ОТ-ПЦР (Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией) с диагностической чувствительностью IS 0,01%, которая была определена с помощью вторичной контрольной панели Armored RNA Quant® (ARQ) (Asuragen, Inc., Остин, Техас, США) [6].

М.В. Дубиной и соавт. были определены аналитические показатели теста, при котором специфичность должна стремиться к 100%, адекватным показателю уровня чувствительности 3–5 копий мРНК на реакцию, при этом отношение транскрипта *BCR::ABL1* к гену-нормализатору должно составлять 0,01% (соответствует уровню ПМО) [18].

По сравнению с аналогом разработанный набор имеет ряд преимуществ. Во-первых, у него более высокие аналитические показатели. Во-вторых, использование одностадийной ОТ-ПЦР дает возможность значительно снизить риск контаминации, технических ошибок при распылении реагентов и образцов, а также снижает время

⁴ <https://roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch>

работы персонала. В-третьих, применяемая мультиплексная смесь специфических зондов и праймеров по двум каналам детекции позволяет существенно сократить объем используемого расходного материала.

Таким образом, нами был создана высокочувствительная мультиплексная тест-система, позволяющая одновременно детектировать транскрипты e13a2 (b2a2) и e14a2 (b3a2) транслокации p210, а также содержащая эндогенный внутренний контроль с оценкой правильности прохождения всех этапов ПЦР, включая выделение РНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Количественное определение и обнаружение транслокации при ХМЛ важны для выбора протоколов лечения

и мониторинга рецидивов заболевания, а чувствительный и точный мониторинг минимальной остаточной болезни играет важную роль в управлении лечения ХМЛ, облегчая принятие решения о прекращении лечения и выявляя пациентов с риском прогрессирования. Апробирование разработанной тест-системы, позволяющей выявлять транскрипт p210 химерного гена *BCR::ABL1*, показало достаточно высокий порядок диагностической специфичности и чувствительности разработанного набора реагентов для количественного выявления уровня относительной экспрессии мРНК химерного гена *BCR::ABL1* в крови с целью верификации диагноза ХМЛ на уровне 100%. Использование эндогенного внутреннего контроля (ген *ABL1*) позволило контролировать основные этапы ПЦР-исследования (пробоподготовку, выделение РНК, реакцию обратной транскрипции и амплификации).

Литература / References

- Ravandi F, Kebriaei P. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009;23(5):1043–63.
<https://doi.org/10.1016/j.hoc.2009.07.007>
- Каприн АД, ред. Злокачественные новообразования в России в 2022 году (заболеваемость и смертность) М.:МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2023.
Kaprin AD, red. Malignant neoplasms in Russia in 2022 (morbidity and mortality). M.: P.A. Herzen Moscow State Medical Research Institute — branch of the Federal State Budgetary Institution NMIC Radiology of the Ministry of Health of Russia; 2023(In Russ.).
- Etienne G, Guilhot J, Rea D, Rigal-Huguet F, Nicolini F, Aude C, et al. Long-Term Follow-Up of the French Stop Imatinib (STIM1) Study in Patients With Chronic Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol.* 2017;35(3):298–305.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2016.68.2914>
- Hochhaus A., Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F., et al. European LeukemiaNet 2020 Recommendations for Treating Chronic Myeloid Leukemia. *Leukemia.* 2020;34(4):966–84.
<https://doi.org/10.1038/s41375-020-0776-2>
- Kantarjian H., Schiffer C., Jones D., Cortes J. Monitoring the response and course of chronic myeloid leukemia in the modern era of BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors: practical advice on the use and interpretation of monitoring methods. *Blood.* 2008;111(4): 1774–80.
<https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-110189>
- Kitamura H, Tabe Y, Ai T, Tsuchiya K, Yuri M, Misawa S, et al. A new highly sensitive real-time quantitative-PCR method for detection of BCR-ABL1 to monitor minimal residual disease in chronic myeloid leukemia after discontinuation of imatinib. *PLoS One.* 2019;14(3):e0207170.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207170>
- Martinez RJ, Kang Q, Nennig D, Bailey N, Brown N, Betz B, et al. One-Step Multiplexed Droplet Digital Polymerase Chain Reaction for Quantification of p190 BCR-ABL1 Fusion Transcript in B-Lymphoblastic Leukemia. *Arch Pathol Lab Med.* 2022;146(1):92–100.
<https://doi.org/10.3390/diagnostics12061305>
- White H.E, Matejtschuk P, Rigsby P, Gabert J, Lin F, Wang YL, et al. Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood.* 2010;116(22):e111–7.
<https://doi.org/10.1182/blood-2010-06-291641>
- Özdemir NZ, Kılıçaslan NA, Yılmaz M, Eşkazan AE. Guidelines for the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia From the NCCN and ELN: Differences and Similarities. *Int J Hematol.* 2023;117(1):3–15.
<https://doi.org/10.1007/s12185-022-03446-1>
- Kottwitz D, Hadi EH, Amrani E, Cabezas S, Dehbi H, Nadifi S, et al. Evaluation of a novel multiplex RT-qPCR assay for the quantification of leukemia-associated BCR-ABL1 translocation. *Int J Hematol.* 2015;102(3):335–41.
<https://doi.org/10.1007/s12185-015-1839-4>
- Franke GN, Maier J, Wildenberger K, Cross M, Giles FJ, Müller M.C, et al. Comparison of Real-Time Quantitative PCR and Digital Droplet PCR for BCR-ABL1 Monitoring in Patients with Chronic Myeloid Leukemia Comparative Study. *J Mol Diagn.* 2020;22(1):81–9.
<https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2019.08.007>
- International Standard, 1st WHO International Genetic Reference Panel for the quantitation of BCR-ABL1 translocation NIBSC code: 09/138
- Winn AN, Atallah E, Cortes J, Deininger MW, Kota V, Larson RA, et al. Estimated Savings After Stopping Tyrosine Kinase Inhibitor Treatment Among Patients With Chronic Myeloid Leukemia. *JAMA Netw Open.* 2023;6(12):e2347950.
<https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2023.47950>
- Cantoni N, Sommariva R, Seitz P, Kulenkampff E, Kahn S, Lambert JF, et al. A multicenter real-world evidence study in the Swiss treatment landscape of chronic myeloid leukemia. *BMC Cancer.* 2022;22(1):1192.
<https://doi.org/10.1186/s12885-022-10241-y>
- Cross NCP, Ernst T, Branford S, Cayuela J-M, Deininger M, Fabarius A, et al. European LeukemiaNet laboratory recommendations for the diagnosis and management of chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2023;37(11):2150–67.
<https://doi.org/10.1038/s41375-023-02048-y>
- Рябчикова НР, Миннихметов ИР, Сафуанова ГШ, Исламгулов ДВ, Карунас АС, Хуснутдинова ЭК. Хронический миелолейкоз: молекулярный мониторинг в клинической практике. *Онкогематология.* 2013;8(1):7–16.
Ryabchikova NR, Minniakhmetov IR, Safuanova GSh, Islamgulov DV, Karunas AS, Khusnutdinova EE. Chronic myelogenous leukemia: molecular monitoring in clinical practice. *Oncohematology.* 2013;8(1):7–16 (In Russ.).
<https://doi.org/10.17650/1818-8346-2013-8-1-7-16>
- Горбенко АС, Столяр МА, Васильев ЕВ, Михалёв МА, Бахтина ВИ, Ольховик ТИ, и др. Использование набора «BCR/ABL — мультитест» в алгоритме лабораторной диагностики онкогематологических заболеваний: экономические аспекты. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2021;66(9):571–6.
Gorbenko AS, Stolyar MA, Vasiliev EV, Mikhalev MA, Bakhtina VI, Olkhovik TI, et al. Use of the «BCR/ABL — multitest» kit in the algorithm of laboratory diagnostics of oncohematological diseases: economic aspects. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2021;66(9):571–6.
<https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-9-571-576>
- Дубина МВ, Кувейда ДА, Хомякова ТЕ, Цаур ГА, Куцев СИ,

Зарицкий АЮ. Молекулярный мониторинг эффективности терапии больных хроническим миелолейкозом в России. *Современная онкология*. 2010;4(12):9–17.
Dubina MV, Kuevda DA, Khomyakova TE, Tsaur GA, Kutsev SI,

Zaritskiy AY. Molecular monitoring of the effectiveness of therapy in patients with chronic myeloid leukemia in Russia. *Journal of Modern Oncology*. 2010; 4(12):9–17 (In Russ.).
EDN: [NCXVBJ](#)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: М.А. Авдоница — написание текста статьи, обзор публикаций по теме статьи; Н.Г. Куклина — планирование исследования, обзор публикаций по теме статьи; А.А. Главацкая — проведение экспериментальных работ; В.К. Дмитриев — проведение экспериментальных работ, сбор и анализ данных; А.С. Чегодарь — проведение экспериментальных работ, сбор и анализ данных; А.М. Данишев — обзор публикаций по теме статьи; Н.А. Бодунова — обзор публикаций по теме статьи, редактирование текста статьи; И.С. Абрамов — сбор и анализ данных; Г.А. Шипулин — редактирование статьи, окончательное утверждение рукописи.

ОБ АВТОРАХ

Авдоница Мария Алексеевна, канд. биол. наук
<https://orcid.org/0000-0002-8605-7432>
marysheilaus@gmail.com

Куклина Наталья Григорьевна, канд. биол. наук
<https://orcid.org/0000-0002-8255-6226>
NKuklina@cspfmmba.ru

Главацкая Арина Андреевна
<https://orcid.org/0000-0001-6223-8258>
abessonova1705@gmail.com

Дмитриев Владислав Константинович
<https://orcid.org/0009-0004-6282-0036>
meetyourmeetr1ch@gmail.com

Чегодарь Анжелика Сергеевна
<https://orcid.org/0000-0001-7753-3698>
a.chegodar@mknc.ru

Данишев Анастасия Михайловна
<https://orcid.org/0000-0002-3573-8342>
a.danishevich@mknc.ru

Бодунова Наталья Александровна, канд. мед. наук
<https://orcid.org/0000-0002-3119-7673>
n.bodunova@mknc.ru

Абрамов Иван Сергеевич
<https://orcid.org/0000-0002-6954-1564>
i.abramov@mknc.ru

Шипулин Герман Александрович, канд. мед. наук
<https://orcid.org/0000-0002-9734-0620>
shipulin@cspfmmba.ru

<https://doi.org/10.47183/mes.2024-241>

УДК 616.155.392.8:575.224.22



ИЗУЧЕНИЕ МУТАЦИОННОГО ПРОФИЛЯ БОЛЬНЫХ Ph-НЕГАТИВНЫМИ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ МЕТОДОМ NGS

А.Н. Кириенко¹, Е.В. Мотыко¹, Е.В. Ефремова¹, Д.В. Кустова¹, Т.Н. Герт¹, И.В. Леппянен¹, В.А. Шуваев^{2,3}, И.С. Мартынкевич¹¹Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия²Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия³Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба, Обнинск, Россия

Введение. Определение драйверных мутаций в генах *JAK2*, *CALR* и *MPL* является «золотым стандартом» в молекулярной диагностике пациентов с Ph-МПН. Однако геномный ландшафт таких пациентов гетерогенен, и стандартные молекулярно-генетические методы не позволяют выявить большинство соматических мутаций и тем самым не дают полного представления об особенностях течения и прогнозе Ph-МПН, а также не позволяют подтвердить клональность заболевания у больных с тройным негативным статусом. Метод секвенирования следующего поколения (NGS) дает возможность одновременно провести анализ обширной панели генов и выявить как патогенные, так и драйверные мутации.

Цель. Оценка возможности использования NGS в изучении мутационного статуса пациентов с Ph-негативными МПН и анализ влияния выявленных патогенных мутаций на выживаемость пациентов.

Материалы и методы. В исследование были включены 83 пациента с диагнозами «истинная полицитемия», «эссенциальная тромбоцитемия» и «первичный миелофиброз» в возрасте от 19 до 85 лет (медиана начала заболевания — 51 год). У всех пациентов секвенирование выполнялось с использованием миелоидной панели из 118 генов со средней глубиной прочтения 1000x на приборе MiSeq (Illumina, США). Клиническая значимость мутаций устанавливалась по базам данных COSMIC и Franklin. Для анализа выживаемости использовали метод Каплана — Мейера с оценкой статистической значимости с помощью теста Кокса — Мантла с использованием программы GraphPad Prism 8.

Результаты. Патогенные мутации в 23 генах были выявлены у 39 (46%) пациентов из общего числа больных. Наиболее часто, у 25% пациентов, мутации детектировали в гене *ASXL1*; они снижали бессобытийную выживаемость на 50,3% (Me = 7,83 года против 15,75 года). Выявленные патогенные мутации в других генах сочетанно с мутациями в драйверных генах также ухудшали показатели бессобытийной выживаемости по сравнению с показателями пациентов, имевших изолированные драйверные мутации. Две и более патогенные мутации значимо снижали бессобытийную выживаемость по сравнению с пациентами с одной патогенной мутацией. Методом NGS также удалось выявить патогенные мутации у 8 из 10 исследуемых пациентов с тринегативным статусом и таким образом подтвердить клональность заболевания.

Выводы. Метод секвенирования следующего поколения (NGS) с использованием панели из 118 генов является эффективным инструментом в выявлении прогностически значимых мутаций, важных для подбора наиболее эффективной персонализированной терапии, позволяющей достигать гематологического ответа.

Ключевые слова: Ph-негативные миелопролиферативные новообразования; секвенирование следующего поколения; патогенные мутации; бессобытийная выживаемость

Для цитирования: Кириенко А.Н., Мотыко Е.В., Ефремова Е.В., Кустова Д.В., Герт Т.Н., Леппянен И.В., Шуваев В.А., Мартынкевич И.С. Изучение мутационного профиля больных Ph-негативными миелопролиферативными новообразованиями методом NGS. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2025;27(1):80–87. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-241>

Финансирование: работа выполнена в рамках НИР «Разработка новых подходов к лечению миелопролиферативных новообразований с включением в программы терапии лекарственных препаратов и трансплантации гемопоэтических стволовых клеток», ЕГИСУ НИОКТР № АААА-А20-120082690039-6, 2020 г.

Соответствие принципам этики: исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» Федерального медико-биологического агентства (протокол № 40 от 29.08.2024). Все пациенты, участвовавшие в исследовании, подписали добровольное информированное согласие на исследование в рамках Хельсинкской декларации 2013 г.

Потенциальный конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

✉ Кириенко Анна Николаевна kirienkoann@yandex.ru

Статья поступила: 16.09.2024 После доработки: 25.11.2024 Принята к публикации: 04.12.2024 Online first: 27.12.2024

NGS ANALYSIS OF THE MUTATIONAL PROFILE OF PATIENTS WITH Ph-NEGATIVE MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS

Anna N. Kirienko¹, Ekaterina V. Motyko¹, Elizaveta V. Efremova¹, Daria V. Kustova¹, Tatyana N. Gert¹, Irina V. Leppyanen¹, Vasily A. Shuvaev^{2,3}, Irina S. Martynkevich¹¹Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Saint-Petersburg, Russia²Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia³Tsyb Medical Radiological Research Center, Obninsk, Russia

Introduction. The identification of driver mutations in the *JAK2*, *CALR*, and *MPL* genes is a gold standard approach in the molecular diagnosis of patients with Ph-negative myeloproliferative neoplasms (Ph-MPNs). However, such patients are characterized by a heterogenous genomic landscape. Standard molecular genetic methods cannot be used to identify most somatic mutations, thus failing to provide a comprehensive understanding of the course and prognosis of Ph-MPNs and to confirm the clonality of the disease in patients with triple-negative status. The next generation sequencing (NGS) technology allows simultaneous analysis of an extensive panel of genes and identification of both pathogenic and driver mutations.

Aim. To evaluate the possibility of using NGS to study the mutational status of patients with Ph-negative MPNs and to analyze the effect of identified pathogenic mutations on patient survival.

© А.Н. Кириенко, Е.В. Мотыко, Е.В. Ефремова, Д.В. Кустова, Т.Н. Герт, И.В. Леппянен, В.А. Шуваев, И.С. Мартынкевич, 2024

Materials and methods. The study included 83 patients with polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis aged from 19 to 85 years (the median onset age of 51 years). For all patients, sequencing was performed using a myeloid panel of 118 genes with an average reading depth of 1000x on MiSeq (Illumina, USA). The clinical significance of the mutations was determined using the COSMIC and Franklin databases. The survival rate was analyzed using the Kaplan–Meyer method followed by assessment of statistical significance using the Cox-Mantel test in the GraphPad Prism 8 environment.

Results. Pathogenic mutations in 23 genes were detected in 39 (46%) patients out of the total cohort of patients. The most frequent mutations were detected in the *ASXL1* gene in 25% of patients, which reduced event-free survival by 50.3% (Me = 7.83 years vs 15.75 years). The pathogenic mutations identified in other genes combined with mutations in driver genes also decreased event-free survival compared to patients with isolated driver mutations. Two or more pathogenic mutations significantly reduced event-free survival compared to patients with only one pathogenic mutation. The NGS method was also capable of identifying pathogenic mutations in 8 out of 10 triple-negative patients studied, thus confirming the clonality of the disease.

Conclusions. The next-generation sequencing (NGS) method using a panel of 118 genes is an effective tool in identifying predictively significant mutations important for selecting the most effective personalized therapy to achieve hematologic response.

Keywords: Ph-negative myeloproliferative neoplasms; next-generation sequencing; pathogenic mutations; event-free survival

For citation: Kirienko A.N., Motyko E.V., Efremova E.V., Kustova D.V., Gert T.N., Leppyanen I.V., Shuvaev V.A., Martynkevich I.S. NGS analysis of the mutational profile of patients with Ph-negative myeloproliferative neoplasms. *Extreme Medicine*. 2025;27(1):80–87. <https://doi.org/10.47183/mes.2024-241>

Funding: the study was carried out within the framework of the research work “Development of new approaches to the treatment of myeloproliferative neoplasms with the inclusion of drugs and hematopoietic stem cell transplantation in the programs of therapy”, 2020 (Registry No. AAAA-A20-120082690039-6).

Compliance with ethics principles: the study was approved by the Ethics Committee of the FSBI Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology of FMBA of Russia, (Protocol No. 40 of 08/29/2024). All patients participating in the study signed a voluntary informed consent for the study within the framework of the Declaration of Helsinki 2013.

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

✉ Anna N. Kirienko kirienkoann@yandex.ru

Received: 16 Sep. 2024 **Revised:** 25 Nov. 2024 **Accepted:** 4 Dec. 2024 **Online first:** 27 Dec. 2024

ВВЕДЕНИЕ

Миелополиферативные новообразования *BCR::ABL1*-негативные (Ph-МПН) представляют собой клональные гематологические злокачественные новообразования, которые характеризуются избыточным выходом зрелых миелоидных клеток в кровь и возникают из мутированной гемопоэтической стволовой клетки [1–3]. К классическим Ph-МПН относят истинную полицитемию (ИП), эссенциальную тромбоцитемию (ЭТ) и первичный миелофиброз (ПМФ) [4].

Открытия молекулярной генетики последних десятилетий позволили выявить общий «пусковой механизм» патогенеза этих заболеваний, а именно: постоянная активация янус-киназного (JAK-STAT) сигнального пути в клетке, посредством которого передается информация от внешних химических сигналов к ядру, приводит к транскрипции ДНК и экспрессии генов, участвующих в иммуногенезе, пролиферации, дифференцировке, апоптозе и онкогенезе [5]. Одной из причин постоянной активации JAK-STAT сигнального пути являются мутации в генах *JAK2*, *CALR* и *MPL*, получивших название «драйверных». Выявление мутаций в данных генах стало неотъемлемой частью современного диагностического алгоритма для пациентов с МПН, который включен в текущие клинические рекомендации. Расшифровка патогенетических механизмов развития Ph-МПН способствовала разработке и внедрению в клиническую практику таргетной терапии ингибиторов янус-киназ, блокирующих внутриклеточную сигнальную систему JAK-STAT [5].

В то же время исследования последних лет показали гетерогенность геномного ландшафта Ph-негативных МПН. Мутации выявляли в генах, отвечающих за различные функции внутри клетки: эпигенетическая регуляция метилирования ДНК (*TET2*, *DNMT3A* и *IDH1/2*), модификация гистонов/хроматина (*ASXL1*, *EZH2*, *SUZ12*), сплайсинг

РНК (*SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*), передача сигнала (*SH2B3*, *LNK*, *CBL*, *RAS*, *NF1*), факторы транскрипции (*TP53* и *RUNX1*) и др. [6–9]. Выявление данных мутаций имеет диагностическое и прогностическое значение, позволяя оценить риск прогрессирования заболевания, выбрать наиболее эффективную тактику лечения и принять решение о необходимости трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Таким образом, для диагностики *BCR::ABL1*-негативных МПН у пациентов все большую актуальность приобретает метод секвенирования следующего поколения (next generation sequencing — NGS), позволяющий одновременно определять мутационный статус большого числа генов.

Цель исследования — оценка возможности использования метода NGS в изучении мутационного статуса пациентов с Ph-негативными МПН и анализ влияния выявленных патогенных мутаций на выживаемость пациентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 83 пациента (30 мужчин и 53 женщины) в возрасте от 19 до 85 лет (медиана начала заболевания — 51 год), находящихся на лечении в клиниках Санкт-Петербурга и Москвы. Диагноз «Ph-негативное МПН» согласно критериям ВОЗ ранее установлен ни у всех больных: из них наблюдали 47 пациентов с диагнозом ПМФ, 15 больных — с диагнозом ИП, 21 человек — с диагнозом ЭТ (табл. 1).

Все пациенты были обследованы ранее на наличие мутаций в драйверных генах: у 54 (65%) человек обнаружилась мутация в гене *JAK2* (V617F), у 16 (19%) — в *CALR*, у 3 (4%) — в *MPL*. Тем не менее данные гены были включены в NGS-панель исследуемых генов и использовались в качестве внутреннего положительного контроля. Группа пациентов с ЭТ и ПМФ, не имеющих мутации ни в одном из «драйверных» генов (так называемые пациенты

с тринегативным статусом), составила 10 (14,7%) пациентов от общего числа выборки.

За время наблюдения у 14 пациентов был выявлен фазовый переход или лейкоэмическая трансформация: у 7 пациентов с диагнозом ПМФ наблюдалась трансформация в ОМЛ; у 3 пациентов с ЭТ и 4 с ИП переход во вторичный миелофиброз (табл. 1). Выделение ДНК из образцов периферической крови проводили с использованием набора QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Нидерланды).

Определение мутаций в генах *JAK2*, *MPL*, *CALR*

Мутации в гене *JAK2* определяли с помощью набора реагентов для обнаружения мутации V617F G/T гена *JAK2* (Janus kinase 2) («Синтол», Российская Федерация). Мутации в генах *CALR* и *MPL* определяли методом секвенирования по Сэнгеру на генетическом анализаторе НАНОФОР-05 («Синтол», Российская Федерация). Для наработки фрагментов ДНК использовали соответствующие праймеры: *MPL*-F 5'-TAGCCTGGATCTCCTTGGTG-3', *MPL*-R 5'-AGAGGTGACGTGCAGGAAGT-3'; *CALR*-F 5'-TGAGGTGTGTGCTCTGCCT-3', *CALR*-R 5'-AGAGACATTATTGGCGCGG-3'.

Секвенирование следующего поколения

У всех пациентов секвенирование выполнялось с использованием таргетной экзонной панели из 118 генов со средней глубиной прочтения 1000x на приборе MiSeq (Illumina, США). Самостоятельно разработанная панель включала в себя ключевые гены, задействованные в миелоидных неоплазиях [6–9]. Для секвенирования на Illumina использовали библиотеки, приготовленные из 200 нг геномной ДНК, расщепленной до фрагментов 300 п.о., с использованием фокусированного ультразвукового аппарата Covaris S2.

Фрагментированную ДНК трансформировали в ДНК-библиотеки с помощью набора KAPA Hyper Prep Kit (Roche, Швейцария). Обогащение ДНК-библиотек проводили с помощью набора Hyper Cap Target Enrichment и набора KAPA Hyper Exome Probes (Roche, Швейцария) согласно протоколу производителя. Для приготовления библиотек ДНК использовали модуль MGIEasy Circularization Module V2.0 (MGI, Китай). Количественный анализ библиотеки проводили на флуориметре Quantus с набором QuantiFluor® dsDNA System (Promega, США).

В качестве средства просмотра анализов секвенирования использовали программное обеспечение Illumina Sequence Analysis Viewer. Качество исходных данных NGS оценивалось с помощью программного обеспечения FastQC в Illumina BaseSpace Sequence Hub. Данные секвенирования были проанализированы с использованием комбинации двух приложений для выравнивания последовательностей и вызова вариантов, также применяемых в Illumina BaseSpace Sequence Hub: приложения DNA Amplicon и приложения Pindel, с пределом обнаружения частоты аллелей 3% (VAF).

Клиническая значимость мутаций устанавливалась по базам данных COSMIC, ClinVar и Franklin согласно критериям ACMG/AMP. Для аннотации функции генов была использована база KEGG.

Для анализа выживаемости применяли метод Каплана — Мейера с оценкой статистической значимости с помощью теста Кокса — Мантла. Статистический

Таблица 1. Сводные данные когорты пациентов

Основные характеристики	Количество пациентов, n
Пол:	
мужской	30
женский	53
Возраст (Ме), лет	19–85 (51)
Диагноз:	
Первичный миелофиброз (ПМФ)	47
Истинная полицитемия (ИП)	15
Эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ)	21
Мутации в драйверных генах:	
<i>JAK2</i>	54
<i>CALR</i>	16
<i>MPL</i>	3
Тринегативный статус	10
Фазовый переход / Лейкемическая трансформация:	
ПМФ в острый миелоидный лейкоз	7
ЭТ во вторичный миелофиброз	3
ИП во вторичный миелофиброз	4

Таблица подготовлена авторами по собственным данным

анализ выполнялся с помощью GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мутационный статус драйверных генов

По крайней мере одна из драйверных мутаций в генах *JAK2*, *CALR* и *MPL* была выявлена у 72 (87%) пациентов из общего числа больных с диагнозом «Ph-негативное МПН», принимавших участие в исследовании, что соответствует данным, полученным иными молекулярными методами.

В ходе исследования у 27 (57,5%) пациентов с диагнозом ПМФ обнаруживалась мутация в гене *JAK2* (V617F), мутация в гене *CALR* — у 12 (25,5%), у 2 (4,2%) пациентов — мутация в гене *MPL*, у 6 (12,8%) пациентов не были выявлены мутации в драйверных генах (так называемый «тринегативный» статус). У всех 15 пациентов с диагнозом ИП определялась мутация в гене *JAK2* (V617F). В гене *JAK2* определялась только мутация в 14-м экзоне (V617F), мутации в 12-м экзоне выявлены не были. В гене *MPL* мутации обнаруживались только в положении W515. В гене *CALR* были выявлены мутации двух основных типов: делеция 52 нуклеотидов и инсерция 5 нуклеотидов.

При проведении исследования у 12 (57%) из 21 пациента с диагнозом ЭТ выявлялась мутация в гене *JAK2* (V617F), мутацию в гене *CALR* регистрировали у 4 (19%) больных, у 1 (5%) пациента была определена мутация в гене *MPL*, в то же время 4 (19%) пациента имели тринегативный статус.

Мутационный профиль исследуемой когорты пациентов

При NGS исследовании 118 генов мутации были выявлены у 39 (46%) из 83 пациентов в 23 генах, представленных на рисунке 1. При этом одну патогенную мутацию имели 19 (49%) из 39 наблюдаемых пациентов, 2 мутации

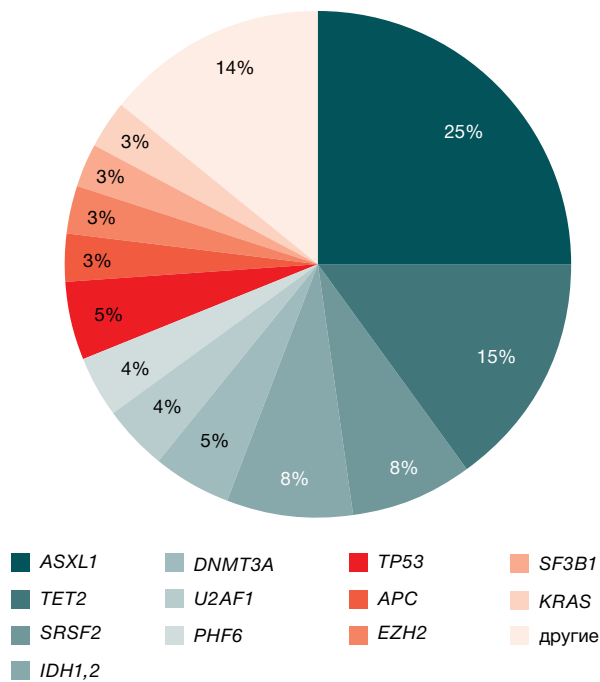


Рисунок подготовлен авторами

Рис. 1. Мутационный профиль 83 пациентов с Rh-негативными миело-пролиферативными новообразованиями

регистривали у 7 (18%) больных, 3 и более мутаций отмечены у 13 (33%) пациентов с Rh-негативными МПН. В среднем у всей когорты выявлялась 1 патогенная мутация.

В анализируемой выборке пациентов патогенные мутации выявлялись чаще других в генах *ASXL1* и *TET2*: у 25 и 15% пациентов соответственно. Мутации в генах *SRSF2* и *IDH1/2* обнаруживались у 8% пациентов, *DNMT3A* — у 6%, *U2AF1*, *PHF6*, *TP53* — у 4% каждая, *APC*, *EZH2*, *SF3B1*, *KRAS* — у 3% каждая. Мутации в генах *ATRX*, *CBL*, *DDX3X*, *EP300*, *GATA2*, *RUNX1*, *SETBP1*, *SUZ12*, *ZRSR2* обнаруживались всего у 1% пациентов каждая (рис. 1).

Среди пациентов с тринегативным статусом были выявлены патогенные мутации у 8 (80%) из 10 пациентов в 7 различных генах. При этом у 4 из них была обнаружена лишь одна мутация, у 2 пациентов две мутации, у 2 пациентов три патогенных мутации одновременно. В двух генах сочетанно *SRSF2* и *ASXL1* мутации были выявлены у 4 пациентов с тринегативным статусом, у 2 пациентов детектировали мутацию в гене *IDH1*, у 1 больного — в генах *RUNX1*, *TET2*, *NF1* и *HRAS*.

Таблица 2. Функции генов, выявленных в ходе NGS исследования

Функции генов	Названия генов
Модификация хроматина (гистонов)	<i>ASXL1</i> , <i>ATRX</i> , <i>EZH2</i> , <i>EP300</i>
Сплайсинг РНК	<i>SRSF2</i> , <i>U2AF1</i> , <i>SF3B1</i> , <i>PHF6</i> , <i>DDX3X</i> , <i>ZRSR2</i>
Метилирование ДНК	<i>DNMT3A</i> , <i>IDH1</i> , <i>IDH2</i> , <i>TET2</i> , <i>SUZ12</i>
Транскрипционные факторы	<i>RUNX1</i> , <i>TP53</i> , <i>GATA2</i>
Репликация ДНК	<i>SETBP1</i> , <i>APC</i>
Передача сигнала	<i>KRAS</i> , <i>CBL</i>

Таблица составлена авторами, аннотация функции генов проведена с помощью базы данных KEGG

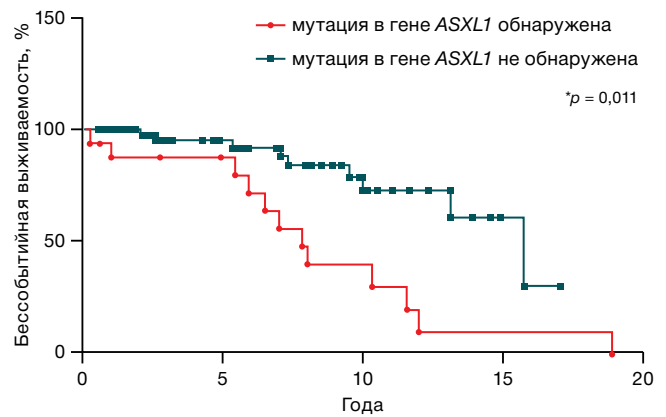


Рисунок подготовлен авторами

Рис. 2. Влияние мутаций в гене *ASXL1* на бессобытийную выживаемость пациентов с Rh-негативными миело-пролиферативными новообразованиями (за событие принимали фазовый переход, лейкоэмическую трансформацию или смерть)

В ходе исследования были обнаружены патогенные мутации в 23 генах, которые дополнительно анализировали с помощью базы данных KEGG, позволяющей предсказать функции данных генов. Большинство генов (*SRSF2*, *U2AF1*, *SF3B1*, *PHF6*, *DDX3X*, *ZRSR2*) участвуют в сплайсинге РНК и метилировании ДНК (*DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *TET2*, *SUZ12*). Меньшее количество генов отвечают за модификацию хроматина (гистонов), репликацию ДНК и передачу сигналов внутри клетки; три гена выполняют роль транскрипционных факторов (табл. 2). Малый размер выборки пациентов, включенных в наше исследование, не позволил оценить влияние каждой функциональной группы на прогноз течения заболевания или эффективность терапии лечения. Тем не менее анализ с помощью базы данных KEGG способствовал пониманию молекулярных механизмов, лежащих в основе Rh-негативных миело-пролиферативных новообразований.

Генетические маркеры лейкоэмической трансформации

В ходе исследования у 14 пациентов с фазовым переходом во вторичный миелофиброз или с лейкоэмической трансформацией обнаруживали в среднем 2 патогенные мутации. При этом мутации в гене *ASXL1* были выявлены у 9 (64%) больных, у 3 (22%) пациентов обнаруживались мутации в генах *IDH1/2*, *DNMT3A*, *TET2*, у 2 (14%) — мутации детектировались в генах *SRSF2*, *SFR3B1*, *TP53*, у 1 (7%) пациента выявлена мутация в генах *KRAS*, *SUZ12*, *PHF6*.

Влияние выявленных мутаций на бессобытийную выживаемость пациентов

В исследовании было показано значимое влияние мутационного профиля генов на показатели бессобытийной выживаемости пациентов. Так, мутации в гене *ASXL1* статистически значимо ассоциировались ($p = 0,0011$) со снижением бессобытийной выживаемости (медиана — 11,8 и 15,75 года) (рис. 2) в исследуемой когорте пациентов.

При анализе данных, представленных на рисунке 3, установлено, что сочетание драйверной и любой из патогенных мутаций (группа драйверная+, патогенная+) статистически значимо связано со снижением бессобытийной

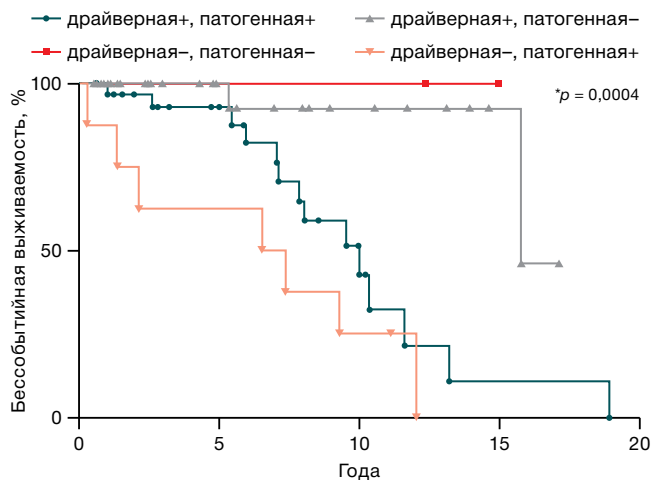


Рисунок подготовлен авторами

Рис. 3. Влияние патогенных мутаций на бессобытийную выживаемость пациентов с Rh-негативными миелопролиферативными новообразованиями

выживаемости по сравнению с группой пациентов, у которых выявлены исключительно драйверные мутации (группа драйверная+, патогенная–), (медиана выживаемости — 10,0 и 15,8 года). Наихудший прогноз был показан для пациентов с тринегативным статусом и наличием хотя бы одной патогенной мутации (группа драйверная–, патогенная+), (медиана выживаемости — 6,9 года). Для группы пациентов, у которых не выявляли ни патогенные, ни драйверные мутации (драйверная–, патогенная–), медиана достигнута не была.

На рисунке 4 показано, что наличие двух и более мутаций также ассоциировалось с достоверным снижением бессобытийной выживаемости ($p < 0,0001$) (медиана выживаемости — 7 и 13,17 года) по сравнению с пациентами с меньшим количеством патогенных мутаций. Анализ данных NGS показал, что большее количество патогенных мутаций связано с ухудшением прогноза выживаемости.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В основе патогенеза Rh-негативных миелопролиферативных новообразований лежат мутации в драйверных генах — *JAK2*, *CALR* и *MPL*. Выявление мутаций в данных генах на сегодняшний момент — основа молекулярной диагностики пациентов с подозрением на Rh-негативное МПН. Между тем исследования последних лет показывают, что генетический ландшафт классических Rh-негативных МПН не ограничивается только мутациями в драйверных генах. Значительное число мутаций в различных генах было описано как патогенные для Rh-негативных МПН, оказывающие влияние на фенотип, течение и прогноз заболевания. Быстрое и достоверное выявление таких мутаций в широком спектре генов невозможно рутинными лабораторными методами. В этой связи все большее применение находит метод NGS, который позволяет с высокой точностью и чувствительностью одновременно определить мутации в большом количестве генов.

В настоящий момент как в научной, так и клинической практике диагностику пациентов с Rh-негативными МПН методом NGS проводят с использованием различных

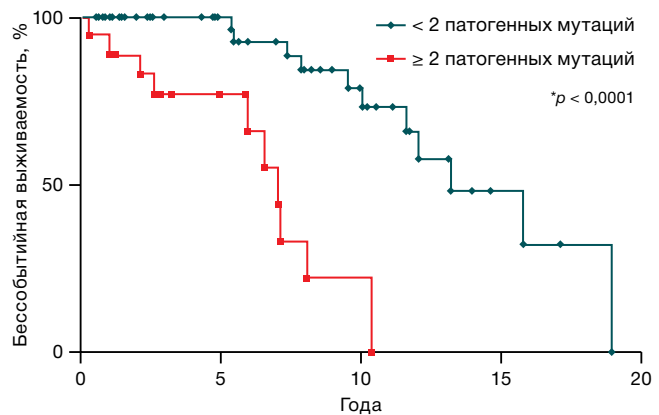


Рисунок подготовлен авторами

Рис. 4. Влияние количества патогенных мутаций на бессобытийную выживаемость пациентов с Rh-негативными миелопролиферативными новообразованиями

индивидуальных и коммерческих панелей генов [9–12]. В нашем исследовании впервые мутационный статус пациентов с Rh-негативными МПН изучен с помощью персонализированной панели из 118 генов. Данная панель включает в себя не только гены, ассоциированные с Rh-негативными МПН, но и гены, мутации в которых выявляются при других типах миелоидных новообразований. Секвенирование было проведено у 83 Rh-негативных пациентов с МПН. Анализ данных показал, что мутации в генах *JAK2*, *MPL* и *CALR*, выявленные у пациентов стандартными лабораторными методами, успешно обнаруживаются в наших условиях методом NGS. Этот факт свидетельствует о надежности полученных данных секвенирования.

В нашем исследовании в дополнение к драйверным генам мутации, определяемые как патогенные, были выявлены у 39 пациентов в 23 (20%) генах из 118 исследуемых. По сравнению с результатами, полученными в исследовании авторов [13], при анализе группы из 197 пациентов методом NGS с использованием таргетной панели патогенные мутации были найдены у 35% больных. При этом мутации были выявлены в 27% генов из 104 анализируемых. Различия в количестве мутировавших генов (20% и 27%) от общего их числа можно объяснить разным набором генов, используемых в таргетных панелях в нашей работе и исследованиях Lundberg et al. [13].

Наиболее часто дополнительные патогенные мутации у пациентов с различными МПН встречаются в гене *ASXL1* [8]. Мы обнаружили, что 25% пациентов имели мутацию именно в данном гене. Частота выявления мутаций в гене *ASXL1* варьирует при различных Rh-негативных МПН. Так, по данным исследователей [14–19], при первичном миелофиброзе мутации были обнаружены в 23–25% случаев, при эссенциальной тромбоцитемии — в 5–20%, при истинной полицитемии частота мутаций в гене *ASXL1* составила 3,5–11,8%. В нашем исследовании данные мутации были обнаружены у 26,6% пациентов с ПМФ, у 14,2% больных с ЭТ и 16% пациентов с ИП.

При клональной эволюции МПН предполагаются два пути мутагенеза с участием гена *ASXL1*:

- патогенные мутации могут возникать вслед за драйверными мутациями в генах *JAK2* и *CALR* при ПМФ;
- могут быть первичным пусковым событием, предшествующим драйверным мутациям [20–22].

Многие исследования показывают влияние мутаций в гене *ASXL1* на общую и бессобытийную выживаемости и тромботические события у пациентов с Ph-негативными МПН [23, 24]. Однако Guglielmelli et al. установили, что мутации в гене *ASXL1* снижают общую выживаемость у пациентов с ПМФ, но не с вторичным МФ [25]. Кроме того, мутации в *ASXL1* оказывают влияние на результаты терапии таргетными препаратами и алло-ТГСК [26]. В нашем исследовании мы показали ассоциацию драматического снижения бессобытийной выживаемости (медиана выживаемости 7,83 против 15,75 года, $p = 0,0011$) для всех пациентов с мутациями и без в данном гене.

Достижения генетики и молекулярной биологии последних лет позволили более полно описать генетический ландшафт Ph-негативных МПН и выявить гены, мутации в которых оказывают негативное влияние на прогноз: *ASXL1*, *EZH2*, *IDH1*, *IDH2*, *SRSF2* и *U2AF1Q157*. Такие мутации получили название «мутации высокого риска» и были включены в различные прогностические шкалы. Количество мутаций в данных генах также влияет на прогноз, а именно: 1 патогенная мутация сокращала медиану общей выживаемости больных в 1,7 раза, 2 мутации — в 4,7 раза по сравнению с пациентами без мутаций в этих генах ($Me = 12,2$, $Me = 7,0$, $Me = 2,6$ года соответственно, $p < 0,0001$) для пациентов с миелофиброзом [27].

В нашем исследовании с использованием панели из 118 генов мы показали, что не только мутации высокого риска оказывали влияние на выживаемость пациентов с МПН, но и любые патогенные варианты мутаций в сочетании с драйверными генами ($p = 0,0004$) существенно снижали ее; при этом важным является не только сам факт наличия данного варианта сочетания, но и количество таких вариантов. У пациентов с двумя и более мутациями значительно снижалась бессобытийная выживаемость по сравнению с пациентами с одной мутацией ($p < 0,0001$). Таким образом, при диагностике Ph-негативного МПН важно не ограничиваться определением мутационного статуса только 6 генов высокого молекулярного риска, но анализировать как можно более широкие панели.

Недавние исследования продемонстрировали важность NGS метода для описания мутационного профиля пациентов с тройным негативным статусом [28, 29]. Действительно, у 8 из 10 таких пациентов из изучаемой нами когорты были выявлены патогенные мутации в различных генах. Обнаружение мутаций у данной группы пациентов позволило подтвердить клональность и оценить риски течения заболевания. Важно отметить, что отсутствие драйверных и патогенных мутаций у пациентов с подтвержденным диагнозом Ph-негативного МПН позволяет выделить их в отдельную когорту с наиболее благоприятным прогнозом течения заболевания без лейкоэмической трансформации [12]. Не во всех исследованиях, однако, удается выделить такую группу. Так, Huang et al. выявили патогенные мутации у всех 12 пациентов с тринегативным статусом [12].

Метод NGS является удобным инструментом как для оценки прогноза заболевания, так и для выбора генов-мишеней таргетной терапии, направленной не только на драйверные, но и на гены с различным функционалом (например, *IDH1,2* и *EZH2*). Мутации в данных генах были выявлены и у пациентов из нашей когорты.

При этом гены *IDH1,2* были мутированы у 8% пациентов, а *EZH2* — у 3% пациентов, что соответствует данным, полученным другими исследователями с помощью стандартных молекулярных методов [8, 30].

Соматические мутации в широком спектре генов выявляются у 80% пациентов с ПМФ и у 50% пациентов с ЭТ/ИП и оказывают влияние на течение и прогноз заболевания [29]. В нашей группе пациентов мы обнаружили патогенные мутации, влияющие на прогноз течения заболеваний, у 46% больных с ПМФ, в том числе и у пациентов с лейкоэмической трансформацией. К факторам риска, повышающим вероятность лейкоэмической трансформации, среди прочего, относят мутации в различных генах: *IDH1*, *IDH2*, *SRSF2*, *ASXL1* при первичном миелофиброзе, в генах *SRSF2*, *IDH2* или *RUNX1* при истинной полицитемии, в генах *TP53*, *SRSF2*, *EZH2*, *U2AF1* или *RUNX1* при эссенциальной тромбоцитемии. При этом было показано, что время до лейкоэмической трансформации сокращается с увеличением количества патогенных мутаций у пациентов с Ph-негативными МПН ($p < 0,0001$), что коррелирует с полученными нами данными о большем количестве мутаций у пациентов с трансформацией заболеваний [12].

Обнаружение драйверных мутаций стало прорывным открытием в диагностике миелопролиферативных новообразований, что помогло в определении патогенеза этих заболеваний. Сейчас внедрение метода NGS значительно изменяет восприятие и подход к диагностике, оценке риска и лечению пациентов с Ph-негативными МПН. Благодаря возможности одновременного поиска мутаций во многих генах NGS позволяет не только устанавливать диагноз и подтверждать клональность заболевания, но и выявлять группы пациентов с неблагоприятным прогнозом и повышенным риском прогрессирования и трансформации заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, применение метода NGS с использованием панели из 118 генов при диагностике больных Ph-негативными миелопролиферативными новообразованиями позволило изучить мутационный профиль заболевания, подтвердить клональность заболевания у пациентов с тринегативным статусом, выявить патогенные мутации, значимо влияющие на результаты терапии пациентов.

В нашем исследовании патогенные мутации выявлялись практически у половины пациентов с Ph-негативными МПН в 23 генах. Снижение бессобытийной выживаемости было показано для больных с сочетанием драйверной и патогенной мутаций. Две и более патогенные мутации у одного пациента сокращали бессобытийную выживаемость по сравнению с пациентами с одной мутацией. Наиболее частым молекулярным событием при Ph-негативных МПН являлись мутации в гене *ASXL1*, ассоциирующиеся со снижением бессобытийной выживаемости больных. Комплексный подход к диагностике Ph-МПН с применением современных молекулярно-генетических технологий позволит устанавливать диагноз, оценивать прогностические особенности течения заболевания и подбирать наиболее эффективную персонализированную терапию.

Литература / References

1. Шуваев ВА, Мартынкевич ИС, Сидоркевич СВ. Миело-пролиферативные новообразования. М.: Буки Веди; 2023. Shuvaev VA, Martynkevich IS, Sidorkevich SV. Myeloproliferative neoplasms. Moscow: Buki Vedi; 2023 (In Russ.).
2. Меликян АЛ, Ковригина АМ, Суборцева ИН. Шуваев ВА, Морозова ЕВ, Ломаиа ЕГ и др. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению Ph-негативных миелолиферативных заболеваний (истинной полицитемии, эссенциальной тромбоцитемии, первичного миелофиброза) (редакция 2020 г.). *Клиническая онкогематология*. 2021;14(2):262–98. Melikjan AL, Kovrigina AM, Suborceva IN, Shuvaev VA, Morozova EV, Lomaia EG. et al. National clinical guidelines for the diagnosis and treatment of Ph-negative myeloproliferative diseases (polycythemia vera, essential thrombocythemia, primary myelofibrosis) (revision 2020). *Clinical oncogematology*. 2021;14(2):262–98 (In Russ.). <https://doi.org/10.21320/2500-2139-2021-14-2-262-298>
3. Spivak JL. Myeloproliferative Neoplasms. *N. Engl. J. Med*. 2017;376:2168–81. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1406186>
4. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF. et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022;36:1703–19. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01613-1>
5. Hu X, Li J, Fu M, Zhao X, Wang W. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):402. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00791-1>
6. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Elala Y, Hanson CA, Ketterling RP et al. Targeted deep sequencing in primary myelofibrosis. *Blood Adv*. 2016;30:105–11. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2016000208>
7. Tefferi A, Lasho TL, Guglielmelli P, Finke CM, Rotunno G, Elala Y. et al. Targeted deep sequencing in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood Adv*. 2016;22:21–30. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2016000216>
8. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017;129(6):667–79. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-695940>
9. Zuo Z, Li S, Xu J, You MJ, Khoury JD, Yin CC. Philadelphia-Negative Myeloproliferative Neoplasms: Laboratory Workup in the Era of Next-Generation Sequencing. *Curr Hematol Malig Rep*. 2019;14(5):376–85. <https://doi.org/10.1007/s11899-019-00534-8>
10. Alduaij W, McNamara CJ, Schuh A, Arruda A, Sukhai M, Kanwar N. et al. Clinical Utility of Next-generation Sequencing in the Management of Myeloproliferative Neoplasms: A Single-Center Experience. *Hemasphere*. 2018;2(3):e44. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000044>
11. Visani G, Etebari M, Fuligni F, Di Guardo A, Isidori A, Loscocco F. et al. Use of Next Generation Sequencing to Define the Origin of Primary Myelofibrosis. *Cancers (Basel)*. 2023;15(6):1785. <https://doi.org/10.3390/cancers15061785>
12. Huang X, Wu J, Deng X, Xu X, Zhang X, Ma W. et al. Mutation profiles of classic myeloproliferative neoplasms detected by a customized next-generation sequencing-based 50-gene panel. *Journal of Bio-X Research*. 2020;3(1):13–20. <https://doi.org/10.1097/JBR.0000000000000061>
13. Lundberg P, Karow A, Nienhold R, Looser R, Hao-Shen H, Nissen I. et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014;123(14):2220–8. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-11-537167>
14. Shih AH, Abdel-Wahab O, Patel JP, Levine RL. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:599–612. <https://doi.org/10.1038/nrc3343>
15. Viny AD, Levine RL. Genetics of myeloproliferative neoplasms. *Cancer J*. 2014;20:61–5. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2020.12.002>
16. Milosevic JD, Kralovics R. Genetic and epigenetic alterations of myeloproliferative disorders. *Int J Hematol*. 2013;97:183–97. <https://doi.org/10.1007/s12185-012-1235-2>
17. Guglielmelli P, Gangat N, Coltro G, Lasho TL, Loscocco GG, Finke CM. et al. Mutations and thrombosis in essential thrombocythemia. *Blood Cancer J*. 2021;11(4):77. <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00470-y>
18. Segura-Diaz A, Stuckey R, Florido Y, Sobas M, Álvarez-Larrán A, Ferrer-Marín F. et al. DNMT3A/TET2/ASXL1 mutations are an age-independent thrombotic risk factor in polycythemia vera patients: an observational study. *Thromb Haemost*. 2024;124(7):669–75. <https://doi.org/10.1055/a-2239-9265>
19. Fujino T, Kitamura T. ASXL1 mutation in clonal hematopoiesis. *Exp Hematol*. 2020;83:74–84. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2020.01.002>
20. Gelsi-Boyer V, Brecqueville M, Devillier R, Murati A, Mozziconacci MJ, Birnbaum D. Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *J Hematol Oncol*. 2012;5:12. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-5-12>
21. Trivail I, Zeschke S, Rentel J, Spanakis M, Scherer T, Gabdoulline R. et al. ASXL1/EZH2 mutations promote clonal expansion of neoplastic HSC and impair erythropoiesis in PMF. *Leukemia*. 2019;33(1):99–109. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0159-0>
22. Svidnicki C, M., De Melo Campos P., Filho A.F., Fujiura L.C., Yoshizato T., Makishima H., et al. Mutations in triple-negative patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2019;134(1):5395. <https://doi.org/10.1182/blood-2019-128764>
23. Regimbeau M, Mary R, Hermetet F, Girodon F. Genetic Background of Polycythemia Vera. *Genes*. 2022;13(4):637. <https://doi.org/10.3390/genes13040637>
24. Nie YB, Sun M, He CK, Ju MK, Zhou FL, Wu SY. et al. ASXL1 mutations in Chinese patients with essential thrombocythemia. *Exp Ther Med*. 2015;15(5):4149–56. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.5939>
25. Guglielmelli P, Coltro G, Mannelli F, Rotunno G, Loscocco GG, Mannarelli C. et al. ASXL1 mutations are prognostically significant in PMF, but not MF following essential thrombocythemia or polycythemia vera. *Blood Adv*. 2022;6(9):2927–31. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021006350>
26. Spiegel J, McNamara C, Kennedy J, et al. Impact of genomic alterations on outcomes in myelofibrosis patients undergoing JAK1/2 inhibitor therapy. *Blood Adv*. 2017;1(20):1729–38. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017009530>
27. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Score J, Mannarelli C, Pancrazzi A. et al. The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: an international study of 797 patients. *Leukemia*. 2014;28(9):1804–10. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.76>
28. Wu S, Luo P, Yu Y, Xiong B, Wang Y, Zuo X. Next-generation sequencing redefines the diagnosis of triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Ann Hematol*. 2022;101(3):705–8. <https://doi.org/10.1007/s00277-021-04561-5>
29. Mroczkowska-Bękarciak A, Wróbel T. BCR::ABL1-negative myeloproliferative neoplasms in the era of next-generation sequencing. *Front Genet*. 2023;14:1241912. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1241912>
30. Shih A, Abdel-Wahab O, Patel J, Levine R. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(9):599–612. <https://doi.org/10.1038/nrc3343>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: А.Н. Кириенко — сбор материала, анализ полученных данных, написание и редактирование текста; Е.В. Мотыко — сбор материала, анализ полученных данных, редактирование текста; Е.В. Ефремова — редактирование, утверждение окончательного варианта текста; Д.В. Кустова — сбор материала, анализ полученных данных; Т.Н. Герт — сбор материала; И.В. Леппянен — сбор материала; В.А. Шуваев — редактирование, утверждение окончательного варианта текста; И.С. Мартынкевич — дизайн исследования, редактирование статьи, утверждение окончательного варианта текста.

ОБ АВТОРАХ

Кириенко Анна Николаевна, канд. биол. наук.
<https://orcid.org/0000-0002-2519-306X>
kirienkoann@yandex.ru

Мотыко Екатерина Вадимовна, канд. биол. наук
<https://orcid.org/0000-0002-6052-6472>
katteerina@mail.ru

Ефремова Елизавета Викторовна
<https://orcid.org/0000-0002-2183-5299>
liza.goncharova@mail.ru

Кустова Дарья Владимировна
<https://orcid.org/0000-0003-4546-5808>
dasha_94-07@mail.ru

Герт Татьяна Николаевна
<https://orcid.org/0000-0002-2793-452X>
tynisa@mail.ru

Леппянен Ирина Викторовна, канд. биол. наук
<https://orcid.org/0000-0002-2158-0855>
leppyanen_irina@rambler.ru

Шуваев Василий Анатольевич, д-р мед. наук
<https://orcid.org/00000000335360770>
shuvaev77@mail.ru

Мартынкевич Ирина Степановна, д-р мед. наук
<https://orcid.org/0000-0001-5958-0490>
martynkevich@niigt.ru

<https://doi.org/10.47183/mes.2025-272>

УДК 57.085.2:547.917



БИОСОВМЕСТИМЫЕ ГЕЛИ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И КРАХМАЛА В КАЧЕСТВЕ ЧЕРНИЛ ДЛЯ 3D-ПЕЧАТИ

Е.А. Малик¹, Ю.А. Нащекина², И.А. Барсук^{3,4,5}, К.П. Головкин^{4,5}, В.Е. Александров^{4,6}, В.Ю. Елоховский⁷, В.Е. Юдин⁷¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия³Главное военно-медицинское управление Министерства обороны Российской Федерации, Москва, Россия⁴Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия⁵Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия⁶Санкт-Петербургский государственный педиатрический университет, Санкт-Петербург, Россия⁷Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Носители, предназначенные для культивирования и трансплантации клеток, находят широкое применение в современной тканевой инженерии. Создание чернил для печати таких носителей позволяет в широких пределах варьировать их форму и архитектуру. Хитозан — природный полимер, который уже находит применение в различных областях регенеративной медицины. Скаффолды на его основе являются искусственным прототипом внеклеточного матрикса *in vitro*. Метод трехмерной печати позволит максимально приблизить структуру такого матрикса к свойствам нативной ткани. Однако для улучшения качества печати необходимо как разработать состав чернил на основе хитозана, так и подобрать оптимальные параметры печати.

Цель. Разработка биосовместимых чернил на основе хитозана с оптимальными реологическими свойствами, пригодными для 3D-печати.

Материалы и методы. В исследовании для создания биочернил применялся хитозан фирмы BiologHerpe (Германия) с молекулярной массой 164 кДа и степенью деацетилования 92,5%. Для модификации биочернил использовали крахмал фирмы Merck (Германия). Для получения трехмерных матриц применяли метод экструзионной 3D-биопечати. В работе использовали 3D-биопринтер фирмы Rokit Invivo (Республика Корея), в котором установлено программное обеспечение Android OS. 3D-печатные матрицы изготавливали из биочернил с различным содержанием хитозана: 4 и 6%. Для исследования биосовместимости печатных конструкций проводили посев культуры мезенхимальных стволовых клеток кролика.

Результаты. Чернила на основе хитозана и крахмала продемонстрировали увеличение вязкости раствора и наилучшие характеристики напечатанных конструкций. Улучшение реологических параметров, оптимальных для печати, происходит при увеличении концентрации хитозана в растворе до 6%, а также при добавлении в раствор крахмала с аналогичной концентрацией. Исследование *in vitro* также показало биосовместимость напечатанных конструкций по отношению к мезенхимным стромальным клеткам.

Выводы. Разработанные чернила могут быть использованы для формирования скаффолдов методом трехмерной печати.

Ключевые слова: биочернила; гидрогель; хитозан; крахмал; биосовместимость; 3D-печать

Для цитирования: Малик Е.А., Нащекина Ю.А., Барсук И.А., Головкин К.П., Александров В.Е., Елоховский В.Ю., Юдин В.Е. Биосовместимые гели на основе хитозана и крахмала в качестве чернил для 3D-печати. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2025;27(1):88–96. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-272>

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-20120).

Соответствие принципам этики: исследование выполнено с соблюдением правил биоэтики, утвержденных Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей. Исследование одобрено на заседании локального Биоэтического комитета Института цитологии РАН (протокол № Ф18-00380, от 09.07.2018).

Потенциальный конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

✉ Барсук Илья Александрович barsuk20220@gmail.com

Статья поступила: 27.09.2024 После доработки: 10.02.2025 Принята к публикации: 14.02.2025 Online first: 06.03.2025

BIOCOMPATIBLE CHITOSAN- AND STARCH-BASED GELS FOR 3D PRINTABLE INKS

Elena A. Malik¹, Yuliya A. Nashchekina², Ilya A. Barsuk^{3,4,5}, Konstantin P. Golovko^{4,5}, Viktor N. Alexandrov^{4,6}, Vladimir Y. Elokhovskiy⁷, Vladimir E. Yudin⁷¹Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia²Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia³Main Military Medical Department of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Moscow, Russia⁴Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia⁵St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia⁶St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russia⁷Institute of Macromolecular Compounds of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

Introduction. Carriers intended for cell culture and transplantation are widely used in modern tissue engineering. The creation of inks for printing such media assumes a wide range of variations in their shape and architecture. Chitosan as a natural polymer is increasingly finding application in various fields of regenerative medicine. Chitosan-based scaffolds are an artificial prototype of the extracellular matrix *in vitro*. The method of 3D printing can be used to bring the structure of such a matrix as close as possible to the properties of native tissues. However, in order to achieve the desired printing quality, the task of developing a chitosan-based ink composition and selecting optimal printing parameters should be solved.

Objective. Development of a biocompatible chitosan-based ink with optimal rheological properties suitable for 3D printing.

Materials and methods. A bioink was manufactured using the chitosan produced by BiologHerpe (Germany) with a molecular weight of 164 kDa and a deacetylation degree of 92.5%. Starch produced by Merck (Germany) was used to modify the bioink. The method of 3D extrusion bioprinting was used to

© Е.А. Малик, Ю.А. Нащекина, И.А. Барсук, К.П. Головкин, В.Е. Александров, В.Ю. Елоховский, В.Е. Юдин, 2025

obtain 3D matrices by a 3D bioprinter by Rockit Invivo (Republic of Korea) equipped with the Android OS software. 3D-printed matrices were obtained from a bioink with different chitosan concentrations: 4% and 6%. Cultures of rabbit mesenchymal stem cells were seeded to study the biocompatibility of the printed structures.

Results. The developed chitosan- and starch-based inks demonstrated an increased viscosity of the solution and improved characteristics of the printed designs. The rheological parameters were optimized for printing by increasing the chitosan concentration in the solution up to 6%, as well as by introducing starch at a similar concentration into the solution. An *in vitro* study also showed the biocompatibility of the printed structures with respect to mesenchymal stromal cells.

Conclusions. The developed inks can be used to form scaffolds by 3D printing.

Keywords: bioink; hydrogel; chitosan; starch; biocompatibility; 3D printing

For citation: Malik E.A., Nashchekina Y.A., Barsuk I.A., Golovko K.P., Alexandrov V.N., Elokhovskiy V.Y., Yudin V.E. Biocompatible chitosan- and starch-based gels for 3D printable inks. *Extreme Medicine*. 2025;27(1):88–96. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-272>

Funding: the research was supported by the Russian Science Foundation (Project No. 21-74-20120).

Compliance with ethical standards: the study was carried out in compliance with the rules of bioethics approved by the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Purposes. The study was approved by the Local Bioethical Committee of the Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences (Protocol No. Ф18-00380 of 9 July 2018).

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

✉ Ilya A. Barsuk barsuk20220@gmail.com

Received: 27 Sep. 2024 **Revised:** 10 Feb. 2025 **Accepted:** 14 Feb. 2025 **Online first:** 6 Mar. 2025

ВВЕДЕНИЕ

Аддитивные технологии, в число которых входит 3D-печать, являются движущей силой крупных инноваций во многих областях науки, в том числе в медицине и биологии.

В качестве материала для печати используются различные полимеры природного и синтетического происхождения, а созданные на их основе конструкции могут стать базой для изготовления функциональных трехмерных тканей [1]. Эти биоматериалы называются чернилами, они имитируют состав тканей человеческого или животного организма. Преимуществом 3D-печати является возможность воспроизведения геометрии трехмерной структуры, которая более похожа на естественную биологическую систему, чем двухмерная *in vitro* модель. Структурное сходство напечатанной конструкции может привести к более физиологически релевантным функциональным результатам. Ни одна другая технология не может обеспечить такого уровня геометрической сложности и подобию живым тканям [2].

3D-печать может применяться для создания объемных трехмерных носителей, обеспечивающих трехмерное культивирование клеток с целью их дальнейшей трансплантации в поврежденные органы и ткани [2]. Напечатанные конструкции вместе с культивируемыми на них клетками могут быть использованы в качестве моделей тканей для тестирования новых лекарственных препаратов [3].

Параметры биопечати можно определить как настройки биопринтера (входные данные встроенного программного обеспечения — ПО), которые необходимы для правильного создания 3D-печатных структур. В этом смысле для 3D-печати подходит только определенный диапазон значений, а их выбор является ключевым фактором для получения жизнеспособных структур. Эти значения зависят от состава чернил, который следует тщательно подбирать в каждом конкретном случае [4].

К основным параметрам печати относят температуру диспенсера, температуру подложки, скорость печати и параметры входящего потока (скорость и давление).

Скорость печати (движение в плоскости XY) важна, поскольку она напрямую связана с общим временем 3D-печати. Кроме того, при методе экструзионной печати поток гидрогеля (ширина нити) контролируется преимущественно за счет скорости печати и скорости ретракции. Используемые значения скорости печати варьируют от 0,2 до 150 мм/с, но наиболее часто находятся в диапазоне 1–30 мм/с [4].

Точные размеры напечатанной 3D-структуры сохраняются при правильном выборе входящего потока, который указывается в процентах. Этот параметр отвечает за количество чернил, экструдированных принтером. Калибровка входящего потока также улучшает настройки ретракции [4].

К основным свойствам чернил для 3D-печати относятся пригодность для печати, вязкоупругие свойства, биodeградируемость, цитосовместимость [5]. 3D-матрица должна имитировать биологическую среду и облегчать клеточное прикрепление, пролиферацию и рост клеток, способствовать диспергированию биоактивных молекул и факторов роста, а также содержать пространство для размещения внеклеточного матрикса [6].

В качестве чернил могут использоваться как природные, так и синтетические полимеры, однако предпочтение отдается природным материалам из-за их высокой биосовместимости, хотя они часто обладают недостаточными механическими свойствами [7]. Наиболее часто применяемыми компонентами в чернилах являются хитозан и альгинат, далее — желатин, гиалуроновая кислота, фиброин шелка и полиэтиленгликоль [8]. Гидрогели могут имитировать, например, модуль упругости мягких тканей человеческого тела. Для самых прочных тканей, таких как кости или зубы, требуются другие материалы — термopластичные полимеры с добавлением гидрогелей [8].

Хитозан является одним из перспективных материалов для 3D-печати. Хитозан имеет три типа реакционно-способных функциональных групп: аминogруппы, а также первичные и вторичные гидроксильные группы в положениях C-2, C-3 и C-6 соответственно. Положительный заряд его функциональных групп делает хитозан единственным положительно заряженным природным полисахаридом.

Следовательно, хитозан может взаимодействовать с отрицательно заряженными биомолекулами, липидами, белками, дезоксирибонуклеиновой кислотой (ДНК) и различными клеточными рецепторами, которые запускают каскад взаимосвязанных реакций в живых организмах, что обуславливает его уникальные характеристики [9]. Примером таких характеристик биочернил на основе хитозана являются хорошее взаимодействие клеток и матрицы, имитация структуры нативной ткани, создание микросреды для обмена кислородом и питательными веществами, а также благоприятный иммунный ответ после имплантации.

По данным авторов J. Huang, H. Fu et al., 3D-печатные структуры проявляли биомолекулярную адаптацию, стабильную биосовместимость и биологическую активность даже после различных постпечатных модификаций [10]. Однако хитозан обладает и некоторыми недостатками, такими как медленная скорость гелеобразования, термолабильность и низкая механическая прочность материалов на его основе.

Важно отметить, что физическая стабильность и механическая прочность чернил для 3D-печати зависят от их вязкоупругих свойств. Обеспечить вязкоупругие свойства хитозана можно за счет физических или химических методов сшивания, а также путем добавления дополнительных компонентов. Поэтому хитозан часто структурно армируется другим биополимером, в том числе полисахаридами. В качестве такого армирующего биополимера может быть использован крахмал [11]. Крахмал состоит из углеводов и обладает такими свойствами, как гидрофильность, биосовместимость, низкая стоимость, хорошая биоразлагаемость и нетоксичность [12]. Крахмал состоит из зернистой формы с линейной амилозой и большим количеством разветвленного амилопектина. Структура крахмала является полукристаллической, в которой добавление ограниченного количества воды и обработка теплом и сдвигом приведут к разрушению водородной связи. На этой стадии крахмал расплавится, и это приведет к образованию термопластичного крахмала. Таким образом, мы предположили, что сочетание таких биосовместимых и биodeградируемых биополимеров, как хитозан и крахмал, компенсирует недостатки каждого биополимера в отдельности, а их совместное использование позволит получить чернила с оптимальными характеристиками для формирования носителей с заданными структурными характеристиками методом 3D-печати. Для получения прогнозируемого результата, а именно матриц с заданными структурными характеристиками, такими как размер и высота ячеек, необходимо определить оптимальное соотношение хитозана и крахмала, а также точные параметры печати.

Цель исследования — разработка биосовместимых чернил с оптимальным соотношением хитозана и крахмала, пригодных для 3D-печати.

Таблица 1. Расчетные концентрации хитозана и крахмала в растворах

Растворы	Концентрация хитозана, %	Концентрация крахмала, %
X/K (4/0)	4	0
X/K (6/0)	6	0
X/K (4/4)	4	4
X/K (6/6)	6	6

Таблица составлена авторами по собственным данным

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения чернил использовали хитозан (BiologHerpe, Германия) с молекулярной массой 164 кДа и степенью деацетилирования 92,5% и крахмал (9005-25-8, ХЧ, Merck, Германия).

В работе использовали мезенхимальные стволовые клетки (МСК), полученные из жировой ткани кролика по методике [13, 14] и предоставленные Центром клеточных технологий Института цитологии РАН. Жировую ткань промывали в фосфатно-солевом буфере, затем обрабатывали коллагеназой и после инактивации коллагеназы клетки центрифугировали. Культивирование клеток проводили в питательной среде α -MEM (модифицированная среда «Игла») с добавлением L-глутамина, 10% бычьей эмбриональной сыворотки и антибиотиков 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (все реактивы Gibco, США). В работе использовали клетки 4–9 пассажей.

Методика приготовления раствора

Для получения матрицы на основе чистого хитозана и хитозана с добавлением крахмала применяли следующую методику. Хитозан перемешивали с водой при комнатной температуре в течение 15 мин на лабораторной мешалке (OSC-10L, Россия) при скорости перемешивания 1000 об/мин для получения суспензии, в которую затем добавили уксусную кислоту (в концентрации 97%, 2% от объема раствора), а также крахмал в концентрации от 0 до 6%.

Состав перемешивали в течение 1,5 ч на лабораторной мешалке (OSC-10L, Россия) со скоростью 1000 об/мин до полного растворения хитозана. Растворы с добавлением крахмала в течение 15 минут дополнительно перемешивали при температуре 100 °С на водяной бане для набухания крахмала. Объем хитозана, крахмала и уксусной кислоты рассчитывали в массовых процентах. Содержание хитозана и крахмала в растворе варьировали. Составы растворов представлены в таблице 1. Названия растворов представлены в формате X/K (4/0), где X — хитозан, K — крахмал, а в скобках — концентрация хитозана/концентрация крахмала.

Реология растворов

Зависимость сдвиговой вязкости гидрогелей от скорости деформации измеряли на реометре AntonPaar (модель Physica MCR-301, Австрия) в измерительном узле конус/плоскость CP25 [$d = 1$ mm] в сдвиговом и динамическом режимах в режимах падения и роста скорости деформации (круговой частоты). Проведен тест на релаксацию вязкости при двух скоростях сдвига: 100 и 0,01 s^{-1} .

3D-биопечать

Для получения трехмерных матриц применяли метод экструзионной 3D-биопечати. В работе использовали 3D-биопринтер фирмы RokIt Invivo (Республика Корея), в котором установлено программное обеспечение Android OS.

Для создания дизайна объемной матрицы использовали компьютерную программу для проектирования Autodesk Fusion 360, в которой создали параллелепипед со сторонами 16, 10 и 0,2 мм.

Для задания настроек 3D-принтера и преобразования созданной модели в G-код использовали программу для слайсинга NewCreator K.

Скорость печати (мм/с) — это линейная скорость движения печатного столика. Входящий поток (%) — это давление, оказываемое на гель в шприце. Выбранные параметры печати представлены в таблице 2.

В результате 3D-биопечати получали объемные матрицы. Далее их осаждали в 10% растворе гидроксида натрия в течение 5 мин, после чего промывали дистиллированной водой для удаления остатков щелочи. После этого обрабатывали 96% этанолом для дополнительной стерилизации и еще раз промывали дистиллированной водой.

Анализ качества печати

Основным параметром, описывающим качество печати, в данной работе является пригодность для печати (strand printability, SP), которая рассчитывается по формуле 1:

$$SP = 1 - \frac{D_s - D_{\text{exp}}}{D_s},$$

где D_{exp} — экспериментальный диаметр напечатанных полос (мм);

D_s — теоретически найденный стандартный диаметр (мм).

Экспериментальный диаметр напечатанного волокна измеряли в программе ImageJ. Затем рассчитывали пригодность для печати по формуле 1.

Результат печати считали удовлетворительным при $SP = 1 \pm 0,1$ [12].

В качестве стандартного диаметра D_s принимали диаметр сопла печатающей головки, равный 0,9 мм.

Измерение D_{exp} проводили 30 раз для каждого образца на разных участках матрицы с помощью программы ImageJ. Значения диаметра получали путем сравнения измеренной величины с эталоном.

Культивирование клеточных культур *in vitro*

Для исследования биосовместимости печатных конструкций проводили посев культуры мезенхимальных стволовых клеток кролика на все напечатанные матрицы. Для этого в каждую чашку Петри добавили по 300 мкл суспензии с клетками с концентрацией 5×10^5 мкл⁻¹. Далее инкубировали при 37 °C в течение 40 мин. После этого к каждому образцу добавляли по 8 мл готовой питательной среды, содержащей питательную среду α -MEM (модифицированная среда «Игла») с добавлением L-глутамина, 10% бычьей эмбриональной сыворотки и антибиотиков (100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (все реактивы Gibco, США).

Культивирование клеток осуществляли в асептических условиях при постоянной температуре 37 °C, концентрации CO₂ 5% и влажности 98%. Для анализа взаимодействия клеток с матрицами были сделаны фотографии через 1 ч, 1, 3 и 7 дней от начала исследования. Все эксперименты проводились в 3–5 повторностях. Прижизненная визуализация клеток проведена с помощью фотофиксации камерой Nikon (США); размерная шкала 200 мкм.

Статистический анализ

Статистический анализ выполнен с использованием программного обеспечения Microsoft Excel, для оценки

Таблица 2. Параметры печати для растворов

Растворы	Скорость печати, мм/с	Входящий поток, %
X/K (4/0)	1–5	25–75
X/K (6/0)	1–5	75–125
X/K (4/4)	3–7	125–175
X/K (6/6)	3–7	125–175

Таблица составлена авторами по собственным данным

статистически значимых различий между конкретными образцами использовали *t*-тест Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные динамической вязкости образцов с разной концентрацией хитозана и крахмала демонстрируют увеличение вязкости раствора полимера с увеличением в растворе концентрации хитозана, а также концентрации крахмала, что вполне естественно (рис. 1). Переход от высокой скорости сдвига (100 с⁻¹), которая имитирует движение раствора полимера в сопле экструдера, к низкой скорости сдвига (0,01 с⁻¹), которая имитирует состояние раствора на столике печатного устройства, демонстрирует наиболее высокую способность восстановления и сохранения формы изделия для состава X/K (6/6).

В первой части эксперимента изменяли скорость печати при постоянном входящем потоке. Во второй части изменяли величину входящего потока при постоянной скорости печати.

На рисунках 2–5 изображены гистограммы, с помощью которых визуально оценивали отношение стандартного диаметра, то есть диаметра сопла (0,9 мм, светлые столбцы), к экспериментальному диаметру (яркие столбцы). Гистограммы с голубыми столбцами 2А — с изменяющейся скоростью, с фиолетовыми 2Б — с изменяющимся входящим потоком. Над столбцами подписаны значения среднего экспериментального диаметра с учетом погрешности. Над гистограммами — фотографии исследуемых образцов. Их делали с одинаковой высотой рядом с миллиметровой бумагой, что позволяет оценить реальные размеры матрицы и рассчитать экспериментальные диаметры.

Результаты показали, что наиболее приближенные значения экспериментального диаметра к стандартному для раствора с содержанием хитозана 4% и крахмала 4% (X/K– 4/4) удалось получить при установке скорости печати 3 мм/м, а входящего потока — 50%. Соответствующие данные представлены на рисунке 2.

Для раствора X/K (6/0) точное значение экспериментального диаметра было достигнуто только при установке скорости печати 3–5 мм/с и входящего потока 100%. Как и в предыдущем случае, данный диапазон можно считать достаточно узким. Соответствующие данные представлены на рисунке 3.

Для раствора X/K (4/4) получили широкий диапазон настроек, при которых экспериментальный диаметр достаточно близок к стандартному: 3–5 мм/с при 150% входящего потока и 5 мм/с при 175% входящего потока. Данные представлены на рисунке 4.

Значение экспериментального диаметра в образце X/K (6/6) оказалось самым стабильным (рис. 5) при изменении

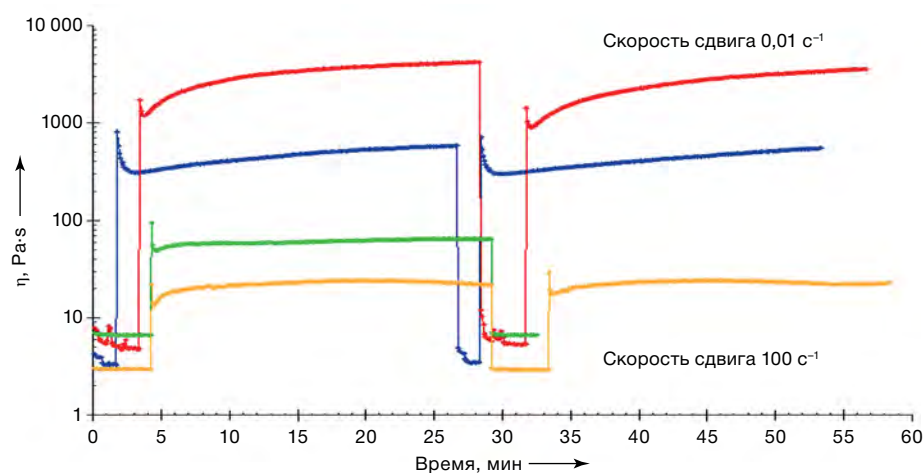


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 1. Динамическая вязкость гидрогелей с разным соотношением хитозана/крахмала (ось X (time t) — время, мин; ось Y (η) — сдвиговая вязкость (Pa·s или Па·с))

Примечание: желтый цвет линии — содержание в растворе 4% хитозана; зеленый цвет линии — содержание в растворе 4% хитозана и 4% крахмала в соотношении 1:1; синий цвет линии — содержание в растворе 6% хитозана; красный цвет линии — содержание в растворе 6% хитозана и 6% крахмала в соотношении 1:1.

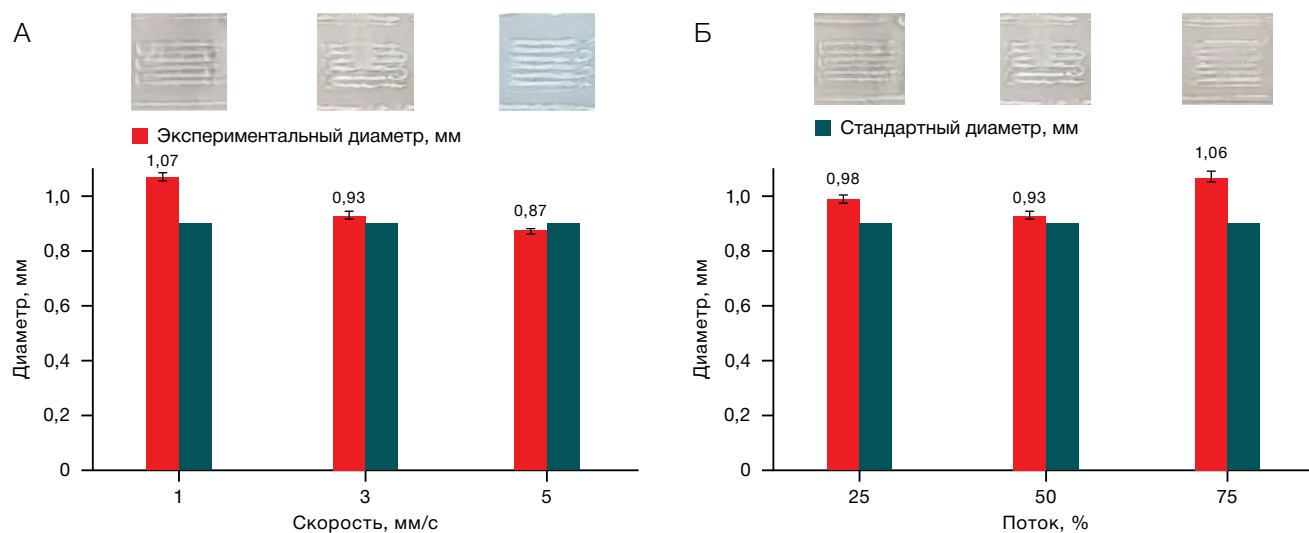


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 2. Влияние скорости печати (А) и величины потока (Б) на качество печати для раствора X/K (4/0)

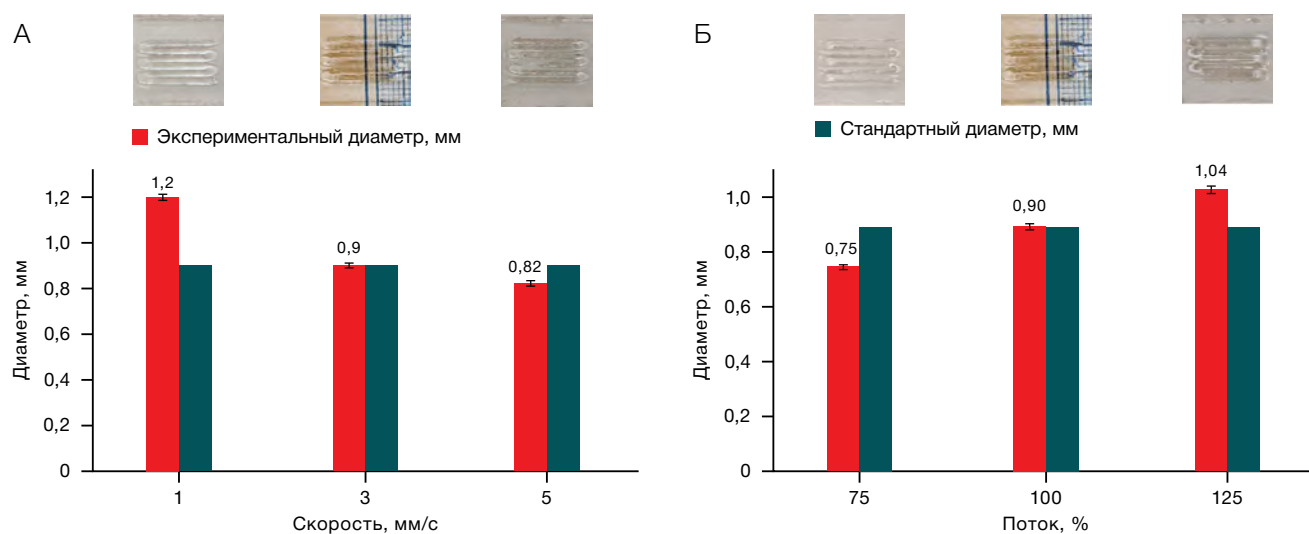


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 3. Влияние скорости печати (А) и величины потока (Б) на качество печати для раствора X/K (6/0)

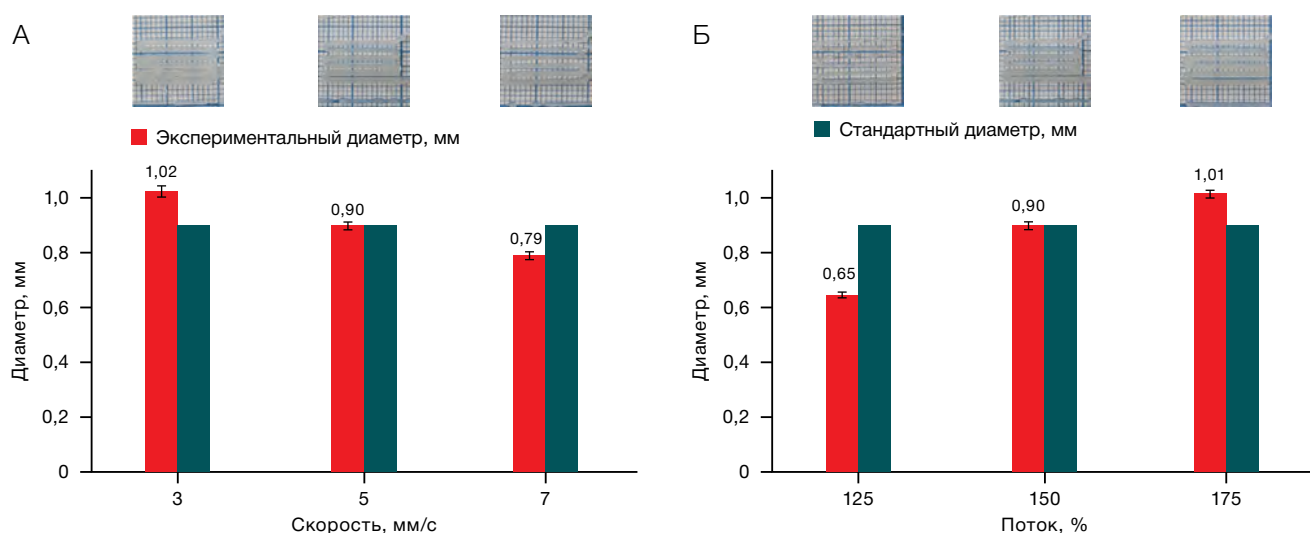


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 4. Влияние скорости печати (А) и величины потока (Б) на качество печати для раствора Х/К (4/4)

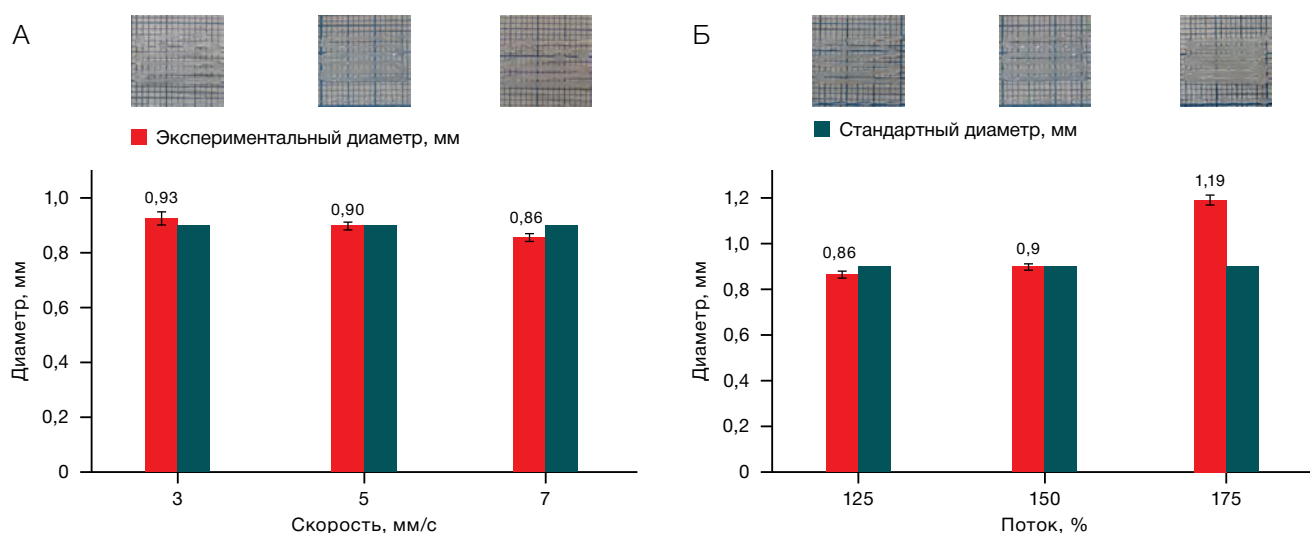


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 5. Влияние скорости печати (А) и величины потока (Б) на качество печати для раствора Х/К (6/6)

параметров печати. Таким образом, достаточно точной печати (близости реальных размеров теоретическим) можно добиться при установке скорости печати от 3 до 7 мм/с при величине входящего потока от 125 до 150%.

В таблице 3 представлены результаты вычислений пригодности для печати всех образцов.

Приемлемыми считали значения, близкие к $1,0 \pm 0,1$. Во всех группах наблюдали снижение пригодности для печати до 0,9 при увеличении скорости печати или снижении входящего потока, а в предельных случаях — нарушение целостности печатаемой конструкции. При понижении скорости печати и повышении входящего потока экспериментальный диаметр становится больше приемлемого, то есть значения пригодности для печати превышало 1,1. В некоторых случаях встречается слияние полос, что делает невозможным определение экспериментального диаметра и пригодности для печати.

Можно считать удовлетворительным результат при повышении скорости печати до 5 мм/с ($p < 0,01$) при том же значении входящего потока. Следовательно, наблюдали достаточно узкий диапазон настроек, при котором экспериментальный диаметр близок к стандартному.

При установке значения входящего потока меньше среднего (25%, $p < 0,001$) зафиксировали превышение экспериментального диаметра над стандартным, что не соответствует результатам всех остальных групп. Данное отклонение может быть объяснено неравномерным распределением биочернил по площади печатаемой конструкции из-за плохой адгезии к стеклу.

При увеличении входящего потока до 175% ($p < 0,0001$) экспериментальный диаметр превышает допустимые значения (напечатанные линии толще, чем требуется).

Таким образом, можно сделать общий вывод: при повышении скорости печати и снижении входящего потока независимо друг от друга наблюдали уменьшение толщины печатаемой линии. Обратное отмечали при понижении скорости печати и повышении входящего потока.

Пригодность для печати повышается при одновременном увеличении скорости печати и входящего потока для растворов с более высокой вязкостью (рис. 1), таких как Х/К (4/4), Х/К (6/6). Кроме того, для этих растворов характерен широкий диапазон параметров, при которых пригодность для печати близка к 1, а значит, реальные размеры матриц достаточно близки к теоретическим.

Таблица 3. Влияние скорости печати и входящего потока на пригодность для печати чернил на основе растворов хитозана и крахмала

Растворы	Скорость потока, мм/с	Входящий поток, %	Пригодность для печати
Х/К (4/0)	1	50	$1,19 \pm 0,12$
	3	50	$1,03 \pm 0,13$
	5	50	$0,97 \pm 0,10^*$
	3	25	$1,09 \pm 0,13^*$
	3	75	$1,18 \pm 0,14$
Х/К (6/0)	1	100	$1,34 \pm 0,12$
	3	75	$0,84 \pm 0,10$
	3	125	$1,15 \pm 0,12$
	5	100	$0,92 \pm 0,10$
	3	100	$1,00 \pm 0,10$
Х/К (4/4)	5	175	$1,13 \pm 0,14$
	7	150	$0,88 \pm 0,12$
	3	150	$1,14 \pm 0,15$
	5	150	$1,00 \pm 0,12$
	5	125	$0,72 \pm 0,10$
Х/К (6/6)	3	150	$1,03 \pm 0,16$
	5	125	$0,96 \pm 0,13$
	5	150	$1,00 \pm 0,13$
	7	150	$0,95 \pm 0,12$
	5	175	$1,32 \pm 0,16^*$

Таблица составлена авторами по собственным данным

Примечание: * $p < 0,01$; * $p < 0,001$; * $p < 0,0001$.

Использование растворов с меньшей плотностью (Х/К (4/0), Х/К (6/0)) в качестве биочернил требует более тщательного выбора настроек печати. Для таких растворов удалось подобрать только одно значение входящего потока, при котором пригодность для печати близка к 1.

В течение 7 дней МСК культивировали как на поверхности матриц, так и рядом с напечатанными филаментами.

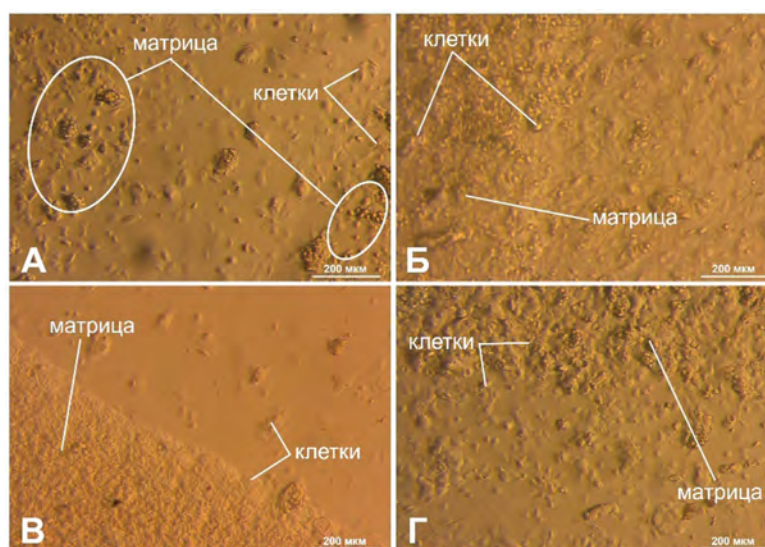
На рисунке 6 представлены результаты культивирования МСК спустя 1 ч после посева. Возле матрицы Х/К (4/0) и на ее поверхности МСК образуют агрегаты (рис. 6А). На рисунке 6Б видно, что клетки распределены

равномерно по поверхности чашки, небольшое скопление присутствует на поверхности матрицы. Наибольшее количество клеток наблюдали на матрице Х/К (4/4) (рис. 6В), при этом клетки были сконцентрированы и не агрегировали. На рисунке 6Г наблюдали неравномерное распределение клеток при их большой концентрации на поверхности матрицы Х/К (6/6).

На рисунке 7 изображены фотографии, сделанные через 1 день после посева. На рисунке 7А наблюдали распластность клеток на поверхности чашки, в то время как на поверхности матрицы Х/К (4/0) клетки образовывали крупные неприкрепленные агрегаты. В случае использования матрицы Х/К (6/0) (рис. 7Б) отмечали большую концентрацию клеток вблизи поверхности. Как и в предыдущем случае, на самой матрице клеток было значительно меньше. На рисунке 7В наблюдали большое количество не распластных клеток на поверхности матрицы Х/К (4/4). На чашке Петри клетки распластались на некотором расстоянии от матрицы. Матрица Х/К (6/6) имеет очень неоднородную структуру, что видно на рисунке 7Г, по которой сложно оценить количество клеток. Между напечатанными полосами концентрация клеток низкая.

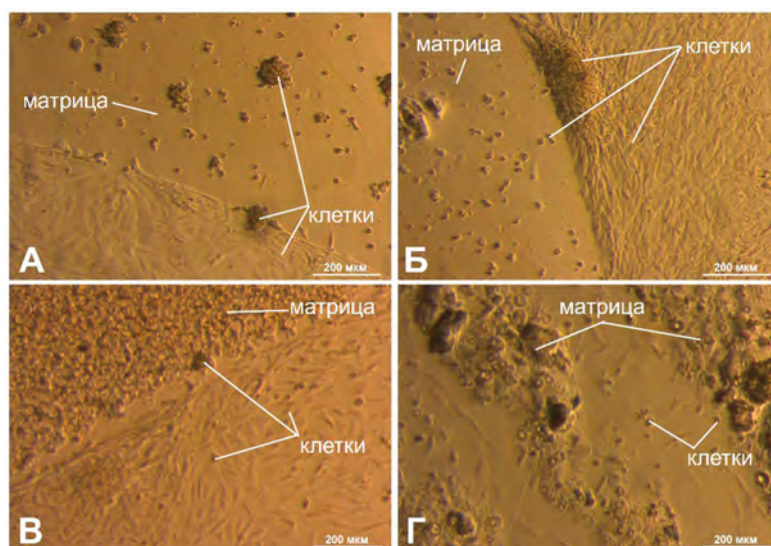
На рисунке 8 приведены фотографии, сделанные через 3 дня после посева. На рисунках 8А и 8Б наблюдали распластность клеток на поверхности чашки Петри. На поверхности матриц Х/К (4/0) и Х/К (6/0) (рис. 8А и Б) клетки в небольшой концентрации и не распластаны. На рисунке 8В наблюдали клетки на поверхности матрицы Х/К (4/4) в высокой концентрации. На рисунке 8Г видно, что клетки распластались на расстоянии от поверхности матрицы Х/К (6/0).

На рисунке 9 представлены результаты культивирования МСК спустя 7 дней после посева. На рисунке 9 (А–В) видно, что клетки распластаны по поверхности чашки Петри и плотно прилегают к поверхности образцов по бокам. Таким образом, можно сделать предположение о биосовместимости матриц. С другой стороны, на рисунке 9Г клетки адгезируют на некотором расстоянии от матрицы Х/К (6/6), что делает ее наименее предпочтительной для использования. Клетки не распластались по поверхности ни одной из матриц, но наибольшее их количество наблюдается на матрице Х/К (4/4), что может говорить о положительном результате добавления крахмала.



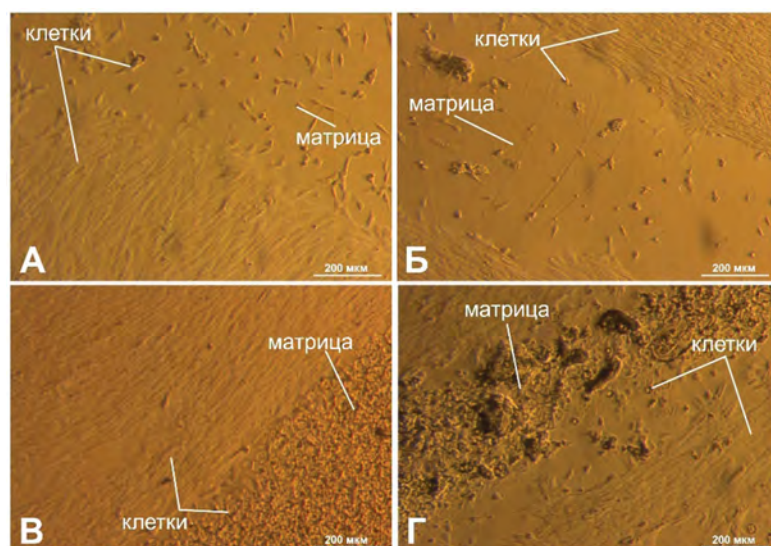
Фотографии выполнены авторами

Рис. 6. Результаты культивирования МСК через 1 ч после посева: А — матрица Х/К (4/0); Б — матрица Х/К (6/0); В — матрица Х/К (4/4); Г — матрица Х/К (6/6)



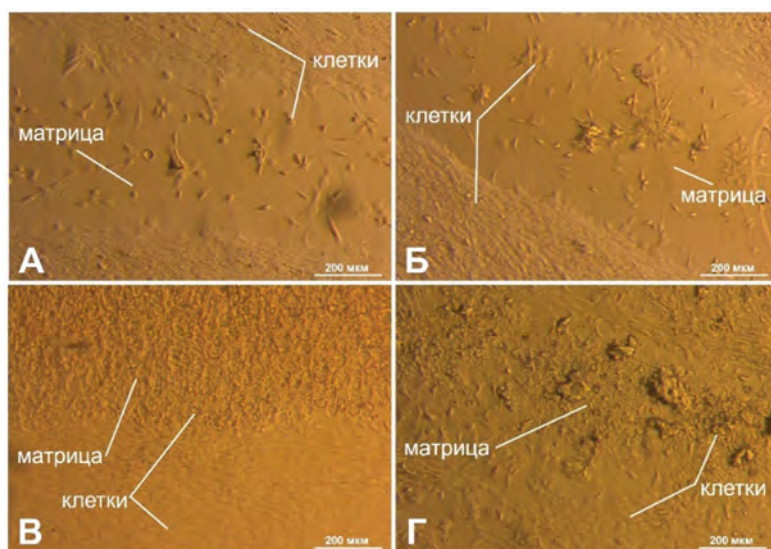
Фотографии выполнены авторами

Рис. 7. Результаты культивирования МСК через 1 день после посева: А — матрица Х/К (4/0); Б — матрица Х/К (6/0); В — матрица Х/К (4/4); Г — матрица Х/К (6/6)



Фотографии выполнены авторами

Рис. 8. Результаты культивирования МСК через 3 дня после посева: А — матрица Х/К (4/0); Б — матрица Х/К (6/0); В — матрица Х/К (4/4); Г — матрица Х/К (6/6)



Фотографии выполнены авторами

Рис. 9. Результаты культивирования МСК через 7 дней после посева: А — матрица Х/К (4/0); Б — матрица Х/К (6/0); В — матрица Х/К (4/4); Г — матрица Х/К (6/6)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования были разработаны чернила на основе хитозана и крахмала, подходящие для 3D-биопечати. Показано, что увеличение концентрации хитозана в растворе до 6%, а также добавление крахмала способствует увеличению динамической вязкости и способствует быстрому восстановлению и сохранению формы раствора полимера во времени после его вытекания из сопла экструдера. В процессе выполнения

экспериментальной работы подобраны оптимальные параметры печати, а именно скорость и входящий поток, которые позволили создать полимерные матрицы с контролируемыми характеристиками структуры. Предварительные эксперименты *in vitro* продемонстрировали биосовместимость полученных конструкций по отношению к мезенхимным стромальным клеткам человека, что позволяет рассчитывать на использование подобных полимерных композиций при разработке раневых покрытий для лечения поврежденных кожных покровов.

Литература / References

1. Borah A, Kumar DS. Overcoming the barriers of two-dimensional cell culture systems with three-dimensional cell culture systems: Techniques, drug discovery, and biomedical applications. *Biomedical Product and Materials Evaluation*. 2022;7:179–229. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823966-7.00003-7>
2. Pai RR, Sekar JA, Ajit S, Velayudhan S, Kasoju N, Kumar A. Three-dimensional bioprinting of tissues and organs. *Biomedical Product and Materials Evaluation*. 2022;5:135–50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823966-7.00018-9>
3. Chircov C, Grumezescu AM. Three-dimensional bioprinting in drug delivery. *Materials for Biomedical Engineering*. 2019;2:19–40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816913-1.00002-7>
4. Mancha Sánchez E, Gómez-Blanco JC, López Nieto E, et al. Hydrogels for Bioprinting: A Systematic Review of Hydrogels Synthesis, Bioprinting Parameters, and Bioprinted Structures Behavior. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020;8:776. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00776>
5. Mukherjee P, Rani A, Saravanan P. Polymeric Materials for 3D Bioprinting. *3D Printing Technology in Nanomedicine*. 2019;4:63–81. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815890-6.00004-9>
6. Iordache F. Bioprinted Scaffolds. *Materials for Biomedical Engineering: Hydrogels and Polymer-based Scaffolds*. 2019;2:35–60. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816901-8.00002-X>
7. Goel A, Meher MK, Gulati K, Poluri KM. Fabrication of Biopolymer-Based Organs and Tissues Using 3D Bioprinting. *3D Printing Technology in Nanomedicine*. 2019;3:43–62. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815890-6.00003-7>
8. Islam MM, Shahruzzaman M, Biswas S, Nuris Sakib M, Rashid TU. Chitosan based bioactive materials in tissue engineering applications-A review. *Bioactive Materials*. 2020;5(1):164–83. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.01.012>
9. Rajabi M, McConnell M, Cabral J, Ali MA. Chitosan hydrogels in 3D printing for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*. 2021;260:117768. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117768>
10. Huang J, Fu H, Wang Z, Meng Q, Liu S, Wang H et al. BMSCs-laden gelatin/sodium alginate/carboxymethyl chitosan hydrogel for 3D bioprinting. *RSC Advances*. 2016;6(110):108423–30. <https://doi.org/10.1039/C6RA24231F>
11. Butler HM, Naseri E, MacDonald DS., Tasker AR, Ali Ahmadi A. Optimization of starch- and chitosan-based bio-inks for 3D bioprinting of scaffolds for neural cell growth. *Materialia*. 2020;(12):100737. <https://doi.org/10.1016/j.mtl.2020.100737>
12. Ghosh S, Gutierrez V, Fernández C, Rodríguez-Pérez M, Viana JC, Reis RL, Mano JF. Dynamic mechanical behavior of starch-based scaffolds in dry and physiologically simulated conditions: effect of porosity and pore size. *Acta Biomaterialia*. 2008;4(4):950–9. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.02.001>
13. Krawczenko A, Klimczak A. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Contribution to Angiogenic Processes in Tissue Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(5):2425. <https://doi.org/10.3390/ijms23052425>
14. Naghieh S, Sarker M, Sharma NK, Barhoumi Z, Chen X. Printability of 3D Printed Hydrogel Scaffolds: Influence of Hydrogel Composition and Printing Parameters. *Applied Sciences*. 2020;10(1):292. <https://doi.org/10.3390/app10010292>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Е.А. Малик — постановка методики, выполнение 3D печати; Ю.А. Нащекина — проведение исследования по биосовместимости; И.А. Барсук — лабораторные исследования; К.П. Головки — проверка критически важного интеллектуального содержания и окончательное утверждение для публикации рукописи; В.Е. Александров — поиск и обзор литературы; В.Ю. Елоховский — реологические исследования; В.Е. Юдин — концепция исследования, научное руководство.

ОБ АВТОРАХ

Малик Елена Андреевна

<https://orcid.org/0009-0000-2245-2436>
malikalionaa@gmail.com

Нащекина Юлия Александровна, канд. биол. наук

<https://orcid.org/0000-0002-4371-7445>
nashchekina.yu@mail.ru

Барсук Илья Александрович

<https://orcid.org/0000-0002-3728-9966>
barsuk20220@gmail.com

Головки Константин Петрович, д-р мед. наук, доцент

<https://orcid.org/0000-0002-1584-1748>
labws@mail.ru

Александров Виктор Николаевич, д-р мед. наук, профессор

<https://orcid.org/0009-0001-9229-5293>
vnaleks9@yandex.ru

Елоховский Владимир Юрьевич, канд. тех. наук

<https://orcid.org/0000-0001-9123-4926>
vladimir.elokhovskiy@gmail.com

Юдин Владимир Евгеньевич, д-р физ.-мат. наук, профессор

<https://orcid.org/0000-0002-5517-4767>
yudinve@gmail.com

<https://doi.org/10.47183/mes.2025-27-1-97-106>

УДК 57.085.23



ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТАВА ПРОТЕОГЛИКАНОВ, СИНТЕЗИРУЕМЫХ *IN VITRO* ХОНДРОЦИТАМИ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

П.А. Голубинская, Е.С. Ручко[✉], А.С. Пикина, И.П. Смирнов, Т.В. Владимирова, В.Д. Гордеева, Г.П. Арапиди, А.В. Еремеев

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Введение. Применение клеточных конструкций на основе плюрипотентных стволовых клеток человека (чПСК) связано с рядом трудностей, одной из них является необходимость стандартизации методов культивирования хондроцитоподобных производных чПСК для получения хрящевой ткани, схожей с естественным гиалиновым хрящом. Гликозаминогликаны (ГАГ) — основа внеклеточного матрикса (ВКМ) хрящевой ткани, поэтому анализ качественного и количественного состава ГАГ хрящеподобных тканеинженерных конструкций является важным звеном для итоговой оценки их потенциальной терапевтической эффективности.

Цель. Определить состав ГАГ, синтезируемых *in vitro* хондроцитами различного генеза, с использованием иммуноферментного анализа (ИФА) и жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС), а также оценить влияние 2D- и 3D-культивирования на их синтез.

Материалы и методы. В исследовании анализировали уровни ГАГ в 2D- и 3D-тканеинженерных конструкциях, полученных из хрящевой ткани 5 доноров, хондроцитоподобных клеток, дифференцированных из 2-х линий чПСК. Клеточные сфероиды получали методом агрегации в микролуночных планшетах и культивировали в мини-биореакторах. Анализ содержания ГАГ в образцах клеточных культур и сфероидов проведен с помощью ИФА и ЖХ-МС/МС. Для оценки статистической значимости различий между образцами использовали тест Краскела — Уоллиса и тест Данна.

Результаты. В исследовании с помощью ИФА выявлены статистически значимые различия ($p < 0,0021$), подтверждающие более высокий уровень синтеза ГАГ в 3D-культурах нативных хондроцитов по сравнению с 2D-культурами (108,67 и 1099,87 нг/мл соответственно). Среднее число спектров белка хондроитинсульфат-протеогликана 4, определенное с помощью ЖХ-МС/МС, также было выше в 3D-культурах, составив 41,75 спектра по сравнению с 2,24 спектра в образцах 2D-культур. Уровни агрекана, бигликана и декорина между культурами не различались. 3D-культуры хондроцитоподобных клеток из чПСК не показали достоверных отличий в содержании ГАГ по сравнению с 2D, что указывает на необходимость оптимизации условий их дифференцировки.

Выводы. В нашем исследовании был определен состав ГАГ, синтезируемых *in vitro* хондроцитами различного генеза, с использованием ИФА и ЖХ-МС/МС, а также оценено влияние 2D- и 3D-культивирования на их синтез. Результаты показали, что 3D-среда культивирования создает условия, способствующие более полноценному формированию хондроцитарного ВКМ в образцах нативных хондроцитов. Однако, несмотря на это, полученные сфероиды хондроцитоподобных производных чПСК не достигают функциональной идентичности с естественной хрящевой тканью, даже после завершения протоколов дифференцировки и не представляют собой идеальные тканеинженерные конструкции для коррекции дефектов хряща.

Ключевые слова: хондроциты; артрит; внеклеточный матрикс; гликозаминогликаны; чПСК; дифференцировка; ИФА; ЖХ-МС/МС

Для цитирования: Голубинская П.А., Ручко Е.С., Пикина А.С., Смирнов И.П., Владимирова Т.В., Гордеева В.Д., Арапиди Г.П., Еремеев А.В. Определение состава гликозаминогликанов, синтезируемых *in vitro* хондроцитами различного генеза. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2025;27(1):97–106. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-27-1-97-106>

Финансирование: исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-15-00250).

Соответствие принципам этики: все использованные клеточные линии человеческих плюрипотентных стволовых клеток были получены авторами в ходе предыдущих исследований. Настоящее исследование одобрено локальным комитетом по этике ФННКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина (протокол № 2019/02 от 09.04.2019). Получение первичного биоматериала для создания клеточных линий чПСК и хондроцитов происходило в соответствии с принципами Хельсинкской декларации. Информированное согласие было получено от всех участников.

Благодарности: авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам Центра коллективного пользования ФННКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина и лично руководителю этого центра кандидату биологических наук Н.П. Полиной за неоценимую помощь в проведении жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией.

Потенциальный конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

✉ Ручко Евгений Сергеевич Ruchkoevgeny@yandex.ru

Статья поступила: 27.09.2024 **После доработки:** 05.02.2025 **Принята к публикации:** 21.02.2025

COMPOSITION ANALYSIS OF PROTEOGLYCANS SYNTHESIZED *IN VITRO* BY CHONDROCYTES OF VARIOUS ORIGINS

Polina A. Golubinskaya, Evgeny S. Ruchko[✉], Arina S. Pikina, Igor P. Smirnov, Tatiana V. Vladimirova, Veronika D. Gordeeva, Georgiy P. Arapidi, Artem V. Eremeev

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

Introduction. The use of cellular constructs based on human pluripotent stem cells (hPSCs) is associated with a number of challenges, including the need to standardize methods for cultivating chondrocyte-like hPSCs derivatives to produce a cartilage tissue similar to natural hyaline cartilage. Glycosaminoglycans (GAGs) are the basis of the extracellular matrix (ECM) of cartilage tissue; therefore, a qualitative and quantitative analysis of the GAG composition of cartilage-like tissue engineering structures is an important step in the final assessment of their potential therapeutic effectiveness.

Objective. To determine the composition of GAGs synthesized *in vitro* by chondrocytes of various origins using enzyme-linked immunoassay (ELISA) and liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC–MS/MS), as well as to evaluate the effect of 2D and 3D culturing on their synthesis.

Materials and methods. We analyzed the GAG levels in 2D and 3D tissue-engineered structures obtained from the cartilage tissue of five donors, chondrocyte-like cells differentiated from two hPSC lines. Cellular spheroids were obtained by aggregation in microlunar plates and cultured in mini-bioreactors. The analysis of the GAG content in cell culture samples and spheroids was carried out using ELISA and LC–MS/MS. The Kruskal–Wallis and Dunn tests were used to assess the statistical significance of the differences between the samples.

© П.А. Голубинская, Е.С. Ручко, А.С. Пикина, И.П. Смирнов, Т.В. Владимирова, В.Д. Гордеева, Г.П. Арапиди, А.В. Еремеев, 2025

Results. The ELISA study revealed statistically significant differences ($p < 0.0021$), confirming higher levels of GAGs synthesized in 3D cultures of native chondrocytes compared to 2D cultures (108.67 ng/mL and 1099.87 ng/mL, respectively). The average number of spectra of the chondroitin sulfate proteoglycan 4 protein, determined using LC-MS/MS, was also higher in 3D cultures, amounting to 41.75 spectra compared to 2.24 spectra in 2D culture samples. The levels of aggrecan, biglycan, and decorin did not differ between cultures. 3D cultures of chondrocyte-like cells from hPSC showed no significant differences in the content of GAG compared to 2D cultures, which indicates the need to optimize the conditions for their differentiation.

Conclusions. In our study, the composition of the GAGs synthesized *in vitro* by chondrocytes of various origins was determined using ELISA and LC-MS/MS. The effect of 2D and 3D cultivation on their synthesis was evaluated. The results showed that 3D culture media create favorable conditions for a more complete formation of chondrocytic ECM in native chondrocyte samples. Despite this, the obtained spheroids of chondrocyte-like hPSCs derivatives fail to achieve functional identity with natural cartilage tissue, even after completion of differentiation protocols, thus not representing optimal tissue engineering structures for correcting cartilage defects.

Keywords: chondrocytes; arthritis; extracellular matrix; glycosaminoglycans; hPSCs; differentiation; ELISA; LC-MS/MS

For citation: Golubinskaya P.A., Ruchko E.S., Pikina A.S., Smirnov I.P., Vladimirova T.V., Gordeeva V.D., Arapidi G.P., Ereemeev A.V. Composition analysis of proteoglycans synthesized *in vitro* by chondrocytes of various origins. *Extreme Medicine*. 2025;27(1):97–106. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-27-1-97-106>

Funding: the research was supported by Russian Science Foundation (project No. 22-15-00250).

Compliance with ethical principles: all used cell lines of human pluripotent stem cells were obtained by the authors in the course of previous studies. This study was approved by the local Ethics committee of the Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine (Protocol No. 2019/02 of 09 Apr. 2019). The primary biomaterial for the creation of esc and chondrocyte cell lines was obtained in accordance with the principles of the Helsinki Declaration. Informed consent was obtained from all participants.

Acknowledge: the authors would like to express their sincere gratitude to the staff of the The Collective Use Center of Genomics, Proteomics, Metabolomics and personally to the head of this center, Cand. Sci. (Biol.) Nadezhda F. Polina, — for invaluable assistance in conducting liquid chromatography with tandem mass spectrometry.

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

✉ Evgeny S. Ruchko Ruchkoevgeny@yandex.ru

Received: 27 Sept. 2024 **Revised:** 09 Feb. 2025 **Accepted:** 21 Feb. 2025

ВВЕДЕНИЕ

Хронические заболевания суставов по-прежнему представляют собой серьезную проблему для мирового здравоохранения. Эти заболевания несут значительное экономическое бремя вследствие распространенности и тяжести поражения опорно-двигательного аппарата. Расходы на лечение и связанная с ними инвалидность ложатся тяжелым бременем как на пациентов, так и на системы здравоохранения. В 2019 году было зафиксировано около 528 млн человек в мире с остеоартритом, что на 113% больше, чем в 1990 году [1]. Клинический потенциал хондроцитов, полученных из хрящевой ткани пациентов, давно признан. Наиболее распространенным методом лечения дефицита хрящевой ткани и коррекции дефектов хряща является индуцированная матрицей имплантация аутологичных хондроцитов (MACI). Данный метод терапии был одобрен Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) в 2016 году [2]. В этой методике используются аутологичные хондроциты, выделенные из биоптата хрящевой ткани пациентов, культивирование которых происходит на трехмерной матрице из коллагеновой мембраны [3]. Однако в некоторых случаях, например при длительном приеме кортикостероидов, нестероидных противовоспалительных препаратов или химиотерапии, получение достаточного количества клеточного материала для проведения MACI оказывается невозможным, что является основным ограничением данной методики. Плюрипотентные стволовые клетки человека, являясь неограниченным источником клеточного материала и исключая необходимость болезненного хирургического вмешательства, представляют собой следующий шаг в развитии клеточных технологий [4]. Однако нерешенными остаются такие проблемы, связанные с применением

чПСК, как высокая стоимость их культивирования и дифференцировки в хондроцитарном направлении, потенциальные риски иммунной реакции на хондроциты, полученные из чПСК, и риски туморогенности и онкогенности полученных из чПСК клеточных конструкций. Прогресс в решении данных проблем неразрывно связан с разработкой новых протоколов дифференцировки, генетического редактирования и культивирования как хондроцитов, полученных из чПСК, так и самих чПСК [4].

Основу хрящевой ткани составляют внеклеточный матрикс и небольшое количество специализированных клеток — хондроцитов, включенных в ВКМ. Состав и организация ВКМ определяют его биомеханические свойства. Функциональные свойства ВКМ близки к вязкоупругому гелю, состоящему из двух основных фаз: твердой фазы, включающей коллагеновые волокна, протеогликаны и неколлагеновые белки, и жидкой фазы, состоящей на 80% из воды и электролитов (Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Cl^-); основным протеогликаном в хряще является агрекан.

Хондроциты механочувствительные клетки, и на их функциональную активность значительную роль оказывает микроокружение [5]. Хондроциты располагаются в небольших полостях, называемых лакунами, окруженных ВКМ. Эти структуры, известные как хондроны [6], образуют основные структурные, функциональные, метаболические единицы суставного хряща [7] и различаются по составу коллагеновых фибрилл и ГАГ. Зона хондронов имеет толщину 2–4 мкм и состоит в основном из протеогликанов и ГАГ (перлкан, декорин, бигликан, агрекан и гиалуроновая кислота), а также коллагена VI типа [8].

Основным протеогликаном хрящевой ткани является агрекан, который взаимодействует с гиалуроновой кислотой и образует большие агрегаты, придающие хрящу амортизирующие свойства. Снижение содержания агрекана и других протеогликанов в хряще связано

с развитием остеоартрита, что приводит к ухудшению механических свойств хряща и прогрессированию заболевания [9]. В то же время бигликан и декорин являются малыми лейцин-обогащенными протеогликанами (SLRP), играющими ключевую роль в поддержании структуры и функции хрящевой ткани. Они участвуют в регуляции фибриллогенеза коллагена, взаимодействуя с его волокнами и влияя на организацию внеклеточного матрикса. Декорин, в частности, связывается с коллагеном II типа, регулируя размер и форму коллагеновых фибрилл, что способствует поддержанию структурной целостности хряща. Бигликан также взаимодействует с коллагеном, но его функции более разнообразны: участие в минерализации кости и регуляции роста клеток [10]. Хондроитинсульфат-протеогликан 4 — мембранный протеогликан, участвующий в адгезии, миграции и межклеточной сигнализации. Его роль в хрящевой ткани недостаточно изучена, но предполагается, что он влияет на взаимодействие хондроцитов с внеклеточным матриксом, поддерживая структуру и функциональность хряща. Также хондроитинсульфат-протеогликан 4 может регулировать рост и дифференцировку клеток, что делает его перспективной мишенью для терапии остеоартрита и регенерации хрящевой ткани [11].

Ферментативно выделенные хондроциты могут продуцировать новый ВКМ в течение нескольких часов после культивирования *in vitro*, хотя дальнейшего образования ВКМ вокруг клетки не происходит [12]. Считается, что полное созревание ВКМ занимает 2–3 недели. При этом исследования показали, что для полного созревания ВКМ и формирования хондронов необходимы определенные условия: микроокружение и физические факторы, такие как гравитационные и гидродинамические эффекты [13], поддержание которых возможно в 3D-структурах [14]. Сфероидные клеточные культуры, в частности, способствуют лучшей выживаемости и функциональной активности клеток по сравнению с традиционными 2D-культурами хондроцитов. Эти преимущества объясняются способностью 3D-структур к лучшей имитации естественной микросреды, а также влиянием химических и физических факторов [15]. Напротив, в условиях 2D-культуры хондроциты теряют свой фенотип, демонстрируют повышенное производство коллагена I типа (ассоциированного с волокнистым хрящом) и пониженный уровень коллагена II типа (ассоциированного с гиалиновым хрящом), а также снижают уровень ГАГ. Следует отметить, что данный феномен дифференцировки еще не был полностью изучен в хондроцитах, полученных из чПСК.

Состав и уровень содержания ГАГ являются критическими характеристиками, описывающими сформированный хондрон. Поэтому при разработке хрящеподобных тканеинженерных конструкций для регенеративной медицины определение уровня содержания и состава ГАГ необходимо для оценки эффективности и функциональной активности полученного хрящевого имплантата [16]. Кроме того, на содержание, свойства и состав ВКМ влияет состояние хондроцитов и их микроокружение. Хондроциты, полученные из поврежденных тканей, таких как пораженный остеоартрозом хрящ, синтезируют гепарансульфат с повышенной сульфатацией, что связано с повышенной активностью катаболических ферментов, таких как матриксные металлопептидазы (MMP3, MMP13), и снижением экспрессии ключевых хондроцитарных генов, таких как коллаген II типа альфа 1 цепи (COL2A1),

агрекан (ACAN) и SRY-box транскрипционный фактор 9 (SOX9) [8].

В исследовании G. Lee, R. Loeser [12] было показано, что хондроциты из поверхностной и средней/глубокой зон хряща, выделенные методом зональной абразии, и при культивировании в течение четырех недель демонстрировали значительные различия в содержании ГАГ. Авторами J. Hu, K. Athanasiou установлено, что хондроциты из средней/глубокой зоны вырабатывали на 250% больше ГАГ и коллагена в пересчете на сухой вес по сравнению с хондроцитами из поверхностной зоны [17]. Кроме того, хондроциты средней/глубокой зоны способны образовывать агрегаты и хрящеподобные структуры, что благоприятно для создания тканеинженерных конструкций. В другом исследовании J. Bekkers et al. [18] было обнаружено расхождение в синтетической активности хондроцитов, выделенных из нагруженных и ненагруженных зон хряща, хотя эти различия уменьшались при прохождении клетками нескольких процедур пассирования.

Существующие подходы получения хрящеподобных клеточных конструкций из чПСК являются несовершенными, так как часто характеризуются низкой воспроизводимостью, вариабельностью эффективности дифференцировки клеток, недостаточной механической прочностью образованных тканей и сложностью масштабирования. ГАГ являются одним из главных компонентов ВКМ хрящевой ткани, поэтому анализ качественного и количественного состава ГАГ — один из основных этапов оценки потенциальной терапевтической эффективности хрящеподобных клеточных конструкций [19]. В то же время условия культивирования, непосредственно влияющие на уровень содержания ГАГ, представляют собой ключевой аспект существующих методик создания подобных клеточных конструкций, который можно модифицировать для получения образцов тканей, наиболее близких по характеристикам к гиалиновому хрящу.

Цель исследования — определить состав ГАГ, синтезируемых *in vitro* хондроцитами различного генеза, с использованием иммуноферментного анализа (ИФА) и жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС), а также оценить влияние 2D- и 3D-культивирования на их синтез.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Распределение образцов по экспериментальным группам

Образцы исследуемых клеточных культур были распределены на группы (табл. 1) по критерию происхождения клеток и типа их культивирования:

- 1) группа 2D-культур нативных хондроцитов включала образцы, полученные от пациентов с гонартрозом и невралгией мениска;
- 2) группа 3D-культур нативных хондроцитов также была представлена образцами от пациентов с аналогичными диагнозами, но выращенными в трехмерных условиях культивирования;
- 3) группа 2D-культур хондроцитов, дифференцированных из чПСК, включала образцы, полученные из клеточных линий чПСК IPSRG4SAb2m c55/1-и IPSRG4S;
- 4) группа 3D-культур хондроцитов, дифференцированных из чПСК, аналогично содержала образцы, полученные из тех же клеточных линий, но в условиях трехмерного культивирования;

Таблица 1. Распределение образцов по группам для анализа содержания гликозаминогликанов с помощью ИФА и анализа протеогликанов с помощью ЖХ-МС/МС

ИФА			ЖХ-МС/МС		
Группа образцов	Число образцов	Характеристика клеточных культур	Группа образцов	Число образцов	Характеристика клеточных культур
2D-культуры нативных хондроцитов	5	Гонартроз — 4 Невралгия мениска — 1	2D-культуры нативных хондроцитов	5	Гонартроз — 4 Невралгия мениска — 1
3D-культуры нативных хондроцитов	2	Гонартроз — 1 Невралгия мениска — 1	3D-культуры нативных хондроцитов	5	Гонартроз — 4 Невралгия мениска — 1
2D-культуры хондроцитов, дифференцированных из чПСК	2	Клеточная линия чПСК IPSRG4SΔb2m c155/1 Клеточная линия чПСК IPSRG4S	2D-культуры хондроцитов, дифференцированных из чПСК	2	Клеточная линия чПСК 4SΔb2m c155/1 Клеточная линия чПСК IPSRG4S
3D-культуры хондроцитов, дифференцированных из чПСК	2	Клеточная линия чПСК IPSRG4SΔb2m c155/1 Клеточная линия чПСК IPSRG4S	3D-культуры хондроцитов, дифференцированных из чПСК	2	Клеточная линия чПСК IPSRG4SΔb2m c155/1 Клеточная линия чПСК IPSRG4S
Контрольная группа чПСК	2	Клеточная линия чПСК IPSRG4S Клеточная линия чПСК IPSRG4SΔb2m c155/1	Контрольная группа чПСК	1	Клеточная линия чПСК IPSRG4S

Таблица составлена авторами по собственным данным

5) контрольная группа чПСК состояла из клеточных линий IPSRG4S и IPSRG4SΔb2m c155/1, не подвергавшихся дифференцировке в хондроциты.

Подобный подход к разделению образцов позволил провести сравнительный анализ влияния различных условий культивирования и происхождения клеток на их характеристики.

Получение первичной культуры хондроцитов из донорского материала и культивирование хондроцитов

Хондроциты выделяли из биоптатов хрящевой ткани пациентов, давших информированное согласие. Перед измельчением хрящ переносили в пробирку объемом 15 мл с помощью серологической пипетки и однократно промывали модифицированной средой «Игла Дульбекко» (DMEM) (Thermo Fisher Scientific, США), дополненной двойным количеством пенициллина/стрептомицина (200 Ед/мл, «ПанЭко», Россия). Затем хрящ помещали в стерильную 60 мм чашку Петри и измельчали стерильными ножницами и скальпелем в присутствии 4 мл среды DMEM, в которую также добавляли двойное количество антибиотика. Измельченный хрящ промывали в 15 мл той же среды. Затем кусочки хряща инкубировали в течение 40 мин в пробирке объемом 15 мл на лабораторном орбитальном шейкере (качалке) (Infort HS Celltron, Швейцария) при 37 °C с 5% CO₂, используя 10 мл среды DMEM, дополненной двойным количеством антибиотика, а также 10 мг коллагеназы типа IV (Worthington Biochemical, США) и 10 мг коллагеназы типа I (Worthington Biochemical, США). После инкубации кусочки хряща центрифугировали в течение 5 мин при 200 g на центрифуге (Eppendorf Centrifuge 5804R, Германия). Надосадочную жидкость аккуратно удаляли, а кусочки хряща ресуспендировали в среде DMEM и повторяли промывку еще 2 раза. После этого к хрящу добавляли 10 мл среды Игла в модификации Дульбекко с добавлением питательной смеси F-12 в соотношении 1:1 (DMEM/F12) (Thermo Fisher Scientific, США), дополненной 20% фетальной бычьей сывороткой (FBS) (HyMedia, Индия), 2 mM Glutamax (Thermo Fisher Scientific, США) и 100 Ед/мл пенициллина/стрептомицина («ПанЭко», Россия). Затем

кусочки переносили в культуральный флакон T-25 см², предварительно обработанный 0,01% раствором желатина типа В («ПанЭко», Россия). Кусочки хряща культивировали при 37 °C с 5% CO₂. Культуру пассировали до достижения монослоя клеток 70% конфлюэнтной плотности; замену культуральной среды производили каждые пять дней.

Культивирование человеческих плюрипотентных стволовых клеток

Линия индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека IPSRG4S была получена в ходе выполнения совместной работы лаборатории клеточной биологии ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина и лаборатории стволовых клеток группы молекулярных исследований мозга Института А.И. Виртанена, Университет Восточной Финляндии, Куопио, Финляндия [20]. В дальнейшем в лаборатории клеточной биологии ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина на основе линии чПСК IPSRG4S была получена линия клеток чПСК IPSRG4SΔb2m c155/1, в которой с помощью геномного редактирования CRISPR/Cas9 был инактивирован ген бета-2-микроглобулина. чПСК культивировали в шестилуночных планшетах, предварительно покрытых матригелем (BD, США), на питательной среде, состоящей из mTeSR-1 (STEMCELL Technology, Канада) и Hybris 8 («ПанЭко», Россия) в соотношении 1:3.

Дифференцировка человеческих чПСК в хондроцитарном направлении

Чтобы вызвать дифференцировку, чПСК культивировали в среде DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, США), дополненной 10% FBS (HyMedia, Индия), 2 mM Glutamax (Thermo Fisher Scientific, США), 100 Ед/мл пенициллина/стрептомицина («ПанЭко», Россия), 10 мкМ ингибитора гликогенсинтазы киназы-3 CHIR99021 (Miltenyi Biotec, Германия) и 10 нМ ретиноевой кислоты (Miltenyi Biotec, Германия). Клетки инкубировали в течение двух дней в CO₂-инкубаторе при 37 °C с 5% CO₂. После этого среда была заменена на среду DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, США), дополненную 10% FBS (HyMedia, Индия), 2 mM Glutamax (Thermo Fisher Scientific, США), 100 Ед/мл пенициллина/стрептомицина

(«ПанЭко», Россия), 10 нг/мл трансформирующего фактора роста β (TGF- β) (Miltenyi Biotec, Германия), 10 нг/мл костного морфогенетического белка-2 (BMP-2) (Miltenyi Biotec, Германия), 2% B27 (Thermo Fisher Scientific, США), 10 мкМ аскорбиновой кислоты (Sigma-Aldrich, США) и 1% раствора инсулин-трансферрин-селенита («ПанЭко», Россия). Клетки культивировали в течение двух недель в тех же условиях CO₂-инкубатора. После дифференцировки хондроцитоподобные производные культивировали в среде DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, США), дополненной 10% FBS (HyMedia, Индия), 2 мМ Glutamax (Thermo Fisher Scientific, США), 100 Ед/мл пенициллина/стрептомицина («ПанЭко», Россия), 10 нг/мл TGF- β (Miltenyi Biotec, Германия) и 10 нг/мл BMP-2 (Miltenyi Biotec, Германия).

Приготовление культуры сфероидов

Для формирования сфероидов брали хондроциты, которые были на 2-м пассаже после выделения клеточной культуры из хрящевой ткани, а хондроцитоподобные производные чПСК сворачивали в сфероиды на 2-м пассаже после начала протокола дифференцировки чПСК. К началу хондрогенной дифференцировки чПСК клеточная линия IPSRG4S находилась на 34-м пассаже, а клетки линии IPSRG4S Δ b2m — на 41-м пассаже. Хондроцитоподобные производные снимали с шестилуночных планшетов с помощью 0,05% раствора трипсина (Thermo Fisher Scientific, США), а хондроциты снимали с культуральных флаконов T-75 см² с помощью 0,25% раствора трипсина (Thermo Fisher Scientific, США). Клетки отмывали от трипсина с помощью среды DMEM (Thermo Fisher Scientific, США), дополненной 10% FBS (HyMedia, Индия), и центрифугировали в течение 5 мин при 200 g. Затем клетки переносили в планшет AggreWell800™ (STEMCELL Technology, Канада) в плотности от 900 000 до 3 млн клеток на лунку и культивировали в среде DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, США), дополненной 10% FBS (HyMedia, Индия) и 10 мкМ ингибитором Rho киназы Y27632 (Miltenyi Biotec, Германия), внося 2 мл полной среды на лунку.

Клетки культивировали на планшете AggreWell800™ от 12 до 24 ч. После периода инкубации сфероиды собирали из лунок с помощью серологической пипетки объемом 5 мл и переносили в пробирку объемом 15 мл. Давали им осесть на дно пробирки в течение 2–3 мин, после чего надосадочную жидкость отбрасывали. Затем сфероиды помещали в свежеразмороженный неразбавленный матригель (BD, США). Через 30 мин сфероиды отмывали путем пассивного отстаивания в пробирке объемом 15 мл или осторожного центрифугирования в течение одной мин при 300 об/мин. После этого сфероиды переносили в самодельные мини-биореакторы, которые являлись низкоадгезионными чашками Петри с каплей клея в центре. Подробный протокол создания мини-биореакторов описан в предыдущем исследовании [21]. Мини-биореакторы помещали на орбитальный шейкер в CO₂-инкубатор. Скорость вращения была установлена на 70–75 об/мин. Через 24 ч среду заменяли. После этого среду меняли еженедельно. После переноса в биореакторы сфероиды культивировали в течение 2 недель.

Количественная полимеразная цепная реакция (кПЦР)

Для оценки экспрессии хондрогенных маркеров проводили количественную полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией по описанному ранее протоколу [22].

Для лизиса клеток в монослойных культурах и сфероидов использовали RLT-буфер (QIAGEN, Германия), дополненный 10 мкл/мл β -меркаптоэтанолом. Сфероиды (по 3–5 штук, в зависимости от размера) и монослойные клеточные культуры пипетировали в 600 мкл RLT для лизирования. Для выделения РНК использовали набор RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN, Германия), а для очистки от геномной ДНК — раствор ДНКзы («СибЭнзим», Россия). Синтез первой нити кДНК проводили с использованием набора MMLV RT kit (Evrogen, Россия) по протоколу производителя. Для проведения кПЦР готовили реакционную смесь: 5 мкл 5× qPCRmix-HS SYBR (Evrogen, Россия), 0,8 мкл 10 мкМ смеси праймеров, 18,2 мкл воды, затем добавляли 1 мкл матрицы кДНК в лунки 96-луночного планшета (Sibio, США). Амплификацию осуществляли на термоблокере CFX96 (Bio-Rad, США) при 39 циклах. В качестве отрицательного контроля использовали кДНК образцов ИПСК для оценки специфичности реакции. Анализ результатов проводили в программе Microsoft Excel с использованием метода $\Delta\Delta C_t$.

Измерение содержания гликозаминогликанов с помощью ИФА

Содержание ГАГ в образцах 2D- и 3D-культуры хондроцитов определяли с помощью набора Human GAG ELISA Kit (FineTest, Китай). Во время культивирования хондроцитов для анализа отбирали аликвоты среды. Образцы хранили при температуре –80 °С. Каждый анализ биологического образца состоял из двух технических повторов. Оптическая плотность измерялась при длине волны 450 нм с помощью ридера Tecan Infinity 200Pro. Стандартная кривая была сформирована в программе Curve Expert Basic путем построения графика зависимости оптической плотности при $\lambda = 450$ нм каждого стандартного раствора от его соответствующей концентрации. Целевая концентрация образцов интерполировалась из этой стандартной кривой.

Для проведения ИФА образцов 2D-культуры клеток брали от 200 000 до 500 000 клеток хондроцитов, хондроцитоподобных производных чПСК и 1,5 млн клеток чПСК. Для проведения ИФА образцов 3D-культур клеток брали 700 000 клеток сфероидов хондроцитов, от 375 000 до 1 млн клеток сфероидов хондроцитоподобных производных чПСК и 1 млн клеток сфероидов чПСК. Для обработки данных значения, полученные для каждого образца, были нормализованы в зависимости от объема среды, в которой культивировались хондроциты, и количества клеток.

Сбор образцов для ЖХ-МС/МС

Хондроциты и хондроцитоподобные производные из чПСК использовали для создания хондрогенных мультислоев (2D-хрящеподобных структур) и 3D-сфероидов с помощью микролуночных планшетов AggreWell 800™ (STEMCELL Technology, Канада). Кроме того, 2D- и 3D-хрящеподобные структуры были получены из первичных культур хондроцитов, выделенных из донорских биологических материалов пациентов. Образцы клеточных культур и 3D-структур подвергали трипсинолизу, проводили жидкостную хроматографию с использованием системы Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, США), а затем масс-спектрометрический анализ с использованием системы Orbitrap Q Exactive HF-X (Thermo Fisher Scientific, США).

Для проведения ЖХ-МС/МС брали по 1 млн клеток для анализа 2D-культур и по 10 сфероидов при анализе 3D-клеточных культур. Перед анализом монослойные культуры предварительно трижды промывали фосфатным буфером для удаления культуральной среды, затем отделяли от культуральной посуды с помощью раствора Версена. После промывки центрифугированием надосадочную жидкость удаляли, а клетки замораживали при -70°C до анализа. 3D-структуры аналогичным образом промывали фосфатным буфером три раза путем пассивной седиментации. Затем осадок подвергался последней процедуре промывки перед замораживанием. После седиментации осадок переносили для анализа белкового состава методом ЖХ-МС/МС.

Анализ состава ГАГ с помощью ЖХ-МС/МС

Для разрушения клеточных структур и выделения белков в образцы добавляли 10% раствор дезоксихолата натрия, доводя его до финальной концентрации 1%. Затем вносили смесь нуклеаз для деградации нуклеиновых кислот и инкубировали при 4°C в течение 30 мин. Далее для восстановления и алкилирования дисульфидных связей к раствору добавляли трис(2-карбоксиэтил)фосфин (5 mM) и хлорацетамид (30 mM), после чего инкубировали при 80°C на протяжении 10 мин. Белки осаждали метанол-хлороформом, полученные осадки ресуспендировали в 100 мкл буфера Tris-HCl (50 mM, pH 8,5), после этого определяли концентрацию белков с помощью BCA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Ферментативное расщепление белков проводили трипсином (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega, США) в соотношении трипсин:белок 1:50 (% w/w), выдерживая образцы при 37°C в течение 16 ч. Прекращение протеолиза осуществляли добавлением трифторуксусной кислоты до концентрации 1%. Затем пептиды высушивали с помощью вакуумного концентрирования (SpeedVac, Thermo Fisher Scientific, США) и растворяли в 20 мкл раствора, содержащего 3% ацетонитрила и 0,1% трифторуксусной кислоты в воде сверхвысокой очистки (mQ). Вслед за этим определяли концентрацию пептидов, используя колоритмический метод определения концентрации белка с помощью бичинхониновой кислоты (BCA-анализ).

Для жидкостной хроматографии использовали систему нано-ЖХ Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, США) с колонкой PicoTips C-18 (длина 10 см, внутренний диаметр 75 мкм, New Objective, США), заполненную сорбентом Kinetex C18 (2,4 мкм, Phenomenex, Torrance, США). Поток устанавливали на уровне 300 нл/мин при 60°C . Буфер А состоял из 0,1% муравьиной кислоты в воде класса LC/MS, а буфер В — из 80% ацетонитрила, 0,1% муравьиной кислоты в воде класса LC/MS. Разделение проводили в градиентном режиме, увеличивая концентрацию буфера В от 3 до 40% в течение 120 мин. Масс-спектрометрический анализ производили на приборе Orbitrap Q Exactive HF-X (Thermo Fisher Scientific, США) с нанораспылительным источником (напряжение +2,2 кВ, температура капилляра 300°C). Сканирование MS1 осуществляли в диапазоне 350–1500 m/z (разрешение 60 000, AGC 3e6, время инъекции 45 мс). Для фрагментации использовали HCD с энергией 30 эВ. Сканирование MS2 выполняли в диапазоне 200–2000 m/z (разрешение 30 000, AGC 2e5, время инъекции 50 мс). Применяли стратегию dd-MS2 с выбором 12 наиболее интенсивных ионов (Top12).

Анализ данных ЖХ-МС/МС

Необработанные данные ЖХ-МС/МС, полученные на масс-спектрометре Orbitrap, были преобразованы в данные формата mgf с помощью программы MSConvert со следующими параметрами командной строки: «--mgf --filterpeakPicking true». Для комплексной идентификации белков полученные результаты обрабатывали с помощью MASCOT и X! Tandem. Показатели тандемной масс-спектрометрии анализировали по базе данных белковых последовательностей UniProt Knowledgebase (таксон человека) с использованием алгоритма ALANINE с допустимой ошибкой 20 ppm для определения массы предшественника и 50 ppm для определения массы фрагмента. Параметры поиска были заданы следующим образом: гидролиз белка трипсином с одним возможным пропущенным сайтом расщепления, постоянная карбамидометилирующая модификация (C) и переменная окислительная модификация (M). Для сравнения результатов идентификации, полученных с помощью MASCOT и X! Tandem, и составления окончательного списка идентифицированных белков результаты обоих алгоритмов идентификации были проанализированы в программе Scaffold 5. Этот алгоритм оценивал локальную частоту ложноположительных идентификаций с использованием стандартной группировки белков в рамках всего эксперимента. Для оценки погрешности идентификации пептидов и белков был выбран пороговый уровень ложной идентификации менее 5%. Дифференциальную экспрессию генов идентифицировали с помощью пакета языка программирования R limma.

Статистический анализ

Статистический анализ данных кПЦР, ИФА, ЖХ-МС/МС выполняли с помощью программы Biorender. Для оценки различий между группами использовали непараметрический тест Краскела — Уоллиса, который применяется для независимых выборок, данные в которых не имели нормального распределения. В случае выявления статистически значимого различия ($p < 0,05$) дополнительно проводили тест множественных сравнений Данна для парных сравнений между группами, что позволило скорректировать вероятность ложноположительных результатов. Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$, при этом для обозначения уровней значимости использовали следующие символы: * ($p < 0,05$), Δ ($p < 0,01$), $\circ$ ($p < 0,001$). Для анализа данных кПЦР использовали *t*-тест Уэлча, учитывающий различия в стандартных отклонениях между двумя группами независимых выборок. Различия считали достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ экспрессии хондроцитарных генов

Метод кПЦР был использован для подтверждения идентичности клеточных культур хондроцитов и хондроцитов, полученных из ЧПСК, путем анализа экспрессии ключевых молекулярных маркеров, характерных для зрелых клеток хрящевой ткани.

Результаты кПЦР подтвердили, что клеточные культуры нативных хондроцитов проявляют высокую экспрессию специфических маркеров, таких как агрекан

(ACAN), коллаген II типа (*COL2A1*) и транскрипционный фактор SOX9, который является ключевым регулятором хондрогенеза (рис. 1). На графике представлены значения относительной экспрессии ключевых хондроцитарных генов в клеточных культурах нативных хондроцитов и хондроцитов, полученных из чПСК. Для нормализации уровней экспрессии использован референсный ген *YWHAZ*. Столбцы на графике отражают средние значения относительной нормализованной экспрессии генов ($\Delta\Delta Ct$) с указанием стандартного отклонения (SD). Достоверных различий, проанализированных с помощью t-теста Уэлча, между образцами нативных хондроцитов и хондроцитоподобных производных чПСК обнаружено не было. Высокий уровень экспрессии хондроцитарных генов указывает на функциональную зрелость клеточных культур нативных хондроцитов. Хондроциты, полученные из чПСК, также показали выраженную экспрессию данных маркеров, что свидетельствует о высокой степени их дифференцировки в хрящевые клетки, аналогичные нативным хондроцитам.

Количественное определение ГАГ в хондроцитах различного происхождения с помощью ИФА

Количественный анализ ГАГ с помощью ИФА выявил, что содержание данных биополимеров значительно выше в 3D-культурах хондроцитов по сравнению с 2D-культурами. В частности, концентрация ГАГ в 3D-культурах нативных хондроцитов до-

стигала 1099,87 нг/мл, что значительно превышало уровень, зафиксированный в 2D-культурах (108,67 нг/мл). Аналогичная тенденция наблюдалась и в культурах хондроцитов, полученных из чПСК, однако содержание ГАГ оставалось ниже по сравнению с нативными хондроцитами, что может свидетельствовать о необходимости дополнительной оптимизации условий дифференцировки и удлинения срока культивирования; соответствующие данные представлены на рисунке 2.

Феномен дедифференцировки хондроцитов в двумерных условиях хорошо документирован [23, 24]. Было показано, что культивирование сфероидов хондроцитов в трехмерных средах усиливает процесс хондрогенной дифференцировки, позволяя получать хондрогенные клеточные конструкции без необходимости в использовании скаффолда или многократного пассирования клеток [25, 26]. Однако количественная оценка ГАГ в данном контексте не приводилась.

Анализ состава ГАГов в культурах клеток хондроцитов различного генеза

ЖХ-МС/МС-анализ позволил детально исследовать состав внеклеточного матрикса. Основным компонентом гликозаминогликанов (ГАГ) оказался хондроитинсульфат-протеогликан 4, уровень которого был значительно выше в 3D-культурах нативных хондроцитов, что свидетельствует о благоприятных условиях для продукции ключевых компонентов хрящевого матрикса. В то же время содержание

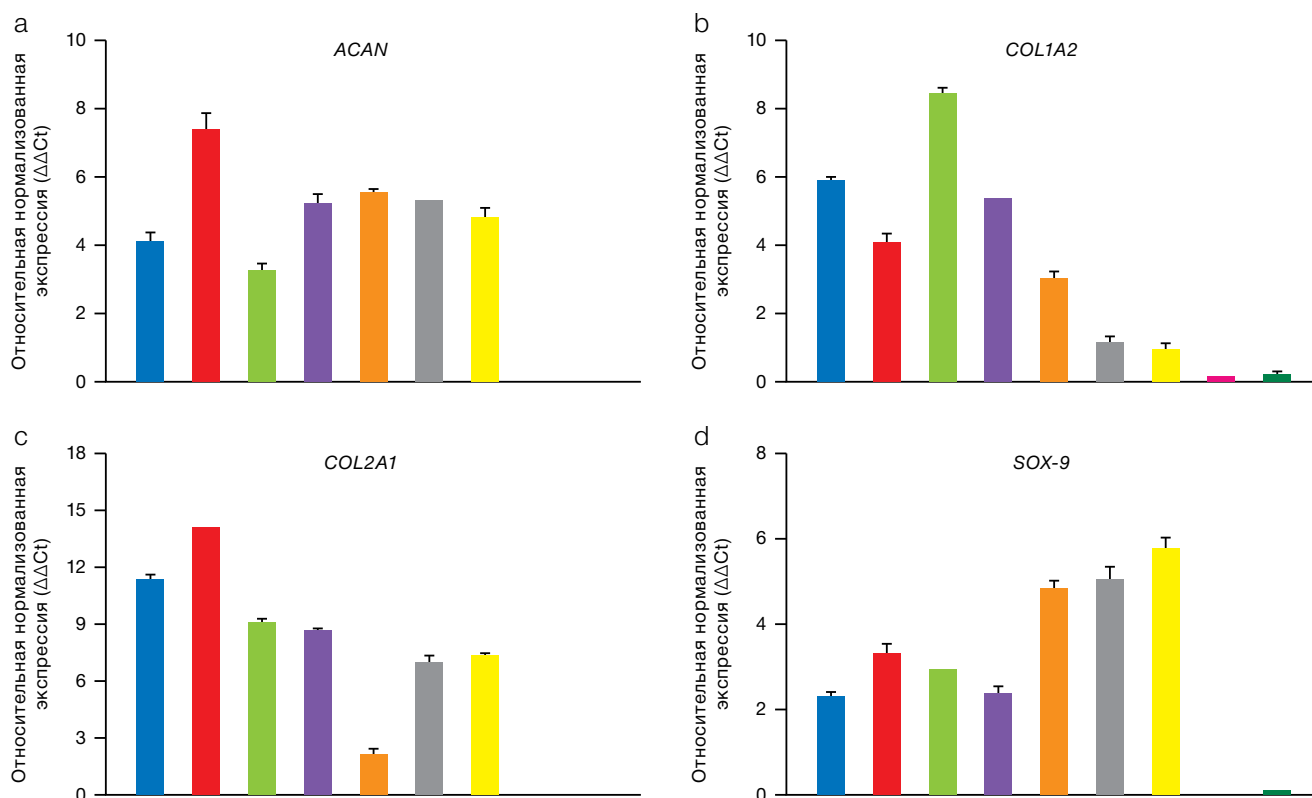


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 1. Относительная экспрессия хондроцитарных генов ($\Delta\Delta Ct$), нормированная на ген *YWHAZ*, в 2D-образцах культур хондроцитов различного происхождения, измеренная методом кПЦР

Примечание: а. Аггрекан (*ACAN*); б. Альфа-2 цепь коллагена I типа (*COL1A2*); в. Альфа-1 цепь коллагена II типа (*COL2A1*); д. Транскрипционный фактор SOX-9; соответствие цветов на схеме исследуемым образцам: синий — хондроциты пациента 76; красный — хондроциты пациента 75; зеленый — хондроциты пациента 47; фиолетовый — хондроциты пациента 44; коричневый — хондроциты пациента 12; серый — хондроцитоподобные клетки, дифференцированные из чПСК IPSRG4SΔb2m cl55/1; желтый — хондроцитоподобные клетки, дифференцированные из чПСК IPSRG4S; пурпурный — чПСК IPSRG4SΔb2m cl55/1; темно-зеленый — чПСК IPSRG4S.

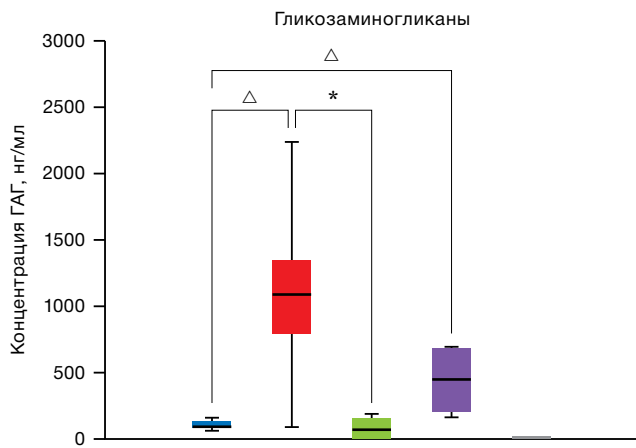


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 2. Результаты количественного определения ГАГ методом ИФА в культурах хондроцитов при 2D- и 3D-условиях

Примечание: соответствие цветов на схеме исследуемым образцам: синий — 2D-культуры хондроцитов пациентов ($n = 5$); красный — 3D-культуры хондроцитов пациентов ($n = 2$); зеленый — 2D-культуры хондроцитов пациентов, дифференцированных из чПСК ($n = 2$); фиолетовый — 2D-культуры хондроцитов пациентов, дифференцированных из чПСК ($n = 2$); серый — контрольная группа чПСК ($n = 2$); уровень экспрессии ГАГ в культурах чПСК равен нулю; уровни статистической значимости по сравнению с группой контроля: * — $p < 0,0332$; Δ — $p < 0,0021$.

других протеогликанов, таких как агрекан, бигликан и декорин, оставалось без значительных изменений.

Рисунок 3 представляет результаты анализа состава ГАГ, синтезируемых в культурах хондроцитов различного генеза, с использованием метода ЖХ-МС/МС. График отображает количественное содержание различных типов ГАГ, включая хондроитинсульфат-протеогликан 4, агрекан, бигликан и декорин, в 2D- и 3D-культурах нативных хондроцитов и хондроцитов, полученных из чПСК. Данные представлены в виде средних значений с указанием стандартного отклонения (SD). Значимые различия между группами оценены с помощью статистических критериев.

Состав ГАГ, определенный с помощью ЖХ-МС/МС, показал повышенный уровень их содержания в 3D-культурах нативных хондроцитов по сравнению с 2D-культурами (рис. 3). Сфероиды хондроцитов, полученные из биоптатов тканей пациентов, демонстрировали значительно более высокую концентрацию хондроитинсульфат-протеогликана 4, в то время как трехмерные культуры хондроцитоподобных производных чПСК имели низкий уровень всех исследованных ГАГ, что указывает на их незрелость даже после дифференцировки. Это ограничение можно потенциально устранить путем продления периода культивирования и дополнения среды факторами, стимулирующими метаболические пути синтеза ГАГ, такими как TGF- β , SOX9, костные морфогенетические белки и сигнальные пути ретиноевой кислоты.

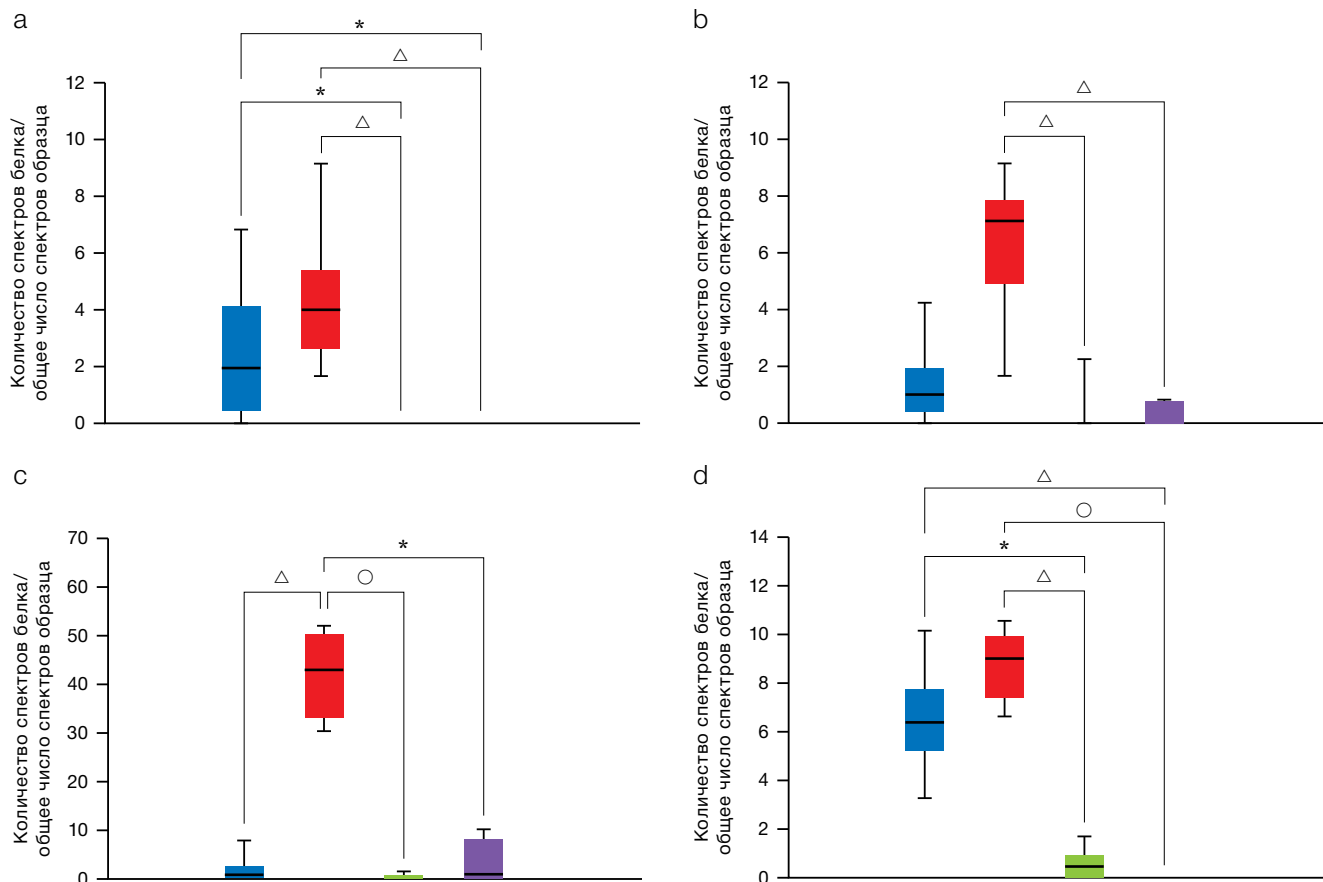


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 3. Результаты анализа состава ГАГ методом ЖХ-МС/МС

Примечание: а. Агрекан; б. Бигликан; в. Хондроитинсульфат-протеогликан 4; д. Декорин; соответствие цветов на схеме исследуемым образцам: синий — 2D-культуры хондроцитов пациентов ($n = 5$); красный — 3D-культуры хондроцитов пациентов ($n = 5$); зеленый — 2D-культуры хондроцитов пациентов, дифференцированных из чПСК ($n = 2$); фиолетовый — 2D-культуры хондроцитов пациентов, дифференцированных из чПСК ($n = 2$); серый — контрольная группа чПСК ($n = 1$); уровень экспрессии протеогликанов в культурах чПСК равен нулю; уровни статистической значимости по сравнению с контрольной группой чПСК: * — $p < 0,0332$; Δ — $p < 0,0021$; $\circ$ — $p < 0,0001$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашем исследовании был определен состав ГАГ, синтезируемых *in vitro* хондроцитами различного генеза, с использованием ИФА и ЖХ-МС/МС, а также оценено влияние 2D- и 3D-культивирования на их синтез. Результаты показали, что 3D-среда культивирования создает условия, способствующие более полноценному формированию хондроцитарного ВКМ в образцах нативных хондроцитов. Однако, несмотря на это,

полученные сфероиды хондроцитоподобных производных ЧПСК не достигают функциональной идентичности с естественной хрящевой тканью даже после завершения протоколов дифференцировки и не представляют собой идеальные тканеинженерные конструкции для коррекции дефектов хряща. Возможно, для более полноценного созревания ВКМ и повышения их потенциальной эффективности в роли конструкций для тканевой инженерии требуется более длительное культивирование в 3D-условиях.

Литература / References

- GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2020;396(10258):1204–22. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30925-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30925-9)
- Carey JL, Remmers AE, Flanagan DC. Use of MACI (autologous cultured chondrocytes on porcine collagen membrane) in the United States: preliminary experience. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*. 2020;8(8):e2325967120941816. <https://doi.org/10.1177/2325967120941816>
- Dekker TJ, Aman ZS, DePhillipo NN, Dickens JF, Anz AW, LaPrade RF. Chondral Lesions of the Knee: An evidence-based approach. *Journal of Bone And Joint Surgery*. 2021;103(7):629–45. <https://doi.org/10.2106/JBJS.20.01161>
- Ali E, Smaida R, Meyer M, Ou W, Li Z, Han Z, et al. iPSCs chondrogenic differentiation for personalized regenerative medicine: a literature review. *Stem Cell Res Ther*. 2024;15(1):e185. <https://doi.org/10.1186/s13287-024-03794-1>
- Li M, Xiao R, Li J, Zhu Q. Regenerative approaches for cartilage repair in the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2017;25(10):1577–87. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2017.07.004>
- Szirmai JA, ed. The concept of the chondron as a biomechanical unit. In: F. Hartmann. *Biopolymere und Biomechanik von Bindegewebsystemen*. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin; 1974. https://doi.org/10.1007/978-3-642-65963-8_9
- Wang Q, El Haj A, Kuiper N. Glycosaminoglycans in the pericellular matrix of chondrons and chondrocytes. *J Anat*. 2008;213(3):266–73. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.00942.x>
- Sophia Fox J, Bedi A, Rodeo S. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health*. 2009;1(6):461–8. <https://doi.org/10.1177/1941738109350438>
- Roughley PJ, Mort JS. The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage. *J exp ortop*. 2014;1:e8. <https://doi.org/10.1186/s40634-014-0008-7>
- Han B, Li Q, Wang C, Chandrasekaran P, Zhou Y, Qin L, et al. Differentiated activities of decorin and biglycan in the progression of post-traumatic osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2021;29(8):1181–92. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2021.03.019>
- Tang F, Lord MS, Stallcup WB, Whitelock JM. Cell surface chondroitin sulphate proteoglycan 4 (CSPG4) binds to the basement membrane heparan sulphate proteoglycan, perlecan, and is involved in cell adhesion. *J Biochem*. 2018;163(5):399–412. <https://doi.org/10.1093/jb/mvy008>
- Lee G, Loeser R. Interactions of the chondrocyte with its pericellular matrix. *Cells Mater*. 1998;8:135–49.
- Vonk L, Roël G, Hernigou J, Kaps C, Hernigou P. Role of Matrix-Associated Autologous Chondrocyte Implantation with Spheroids in the Treatment of Large Chondral Defects in the Knee: A Systematic Review. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13):e7149. <https://doi.org/10.3390/ijms22137149>
- Pittinen J, Ylärinne J, Piltti J, Karhula S, Rieppo L, Ojanen S, et al. Effect of centrifugal force on the development of articular neocartilage with bovine primary chondrocytes. *Cell Tissue Res*. 2019;375(3):629–39. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2938-3>
- Caron MM, Emans PJ, Coolsen MM, Voss L, Surtel DA, Cremers A, et al. Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20(10):1170–8. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.06.016>
- Исследование состава гликозаминогликанов, синтезируемых хондроцитами различного генеза *in vitro*. Тезисы докладов 77-й Международной школы-конференции молодых ученых «БИОСИСТЕМЫ: организация, поведение, управление». Нижний Новгород; 2024. Study of the composition of glycosaminoglycans synthesized by chondrocytes of different origins *in vitro*. Abstracts of the 77th International School-Conference of Young Scientists «BIOSYSTEMS: Organization, Behavior, Control». Nizhny Novgorod; 2024 (In Russ.). EDN: QQPJWI
- Hu J, Athanasios K. Chondrocytes from different zones exhibit characteristic differences in high density culture. *Connect Tissue Res*. 2006;47(3):133–40. <https://doi.org/10.1080/03008200600685392>
- Bekkers J, Saris D, Tsuchida A, van Rijen M, Dhert W, Creemers L. Chondrogenic potential of articular chondrocytes depends on their original location. *Tissue Eng*. 2024;20(3–4):663–71. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2012.0673>
- Sodhi H, Panitch A. Glycosaminoglycans in Tissue Engineering: A Review. *Biomolecules*. 2021;11(1):e29. <https://doi.org/10.3390/biom11010029>
- Holmqvist S, Lehtonen S, Chumarina M, Puttonen K, Azevedo C, Lebedeva O, et al. Creation of a library of induced pluripotent stem cells from Parkinsonian patients. *NPJ Parkinsons Dis*. 2016;2:e16009. <https://doi.org/10.1038/npjparkd.2016.9>
- Eremeev A, Belikova L, Ruchko E, Volovikov E., Zubkova O., Emelin A., et al. Brain Organoid Generation from Induced Pluripotent Stem Cells in Home-Made Mini Bioreactors. *J Vis Exp*. 2021;178:e62987. <https://doi.org/10.3791/62987>
- Барина АА, Пикина АС, Голубинская ПА, Ручко ЕС, Еремеев АВ. *In vitro* оценка иммуногенности хондроцитов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток с нокаутом В2М. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2024;26(1):32–42. Barinova AA, Pikina AS, Golubinskaya PA, Ruchko ES, Yermeyev AV. *In vitro* assessment of the immunogenicity of chondrocytes derived from B2M knockout-induced pluripotent stem cells. *Extreme Medicine*. 2024;26(1):32–42 (In Russ.). <https://doi.org/10.47183/mes.2024.001>
- Yishan C, Yu Y, Wen Y, Chen J, Lin J, Sheng Z, et al. A high-resolution route map reveals distinct stages of chondrocyte dedifferentiation for cartilage regeneration. *Bone Res*. 2022;10:e38 <https://doi.org/10.1038/s41413-022-00209-w>
- Ma B, Leijten JC, Wu L, Kip M, van Blitterswijk CA, Post JN, Karperien M. Gene expression profiling of dedifferentiated human articular chondrocytes in monolayer culture. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2013;21(4):599–603. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2013.01.014>

25. Vakhrushev IV, Basok YB, Baskaev KK, Novikova VD, Leonov GE, Grigoriev AM, et al. Cartilage-Specific Gene Expression and Extracellular Matrix Deposition in the Course of Mesenchymal Stromal Cell Chondrogenic Differentiation in 3D Spheroid Culture. *Int. J. Mol. Sci.* 2024;25:e5695. <https://doi.org/10.3390/ijms25115695>
26. Yen BL, Hsieh CC, Hsu PJ, Chang CC, Wang LT, Yen ML. Three-Dimensional Spheroid Culture of Human Mesenchymal Stem Cells: Offering Therapeutic Advantages and *In Vitro* Glimpses of the *In Vivo* State. *Stem Cells Translational Medicine*. 2023;12(5):235–44. <https://doi.org/10.1093/stcltm/szad011>

Вклад авторов: все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад в подготовку и написание статьи распределен следующим образом: П.А. Голубинская — получение и культивирование первичных культур хондроцитов, подготовка образцов клеток для анализа, сбор и анализ литературных источников, написание текста и редактирование статьи; Е.С. Ручко — дифференцировка ЧПСК в хондроцитарном направлении, сбор и анализ литературных источников, написание текста и редактирование статьи; А.С. Пикина — получение и культивирование сфероидов, подготовка образцов клеток для анализа, написание текста и редактирование статьи; И.П. Смирнов — проведение масс-спектрометрического определения белкового состава образцов, написание текста статьи; Т.В. Владимирова — постановка и анализ ИФА, написание текста статьи; В.Д. Гордеева — анализ данных ЖХ-МС/МС, написание текста и редактирование статьи; Г.П. Арапиди — анализ данных ЖХ-МС/МС, сбор и анализ литературных источников, написание текста; А.В. Еремеев — создание дизайна экспериментов, руководство направлением исследования, написание текста и редактирование статьи, утверждение окончательной версии статьи.

ОБ АВТОРАХ

Голубинская Полина Александровна, канд. мед. наук
<https://orcid.org/0000-0002-7414-7326>
polinapigeon@gmail.com

Ручко Евгений Сергеевич
<https://orcid.org/0000-0002-1361-666X>
ruchkoevgeny@yandex.ru

Пикина Арина Сергеевна
<https://orcid.org/0000-0002-8967-2318>
arina.pikina@yandex.ru

Смирнов Игорь Павлович, канд. хим. наук
<https://orcid.org/0000-0003-0402-3392>
smirnov_i@hotmail.com

Владимирова Татьяна Викторовна
<https://orcid.org/0009-0001-9266-2065>
tat.vlad24@gmail.com

Гордеева Вероника Дмитриевна, канд. биол. наук
<https://orcid.org/0000-0001-8904-8235>
gordeeva.veronika@phystech.edu

Арапиди Георгий Павлович, канд. биол. наук
<https://orcid.org/0000-0003-2323-1859>
arapidi@gmail.com

Еремеев Артем Валерьевич, канд. биол. наук
<https://orcid.org/0000-0002-3428-7586>
art-eremeev@yandex.ru

<https://doi.org/10.47183/mes.2025-257>

УДК 543.645: 616.931



ЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЯ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ Eu^{3+} ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ ТОКСИНОВ

С.П. Ярков[✉], С.И. Третьяков, И.В. Шиленко, Е.К. Шаулина, А. Мандажи, Д.А. Зенков, Ю.Н. Ишков, К.К. Стяжкин

Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения, Москва, Россия

Введение. Повышение чувствительности иммунохроматографического анализа как одного из экспресс-методов индикации и диагностики патогенных микроорганизмов и токсинов актуально для пищевой безопасности и здравоохранения в целом.

Цель. Разработка экспериментального образца видеорецифрового регистратора люминесцентных иммунохроматограмм РЛИ- Eu^{3+} и адаптированных к прибору люминесцентных иммунохроматографических тестов (ЛИХТ) на основе микросфер с соединениями европия, сравнение чувствительности ЛИХТ с ИХА-тестами на основе наночастиц коллоидного золота (НКЗ) для увеличения чувствительности метода и выявления патогенных микроорганизмов и их токсинов.

Материалы и методы. В качестве люминесцентной метки для иммунохроматографии использовали субмикронные полимерные микросферы, меченные органическими комплексами трехвалентного европия (Eu^{3+}), ЛИХТ регистрировали с помощью разработанного прибора-регистратора РЛИ- Eu^{3+} .

Результаты. Показано, что порог обнаружения люминесцирующего комплекса Eu^{3+} на иммунохроматографической мембране равен 2 пг/мм², линейность показаний наблюдается в диапазоне 2–200 пг/мм². Коэффициенты вариации показаний прибора в диапазоне концентраций люминесцирующего комплекса 20–200 пг/мм² составляют < 5%, в диапазоне 2–20 пг/мм² — менее 10%. С использованием ЛИХТ и прибора РЛИ- Eu^{3+} определены следующие пороги обнаружения: холерного токсина — 10 нг/мл, стафилококкового энтеротоксина типа В — 0,5 нг/мл, клеток возбудителя чумы — 1×10^3 м.к./мл, спор возбудителя сибирской язвы — 5×10^3 спор/мл, антигенов вируса Конго-Крымской геморрагической лихорадки (ККГЛ) — в разведении 1:640 000.

Выводы. Разработанный видеорецифровый регистратор РЛИ- Eu^{3+} и ЛИХТ на основе комплексов европия позволили снизить в 20–128 раз порог обнаружения патогенных микроорганизмов и бактериальных токсинов по сравнению с иммунохроматографическими тестами на основе НКЗ для тех же патогенов.

Ключевые слова: люминесцентная иммунохроматография; видеорецифровая регистрация результатов; субмикронные полимерные частицы с комплексами европия; холерный токсин; стафилококковый энтеротоксин типа В; клетки возбудителя чумы; споры возбудителя сибирской язвы; антигены вируса ККГЛ

Для цитирования: Ярков С.П., Третьяков С.И., Шиленко И.В., Шаулина Е.К., Мандажи А., Зенков Д.А., Ишков Ю.Н., Стяжкин К.К. Люминесцентная иммунохроматография на основе комплексных соединений Eu^{3+} для выявления патогенных микроорганизмов и бактериальных токсинов. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2025;27(1):107–114. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-257>

Соответствие принципам этики: в исследовании не принимали участие пациенты и лабораторные животные, поэтому исследование не требует представления заключения комитета по биомедицинской этике.

Финансирование: исследование выполнено без спонсорской поддержки.

Потенциальный конфликт интересов: К.К. Стяжкин является членом редакционной коллегии журнала «Медицина экстремальных ситуаций». Остальные авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов.

✉ Ярков Сергей Петрович diasol@dol.ru

Статья поступила: 29.10.2024 После доработки: 11.12.2024 Принята к публикации: 24.12.2024 Online first: 19.02.2025

LUMINESCENT IMMUNOCHROMATOGRAPHY BASED ON Eu^{3+} COORDINATION COMPOUNDS FOR DETECTION OF PATHOGENIC MICROORGANISMS AND BACTERIAL TOXINS

Sergey P. Yarkov[✉], Sergey I. Tretyakov, Inessa V. Shilenko, Ekaterina K. Shaulina, Angelina Mandaji, Denis A. Zenkov, Yuri N. Ishkov, Konstantin K. Styazhkin

State Scientific Research Institute of Biological Instrumentation, Moscow, Russia

Introduction. Increasing the sensitivity of immunochromatographic assay as an express method for detection and diagnosis of pathogenic microorganisms and toxins is a relevant task with regard to ensuring food safety and population health in general.

Objective. Development of a prototype of a video digital recorder of luminescent immunochromatograms (RLI- Eu^{3+}) and luminescent immunochromatographic tests (LICHT) adapted to a device based on microspheres with europium compounds. Comparison of the sensitivity of LICHT and AuNPs-based immunochromatography assay (ICA) tests to increase the sensitivity of the method for detection of pathogenic microorganisms and their toxins.

Material and methods. Submicron polymer microspheres labeled with organic complexes of trivalent europium (Eu^{3+}) were used as a luminescent label for immunochromatography. LICHT were recorded using the developed RLI- Eu^{3+} recorder.

Results. The detection threshold of the Eu^{3+} luminescent complex on the immunochromatographic membrane was shown to be 2 pg/mm², with the linearity of the readings ranging within 2–200 pg/mm². The coefficients of variation of the instrument readings in the luminescent complex concentration range of 20–200 pg/mm² and 2–20 pg/mm² were found to be less than 5% and 10%, respectively. Using LICHT and the RLI- Eu^{3+} device, detection thresholds were determined as follows: cholera toxin — 10 ng/mL, staphylococcal enterotoxin type B — 0.5 ng/mL, plague pathogen cells — 1×10^3 cells/mL, anthrax pathogen spores — 5×10^3 spores/mL, Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) virus antigens — at a dilution of 1:640,000.

Conclusions. The developed video digital recorder RLI- Eu^{3+} and LICHT based on europium coordination compounds enabled the detection threshold of pathogenic microorganisms and bacterial toxins to be reduced by 20–128 times compared to immunochromatographic tests based on colloidal gold (CG) for the same pathogens.

Keywords: luminescent immunochromatography; video digital recording; submicron polymer particles with europium complexes; cholera toxin; staphylococcal enterotoxin type B; plague pathogen cells; anthrax pathogen spores; CCHF virus antigens

© С.П. Ярков, С.И. Третьяков, И.В. Шиленко, Е.К. Шаулина, А. Мандажи, Д.А. Зенков, Ю.Н. Ишков, К.К. Стяжкин, 2025

For citation: Yarkov S.P., Tretyakov S.I., Shilenko I.V., Shaulina E.K., Mandaji A., Zenkov D.A., Ishkov Y.N., Styazhkin K.K. Luminescent immunochromatography based on Eu^{3+} coordination compounds for detection of pathogenic microorganisms and bacterial toxins. *Extreme Medicine*. 2025;27(1):107–114. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-257>

Compliance with ethical principles: patients and laboratory animals did not participate in the study, so the study does not require an approval from the biomedical ethics committee.

Funding: this work was carried out without sponsorship.

Potential conflict of interest: K.K. Styazhkin is a member of the Editorial Board of *Extreme Medicine*. The other authors declare no potential conflict of interest.

✉ Sergey P. Yarkov diasol@dol.ru

Received: 29 Oct. 2024 **Revised:** 11 Dec. 2024 **Accepted:** 24 Dec. 2024 **Online first:** 19 Feb. 2025

ВВЕДЕНИЕ

Иммунохроматографический анализ в различных его вариантах широко распространен для проведения экспресс-анализов в клинической лабораторной диагностике при контроле пищевых продуктов, мониторинге объектов окружающей среды для выявления патогенных микроорганизмов и токсинов.

Люминесцентный иммунохроматографический анализ (ЛИХА) является распространенным методом экспресс-диагностики (например, специфических антител к вирусу ящура в сыворотке крови [1]), в котором люминесцентные частицы используются для маркировки антител. Концентрация кардиомаккеров в крови методом люминесцентного иммунохроматографического анализа количественно определяется путем анализа интенсивности люминесценции тест-полоски [2, 3]. Преимуществами этого метода являются высокая воспроизводимость результатов, чувствительность, помехозащищенность со стороны естественной флуоресценции исследуемой пробы. ЛИХА широко используется в области безопасности пищевых продуктов [4, 5] и мониторинга окружающей среды [6].

Прирост чувствительности, достигнутый в ЛИХА, по сравнению с традиционными метками иммунохроматографии — наночастицами коллоидного золота (НКЗ) — составляет один-два порядка [7, 8]. Сравнение флуоресцентных маркеров с метками на основе НКЗ и магнитных наночастиц в ИХА резюмируется в обзоре [9]. Среди люминесцентных маркеров, применяемых в ЛИХА, своими свойствами выделяются полимерные микросферы диаметром 0,1–0,3 мкм, поверхность которых содержит карбоксильные группы, что позволяет осуществлять ковалентную связь с рецепторными белками, например иммуноглобулинами различных классов. При получении микросфер в процессе полимеризации в состав реакционной массы вводят органические комплексы трехвалентного европия, например $\text{Eu}(\text{DBM})_3\text{Phen}$, (1,10-фенантролин)-три-(дибензоилметанат) европия; $\text{Eu}(\text{TTA})_3\text{Phen}$, (2,9-диметил-4,7-дифенил-1,10-фенантролин)-три-теноилтрифторацетонат европия в количестве не более 10% по массе [10]. Препараты таких микросфер поглощают свет в ближней ультрафиолетовой области при $\lambda_{\text{max}} = 365$ нм и флуоресцируют в красной области спектра при $\lambda_{\text{max}} = 615$ нм, обладая при этом узким эмиссионным пиком флуоресценции. Для регистрации люминесценции аналитической и контрольной зон иммунохроматограмм (АЗ, КЗ) используют полупроводниковые диоды, фотоэлектронные умножители, видеокамеры. Видеоцифровой метод регистрации

(ВЦР) результатов ИХА с различными метками имеет ряд преимуществ по сравнению с другими конструктивными решениями. ВЦР тестов на основе НКЗ, например, позволяет получить количественные данные о содержании токсинов в молочных продуктах [11].

Цель исследования — разработка экспериментального образца видеоцифрового регистратора люминесцентных иммунохроматограмм РЛИ- Eu^{3+} и адаптированных к прибору люминесцентных иммунохроматографических тестов (ЛИХТ) на основе микросфер с соединениями европия, сравнение чувствительности ЛИХТ с ИХА-тестами на основе НКЗ для увеличения чувствительности метода и выявления патогенных микроорганизмов и их токсинов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения конъюгатов использовали: моноклональные антитела (МКА) к В-субъединице холерного токсина (ХТ), клон 3D11 (ООО «Хайтест», Россия); МКА к капсульному F1 антигену возбудителя чумы; МКА к спорам возбудителя сибирской язвы, клон SA26; МКА к SEB, клон S222 (ОАО «ВНЦМДЛ», Россия); мышинные поликлональные иммуноглобулины к ККГЛ (ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). Для создания ЛИХТ и тестов на основе НКЗ использовали одни и те же партии и лоты препаратов антител.

В качестве анализируемых антигенов применяли паспортизованные препараты ХТ и SEB, инаktivированные микробные клетки *Y. pestis*, штамм EV, инаktivированные клетки *B. anthracis*, штамм 942 (ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора), паспортизованные сахарозо-ацетоновые антигены вируса ККГЛ, штамм 741, генотип Европа 1 (ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России).

Синтез конъюгатов антител с люминесцирующими микросферами осуществляли путем ковалентного связывания [12]. К 5 мкл суспензии люминесцирующих микросфер (1%, вес/объем) диспергировали в 1,0 мл MES-буфера (0,05 М, pH 6,0) и дополняли 10 мкл растворами EDC и NHS (0,5 мг/мл) для активации карбоксильных групп, содержащихся на их поверхности. Перемешивали и встряхивали на лабораторном вихревом встряхивателе Vortex-3000 (производитель Viggens, КНР) в течение 20 мин при комнатной температуре в темноте, затем центрифугировали на центрифуге Thermo Scientific SL 4R Plus (производитель Thermo Fisher Scientific, США) при $\times 9600$ g в течение 15 мин, супернатант отбрасывали. Осадок ресуспендировали в 1,0 мл фосфатного буфера (0,01 М, pH 7,4). Затем добавляли 100 мкл раствора антител в концентрации 0,2 мг/мл. Полученную смесь антител

и активированных люминесцирующих микросфер постоянно перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре в темноте. Затем добавляли 100 мкл блокирующего раствора (20% БСА), чтобы заблокировать сайты неспецифического связывания на поверхности люминесцирующих микросфер, и выдерживали 1 ч при комнатной температуре. Полученную суспензию центрифугировали при 8000 g в течение 15 мин, супернатант отбрасывали, а к осадку добавляли 200 мкл диспергирующего раствора, препятствующего агглютинации конъюгатов люминесцирующих микросфер с антителами между собой (0,02 M, TRIS-HCl), содержащего 0,5% (вес/объем) трегалозы, 10% (вес/объем) сахарозы, 0,5% поливинилпирролидона, 0,1% Tetronic 1307 (S9), 0,05% ProClin™ 300, 1% БСА и 0,1% Tween-20), и хранили при 4 °C до применения.

В качестве антител для формирования аналитической зоны ЛИХТ использовали: кроличьи поликлональные антитела к В-субъединице холерного токсина; МКА к капсальному F1 антигену возбудителя чумы, клон F41F8C9; МКА к спорам сибирской язвы, клон 278H4A7 (филиал ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, г. Киров); мышиные иммуноглобулины к антигенам ККГЛ (ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России); МКА к SEB S643 (производство ОАО «ВНЦМДЛ») в концентрации 2,0 мг/мл. Антителами контрольной зоны ЛИХТ служили козы анти-тела к иммуноглобулинам мыши и козы анти-тела к иммуноглобулинам кролика (ООО «Хайтест») в концентрации 0,1 мг/мл.

Для изготовления мультимембранного композита ЛИХТ использовали стекловолоконную мембрану GFCP001000 и целлюлозные мембраны CFSP203000 и CFSP173000 (Millipore), карточки с нитроцеллюлозной мембраной TYPE-CNPF-SN12-L2-P25, 10 µm Mdi (Индия). Готовые тест-полоски помещали в пластиковые оправы TYPE-Device-1 Mdi (Индия), верхнюю крышку которых покрывали матовой черной краской. Перед нанесением на стекловолоконную мембрану конъюгат микросфер с антителами обрабатывали ультразвуком на диспергаторе Labsonic 2000 (производство B. Braun, Германия) в течение 10 с, перемешивали, добавляли буфер хранения до концентрации 0,01%. Полученный конъюгат вручную наносили на стекловолоконную мембрану GFCP001000 Millipore и сушили при комнатной температуре.

Видеоцифровой люминесцентный иммунохроматографический анализ проводили с помощью прибора РЛИ-Eu³⁺ при комнатной температуре в течение 25 мин с момента внесения анализируемой пробы. Объем пробы, вносимой в ЛИХТ, составлял 140 мкл.

Рабочие контрольные образцы (РКО), предназначенные для изучения аналитических характеристик регистрирующего прибора, изготавливали в двух вариантах, отличающихся диапазоном концентраций люминесцирующих микросфер в аналитической зоне. РКО представляли собой иммунохроматографические мембраны, на которые с помощью диспенсера IsoFlow™ (изготовитель Imagene Technology Inc, США) наносили в виде полосок суспензию люминесцирующих микросфер с европием с линейной плотностью 0,08 мкл/мм. Мембраны высушивали при комнатной температуре, нарезали с помощью программируемой гильотины Matrix 2360 (изготовитель Kinematic Automation Inc, США) на полоски шириной 4 мм и помещали в оправы для мультианалитических иммунохроматографических элементов. Для формирования КЗ использовали суспензию микросфер

в концентрации 0,01%. Для формирования АЗ использовали концентрации микросфер от 0,00005 до 0,01%. Площадь зон на мембране с люминесцирующими микросферами составляла 4 мм² каждая. Таким образом получали имитацию ЛИХТ с различной интенсивностью люминесценции АЗ.

РКО хранили в светонепроницаемых пакетах при 4 °C. В исследовании использовались следующие реактивы. 1% (вес/объем) суспензия карбоксилированных полистирольных микросфер с комплексом европия в деионизованной воде с добавлением 0,05% NaNO₃ (производство Bang Laboratories, США). Средний диаметр микросфер 190 нм (2-(N-морфино)-этансульфоновая кислота) моногидрат (MES), трис-(гидроксиметиламинометан) солянокислая соль (TRIS-HCl), Tween-20, бычий сыроточный альбумин (БСА) свободный от протеаз, (N-(3-диметиламинопропил)-N-этилкарбодиимид гидрохлорид) (EDC), N-гидроксисукцинимид (NHS), гидроксид натрия, ProClin™-300, глицин, поливинилпирролидон MM 40.000, натрия хлорид — все производство Sigma-Aldrich. Трегалоза-D (+) — дигидрат для биохимии, соляная кислота (ч) (Диа-М (Россия)), Tetronic 1307(S9), Bravads (KHP).

Для изготовления иммунохроматографических тестов на основе НКЗ в качестве метки конъюгата использовали частицы со средним диаметром 30 нм [11]. Иммуные компоненты таких тестов были идентичны тем, которые применяли при изготовлении ЛИХТ. Мультимембранные композиты и приемы изготовления тестов аналогичны приемам изготовления ЛИХТ. Для ВЦР иммунохроматограмм с НКЗ использовали анализатор видеоцифровой иммунохроматографический Рефлеком (регистрационное удостоверение на медицинское изделие от 26 апреля 2016 года № ФСР 2011/11281/, ТУ9443-001-43312649-2014, изготовитель ООО «Синтэко-комплекс» (Россия)).

Обработка результатов проводилась с помощью программы Microsoft Excel 2003, опция «Описательная статистика».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработанный регистратор люминесцентных иммунохроматограмм РЛИ-Eu³⁺ состоит из измерительного

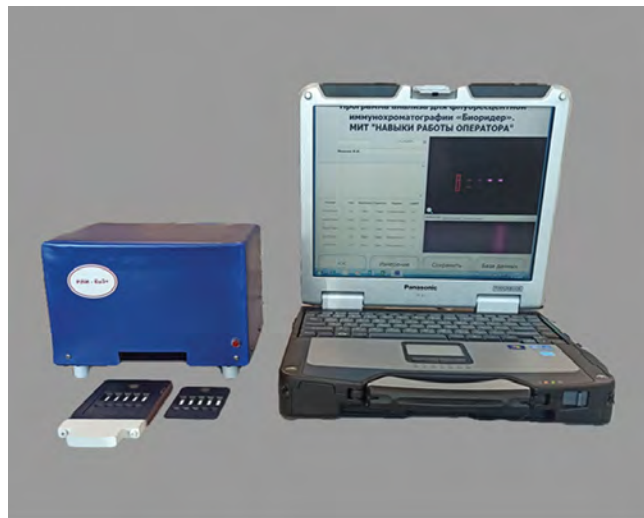


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 1. Внешний вид регистратора люминесцентных иммунохроматограмм РЛИ-Eu³⁺

Таблица 1. Результаты измерения интенсивности люминесценции аналитической зоны РКО в зависимости от концентрации люминесцирующего комплекса европия на мембране

Концентрация суспензии микросфер при формировании аналитической зоны, %	1×10^{-2}	5×10^{-3}	$2,5 \times 10^{-3}$	1×10^{-3}	5×10^{-4}	$2,5 \times 10^{-4}$	1×10^{-4}	5×10^{-5}	0
Концентрация люминесцирующего комплекса европия на мембране, пг/мм ²	200	100	50	20	10	5	2	1	0
Средняя величина интенсивности люминесценции, усл. ед.	552,3	314	144,3	45,5	44,3	24,4	12,1	3,5	1,06
Стандартное отклонение (SD)	13,0	12,1	5,9	2,3	3,9	2,0	1,2	1,7	0,62
Коэффициент вариации (CV), %	2,35	3,9	4,09	5,05	8,80	8,20	9,92	48,57	58,49
Стандартная ошибка среднего значения (SE)	4,1	4,0	1,9	0,7	1,2	0,6	0,4	0,5	0,20
Уровень надежности (95,0%)	9,3	9,3	4,2	1,7	2,8	1,4	0,9	1,2	0,44

Таблица подготовлена авторами по собственным данным

блока и ЭВМ (ноутбука) с предустановленной программой управления и обсчета полученных результатов анализа. Внешний вид прибора представлен на рисунке 1.

В измерительном блоке находится люминесцентный источник света, состоящий из двух ртутных газоразрядных ламп мощностью по 4 Вт каждая. Колбы ламп изготовлены из стекла Вуда, создающего поле равномерного ультрафиолетового облучения иммунохроматограмм с максимумом длины волны при 365 нм, а также источник питания ламп. В корпусе измерительного блока также расположена твердотельная видеокамера с разрешением 1200×1600 пикселей и скоростью съемки видео 15 кадров/с. Перед объективом камеры установлен стеклянный светофильтр эмиссии люминесценции CB580, обеспечивающий 90% пропускания излучения в диапазоне длин волн от 600 до 900 нм. Видеокамера соединена с компьютером через разъем USB 2.0. Пластиковые оправы, содержащие мембраны ЛИХТ, помещаются внутрь прибора с помощью держателя. Прибор позволяет проводить одновременную регистрацию до 5 иммунохроматограмм, однако предусмотрена возможность измерения и единичных тестов.

Полученные с помощью видеокамеры прибора изображения обрабатывались программой анализа флуоресцентных иммунохроматограмм, работающей в среде Windows 7, 10.

Прибор обеспечивает вычисление интегральной интенсивности аналитической и контрольной зон ЛИХТ

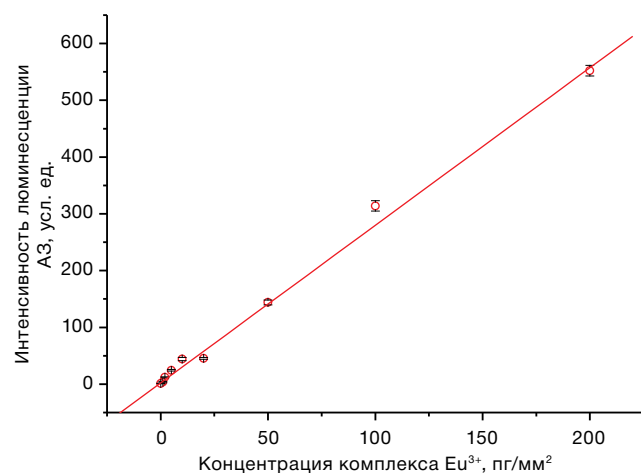


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 2. График зависимости интенсивности люминесценции аналитической зоны РКО от поверхностной концентрации комплекса европия на аналитической мембране

с автоматической коррекцией базовой линии. Критерием положительного результата анализа при ВЦР являлось превышение величины интенсивности люминесценции аналитической зоны теста над средним значением фона в «холостом» опыте с учетом ошибки измерения при 95% доверительной вероятности:

$$[X_{\text{ср.}} - t_s \times SE]_{\text{сигнала}} \geq [X_{\text{ср.}} + t_s \times SE]_{\text{фона}} \quad (1)$$

где:

$X_{\text{ср.}}$ — среднее из n измерений;

t_s — коэффициент распределения Стьюдента для n измерений;

SE — стандартная ошибка среднего значения при 95% доверительной вероятности.

Технические характеристики регистратора люминесценции РЛИ- Eu^{3+} : масса 1,64 кг, габариты 150×200×170 мм, электропитание 220–240 В, 0,15 А, 50 Гц. Управление от внешнего компьютера с ОС Windows 7, 10 специализированной программой. Максимум длины волны возбуждающего света $\lambda_{\text{ex}} = 365$ нм, максимум длины волны эмиссии $\lambda_{\text{em}} = 615$ нм. Предел обнаружения люминесцирующего вещества на иммунохроматографической мембране 2,0 пг/мм². Количество иммунохроматограмм в оправе теста может варьироваться от 1 до 5. Коэффициент вариации показаний интенсивности люминесценции аналитической зоны теста в диапазоне концентраций люминесцирующего комплекса 2–20 пг/мм² < 10%, в диапазоне 20–200 пг/мм² < 5%. Линейность показаний в диапазоне 2–200 пг/мм². Рабочий диапазон температур от 5 до 35 °С.

В таблице 1 приведены результаты измерений РКО с помощью прибора РЛИ- Eu^{3+} в различных диапазонах концентраций люминесцирующего комплекса европия в аналитической зоне РКО.

Данные, представленные в таблице 1, демонстрируют удовлетворительные значения коэффициента вариации измерений (CV) в диапазоне концентраций микросфер от 20 до 200 пг/мм², что говорит о высокой воспроизводимости результатов измерений с помощью прибора РЛИ- Eu^{3+} . Более высокие значения коэффициента вариации наблюдаются при измерении концентраций < 5 пг/мм². Чувствительность обнаружения люминесцирующих микросфер на поверхности мембраны достигает 1 пг/мм², что в 3,5 раза превышает средние значения люминесценции в «холостом» опыте.

Линейность показаний прибора при измерении РКО представлена на рисунке 2.

Линейная регрессия зависимости интенсивности люминесценции микросфер на мембране от концентрации

микросфер построена методом наименьших квадратов с помощью программы Origin 6.1 (OriginLab Corp). Коэффициент корреляции линейной зависимости $R = 0,99$.

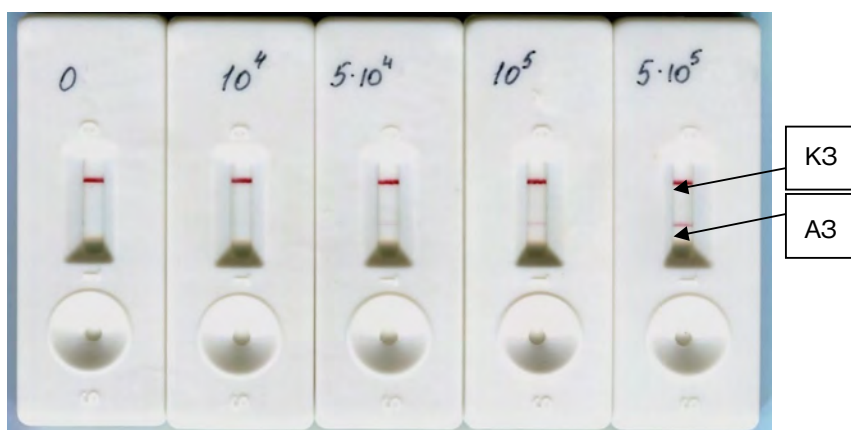
Люминесцентные тесты для иммунохроматографического выявления патогенных микроорганизмов и токсинов были разработаны в «сэндвич»-формате. Подробное описание иммунохроматографических тестов на основе НКЗ в «сэндвич»-варианте и процедуры анализа для выявления бактериальных токсинов и споровых форм микроорганизмов даны в работах [13, 14].

В ходе исследования жидкую пробу, потенциально содержащую патогенные микроорганизмы или токсины, вносили на подложку для нанесения образца. Под действием капиллярных сил происходит перемещение жидкости по мультимембранному композиту. Сначала солубилизируется конъюгат микросфер с иммобилизованными на поверхности специфическими иммуноглобулинами. Конъюгат микросфер люминесцировал в красной области спектра. При этом в случае наличия определяемого антигена в пробе образовывался антигенный иммунный комплекс, который с током жидкости перемещался по аналитической мембране вместе с избытком конъюгата. Далее иммунный комплекс захватывался на аналитической мембране специфическими антителами в АЗ, образуя «сэндвич», а несвязанные антитела конъюгата — антителами, расположенными в КЗ тест-полоски, что приводило

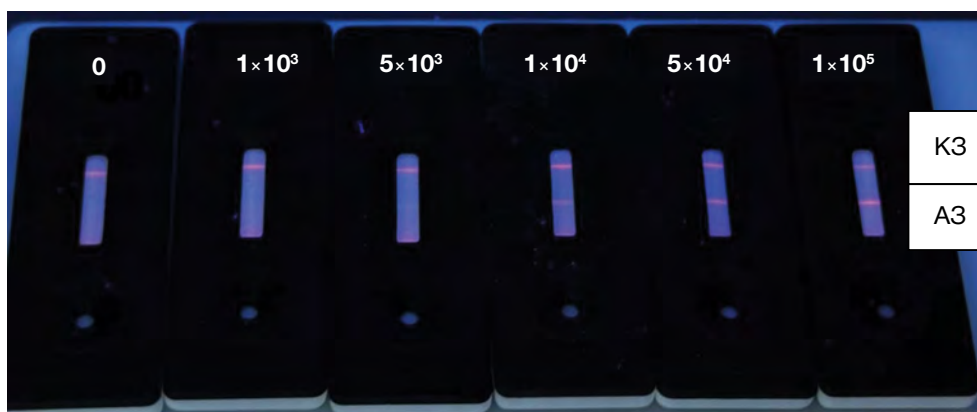
к образованию двух люминесцирующих линий. В случае отсутствия антигена в пробе антигенный иммунный комплекс не образуется, поэтому единственная видимая при ультрафиолетовом освещении линия формируется за счет связывания антител конъюгата и антител КЗ (антивидовых по отношению к антителам конъюгата) только в КЗ. Внешний вид тестов для обнаружения клеток вакцинного штамма возбудителя чумы на основе НКЗ и на основе люминесцентных микросфер при ультрафиолетовом облучении с длиной волны 365 нм представлен на рисунке 3.

В таблице 2 приведены пороги обнаружения для различных патогенных микроорганизмов и бактериальных токсинов, достигнутые с помощью ЛИХТ и иммунохроматографии с применением НКЗ.

Данные, приведенные в таблице 2, показывают на примере микроорганизмов различных таксономических групп (вегетативные и споровые формы бактерий, вирусы, а также бактериальные токсины), что применение иммунохроматографии с конъюгатами на основе микросфер с люминесцентной меткой соединений европия обеспечивает намного большую чувствительность, чем использование тестов с конъюгатами НКЗ. Корректность сравнения обеспечивается использованием тех же партий антител для изготовления тестов на основе люминесцентных антител и тестов на основе НКЗ. При сравнении чувствительности применяли идентичные антигенные препараты.



Тесты на основе НКЗ, освещение видимым светом



ЛИХТ при освещении светом $\lambda = 365$ нм

Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 3. Внешний вид иммунохроматограмм клеток *Y. pestis* EV

Примечание: стрелками и буквами обозначены аналитическая (АЗ) и контрольная (КЗ) зоны тестов; концентрации указаны в м.к./мл.

Таблица 2. Сравнительные характеристики ЛИХТ и иммунохроматографических тестов на основе НКЗ при выявлении бактериальных токсинов и патогенных микроорганизмов

Аналит	Отношение минимально выявляемых концентраций аналита для различных меток конъюгатов иммунохроматографических тестов		
	ЛИХТ на основе микросфер с комплексом Eu^{3+} , ВЦР люминесценции	ИХТ на основе НКЗ, ВЦР отраженного света	Отношение чувствительности ЛИХТ к чувствительности ИХТ
Стафилококковый энтеротоксин типа В, нг/мл	0,5	30	60
Холерный токсин, нг/мл	10	500	50
Микробные клетки <i>Y. pestis</i> , штамм EV, м.к./мл	1×10^3	5×10^4	50
Споры <i>B. anthracis</i> , спор/мл	5×10^3	1×10^5	20
Возбудитель ККГЛ (разведение исходного препарата вирусных антигенов)	1:640 000	1:5000	128

Таблица составлена авторами по собственным данным

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Применение видеоцифровой регистрации иммунохроматограмм в сочетании с микросферами, содержащими комплексы европия, дает значительный выигрыш чувствительности в ИХА. Это обусловлено значительным объемом микросфер, содержащих большое количество комплексов европия на частицу, и фотофизическими свойствами самих комплексов европия. Эти соединения возбуждаются УФ-светом ближнего диапазона 365–370 нм, а излучают люминесценцию в красной области.

Значительный стоксов сдвиг обусловлен процессами возбуждения хелатного лиганда комплекса и дальнейшим переносом энергии на $^5\text{D}_0$ энергетический уровень иона Eu^{3+} с последующими переходами между уровнем $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ и эмиссией света в диапазоне $\lambda = 610\text{--}660$ нм с высоким квантовым выходом. С практической точки зрения это позволяет применять в анализируемом образце и буферных растворах, применяемых в ИХА. Однако данные соединения не лишены недостатков, поскольку уменьшают квантовый выход люминесценции при повышении температуры. Так, запolyмеризованные в пленках комплексы европия имеют стабильную люминесценцию в диапазоне от -60 до $+25$ °C, а при нагревании пленки до температуры выше $+25$ °C наблюдается уменьшение интенсивности и времени затухания люминесценции, соответствующей переходу $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ [15]. Эффект обратим: при охлаждении интенсивность люминесценции восстанавливается. Это явление может снижать чувствительность ЛИХТ при использовании в полевых условиях при повышенных температурах.

Согласно паспортным данным препарата поверхность одной микросферы содержит до 353 тыс. карбоксильных групп при среднем диаметре микросфер 190 нм. Это позволяет проводить эффективную конъюгацию люминесцирующих микросфер с белками антител за счет образования ковалентных связей между аминокислотными группами антител

и карбоксильными группами микросфер. Конъюгат микросфер с иммуноглобулинами обладает значительным количеством валентностей антител, что способствует эффективному образованию иммунных комплексов с антигенами бактерий, токсинов, вирусов [16].

Применение видеокамер в качестве приемника излучения также является значительным достоинством ВЦР [17], поскольку последние имеют высокую чувствительность и возможность изменять яркость, контраст, гамму изображения. Эти свойства видеокамер позволяют улучшать изображение иммунохроматограмм в широком диапазоне интенсивности люминесценции. Кроме того, ВЦР не требует механических приводов (актуаторов) для перемещения иммунохроматограмм под лучом возбуждающего света.

Нами получены данные относительно существенных различий в чувствительности ЛИХТ и иммунохроматографических тестов на основе НКЗ при выявлении токсинов и патогенных микроорганизмов. Повышение чувствительности обнаружения микроорганизмов и токсинов при применении люминесцентных меток по сравнению с тестами на основе НКЗ объясняется в первую очередь более высокой чувствительностью обнаружения люминесцентных меток по сравнению с чувствительностью обнаружения колориметрических меток (НКЗ). Важным фактором повышения чувствительности является большее количество захватывающих антител в иммунохроматографических конъюгатах люминесцентных микросфер сравнительно с аналогичными конъюгатами НКЗ. Это обусловлено геометрическими размерами микрочастиц: средний диаметр НКЗ составляет 30 нм, а средний диаметр люминесцентных микросфер 190 нм. Указанные факторы приводят к более эффективному процессу иммунохроматографии и детекции результатов анализа. При этом следует отметить, что подготовка проб к анализу, процедура ИХА и время его проведения не изменяются. Технологические изготовления ЛИХТ и тестов ИХА на основе НКЗ также сходны, за исключением стадии синтеза конъюгата, и не требуют изменения технологической линейки производственного оборудования.

Высокая чувствительность ЛИХТ имеет значение для санитарно-гигиенического аспекта применения иммунохроматографии в целом, т.к. дает возможность обнаруживать меньшие концентрации патогенных микроорганизмов и токсинов в объектах окружающей среды, пищевых продуктах, биологических жидкостях организма. ЛИХТ могут быть полезны для иммунохимической

верификации посевов микроорганизмов традиционным микробиологическим методом за счет сокращения времени культивирования, позволяя идентифицировать клетки и бактериальные токсины за более короткое время.

ВЫВОДЫ

1. Разработан экспериментальный образец видеоцифрового регистратора люминесцентных иммунохроматограмм РЛИ-Eu³⁺, где в качестве метки для иммунохроматографии используются субмикронные микросферы, в состав которых входят комплексные соединения трехвалентного европия, конъюгированные со специфическими антителами.

2. РЛИ-Eu³⁺ имеет порог чувствительности по люминесцирующему комплексу европия 2 пг вещества на 1 мм² иммунохроматографической мембраны и линейность в диапазоне 2–200 пг/мм².

Литература / References

- Hou FP, Bai MY, Zhang Y, Liu HY, Sun SQ, Guo HC. Fluorescent immunochromatographic assay for quantitative detection of the foot-and-mouth disease virus serotype O antibody. *Microchem. J.* 2020;155:104690. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104690>
- Kim TK, Oh S, Hong SC, Mok YJ, Choi EY. Point-of-Care Fluorescence Immunoassay for Cardiac Panel Biomarkers. *J. Clin. Lab. Anal.* 2014;28:419–27. <https://doi.org/10.1002/jcla.21704>
- Gao YM, Wei JC, Mak PU, Vai MI, Du M, Pun SH. Development of a Calibration Strip for Immunochromatographic Assay Detection Systems. *Sensors.* 2016;16:1007. <https://doi.org/10.3390/s16071007>
- Raeisossadati MJ, Danesh NM, Borna F, Gholamzad M, Ramezani M, Abnous K, Taghdisi SM. Lateral flow-based immunobiosensors for detection of food contaminants. *Biosens. Bioelectron.* 2016;86:235–46. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.06.061>
- Wu Y, Sun J, Huang X, Lai W, & Xiong Y. Ensuring food safety using fluorescent nanoparticles-based immunochromatographic test strips. *Trends in Food Science & Technology.* 2021; 118:658–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.10.025>
- Sanchis A, Salvador JP, Marco MP. Multiplexed immunochemical techniques for the detection of pollutants in aquatic environments. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2018;106:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.06.015>
- Berlina AN, Taranova NA, Zherdev AV, Vengerov YY, Dzantiev BB. Quantum dot-based lateral flow immunoassay for detection of chloramphenicol in milk. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2013;405(14):4997–5000. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6876-3>
- Taranova NA, Berlina AN, Zherdev AV, Dzantiev BB. “Traffic light” immunochromatographic test based on multicolor quantum dots for the simultaneous detection of several antibiotics in milk. *Biosensors and Bioelectronics.* 2015;63:255–61. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.07.049>
- Yang J.C., Wang K., Xu H., Yan W.Q., Jin Q.H., Cui D.X. Detection platforms for point-of-care testing based on colorimetric, luminescent and magnetic assays: A review. *Talanta.* 2019;202:96–110. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.04.054>
- Баюшева ВВ, Белозерова ОА, Чередниченко АГ. Синтез и люминесцентные свойства комплексов редкоземельных металлов (РЗМ) с замещенным 1,10-фенантролином и β-дикетонами. *Успехи в химии и химической технологии.* 2014;28(6):16–8. Bajusheva VV, Belozero OA, Cherednichenko AG. Synthesis and luminescent properties of rare earth metal complexes (REM) with substituted 1,10-phenanthroline and β-diketones. *Uspekhi v Khimii i Khimicheskoi Tekhnologii Magazine.* 2014;28(6):16–8 (In Russ.). EDN: [STFEWMN](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-2-94-99)
- Ярков СП, Третьяков СИ, Шиленко ИВ, Ишков ЮН, Стяжкин КК. Выявление стафилококкового энтеротоксина типа В в молочной продукции иммунохроматографией с визуальной и видеоцифровой детекцией. *Медицина экстремальных ситуаций.* 2023;3:86–91. Yarkov SP, Tretyakov SI, Shilenko IV, Ishkov YuN, Styazhkin KK. Identification of staphylococcal enterotoxin B in dairy products by immunochromatography with visual and digital video detection. *Extreme Medicine.* 2023;3:86–91 (In Russ.). <https://doi.org/10.47183/mes.2023.039>
- Jiao X, Peng T, Liang Z, Hu Y, Meng B, Zhao Y, et al. Lateral Flow Immunoassay Based on Time-Resolved Fluorescence Microspheres for Rapid and Quantitative Screening CA199 in Human Serum. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23:9991–9. <https://doi.org/10.3390/ijms23179991>
- Еремкин АВ, Ипатов СС, Куклина ГВ, Печенкин ДВ, Кытманов АА, Тихвинская ОВ и др. Разработка иммуноферментных тест-систем и иммунохроматографических наборов реагентов, предназначенных для выявления стафилококковых энтеротоксинов типов А и В. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2021;2:94–9. Eremkin AV, Ipatov SS, Kuklina GV, Pechenkin DV, Kytmanov AA, Tikhvinskaya OV, et al. Development of ELISA test-systems and immune-chromatographic reagent panel designed for the detection of staphylococcal enterotoxins of A and B types. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2021;2:94–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-2-94-99>
- Ярков СП, Третьяков СИ, Шаулина ЕК, Бровкина АН, Храмов ЕН. Повышение чувствительности иммунохроматографических тестов для выявления возбудителя сибирской язвы и стафилококкового энтеротоксина типа В на основе усиления серебром и инструментальной регистрации. *Медицина экстремальных ситуаций.* 2019;21(3):122–31. Yarkov SP, Tretyakov SI, Shaulina EK, Brovkina AN, Khramov EN. Elevation the sensitivity of immunochromatographic tests to identify the causative agent of anthrax and staphylococcal enterotoxin type B based on silver amplification and instrumental recording. *Extreme medicine.* 2019;21(3):122–31 (In Russ.). EDN: [KSFFST](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-2-94-99)
- Лапаев ДВ, Зиятдинова РМ, Князев АА, Галяметдинов ЮГ, Никифоров ВГ, Лобков ВС. Механизм температурного тушения люминесценции в застеклованной пленке β-дикетонатного комплекса европия (III). *Вестник технологического университета.* 2018;21(4):13–18. Lapaev DV, Ziyatdinova RM, Knyazev AA, Galyametdinov YuG,

- Nikiforov VG, Lobkov VS. Mechanism of temperature quenching of luminescence in a glassy film of the β -diketonate complex of europium (III). *Bulletin of the Technological University*. 2018;21(4):13–8 (In Russ.).
EDN: [XPSTYL](#)
16. Xie QY, Wu YH, Xiong QR, Xu HY, Xiong YH, Liu K, et al. Advantages of fluorescent microspheres compared with colloidal gold as a label in immunochromatographic lateral flow assays. *Biosens. Bioelectron.* 2014;54:262–5.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.11.002>
17. Gupta, R., Gupta, P., Wang, S. et al. Ultrasensitive lateral-flow assays via plasmonically active antibody-conjugated fluorescent nanoparticles. *Nat. Biomed. Eng.* 2023;7:1556–70.
<https://doi.org/10.1038/s41551-022-01001-1>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: С.П. Ярков — идея, участие в создании прибора РЛИ-Eu³⁺, планирование экспериментов и анализ результатов, подготовка черновика рукописи; С.И. Третьяков — участие в создании прибора РЛИ-Eu³⁺ и его испытаниях, создание люминесцентных иммунохроматографических тестов; И.В. Шиленко, Е.К. Шаулина — создание иммунохроматографических тестов, проведение экспериментов, анализ полученных результатов; А. Мандажи, Д.А. Зенков — участие в создании иммунохроматографических тестов; Ю.Н. Ишков — текущее руководство исследованиями, правка рукописи; К.К. Стяжкин — общее руководство и редактирование рукописи.

ОБ АВТОРАХ

Ярков Сергей Петрович, д-р. биол. наук
<https://orcid.org/0000-0003-4644-0485>
diasol@dol.ru

Третьяков Сергей Иванович, канд. технич. наук
<https://orcid.org/0000-0003-2826-9581>
14otd@gosniibp.ru

Шиленко Инесса Владимировна, канд. технич. наук
<https://orcid.org/0000-0003-0801-6923>
14otd@gosniibp.ru

Шаулина Екатерина Константиновна
<https://orcid.org/0009-0008-7522-7775>
14otd@gosniibp.ru

Мандажи Ангелина
<https://orcid.org/0009-0005-4482-3724>
14otd@gosniibp.ru

Зенков Денис Александрович
<https://orcid.org/0009-0001-3209-4940>
14otd@gosniibp.ru

Ишков Юрий Николаевич, канд. хим. наук
<https://orcid.org/0000-0001-8355-7821>
14otd@gosniibp.ru

Стяжкин Константин Кириллович, д-р биол. наук, профессор
<https://orcid.org/0000-0002-9988-2343>
director@gosniibp.ru

<https://doi.org/10.47183/mes.2025-270>

УДК 615.8:615.825.1:617.586



ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОНСЕРВАТИВНЫХ МЕТОДОВ ЛЕЧЕНИЯ ПЛАНТАРНОГО ФАСЦИИТА У СПОРТСМЕНОВ

А.В. Сливин^{1,2}, В.В. Кармазин¹, К.А. Шлыков³, С.А. Парастаев^{1,2}¹ Федеральный научно-клинический центр спортивной медицины и реабилитации Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия² Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия³ Клиника остеопатии и классической медицины «Остеополитклиник», Москва, Россия

Введение. Плантарный фасциит (ПФ) — многофакторная патология, ограничивающая тренировочную и соревновательную деятельность спортсмена, а в некоторых случаях обуславливающая преждевременное завершение спортивной карьеры. Поиск оптимальных методов консервативного воздействия, которые позволят повысить эффективность лечения, является важной задачей спортивной медицины.

Цель. Разработка дифференцированного подхода к консервативному лечению спортсменов с ПФ с учетом биомеханических особенностей заболевания.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 82 спортсмена (37 мужчин и 45 женщин, медиана возраста — 30 (23; 34) лет) с односторонним ПФ, которые были разделены на 4 группы в зависимости от типа терапевтического воздействия: группа 1 — ударно-волновая терапия (УВТ), группа 2 — вибрационное воздействие в сочетании с миофасциальным релизом мышц задней группы бедра и голени, группа 3 — индивидуальные ортезы стоп, группа 4 — комплекс вибрационного воздействия, миофасциального релиза, индивидуальных ортезов стоп. Терапевтические мероприятия оценивались по динамике болевого синдрома, результатам бароподометрического обследования, выраженности напряжения мышц бедра и голени, изменению толщины подошвенного апоневроза.

Результаты. Все исследуемые методы воздействия показали различную степень эффективности в отношении снижения боли ($p < 0,001$), уменьшения толщины подошвенного апоневроза ($p < 0,05$) и нормализации подошвенного давления заднего и переднего отделов пораженной стопы ($p < 0,05$), повышения постуральной устойчивости спортсменов по объективным показателям ($p < 0,05$). Наиболее выраженное снижение болевого синдрома было отмечено при использовании УВТ. В группах 2 (вибрационное воздействие и миофасциальный релиз) и 3 (индивидуальные ортезы стоп) отмечено статистически значимое снижение напряжения мышц задней группы голени ($p < 0,05$); кроме того, в группе 2 значимо увеличивался угол дорсифлексии голеностопного сустава ($p < 0,05$). Группа 4 (комплексное воздействие), по данным объективных показателей, характеризовалась лучшей биомеханической стабильностью.

Выводы. В купировании выраженного острого процесса высокую эффективность демонстрирует УВТ. При наличии у спортсмена биомеханических нарушений / деформаций стопы целесообразно использовать ортезы стоп, а в случае напряжения мышц голени и ограничения дорсифлексии — вибрационное воздействие в сочетании с миофасциальным релизом.

Ключевые слова: плантарный фасциит; спорт; ударно-волновая терапия; вибрационное воздействие; ортезы стоп; миофасциальный релиз; биомеханика

Для цитирования: Сливин А.В., Кармазин В.В., Шлыков К.А., Парастаев С.А. Эффективность консервативных методов лечения плантарного фасциита у спортсменов. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2025;27(1):115–123. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-270>

Финансирование: исследование выполнено без спонсорской поддержки.

Соответствие принципам этики: исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» (протокол № 225 от 23.01.23). Все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Потенциальный конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

✉ Сливин Антон Вячеславович anton-slivin@mail.ru

Статья поступила: 21.10.2024 **После доработки:** 06.02.2025 **Принята к публикации:** 12.02.2025 **Online first:** 25.02.2025

EFFECTIVENESS OF CONSERVATIVE METHODS FOR PLANTAR FASCIITIS TREATMENT IN ATHLETES

Anton V. Slivin^{1,2}, Valerii V. Karmazin¹, Kirill A. Shlykov³, Sergey A. Parastaev^{1,2}¹ Federal Research and Clinical Center of Sports Medicine and Rehabilitation, Moscow, Russia² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia³ Osteopathy and Classical Medicine Clinic Osteopolyclinic, Moscow, Russia

Introduction. Plantar fasciitis (PF) is a multifactorial pathology that restricts an athlete's training and competitive activities, leading to premature termination of a sports career in some cases. The search for optimal conservative treatment methods that may improve the overall therapy effectiveness represents an important task of sports medicine.

Objective. Development of a differentiated approach to conservative treatment of athletes suffering from PF, taking the biomechanical features of the disease into account.

Materials and methods. The study involved 82 athletes, including 37 men and 45 women suffering from unilateral PF with a median age of 30 (23; 34) years. The participants were divided into four groups depending on the type of therapeutical action: Group 1 — shock wave therapy (ESWT); Group 2 — vibration therapy combined with myofascial release of the muscles of the posterior thigh and shin; Group 3 — individual orthoses of the feet; Group 4 — a combination of vibration therapy, myofascial release, individual orthoses of the feet. The tested therapeutic measures were assessed by the dynamics of pain syndrome, the results of baropodometry, the severity of tension in the thigh and shin muscles, and changes in the thickness of plantar aponeurosis.

Results. All the studied treatment methods showed varying degrees of effectiveness in reducing pain ($p < 0.001$), reducing the thickness of plantar aponeurosis ($p < 0.05$), normalizing plantar pressure in the posterior and anterior parts of the affected foot ($p < 0.05$), and increasing the postural stability of athletes according to objective indicators ($p < 0.05$). The use of ESWT resulted in the most pronounced reduction in pain. In Groups 2 (vibration therapy and myofascial release) and 3 (individual foot orthoses), a statistically significant decrease in muscle tension in the posterior shin group was observed ($p < 0.05$).

© А.В. Сливин, В.В. Кармазин, К.А. Шлыков, С.А. Парастаев, 2025

In addition, in Group 2, the angle of dorsiflexion of the ankle joint increased significantly ($p < 0.05$). Group 4 (combined treatment) demonstrated the highest level of biomechanical stability.

Conclusions. ESWT demonstrates a high effectiveness in relieving a pronounced acute process. In cases where an athlete experiences some biomechanical disorders or deformities of the foot, orthoses of the feet are advisable. In case of tension of the shin muscles and limitation of dorsiflexion, vibration therapy combined with myofascial release is recommended.

Keywords: plantar fasciitis; sports; shock wave therapy; vibration therapy; foot orthoses; myofascial release; biomechanics

For citation: Slivin A.V., Karmazin V.V., Shlykov K.A., Parastayev S.A. Effectiveness of conservative methods for plantar fasciitis treatment in athletes. *Extreme Medicine*. 2025;27(1):115–123. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-270>

Funding: the study was carried out without sponsorship.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the local Pirogov Russian National Research Medical University Ethics committee (No. 225 of 23 Jan. 2023). All participants signed a voluntary informed consent to participate in the study.

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

✉ Anton V. Slivin anton-slivin@mail.ru

Received: 21 Oct. 2024 **Revised:** 6 Feb. 2025 **Accepted:** 12 Feb. 2025 **Online first:** 25 Feb. 2025

ВВЕДЕНИЕ

Плантарный фасциит (ПФ) — актуальная и распространенная проблема в спорте, препятствующая тренировочному процессу. Для лечения данной патологии могут быть использованы как консервативные, так и хирургические методы воздействия [1]. Однако в связи с длительностью восстановительного периода и риском послеоперационных осложнений в клинической практике первой линией терапии признаются консервативные методы [2].

Ранее неоднократно отмечалось, что основной проблемой, с которой сталкивается врач при лечении ПФ спортсменов, является низкая эффективность консервативных воздействий, в том числе недостаточная длительность купирования болевого синдрома [3]. Среди методов консервативного воздействия широко используется методология физической и реабилитационной медицины, однако ни один из методов лечения ПФ на настоящий

момент не имеет убедительной доказательной базы [4]. Возможной причиной подобной ситуации могут быть нарушения биомеханики, лежащие в основе развития дегенеративных изменений подошвенного апоневроза, и, как следствие, высокая гетерогенность результатов лечения.

Несмотря на широкий спектр способов коррекции, апробированных при ПФ, в том числе и у спортсменов, единые подходы к формированию комбинаций методов не были разработаны; не был сформирован инструмент мониторинга эффективности терапевтических воздействий, а также не обоснована тактика ведения спортсменов с ПФ с целью коррекции не только болевого синдрома, но и профилактики рецидивов заболевания.

С учетом изложенного чрезвычайно важной при ПФ в целом и среди спортсменов в частности представляется оценка факторов риска заболевания и нарушенных биомеханических паттернов [5]. Воздействие на ключевые звенья патогенеза заболевания позволит дифференцировать терапию и, соответственно, повысить результаты лечебных воздействий, а также сократить сроки реабилитации спортсменов.

Цель исследования — разработка дифференцированного подхода к консервативному лечению спортсменов с ПФ с учетом биомеханических особенностей заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 82 спортсмена (37 мужчин и 45 женщин), представляющие различные виды спорта: легкую атлетику, футбол, баскетбол, регби, теннис, гандбол, волейбол, бобслей, фехтование и некоторые другие (рис. 1). Медиана возраста спортсменов составила 30 (23; 34) лет. Спортсмены проходили восстановительное лечение в ФГБУ ФНКЦСМ ФМБА России в период 2023–2024 гг.

Критериями включения в исследование являлись: клинический диагноз ПФ с односторонней локализацией процесса, возраст от 16 до 50 лет, наличие спортивной квалификации. Критерии не включения спортсменов в исследование: исключенный диагноз «плантарный фасциит», наличие системных заболеваний соединительной ткани, возраст, не соответствующий критериям

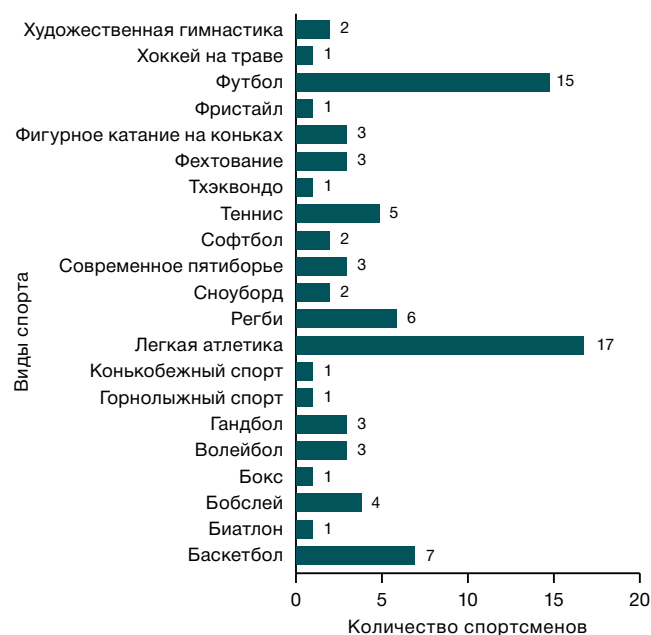


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 1. Распространенность плантарного фасциита в различных видах спорта в выборке

включения (менее 16 и более 50 лет), невозможность выполнения программ диагностики и коррекции по независящим обстоятельствам (тяжелые травмы, заболевания, эпидемические риски, приводящие к прерыванию спортивной карьеры), отсутствие спортивной квалификации, отказ от участия в исследовании. Критерии исключения спортсменов из исследования: травма опорно-двигательного аппарата, случившаяся в период проведения исследования, отказ от дальнейшего участия в исследовании.

Все спортсмены с ПФ были разделены на 4 группы в зависимости от типа проводимых терапевтических мероприятий:

- группа 1 ($n = 27$) — спортсмены, которым было проведено лечение с помощью ударно-волновой терапии (УВТ);
- группа 2 ($n = 20$) — спортсмены, которым было проведено лечение с помощью вибрационного воздействия в сочетании с миофасциальным релизом (МФР) мышц задней группы бедра и голени;
- группа 3 ($n = 19$) — спортсмены, которым было проведено лечение с использованием индивидуальных ортезов стоп;
- группа 4 ($n = 16$) — спортсмены, которым было проведено лечение с помощью вибрационного воздействия, в сочетании с МФР мышц задней группы бедра и голени, а также с применением индивидуальных ортезов.

Фокусированная ударно-волновая терапия проведена на аппарате BTL-6000 FSWT (Великобритания) с площадью потока энергии $0,65 \text{ мДж/мм}^2$ и частотой 4–6 Гц. Курсовое вибрационное воздействие длительностью 9–10 дней выполняли на устройстве «Vibrosphere» (Швеция) с последовательным увеличением частотного диапазона от 20 до 45 Гц. Миофасциальный релиз мышц задней группы бедра и голени осуществлялся спортсменами самостоятельно с использованием ролла с ребристой поверхностью. Для изготовления индивидуальных ортопедических стелек применяли заготовки фирмы «Formthotics» (Новая Зеландия)¹.

Эффективность лечебных мероприятий оценивали по: динамике болевого синдрома, определяемой с помощью русскоязычной версии визуально-аналоговой шкалы для стопы и голеностопного сустава (Visual Analog Scale Foot and Ankle — VAS FA) [6], наличию болезненности мышц задней группы бедра и голени, выявлению объема движения голеностопного сустава по углу дорсифлексии голеностопного сустава, результатам бароподометрического обследования (в статических и динамических тестах) и изменениям толщины плантарной фасции. Болезненность мышц задней группы бедра и голени проводилась пальпаторно, измерение угла дорсифлексии голеностопного сустава осуществлялось в положении лежа на спине при разогнутом коленном суставе путем гониометрии. Бароподометрическое обследование производилось на аппаратно-программном комплексе WINTRACK (Medicapture, Франция) по алгоритму, состоящему из статического и серии динамических тестов (сагиттальный, фронтальный, тест подъема на передний отдел стопы и прыжковый тест) [7]. При этом оценивали изменения скорости общего центра давления (ОЦД) во фронтальной и сагиттальной плоскостях, а также площади статокинезиограммы: скорость ОЦД во фронтальной плоскости оценивалась в сагиттальном динамическом тесте, а в сагиттальной плоскости — во фронтальном тесте; площадь статокинезиограммы исследовалась в прыжковом динамическом тесте.

Толщина плантарной фасции определялась с использованием магнитно-резонансной томографии, которая выполнялась на аппарате SIGMA Creator мощностью 1,5 Т (General Electric, США). Измерение производилось на сагиттальных срезах на 1 см дистальнее места прикрепления к пяточному бугру. Анализ оценки эффективности лечебных мероприятий осуществляли через 7 и 14 дней. Спустя 28 дней после завершения терапевтических мероприятий дополнительно производили повторную оценку выраженности боли. В качестве дополнительного метода для определения наличия и выраженности пронации стопы была проведена оценка положения стопы с помощью шкалы FPI-6 (Foot Posture Index — 6).

Для статистического анализа данных использовали пакет прикладных программ IBM SPSS Statistics 23. Для оценки типа распределения значений количественных признаков применялись критерии Колмогорова — Смирнова и Шапиро — Уилка с критическим уровнем значимости 0,05. В случае отличий распределения от нормального прибегали к методам непараметрического анализа. Описательная статистика количественных данных приведена в форме медианы и квартилей, описание качественных признаков — в виде относительных частот и их доверительных интервалов. Для сравнительного межгруппового анализа использован непараметрический U -критерий Манна — Уитни, а внутригруппового — тест Уилкоксона. Сравнение дискретных величин проводилось с использованием критерия χ^2 . Уровень значимости для всех вычислений менее 0,05 был принят за статистическую значимость.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Наибольшее количество случаев ПФ было отмечено у спортсменов, занятых в легкой атлетике, футболе, баскетболе, регби и теннисе (рис. 1). Более подробная информация о группах исследования, оцененная до начала лечебных мероприятий, представлена в таблице 1.

В ходе исследования статистически значимых различий в выборке по возрасту, ИМТ, спортивному стажу не выявлено. При оценке выраженности пронации по шкале FPI-6 установлено, что стопа у спортсменов с ПФ была умеренно прониорована, все исследуемые группы спортсменов были сопоставимы по данному параметру.

Также установлено, что в группе 1 у спортсменов, которым проводилось лечение с помощью УВТ, угол дорсифлексии голеностопного сустава был наименьшим и составил 15° , что свидетельствует о более выраженном напряжении трехглавой мышцы голени по сравнению с другими группами до начала терапевтических мероприятий.

При анализе болевого синдрома, оцененного по VAS FA, выявлено статистически значимое ($p < 0,001$) снижение интенсивности болевого синдрома во всех исследуемых группах в динамике наблюдения при проведении внутригруппового анализа. Соответствующие данные представлены на рисунке 2. Так, в группе 1 боль у спортсменов снизилась на 63%, в группе 2 — на 14%, в группе 3 — на 61%, а в группе 4 — на 18%. В динамике наблюдения за спортсменами с ПФ не было отмечено статистически значимого снижения балла по шкале VAS FA спустя 28 дней после окончания терапии, что свидетельствует об устойчивости достигнутого терапевтического эффекта.

¹ Пономаренко ГН, Гайдук АА. Применение индивидуальных ортезов стопы ФормТотикс в клинической практике. Методические рекомендации. СПб; 2015.

Таблица 1. Сводные характеристики спортсменов в группах до начала лечебных мероприятий

Показатель	Группа 1 (n = 27)	Группа 2 (n = 20)	Группа 3 (n = 19)	Группа 4 (n = 16)
Возраст, лет	31 (23; 37)	27,5 (24; 35)	27 (21; 36)	30 (25; 33)
Индекс массы тела, кг/м ²	22,1 (21; 23)	21,8 (21; 24)	22,2 (21; 24)	22,8 (21; 25)
Спортивный стаж, лет	22 (18; 30)	20 (17; 25)	19 (16; 25)	20,5 (17; 22)
Выраженность пронации по шкале FPI-6, балл	6 (5; 7)	6 (4; 7)	6 (5; 6)	6 (5; 7)
Угол дорсифлексии голеностопного сустава, градус (°)	15 (12; 18)	20 (17; 23)	19 (15; 22)	19 (17; 22)

Таблица подготовлена авторами по собственным данным

Примечание: данные представлены в виде медианы (Me) значений нижнего и верхнего квартилей Q [25–75%].

При оценке эффективности лечебных мероприятий установлено, что во всех исследуемых группах в динамике наблюдения через 7 и 14 дней не было достигнуто статистически значимого снижения болезненности мышц задней группы бедра при пальпации по сравнению

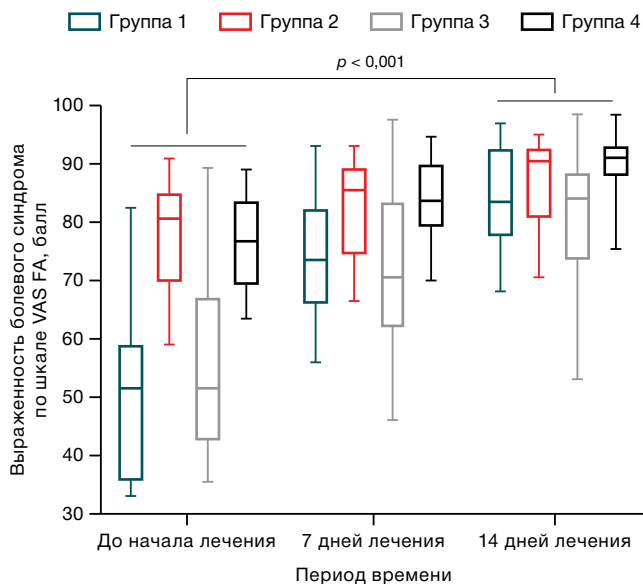


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 2. Эффективность терапевтических мероприятий у спортсменов с плантарным фасциитом по показателю «оценка боли по VAS FA»

с периодом до начала исследования. Соответствующие данные представлены на рисунке 3А.

В то же время у спортсменов из групп 2, 3 и 4 обнаружено статистически значимое снижение болезненности и напряжения мышц задней группы голени при пальпации через 14 дней по сравнению с периодом до начала лечения на 63, 59, 61% соответственно ($p < 0,05$). Данные представлены на рисунке 3Б.

При внутригрупповом анализе изменений угла дорсифлексии голеностопного сустава в динамике наблюдения (до начала лечения / 14 дней лечения) у спортсменов было выявлено статистически значимое увеличение объема движения в голеностопном суставе в группах 2 (вибрационное воздействие и миофасциальный релиз) ($p < 0,05$) и 4 (вибрационное воздействие, миофасциальный релиз и индивидуальные ортезы стоп) ($p < 0,01$) на 15 и 26% соответственно. В остальных исследуемых группах статистически значимой динамики отмечено не было (рис. 4).

Результаты анализа изменений подошвенного давления на поверхность опоры в переднем и заднем отделах пораженной стопы до/после лечения по данным бароподометрического обследования представлены в таблице 2. В ходе проведения корректирующих воздействий у спортсменов во всех группах была отмечена нормализация распределения подошвенного давления в статическом тесте ($p < 0,05$); при этом в группах 1 (УВТ) и 3 (индивидуальные ортезы стоп) выявлено увеличение давления заднего отдела пораженной стопы на 37 и 18 % соответственно. В то же время в группах 2 (вибрационное

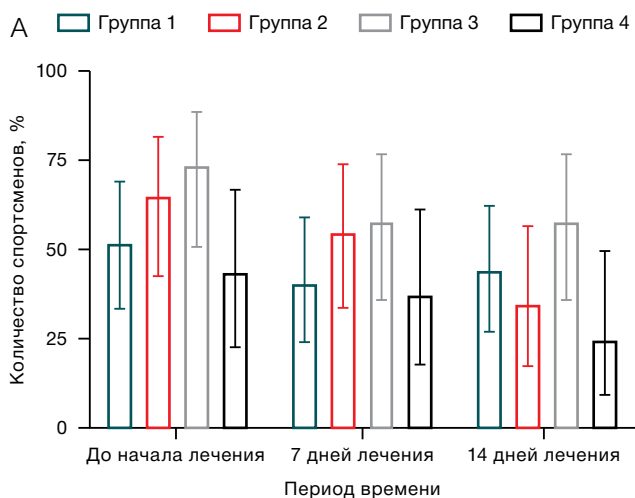
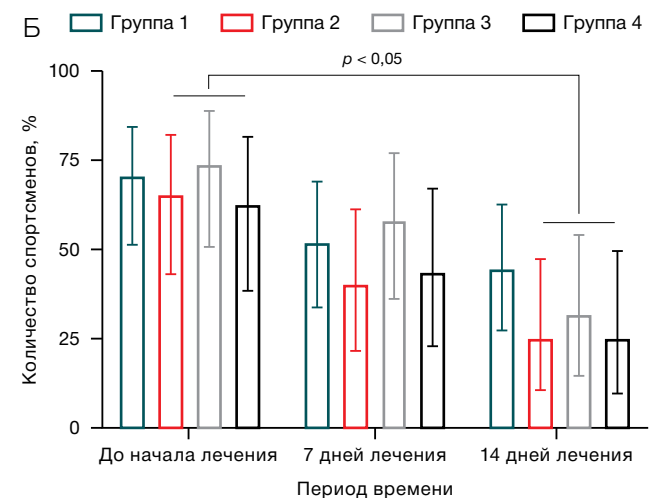


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 3. Эффективность терапевтических мероприятий у спортсменов с плантарным фасциитом по показателям: А — болезненность мышц задней группы бедра; Б — болезненность мышц задней группы голени

воздействие и миофасциальный релиз) и 4 (вибрационное воздействие, миофасциальный релиз и индивидуальные ортезы стоп), напротив, отмечено снижение подошвенного давления на 17 и 13 % соответственно по сравнению с результатами до лечения.

При анализе бароподометрических показателей в динамических тестах у спортсменов с ПФ в сравнении до/после лечения (рис. 5) установлено снижение скорости ОЦД как во фронтальной, так и в сагиттальной плоскостях, а также площади статокинезиограммы ($p < 0,05$). Так, у спортсменов из группы 1 снижение скорости ОЦД во фронтальной плоскости составило 31%, из группы 2 — 21%, из группы 3 — 26,6% и из группы 4 — 39%.

В то же время снижение скорости ОЦД в сагиттальной плоскости у спортсменов из группы 1 составило 29,4%, из группы 2 — 16,6%, из группы 3 — 27,7%, из группы 4 — 37%.

Также отмечено снижение площади статокинезиограммы на 8,7% у спортсменов из первой группы, в группе 2 — на 12,7%, в группе 3 — на 16,3%, в группе 4 — на 9,2%.

Наиболее выраженное снижение показателей скорости ОЦД отмечено у спортсменов в группе 4 (вибрационное воздействие, миофасциальный релиз и индивидуальные ортезы стоп): на 39% скорости ОЦД во фронтальной плоскости, на 37% скорости ОЦД в сагиттальной плоскости (рис. 5Г), а площадь статокинезиограммы значительно уменьшилась в группе 3 — на 16,3% (рис. 5В).

На рисунке 6 представлены баропододограммы спортсменов с ПФ в динамике наблюдения (до лечения / 14 дней лечения) и отражены изменения общего вектора давления (ОВД) и подошвенного давления.

Обращает внимание увеличение подошвенного давления заднего отдела стопы в статическом тесте (рис. 6А), уменьшение площади распределения ОВД и векторов давления под стопами в сагиттальном динамическом тесте (рис. 6Б), централизация ОВД после терапевтических мероприятий во фронтальном (рис. 6В), а также уменьшение площади распределения ОВД в прыжковом динамическом тесте (рис. 6Г).

Динамика изменений толщины плантарной фасции отражена на рисунке 7. Во всех группах отмечено статистически значимое снижение толщины плантарной фасции у спортсменов: из группы 1 на 4,8% ($p = 0,001$), из группы 2 на 5,8% ($p = 0,037$), из группы 3 на 8,5% ($p = 0,008$), из 4 группы на 12,5% ($p = 0,012$). Однако в группах 1 (УВТ) и 2 (вибрационное воздействие и миофасциальный релиз) изменение толщины плантарной фасции было менее выражено, чем у спортсменов из групп 3 (индивидуальные ортезы стоп) и 4 (вибрационное воздействие, миофасциальный релиз и индивидуальные ортезы стоп).

Однако, несмотря на статистически значимые изменения толщины подошвенного апоневроза, их выра-

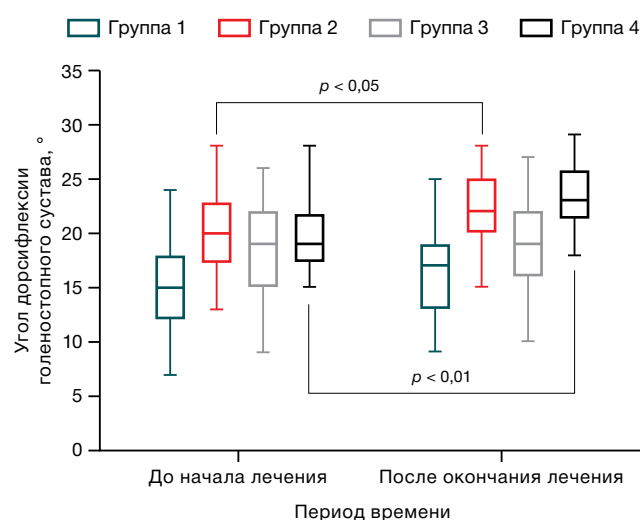


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 4. Эффективность лечебных мероприятий у спортсменов с плантарным фасциитом по показателю «угол дорсифлексии голеностопного сустава»

женность не позволяет однозначно говорить о наличии клинически значимых различий (особенно у спортсменов из групп 1 и 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе исследования было отмечено статистически значимое снижение боли по показателю VAS FA во всех группах спортсменов, что свидетельствует в целом об эффективности проводимых корригирующих мероприятий при ПФ. Так, экстракорпоральную ударно-волновую терапию при лечении ПФ успешно применяли некоторые зарубежные и отечественные авторы [8, 9]. Mendes et al. получили положительный эффект в отношении снижения боли у пациентов с ПФ при использовании индивидуальных ортопедических стелек [10], что в последующем было подтверждено и другими авторами [11, 12]. Kırmızı et al. отметили эффективность комбинированной терапии лечебными упражнениями и ортезами стоп в отношении снижения боли у пациентов с ПФ и плоскостопием [13].

Болезненность мышц задней группы голени статистически значимо снизилась у представителей группы 2, при терапии которых использовали вибрационное воздействие и миофасциальный релиз, и группы 3, у которых применяли индивидуальные ортезы стоп. Данный факт может быть объяснен большим влиянием вибрационного воздействия и индивидуальных ортезов стоп на активацию внутренних и внешних мышц стопы, что способствует их лучшему включению в акт ходьбы. Ранее высказывалось предположение, что болезненность и напряжение

Таблица 2. Внутригрупповой анализ изменений подошвенного давления стоп у спортсменов с плантарным фасциитом в различных группах

Группы спортсменов	Передний отдел, %		p	Задний отдел, %		p
	до лечения	после лечения		до лечения	после лечения	
Группа 1 (n = 27)	27 (24; 29)	24 (23; 24)	<0,001	19 (14; 21)	26 (23; 27)	<0,001
Группа 2 (n = 20)	20,5 (17; 23)	23 (22; 24)	0,001	35 (29; 39)	29 (27; 31)	0,001
Группа 3 (n = 19)	26 (23; 28)	23 (23; 24)	0,008	22 (18; 29)	26 (25; 27)	0,024
Группа 4 (n = 16)	21 (19; 24)	23 (22; 24)	0,046	31,5 (29; 37)	27,5 (26; 29)	0,002

Таблица подготовлена авторами по собственным данным

Примечание: данные представлены в виде медианы (Me) значений нижнего и верхнего квартилей Q [25–75%].

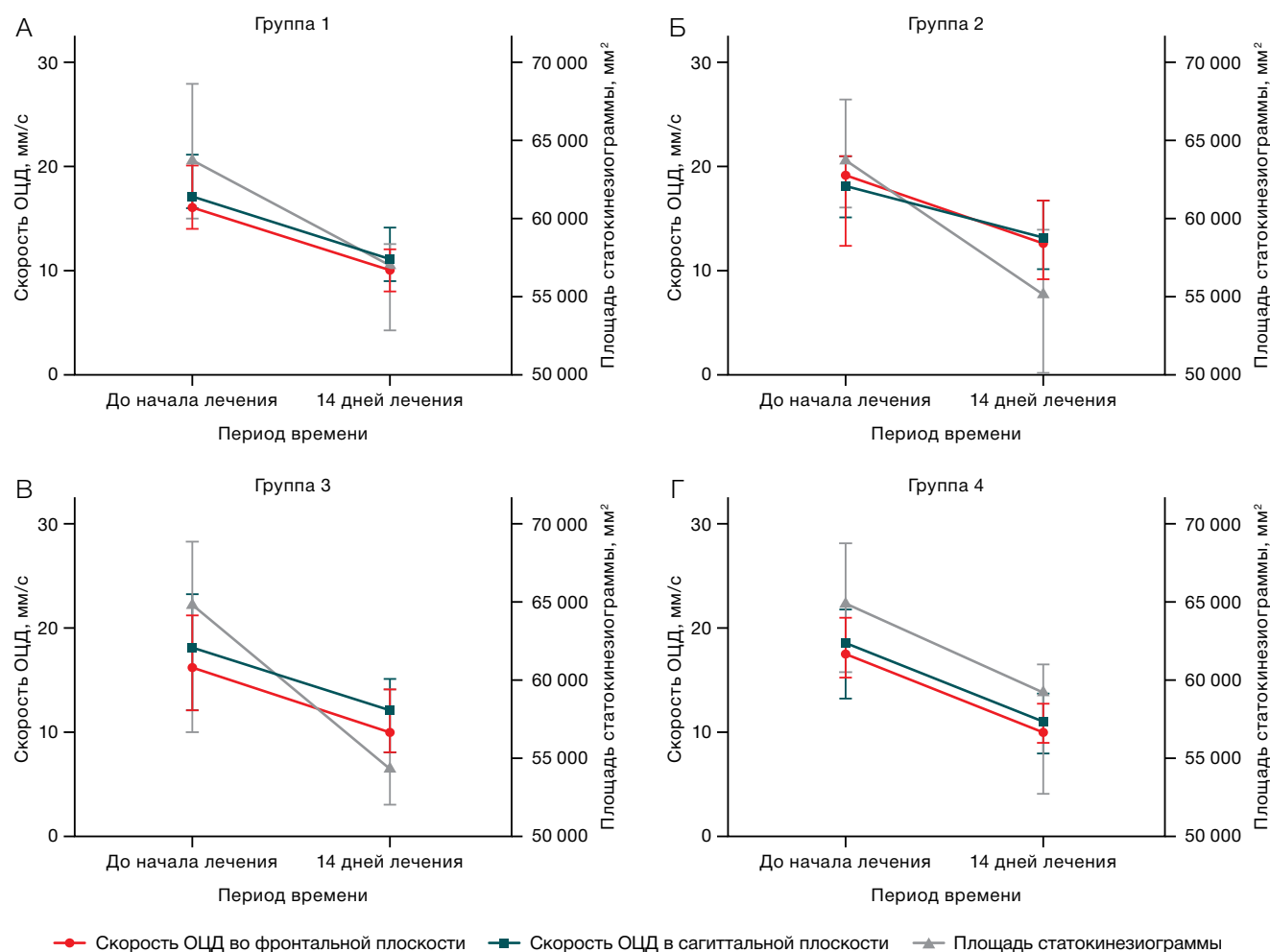


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 5. Изменения показателей бароподометрии, полученных в динамических тестах, до/после лечения у спортсменов с плантарным фасцитом в зависимости от типа вмешательства

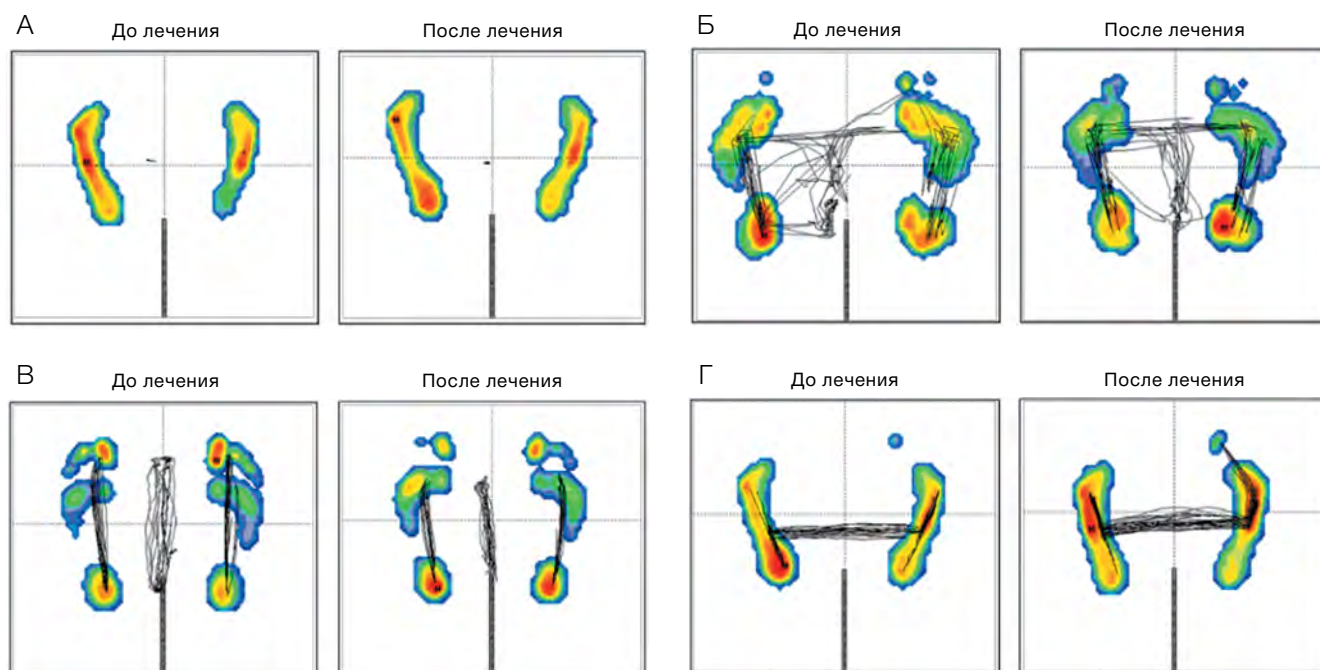


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 6. Бароподометрии спортсменов с плантарным фасцитом в динамике наблюдения: А — в статическом тесте; Б — в прыжковом динамическом тесте; В — в сагиттальном динамическом тесте; Г — во фронтальном динамическом тесте

трехглавой мышцы голени, причем преимущественно ее медиальной головки, может быть связана с повышенной нагрузкой на мышцу ввиду компенсации недостаточной функции внешних мышц стопы, в частности задней большеберцовой мышцы [14, 15]. Более того, Zhou et al. сообщили, что мероприятия, направленные на снижение жесткости и напряжения медиальной порции икроножной мышцы, могут способствовать снижению выраженности болевого синдрома у пациентов с ПФ [15].

Угол дорсифлексии голеностопного сустава статистически значимо увеличился в группах 2 (вибрационное воздействие и миофасциальный релиз) и 4 (вибрационное воздействие, миофасциальный релиз и индивидуальные ортезы стоп), что представляется логичным, поскольку данный факт, вероятно, обусловлен вибрационным и миофасциальным воздействием на мышцы задней группы голени, что сделало их более мягкими и пластичными и в совокупности со стретчингом позволило значимо увеличить объем тыльного сгибания голеностопного сустава, о чем ранее сообщали некоторые авторы [15–20]. Однако Landorf et al. не обнаружили вышеупомянутой связи [21].

По результатам бароподометрического обследования при ПФ отмечена нормализация показателей подошвенного давления на пораженной стопе, а именно: у спортсменов с низкими показателями подошвенного давления заднего отдела стопы оно увеличилось до нормальных значений, а у спортсменов с изначально высоким значением подошвенного давления заднего отдела стопы, напротив, уменьшилось. Перераспределение давления в заднем отделе стопы сопровождалось также нормализацией подошвенного давления в переднем отделе как пораженной стопы, так и интактной (контралатеральной), в которых подошвенное давление ранее было компенсаторно нарушено. Помимо нормализации подошвенного давления, у всех спортсменов с ПФ в ходе проведения корригирующих мероприятий отмечено улучшение как общей постральной стабильности, так и локальной, которая оценивалась по результатам проведения динамических тестов. При этом в группах 2 (вибрационное воздействие и миофасциальный релиз) и 4 (вибрационное воздействие, миофасциальный релиз и индивидуальные ортезы стоп) отмечено большее снижение площади статокинезиограммы в прыжковом тесте, что, вероятно, может свидетельствовать о влиянии вибрационного воздействия на общий постральный баланс посредством влияния на проприоцептивный аппарат. Данный факт представляется особенно интересным, поскольку это может свидетельствовать о важном влиянии патобиомеханики вышележащих отделов органов опоры и движения (таз) на нижележащие (стопы). О подобном влиянии также ранее сообщали некоторые авторы [22–24].

Толщина подошвенного апоневроза имела тенденцию к снижению во всех исследуемых группах, что свидетельствует о снижении выраженности отека фасции. Это, в свою очередь, может отражать снижение нагрузки на подошвенный апоневроз и уменьшение дегенеративно-воспалительных изменений [25, 26]. Небольшая выраженность снижения толщины плантарной фасции может быть объяснена небольшим периодом наблюдения (14 дней), недостаточным для выявления четких морфологических изменений, сопутствующих клинически значимому улучшению у спортсменов с ПФ. В то же время Drake et al. отмечали, что изменения морфологии

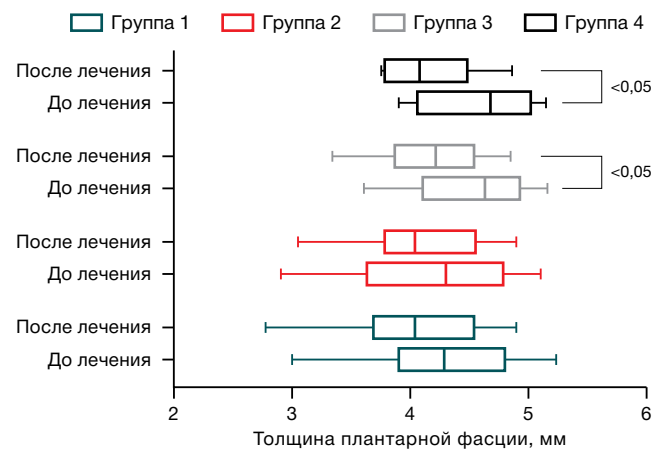


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 7. Толщина плантарной фасции до/после лечения в группах наблюдения

подошвенного апоневроза далеко не всегда могут соответствовать данным клинического осмотра пациента [27].

Поскольку в настоящем исследовании группы спортсменов были сформированы путем простой рандомизации, то, опираясь на показатели анализа изменений в динамике наблюдения, можно заключить, что УВТ позволяет наиболее эффективно купировать выраженный болевой синдром у спортсменов. Помимо этого, значительную эффективность также показывают и индивидуальные ортезы стоп. Однако на выбор рекомендуемого терапевтического агента могут оказывать влияние также и значимые факторы риска [28]. Среди таких факторов: плоскостопие, избыточная пронация стопы, ограничение дорсифлексии голеностопного сустава, напряжение и болезненность мышц задней группы голени, молоткообразная деформация пальцев стопы [29–32]. Так, вибрационное воздействие, миофасциальный релиз и индивидуальные ортезы стоп показали лучшее влияние на коррекцию/компенсацию имеющихся биомеханических факторов риска заболевания у спортсменов. На основании вышеизложенного представляется целесообразным в случае острого процесса использовать локальные методы воздействия с целью оказания противовоспалительного эффекта и затем производить коррекцию патобиомеханики, приведшей к развитию заболевания, а в случае вялотекущего процесса исправление нарушенных биомеханических паттернов позволит не только предупредить развитие рецидивов заболевания в перспективе, но и купировать болевой синдром.

Направления дальнейших исследований должны быть сосредоточены на оценке устойчивости достигнутых клинических результатов в спортивной популяции при более длительном наблюдении (12–18 недель) и оценке роли лечебных упражнений в профилактике возможных рецидивов заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования было установлено, что все применявшиеся терапевтические методы показали умеренную эффективность при лечении ПФ в спортивной популяции. Выбор метода терапевтического воздействия определяется в первую очередь выраженностью болевого синдрома, а также структурно-функциональными особенностями стопы, выявленными в ходе проведения

биомеханического обследования на бароподометрической платформе.

В контингенте спортсменов обосновано использование дифференцированного подхода в рамках комплексной терапии, направленной на коррекцию всех имеющихся факторов риска. В случае необходимости купирования острого болевого синдрома высокую эффективность демонстрирует УВТ. Для терапевтического воздействия при выявлении деформаций стопы целесообразно использовать индивидуальные ортезы стоп, а в случае ограничения дорсифлексии голеностопного сустава и напряжения мышц задней группы

голеньи высокой эффективностью обладает вибрационное воздействие в сочетании с МФР мышц задней группы голени.

Лечение ПФ у спортсменов — трудный и длительный процесс, который не всегда заканчивается возобновлением полноценной спортивной деятельности. Применение комбинированной и алгоритмизированной персонализированной терапевтической стратегии с учетом значимых факторов риска заболевания в спортивной популяции позволяет значительно сократить сроки восстановительного лечения спортсменов с данной патологией, а также снизить частоту рецидивов заболевания.

Литература / References

1. Trojan T, Tucker AK. Plantar Fasciitis. *Am Fam Physician*. 2019;99(12):744–50. PMID: 31194492
2. Atzmon R, Ellig D, Dubin J, Vidra M, Marom O, Tavdi A, et al. Comparison of Platelet-Rich Plasma Treatment and Partial Plantar Fasciotomy Surgery in Patients with Chronic Plantar Fasciitis: A Randomized, Prospective Study. *J Clin Med*. 2022;11(23):6986. <https://doi.org/10.3390/jcm11236986>
3. Coppola M, Sgadari A, Marasco D, Danti C, Vitale G, Smeraglia F, Balato G, Bernasconi A. Treatment Approaches for Plantar Fasciopathy in Elite Athletes: A Scoping Review of the Literature. *Orthop J Sports Med*. 2022;10(11):23259671221136496. <https://doi.org/10.1177/23259671221136496>
4. Wang B, Wang XL, Ma YT, Wu W, Zheng YJ. Evaluation of the efficacy of trigger points combined with extracorporeal shock waves in the treatment of plantar fasciitis: heel temperature and plantar pressure. *BMC Musculoskelet Disord*. 2024 Mar 2;25(1):191. <https://doi.org/10.1186/s12891-024-07296-2>
Erratum in: *BMC Musculoskelet Disord*. 2024;25(1):546. <https://doi.org/10.1186/s12891-024-07643-3>
5. Pazhooman H, Alamri MS, Pomeroy RL, Cobb SC. Foot kinematics in runners with plantar heel pain during running gait. *Gait Posture*. 2023;104:15–21. <https://doi.org/10.1016/j.gaitpost.2023.05.019>
6. Ковалева МА, Могельницкий АС, Беляев АФ. Валидация русскоязычной версии визуально-аналоговой шкалы для стопы и голеностопного сустава — Visual Analog Scale Foot and Ankle (VAS FA). *Российский остеопатический журнал*. 2023;(3):34–45.
Kovaleva MA., Mogelnitskiy AS., Belyaev AF. Validation of Russian-language version of Visual Analog Scale Foot and Ankle (VAS FA). *Russian Osteopathic Journal*. 2023;(3):34–45 (In Russ.). <https://doi.org/10.32885/2220-0975-2023-3-34-45>
7. Кармазин ВВ, Сливин АВ, Парастаев СА. Особенности распределения подошвенного давления стоп у спортсменов с плантарным фасциитом. Медицина экстремальных ситуаций. 2024;26(2):87–93.
Karmazin VV, Slivin AV, Parastaev SA. Plantar pressure distribution features in athletes with plantar fasciitis. *Extreme Medicine*. 2024;26(2):87–93 (In Russ.). <https://doi.org/10.47183/mes.2024.036>
8. Белоногов ВН, Киреев СИ, Киреев СН, Семенов НС. Применение ударно-волновой терапии в комплексном лечении плантарного фасциита. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2019;15(4):858–61
Belonogov VN, Kireev SI, Kireev SN, Semenov NS. Application of shock wave therapy in the complex treatment of plantar fasciitis. *Saratov Scientific Medical Journal*. 2019;15(4):858–61 (In Russ.). EDN: LOOVML
9. Вихлянцев ВА, Кобелев МВ, Шаповалова ЕМ. Механизм клинической эффективности радиального ударно-волнового метода в лечении плантарного фасциита. *Медицинская наука и образование Урала*. 2020;21(2):84–6.
10. Vkhlyantsev VA, Kobelev MV, Shapovalova EM. The mechanism of clinical effectiveness of the radial shock wave method in the treatment of plantar fasciitis. *Medical Science and Education of the Urals*. 2020;21(2):84–6 (In Russ.). <https://doi.org/10.36361/1814-8999-2020-21-2-84-86>
10. Mendes AAMT, Silva HJA, Costa ARA, Pinheiro YT, Lins CAA, de Souza MC. Main types of insoles described in the literature and their applicability for musculoskeletal disorders of the lower limbs: A systematic review of clinical studies. *J Bodyw Mov Ther*. 2020;24(4):29–36. <https://doi.org/10.1016/j.jbmt.2020.06.001>
11. Schuitema D, Greve C, Postema K, Dekker R, Hijmans JM. Effectiveness of Mechanical Treatment for Plantar Fasciitis: A Systematic Review. *J Sport Rehabil*. 2019;29(5):657–74. <https://doi.org/10.1123/jsr.2019-0036>
12. Lewis RD, Wright P, McCarthy LH. Orthotics Compared to Conventional Therapy and Other Non-Surgical Treatments for Plantar Fasciitis. *J Okla State Med Assoc*. 2015;108(12):596–8.
13. Kirmizi M, Sengul YS, Akcali O, Angin S. Effects of foot exercises and customized arch support insoles on foot posture, plantar force distribution, and balance in people with flexible flatfoot: A randomized controlled trial. *Gait Posture*. 2024;113:106–14. <https://doi.org/10.1016/j.gaitpost.2024.05.030>
14. Dayton P. Anatomic, Vascular, and Mechanical Overview of the Achilles Tendon. *Clin Podiatr Med Surg*. 2017;34(2):107–13. <https://doi.org/10.1016/j.cpm.2016.10.002>
15. Zhou JP, Yu JF, Feng YN, Liu CL, Su P, Shen SH, Zhang ZJ. Modulation in the elastic properties of gastrocnemius muscle heads in individuals with plantar fasciitis and its relationship with pain. *Sci Rep*. 2020;10(1):2770. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59715-8>
16. Cheung JT, Zhang M, An KN. Effect of Achilles tendon loading on plantar fascia tension in the standing foot. *Clin Biomech (Bristol)*. 2006;21(2):194–203. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiomech.2005.09.016>
17. Lee SH, Suh DH, Kim HJ, Jang WY, Park YH, Sung HJ, Choi GW. Association of Ankle Dorsiflexion With Plantar Fasciitis. *J Foot Ankle Surg*. 2021;60(4):733–7. <https://doi.org/10.1053/j.jfas.2021.02.004>
18. Nakale NT, Strydom A, Saragas NP, Ferrao PNF. Association Between Plantar Fasciitis and Isolated Gastrocnemius Tightness. *Foot Ankle Int*. 2018;39(3):271–7. <https://doi.org/10.1177/1071100717744175>
19. Sullivan J, Burns J, Adams R, Pappas E, Crosbie J. Musculoskeletal and activity-related factors associated with plantar heel pain. *Foot Ankle Int*. 2015;36(1):37–45. <https://doi.org/10.1177/1071100714551021>
20. Bolívar YA, Munuera PV, Padillo JP. Relationship between tightness of the posterior muscles of the lower limb and plantar fasciitis. *Foot Ankle Int*. 2013;34(1):42–8. <https://doi.org/10.1177/1071100712459173>
21. Landorf KB, Kaminski MR, Munteanu SE, Zammit GV, Menz HB. Clinical measures of foot posture and ankle joint dorsiflexion do not differ in adults with and without plantar heel pain. *Sci Rep*. 2021;11(1):6451. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85520-y>

22. Lee JH, Park JH, Jang WY. The effects of hip strengthening exercises in a patient with plantar fasciitis: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(26):e16258. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000016258>
23. Lewis CL, Ferris DP. Walking with increased ankle push-off decreases hip muscle moments. *J Biomech*. 2008 Jul 19;41(10):2082–9. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2008.05.013>
24. Mueller MJ, Sinacore DR, Hoogstrate S, Daly L. Hip and ankle walking strategies: effect on peak plantar pressures and implications for neuropathic ulceration. *Arch Phys Med Rehabil*. 1994 Nov;75(11):1196–200. [https://doi.org/10.1016/0003-9993\(94\)90004-3](https://doi.org/10.1016/0003-9993(94)90004-3)
25. Chimutengwende-Gordon M, O'Donnell P, Singh D. Magnetic resonance imaging in plantar heel pain. *Foot Ankle Int*. 2010;31(10):865–70. <https://doi.org/10.3113/FAI.2010.0865>
26. Bicer M, Hocaoglu E, Aksoy S, İnci E, Aktaş İ. Assessment of the Efficacy of Extracorporeal Shockwave Therapy for Plantar Fasciitis with Magnetic Resonance Imaging Findings. *J Am Podiatr Med Assoc*. 2018;108(2):100–5. <https://doi.org/10.7547/15-106>
27. Drake C, Whittaker GA, Kaminski MR, Chen J, Keenan AM, Rathleff MS, Robinson P, Landorf KB. Medical imaging for plantar heel pain: a systematic review and meta-analysis. *J Foot Ankle Res*. 2022;15(1):4. <https://doi.org/10.1186/s13047-021-00507-2>
28. Tan VAK, Tan CC, Yeo NEM, Zhang M, Mehta KV, Tian RHH, Tan B. Consensus statements and guideline for the diagnosis and management of plantar fasciitis in Singapore. *Ann Acad Med Singap*. 2024;53(2):101–12. <https://doi.org/10.47102/annals-acadmedsg.2023211>
29. Martinelli N, Bianchi A, Martinkevich P, Sartorelli E, Romeo G, Bonifacini C, Malerba F. Return to sport activities after subtalar arthroereisis for correction of pediatric flexible flatfoot. *J Pediatr Orthop B*. 2018;27(1):82–7. <https://doi.org/10.1097/BPB.0000000000000449>
30. Pohl MB, Hamill J, Davis IS. Biomechanical and anatomic factors associated with a history of plantar fasciitis in female runners. *Clin J Sport Med*. 2009;19(5):372–6. <https://doi.org/10.1097/JSM.0b013e3181b8c270>
31. Bencke J, Christiansen D, Jensen K, Okholm A, Sonne-Holm S, Bandholm T. Measuring medial longitudinal arch deformation during gait. A reliability study. *Gait Posture*. 2012;35(3):400–4. <https://doi.org/10.1016/j.gaitpost.2011.10.360>
32. Knapik DM, LaTulip S, Salata MJ, Voos JE, Liu RW. Impact of Routine Gastrocnemius Stretching on Ankle Dorsiflexion Flexibility and Injury Rates in High School Basketball Athletes. *Orthop J Sports Med*. 2019;7(4):2325967119836774. <https://doi.org/10.1177/2325967119836774>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: А.В. Сливин — дизайн исследования, сбор, анализ и обработка материала, написание текста, статистическая обработка данных, визуализация, составление списка литературы; В.В. Кармазин — концепция и дизайн исследования, сбор, анализ и обработка материала, редактирование; К.А. Шлыков — сбор материала, написание текста, составление списка литературы; С.А. Парастаев — анализ материала, редактирование, утверждение финальной версии.

ОБ АВТОРАХ

Сливин Антон Вячеславович

<https://orcid.org/0000-0003-2107-6525>
anton-slivin@mail.ru

Шлыков Кирилл Алексеевич

<https://orcid.org/0009-0005-0957-1840>
kirill@drshlykov.ru

Кармазин Валерий Вячеславович, канд. мед. наук

<https://orcid.org/0000-0002-1971-4420>
vkarma@mail.ru

Парастаев Сергей Андреевич, д-р. мед. наук

<https://orcid.org/0000-0002-2281-9936>
ParastaevSA@sportfmba.ru

<https://doi.org/10.47183/mes.2025-267>

УДК 612.135+612.014.4



РЕГИОНАРНЫЙ КОЖНЫЙ КРОВОТОК У ЗДОРОВЫХ ОБСЛЕДУЕМЫХ В УСЛОВИЯХ 21-СУТОЧНОЙ АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОЙ ГИПОКИНЕЗИИ

Д.В. Пашкова¹✉, Ю.А. Попова¹, А.А. Федорович^{1,2}, А.В. Шпаков¹¹ Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, Россия² Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Введение. Исследование микроциркуляторного звена как элемента сердечно-сосудистой системы применительно к космической медицине актуально как для выявления адаптационных изменений к невесомости, так и поиска новых диагностических критериев оценки функционального состояния организма космонавта в перспективе дальних космических полетов.

Цель. Изучение микрокровотока и его регуляции в различных областях кожи у здоровых добровольцев в условиях 21-суточной антиортостатической (–6°) гипокинезии (АНОГ).

Материалы и методы. В эксперименте приняли участие 6 мужчин-добровольцев в возрасте 26–34 лет. Для моделирования транслокации жидких сред и гиподинамии испытуемые находились в антиортостатическом положении в течение 21 сут. Микроциркуляцию исследовали с помощью метода лазерной доплеровской флоуметрии с использованием портативных лазерных анализаторов «ЛАЗМА ПФ» (ООО НПП «ЛАЗМА», Россия). Исследование проводили за 2 сут до начала АНОГ, на 3, 7, 15, 18 и 20 сут экспериментального воздействия, а также через 2 сут после окончания АНОГ. Статистический анализ данных проведен с использованием программного обеспечения Statistica 13.0 (IBM; США).

Результаты. Обнаружено статистически значимое снижение базальной перфузии и амплитуды миогенных колебаний в области кожи лба и голени на 3 сут в условиях антиортостатической гипокинезии. Анализ результатов функциональных проб на предплечье показал уменьшение индекса дыхательной пробы на 10,87% на протяжении всего экспериментального периода, снижение веноуло-артериолярной реакции на 3 сут гипокинезии в среднем на 10,64% и увеличение на 91,82% резерва капиллярного кровотока на 3 сут, сохраняющееся на протяжении всего воздействия.

Выводы. Эффект воздействия АНОГ выражен в снижении кожной перфузии на фоне увеличенного тонуса терминальных артериол и прекапиллярных сфинктеров в области лба и голени, что может указывать на распределение микрокровотока в сторону более крупных сосудов. Несмотря на стабильность перфузии в области кожи предплечья в покое, проведенные функциональные пробы показали, что, вероятно, условия АНОГ приводят к изменению вазомоторной функции.

Ключевые слова: антиортостатическая гипокинезия; кожный кровоток; лазерная доплеровская флоуметрия; перфузия крови; регуляция кожного кровотока

Для цитирования: Пашкова Д.В., Попова Ю.А., Федорович А.А., Шпаков А.В. Регионарный кожный кровоток у здоровых обследуемых в условиях 21-суточной антиортостатической гипокинезии. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2025;27(1):124–130. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-267>

Финансирование: работа была выполнена в рамках базовых тематик ИМБП РАН: 64.1, FMFR-2024-0042 и FMFR-2024-0038.

Благодарности: коллективу лаборатории физиологических эффектов гипокинетических воздействий ГНЦ РФ — ИМБП РАН за организацию эксперимента и возможность проведения исследования, а также всем добровольцам за участие.

Соответствие принципам этики: исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации. Все обследуемые проходили медицинский отбор врачебной экспертной комиссией ГНЦ РФ — ИМБП РАН, в ходе которого заболеваний и патологий, препятствующих участию в эксперименте, выявлено не было. Все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено Комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ — ИМБП РАН (протокол № 621 от 08.08.2022).

Потенциальный конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

✉ Пашкова Дарья Валерьевна dashapashkova1@yandex.ru

Статья поступила: 11.09.2024 **После доработки:** 11.12.2024 **Принята к публикации:** 26.12.2024 **Online first:** 06.03.2025

REGIONAL CUTANEOUS BLOOD FLOW IN HEALTHY SUBJECTS UNDER CONDITIONS OF 21-DAY HEAD-DOWN BED REST

Daria V. Pashkova¹✉, Julia A. Popova¹, Andrey A. Fedorovich^{1,2}, Alexey V. Shpakov¹¹ Institute of Biomedical Problems, Moscow, Russia² National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine, Moscow, Russia

Introduction. Research into the microvasculature as an integral component of the cardiovascular system is particularly relevant in space medicine for identifying adaptive changes to weightlessness and developing new diagnostic criteria for assessing the functional state of an astronaut's body in long-duration space flights.

Objective. To study the process of microcirculation and its regulation in various skin areas in healthy volunteers under conditions of 21-day head-down (–6°) bed rest (HDBR).

Materials and methods. The experiment involved six male volunteers aged 26–34 years. To simulate translocation of liquid media and physical inactivity, the subjects remained in an antiorthostatic position for 21 days. Microcirculation was studied by laser Doppler flowmetry using LAZMA PF portable laser analyzers (SPE "LAZMA" Ltd, Russia). Participant examination was conducted two days prior the onset of the study, on the 3rd, 7th, 15th, 18th, and 20th day of experimental exposure, as well as two days after the completion of HDBR. Statistical data analysis was performed using the Statistica 13.0 software (IBM, USA).

Results. On day 3 of HDBR exposure, a statistically significant decrease in basal perfusion and the amplitude of myogenic oscillations in the skin of the forehead and shin was observed. The analysis of functional tests on the forearm showed a decrease in the respiratory test index by 10.87% throughout the experimental period. On day 3 of hypomobility, a decrease in the venuloarteriolar response by an average of 10.64% and an increase by 91.82% in the capillary blood flow reserve were noted, with the latter persisting throughout the entire exposure.

Conclusions. The effect of HDBR is expressed in a decrease in skin perfusion against the background of increased tone of terminal arterioles and precapillary sphincters in the forehead and lower legs, which may indicate microcirculation shift toward larger vessels. Despite the skin perfusion stability in the forearm area at rest, the conducted functional tests showed the probability of changes in vasomotor function under the action of HDBR.

© Д.В. Пашкова, Ю.А. Попова, А.А. Федорович, А.В. Шпаков, 2025

Keywords: head-down bed rest; cardiovascular system; skin blood flow; laser Doppler flowmetry; blood perfusion; skin blood flow regulation

For citation: Pashkova D.V., Popova J.A., Fedorovich A.A., Shpakov A.V. Regional cutaneous blood flow in healthy subjects under conditions of 21-day head-down bed rest. *Extreme Medicine*. 2025;27(1):124–130. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-267>

Funding: the work was carried out within the framework of topic FMFR-2024-0042 and FMFR-2024-0038 of the Institute of Biomedical Problems.

Acknowledgements: the authors express their gratitude to the staff of the Laboratory of Physiological Effects of Hypokinetic Action (Institute of Biomedical Problems) for their assistance in organizing the research and to all volunteers for their participation.

Compliance with ethical standards: this study was conducted in accordance with the principles of the Helsinki Declaration. All subjects underwent medical selection by the medical expert commission of the Institute of Biomedical Problems — no diseases or pathologies preventing participation in the experiment were identified. All participants signed a voluntary informed consent to participate in the study. The study was approved by the Institute of Biomedical Problems Commission on Biomedical Ethics (No. 621 dated 8 Aug. 2022).

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

✉ Daria V. Pashkova dashapashkova1@yandex.ru

Received: 11 Sep. 2024 **Revised:** 11 Dec. 2024 **Accepted:** 26 Dec. 2024 **Online first:** 6 Mar. 2025

ВВЕДЕНИЕ

Невесомость, являясь одним из основных факторов космического полета (КП), в достаточно сильной степени влияет на состояние сердечно-сосудистой системы (ССС). В первую очередь это влияние вызвано перераспределением крови в краниальном направлении. Кроме того, эффекты, оказываемые факторами КП на ССС, включают такие изменения, как перемещение жидкости из внутрисосудистых отделов во внутриклеточные пространства, снижение общего объема циркулирующей крови, потерю массы миокарда, снижение сосудистого сопротивления, увеличение венозного возврата, ортостатическая непереносимость после возвращения к условиям гравитации [1, 2].

Перспектива осуществления дальних космических полетов (на Луну, Марс и т. д.) с возможностью высадки на их поверхности ставит перед исследователями задачи решения медицинских вопросов без возможности оперативной информационной поддержки с Земли. Если принять во внимание этот факт, то оценка функционального состояния кровеносной системы как на макро-, так и на микроуровне в значительной степени способна отражать общую адаптационную реактивность организма и его устойчивость к внешним воздействиям. С этой точки зрения в качестве объекта исследования интерес вызывает микроциркуляторное русло — «конечное» звено сердечно-сосудистой системы, которое одним из первых реагирует на изменения окружающей среды [3]. Кожа является одним из наиболее доступных объектов исследования микроциркуляции крови, при этом следует учитывать, что кожный кровоток принимает непосредственное участие в терморегуляции [4].

По данным N. Charkoudian известно, что кожная микроциркуляция реагирует на тепловой или холодный стресс [5], при этом научные данные из различных источников могут иметь расхождения, что обусловлено разнообразием применяемых методов оценки общего теплового воздействия [6, 7]. Так, по данным А.А. Федорович и соавт., при 30-суточном пребывании в гермообъекте в условиях температуры +30...+38 °С и влажности 30–50% не было обнаружено увеличения тканевой перфузии, регистрируемой методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) на предплечье,

что объяснялось особенностями ангиоархитектоники кожи и глубиной зондирования измерительной аппаратурой [6]. Исследование микроциркуляторного русла кожи Yuan et al. с применением метода ЛДФ в эксперименте со 180-суточной изоляцией в нейтральных по температуре и влажности условиях выявило снижение реакции кровотока на пробу с ацетилхолином, что указывало на проявление эндотелиальной дисфункции [8]. На данный момент известно о двух экспериментах по изучению кожной микрогемоциркуляции в условиях КП. В первом исследовании [9] авторы оценивали кожный кровоток и эндотелийзависимую вазодилатацию на уровне предплечья методом ЛДФ в сочетании с ионофорезом ацетилхолина во время 3-недельного КП на станции «Тяньгун-2» у двух тайконавтов. Авторы наблюдали небольшое снижение базальной перфузии во время и после КП, а также признаки нарушения функции эндотелия. Во втором исследовании [10], проведенном на борту МКС с участием одного космического туриста и одного профессионального космонавта, было обнаружено снижение тканевой перфузии и повышение сосудистого тонуса на 2-е и 3-е сут КП в области кожи I пальца стопы и височной области головы. При этом были обнаружены функциональные различия в показателях кожной перфузии кожи верхних и нижних конечностей между обследуемыми космонавтами, что авторы связывают с применением профилактического средства перераспределения крови у одного из участников исследования [10].

Сложность организации космических экспериментов и малый размер выборки обследуемых космонавтов при многокомпонентности факторов КП на данный момент не позволяют всесторонне изучить микроциркуляторное звено и его регуляцию в этих условиях. На Земле оценить влияние таких эффектов невесомости, как гиподинамия, снятие опорной нагрузки, перераспределение жидких сред в краниальном направлении, позволяют модельные эксперименты. Одним из таких является антиортостатическая гипокинезия (АНОГ), которая в первую очередь позволяет моделировать перераспределение жидких сред организма в краниальном направлении.

Цель исследования — изучение микрокровотока и его регуляции в различных областях кожи у здоровых мужчин-добровольцев в условиях 21-суточной антиортостатической гипокинезии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Комплексный эксперимент с участием 6 здоровых добровольцев мужского пола (средний возраст $30,3 \pm 5,2$ года; вес — $72,8 \pm 7,7$ кг; рост — $177,1 \pm 6,3$ см) проведен на стендовой базе «Гипогравитация» ГНЦ РФ — ИМБП РАН. Добровольцы находились в антиортостатическом положении с углом наклона тела относительно горизонта -6° без применения профилактических физических упражнений при умеренном ограничении двигательной активности в течение 21 сут. Вертикализация обследуемых осуществлялась для кратковременных гигиенических процедур (один раз ежедневно), а также для проведения пассивного ортостатического теста (на 6, 14 и 19-е сут) и теста с отрицательным давлением на нижнюю половину тела (ОДНТ) на 19 сут. По медицинским показаниям один из испытуемых был допущен для участия в эксперименте с ограничениями: при условии исключения нагрузочных проб, в том числе ортостатических. Подробные условия проведения эксперимента описаны в статье [11].

Для оценки состояния микроциркуляторного русла кожи применяли метод лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ), в основе которого лежит зондирование исследуемой области с помощью лазерного излучения и анализ отраженного сигнала от движущихся в кровотоке эритроцитов. Критериями исключения для данного исследования микроциркуляторного русла кожи (МЦР) методом ЛДФ являлись: возраст старше 40 лет, наличие дополнительных факторов воздействия (дыхание гипероксическими смесями и т.д.), наличие у обследуемых невусов и татуировок в области наложения датчиков. Все шесть участников эксперимента по этим условиям вошли в группу исследования.

Для регистрации показателей микроциркуляции методом ЛДФ использовали три портативных лазерных анализатора «ЛАЗМА ПФ» (ООО НПП «ЛАЗМА», Россия), длина волны зондирующего излучения — 850 нм. Один

датчик располагали на недоминантной руке в области Захарьина — Геда: по срединной линии предплечья, на 3–4 см выше шиловидных отростков лучевой и локтевой костей. Второй — на передне-внутренней поверхности в нижней трети голени. Третий датчик устанавливали в центральной зоне лба (рис. 1).

Анализаторы фиксировали с помощью медицинских трубчатых эластичных бинтов. Общее время исследования составляло 45 минут. На первом этапе регистрировали базальную перфузию в покое: обследуемый находился в расслабленном положении лежа, при спокойном дыхании в состоянии бодрствования. По истечении 10 минут в области предплечья осуществляли функциональные пробы: дыхательную, окклюзионные (венозную и артериальную) пробы. Дыхательная проба включает маневр задержки дыхания (в течение 15 с после быстрого глубокого вдоха через рот) и позволяет провести оценку функционального состояния симпатической вазомоторной регуляции. Венозная окклюзия создается путем нагнетания давления в плечевой манжете до 40 мм рт. ст. и поддержанием его на этом уровне в течение 2 мин, благодаря чему искусственно создается увеличение посткапиллярного давления, но при этом нет препятствия притоку артериальной крови, что позволяет оценить веноу-артериальную констрикторную реакцию без вовлечения симпатической регуляции. Для определения резерва капиллярного кровотока применяли артериальную окклюзию, для проведения которой в плечевой манжете нагнетали давление на уровне 30–50 мм рт. ст. выше индивидуального систолического и поддерживали на этом уровне в течение 3 мин с последующей регистрацией параметров в периоде постокклюзионной гиперемии. Применение данных проб позволяет оценить состояние механизмов регуляции тканевого кровотока, а также общее функциональное состояние микроциркуляторного русла в области кожи предплечья согласно принятой методологии [12, 13].

С помощью специального программного обеспечения «Lazma» (ООО НПП «ЛАЗМА», Россия) рассчитывали базальный уровень перфузии (М) в перфузионных единицах (п.е.), а также амплитудно-частотный спектр осцилляций кровотока на основе вейвлет-анализа: максимальные амплитуды вазомоций определяли в соответствующих частотных диапазонах: Аз, Ан, Ам, Ав, Ас (эндотелиальные, нейрогенные, миогенные, веноулярные (дыхательные) и сердечные компоненты формирования микрососудистого тонуса соответственно). При выполнении функциональных проб оценивали следующие показатели: ИДП — индекс дыхательной пробы, ВАР — веноу-артериальная реакция, РКК — резерв капиллярного кровотока (по данным ЛДФ-граммы кожи предплечья).

Исследование микроциркуляторного русла проводили за 2 сут до начала воздействия (фоновое исследование), на 3, 7, 15, 18, 20-е сут во время воздействия АНОГ, а также через два дня после окончания воздействия (период последствий). Регистрацию изучаемых параметров до и после периода АНОГ осуществляли в положении обследуемого лежа (через 15 мин. после адаптации к горизонтальному положению), в условиях АНОГ — в антиортостатическом положении обследуемого. Исследование до и после воздействия выполняли в лабораторных условиях с постоянным микроклиматом: температура окружающей среды — $24,33 \pm 2,58$ °C, влажность — $57,83 \pm 6,97$ %, атмосферное давление — $741,17 \pm 16,57$ мм рт. ст. В условиях АНОГ исследование проводили в помещении,

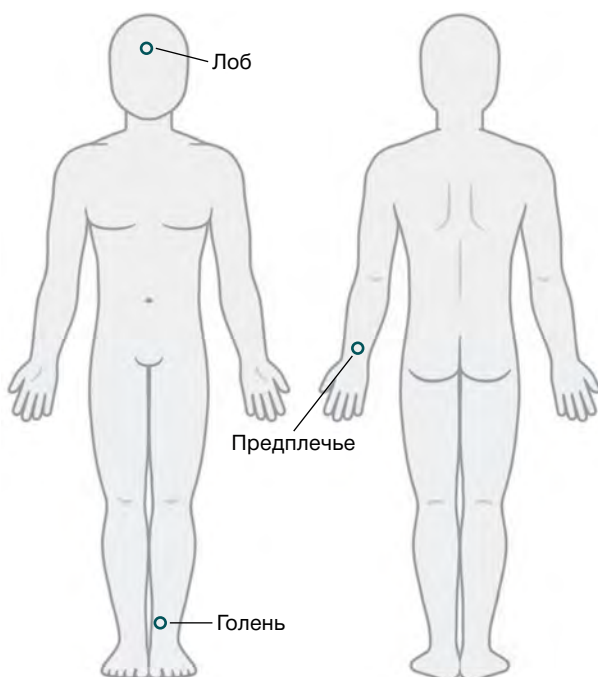


Рисунок подготовлен авторами по данным интернет-источника

Рис. 1. Расположение портативных лазерных анализаторов во время исследования

параметры окружающей среды в котором были следующие: температура окружающей среды — $23,36 \pm 1,34$ °C, влажность — $54,57 \pm 3,03\%$; атмосферное давление — $744,57 \pm 17,08$ мм рт. ст.

Статистический анализ массива полученных данных осуществляли с помощью пакета статистических программ Statistica 13.0 (IBM; США) с использованием метода главных компонент и критерия Вилкоксона [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ

При анализе данных исследуемая выборка из 6 человек была проверена на однородность с помощью метода главных компонент по всем показателям, зарегистрированным во время эксперимента. Полученные результаты зафиксировали однородность группы (значения не выходят за пределы двух стандартных отклонений).

Статистический анализ показал, что на 3-и сут пребывания в условиях АНОГ отмечено снижение уровня базальной перфузии ($p < 0,05$, критерий Вилкоксона) на 32,84% в области кожи лба и 22,52% в области кожи голени (рис. 2). Кроме того, снижение данного показателя в области кожи голени было отмечено на 15-е и 18-е сут воздействия и составило 31,64 и 34,68% соответственно, что, вероятно, связано с циклограммой эксперимента, которая включала в себя ортостатический тест. Стоит отметить, что у обследуемого, которому не проводили ортостатический тест и ОДНТ-тест во время периода АНОГ, к 3-м сут гипокинезии снижение перфузии крови в коже лба составило 7,02%, в течение АНОГ тенденция к снижению этого показателя сохранялась и к 20-м сут воздействия достигла максимального различия с фоном (34,21%). Можно было бы предположить, что изменения кожной перфузии связаны с температурными условиями, поскольку кожа является важнейшим компонентом терморегуляционной системы человека [4].

В нашем исследовании температура окружающей среды в период воздействия составила $23,36 \pm 1,34$ °C и значимо не отличалась от температуры лабораторной комнаты, в которой проводили исследования до и после АНОГ ($24,33 \pm 2,58$ °C). Кроме того, измерение температуры исследуемой области было произведено с помощью встроенного в ЛДФ-анализатор датчика, этот показатель в течение всего эксперимента статистически значимо не изменялся. Температура в среднем составляла $32,88 \pm 1,36$ °C в области кожи лба и $32,73 \pm 1,38$ °C в области кожи голени. Уровень влажности помещений при исследовании практически не отличался между сессиями: во время проведения методики окна были закрыты, система кондиционирования воздуха перед исследованием (за 15 минут до начала измерения) и во время его проведения была отключена. За 15 минут до начала обследования участники эксперимента не были накрыты одеялом, обследуемые участки кожи были открыты (освобождены от одежды) для адаптации к условиям окружающей среды, по субъективным ощущениям все добровольцы чувствовали себя комфортно в данных условиях. Таким образом, влияние колебаний параметров окружающей среды на наши результаты было минимальным.

Как в области кожи лба, так и в области голени было обнаружено снижение амплитуды миогенных колебаний на 51,15% и 41,94% на раннем этапе адаптации организма к условиям АНОГ (3 сут). Стоит отметить, что в области головы значение Ам сохранялось ниже фонового (измеренного за 2 дня до начала воздействия) и снизилось

относительно фона на 57,03% — 7-е сут, на 47,23% — 15-е сут и на 47,71% к 18 сут (рис. 3).

При анализе данных, полученных во время функциональных проб, были обнаружены изменения как в ИДП при проведении дыхательной пробы, так и в ВАР и РКК при проведении венозной и артериальной окклюзии соответственно (рис. 4). Однако эти изменения носили разнонаправленный характер: если ВАР и ИДП снижались, то РКК превышал фоновые величины в период АНОГ. Причем ВАР имел сниженное значение относительно фонового воздействия на 3-и и 15-е сут АНОГ, ИДП — на протяжении всего воздействия.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что модель антиортостатической гипокинезии в первую очередь создает такой эффект невесомости, как перераспределение жидкостных сред организма в краниальном направлении. В данном эксперименте,

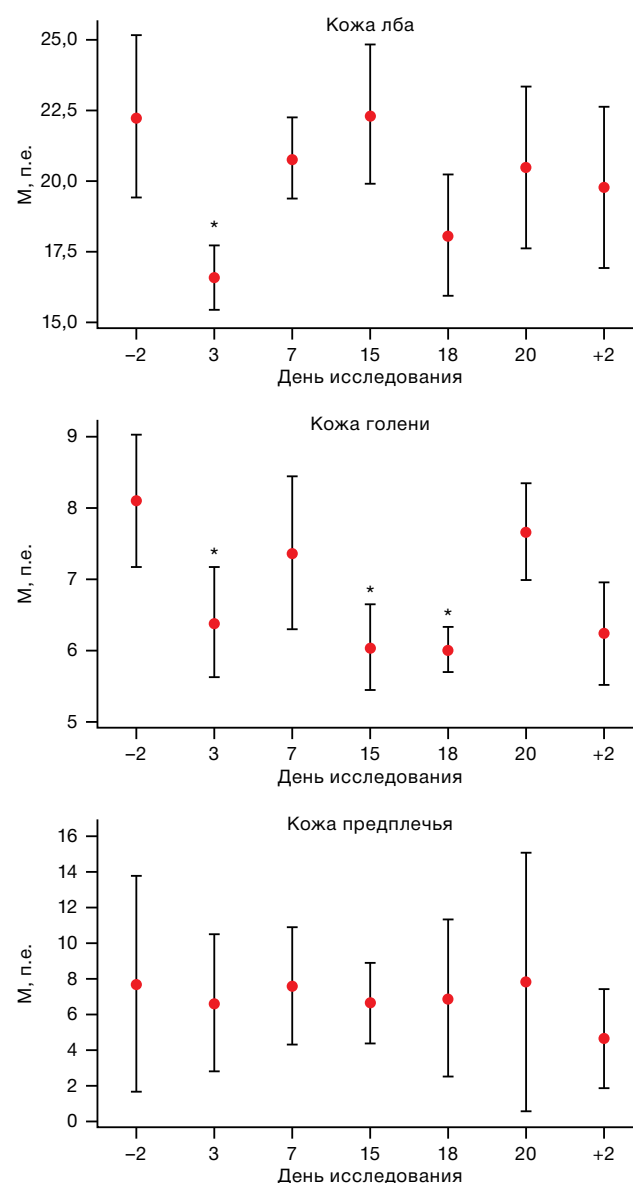


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 2. Изменения базальной перфузии в условиях АНОГ

Примечание: на графиках представлены средние значения и интерквартильный размах; по оси X: -2 и +2 — сутки до и после АНОГ соответственно; * статистически значимые различия $p < 0,05$.

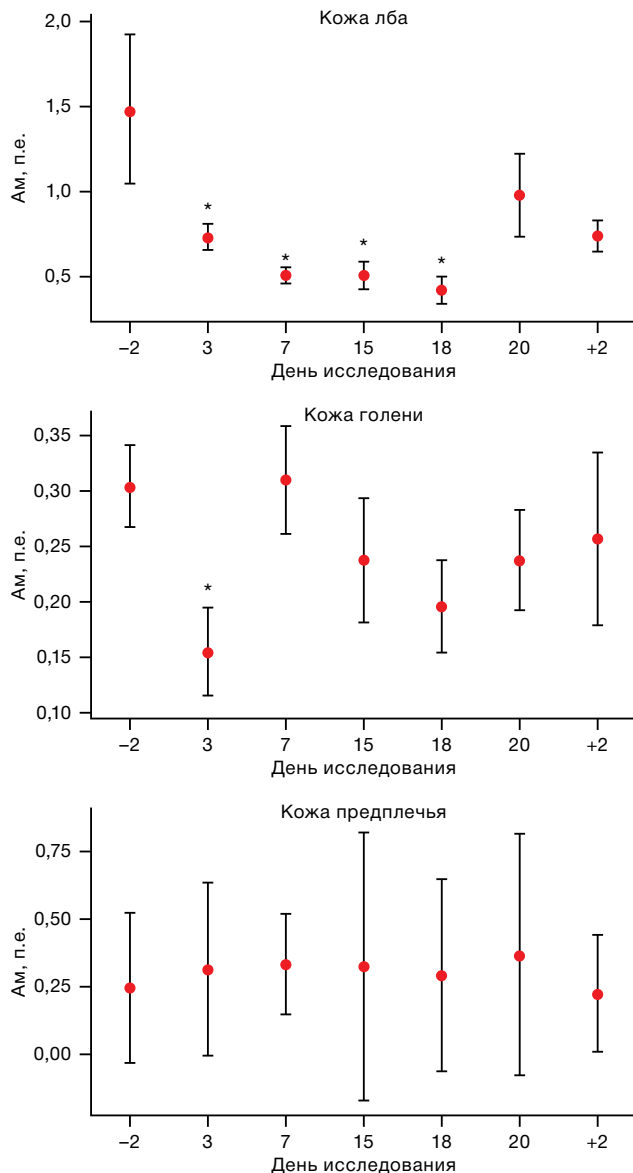


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 3. Изменения амплитуды миогенных колебаний (Am) в условиях АНОГ
Примечание: на графиках представлены средние значения и интерквартильный размах; по оси X: -2 и +2 — сутки до и после АНОГ соответственно; * статистически значимые различия $p < 0,05$.

частью которого являлось текущее исследование, коллективом авторов [11] было показано, что в результате воздействия АНОГ со стороны центральной гемодинамики наблюдается среднесуточное снижение частоты сердечных сокращений и артериального давления, в ранее проведенных исследованиях — снижение общего периферического сопротивления [15], со стороны периферической гемодинамики — снижение кровотока в нижних конечностях [16].

Результаты, полученные в нашем исследовании, свидетельствуют о том, что условия АНОГ с углом наклона -6° приводят к изменениям кожного микроциркуляторного русла в области голени и лба на раннем этапе адаптации организма (3 сут воздействия). Другими словами, изменения носят односторонний характер как в коже нижних конечностей, так и в коже головы. Эти данные согласуются с результатами исследования, проведенного Briet et al. [17], которые в условиях АНОГ наблюдали уменьшение перфузии крови в области шеи.

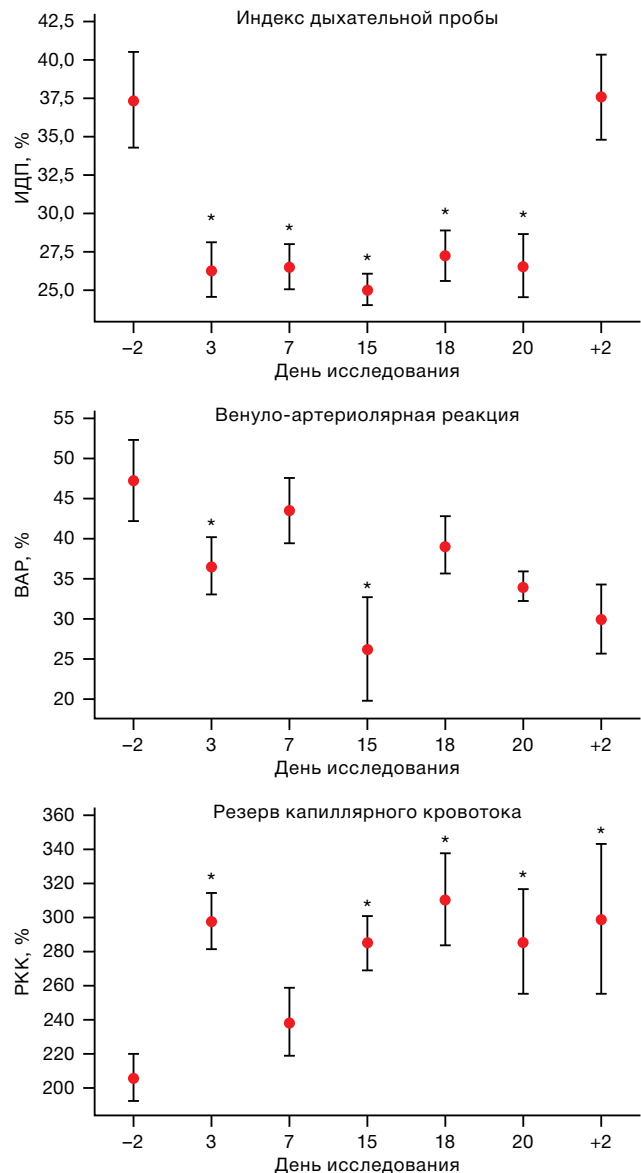


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 4. Динамика показателей функциональных проб в условиях АНОГ.
Примечание: на графиках представлены средние значения и интерквартильный размах; по оси X: -2 и +2 — сутки до и после АНОГ соответственно; * статистически значимые различия $p < 0,05$.

В эксперименте Kurazumi et al. [18] при кратковременном переводе обследуемых в антиортостатическое положение было показано снижение кожного кровотока в области кожи щек при 10-минутном антиортостазе с углом наклона тела -30° , на фоне которого было обнаружено значительное повышение сосудистого сопротивления в данной области.

В нашем исследовании на фоне снижения перфузии было отмечено уменьшение амплитуды миогенных колебаний как в области нижних конечностей, так и в области кожи лба, что указывает на увеличение сосудистого тонуса в микроциркуляторном русле кожи этих регионов. Вследствие относительно повышенного тонуса артериол происходит сужение просвета микрососудов, что снижает кожный кровоток в исследуемых областях. Можно предположить, что уменьшение амплитуды миогенных вазомоций в коже лба может отражать защитные механизмы в бассейне внутренней сонной артерии (в том числе — для капилляров головного мозга) от избыточного

повышения гидростатического давления в условиях увеличенного притока артериальной крови и затрудненного венозного оттока (миогенная ауторегуляция сосудистого русла головного мозга). Именно миогенный тонус является последним регуляторным звеном на входе в капилляр. Увеличение уровня тканевой перфузии в коже лба может являться следствием активации других регуляторных механизмов или вкладом в общую спектральную мощность отраженного сигнала веноулярного компонента (веноулярное полнокровие) на фоне затруднения венозного оттока от головы в условиях АНОГ. Восстановление уровня перфузии крови в коже лба на 7, 15, 20-е сут АНОГ до исходного фонового уровня, вероятно, связано с последствием временной вертикализации обследуемых накануне сессии исследования, связанной с проведением пассивной ортопробы (6, 14, 19-е сут) и пробы с ОДНТ (19-е сут).

Обнаруженные изменения (снижение перфузии и амплитуды миогенных колебаний) на 3-й и 18-е сут могут указывать на распределение крови из области кожи голени и лба в более крупные сосуды на фоне централизации кровотока. Было показано, что в условиях космического полета основной объем внеклеточной жидкости, по данным биоимпедансометрии, наблюдается в области живота [19].

Установлено, что полученные нами изменения кожной перфузии в области лба и голени в условиях АНОГ носят схожий характер с результатами, зарегистрированными в эксперименте по исследованию микроциркуляторно-тканевых систем методом ЛДФ на Международной космической станции [10]. В отличие от полученных результатов ЛДФ в условиях 3-недельного КП, свидетельствующих о некотором снижении базальной перфузии в коже предплечья на протяжении всего полета [20], в нашем исследовании в условиях АНОГ аналогичной длительности не было обнаружено изменений данного параметра ЛДФ в коже предплечья.

Тем не менее анализ данных функциональных проб показал, что условия АНОГ приводят к изменению вазомоторной функции сосудов кожи предплечья, о чем может свидетельствовать как снижение ВАР, так и снижение ИДП, то есть отмечается снижение реакции микрососудов на оба вида констрикторных стимулов. Стабильно сниженная величина ИДП на протяжении всего периода АНОГ указывает на то, что степень укорочения гладкомышечных клеток при активации симпатической адренергической системы снижается либо за счет изменения чувствительности миоцитов к норадреналину, либо за счет повышенного тонуса миоцитов. В связи с этим можно предположить, что тонус миоцитов повышен и на предплечье (чем выше исходный тонус, тем меньше степень укорочения мышцы и, следовательно, ниже амплитуда

регистрируемого сигнала), хотя по данным амплитудно-частотного вейвлет-анализа достоверного уменьшения амплитуды миогенных вазомоций мы не зарегистрировали. В основе констрикторной реакции при венозной окклюзии лежит сокращение прекапиллярных артериол в ответ на растяжение миоцитов при повышении давления сначала в венозном отделе, затем в капиллярном и далее в прекапиллярном (механизм Остроумова — Бейлиса).

Снижение показателя ВАР в условиях АНОГ можно объяснить затрудненным притоком крови и свободным венозным руслом в системе МЦР, которое не успевает заполняться за 2 минуты окклюзии. Нельзя также исключить и повышенный тонус миоцитов в условиях АНОГ. Увеличение РКК можно рассматривать с позиции повышения чувствительности гладкомышечных клеток на дилататорное действие продуктов метаболизма при временном ограничении кровотока. В то же время, по некоторым литературным данным, реакция на артериальную окклюзию может косвенно указывать на изменение эндотелиальной функции [13, 21]. Мы предположили, что увеличение РКК, наблюдаемое в нашем эксперименте, может опосредованно указывать на изменение эндотелиальной функции, поскольку другими авторами были получены данные о нарушении эндотелийзависимой вазодилатации (в пробе с ацетилхолином) в условиях АНОГ без профилактики как у мужчин [22], так и у женщин [23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в нашем исследовании была изучена динамика перфузии и регуляторных механизмов формирования сосудистого тонуса в различных участках кожи у здоровых мужчин в условиях 21-суточной АНОГ. Было показано, что со стороны кожного микрокровоотока и его регуляции на данный вид воздействия в большей степени реагируют области кожи лба и нижних конечностей. Эффект перераспределения крови и гиподинамии выражен в снижении кожной перфузии на фоне увеличенного тонуса терминальных артериол и прекапиллярных сфинктеров. Подобная динамика может указывать на распределение микрокровоотока в сторону более крупных сосудов. Несмотря на стабильность перфузии в области кожи предплечья в покое, проведенные функциональные пробы показали, что, вероятно, условия АНОГ приводят к изменению вазомоторной функции.

Результаты, полученные в нашем исследовании, позволяют предположить перспективность дальнейшего изучения микрогемодинамики кожи применительно к условиям реальной невесомости при использовании модели АНОГ.

Литература / References

1. Егоров АД, Ицеховский ОГ. Исследование сердечно-сосудистой системы в длительных космических полетах. *Космическая биология и авиакосмическая медицина*. 1983;17(5):4–6.
Egorov AD, Itsekhevskii OG. Study of the cardiovascular system in long-term space flights. *Space biology and aerospace medicine*. 1983; 17(5):4–6 (In Russ.).
2. Blaber AP, Goswami N, Xu D. Prolonged unloading of the cardiovascular system during bedrest and spaceflight weakens neural coupling between blood pressure and heart rate. *Acta Astronautica*. 2022; 195:567–73.
<https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2022.03.009>
3. Pizzorni C, Sulli A, Smith V, Lladó A, Paolino S, Cutolo M, Ruaro B. Capillaroscopy 2016: new perspectives in systemic sclerosis. *Acta Reumatol Port*. 2016;41:8–14.
4. Johnson JM, Minson CT, Kellogg DL. Cutaneous Vasodilator and Vasoconstrictor Mechanisms in Temperature Regulation. *Comprehensive Physiology*. 2014;4(1):33–89.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c130015>
5. Charkoudian N. Skin blood flow in adult human thermoregulation: how it works, when it does not, and why. *Mayo Clin Proc*. 2003; 78 (5):603–12.
<https://doi.org/10.4065/78.5.603>
6. Федорович АА, Родненков ОВ, Агеева НВ, Осяева МК, Рогоза АН. Параметры микроциркуляторного кровотока в коже человека в условиях длительного теплового стресса (модельный эксперимент). *Кардиологический вестник*. 2013;1(20):7–17.
Fedorovich AA, Rodnenkov OV, Ageeva NV, Osyeva MK, Rogozha AN. Parameters of microcirculatory blood flow in human skin under conditions of prolonged thermal stress (model experiment). *Cardiological Bulletin*. 2013;1(20):7–17.
EDN: [RNIWAT](https://rniwat.ru)
7. McCord GR, Cracowski JL, Minson CT. Prostanoids contrib-

- ute to cutaneous active vasodilation in humans. *Physiology and Pharmacology of Temperature Regulation*. 2006;291:R596–R602.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00710.2005>
8. Yuan M, Custaud MA, Xu Z, Wang, J, Yuan M, Tafforin C, Treffel L, et al. Multi-system adaptation to confinement during the 180-day controlled ecological life support system (CELSS) experiment. *Front. Physiol.* 2019;10:575.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00575>
 9. Lloret J, Arnaud L, Gauquelin G, Ming Y, Yin X, Li Y. Cardiospace French Chinese Cooperation in Gravitational Physiology. *39th ISGP Meeting & ESA Life Sciences Meeting*. Noordwijk; 2019.
 10. Дунаев АВ, Локтионова ЮИ, Жарких ЕВ, Федорович АА, Сидоров ВВ, Васин АВ, Дубинин ИВ. Исследование микроциркуляции крови в условиях невесомости с помощью портативных лазерных доплеровских флоуметров. *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2024;58(1):47–54.
Dunaev AV, Loktionova JI, Zharkikh EV, Fedorovich AA, Sidorov VV, Vasin AV, Dubinin IV. Investigation of blood microcirculation in microgravity with the use of portable laser Doppler flowmeters. *Aerospace and environmental medicine*. 2024;58(1):47–54 (In Russ.).
<https://doi.org/10.21687/0233-528X-2024-58-1-47-54.10.1016>
 11. Пучкова АА, Шпаков АВ, Баранов ВМ, Катунцев ВП, Ставровская ДМ, Примаченко ГК и др. Общие результаты эксперимента с 21-суточной антиортостатической гипокинезией без применения средств профилактики. *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2023;57(4):31–41.
Puchkova AA, Shpakov AV, Baranov VM, Katuntsev VP, Stavrovskaya DM, Primachenko GK, et al. General results of the 21-day head-down bedrest study without the use of countermeasures. *Aerospace and environmental medicine*. 2023;57(4):31–41 (In Russ.).
<https://doi.org/10.21687/0233-528X-2023-57-4-31-41>
 12. Лапитан ДГ, Рогаткин ДА. Функциональные исследования системы микроциркуляции крови методом лазерной доплеровской флоуметрии в клинической медицине: проблемы и перспективы. *Альманах клинической медицины*. 2016;44(2):249–59.
Lapitan DG, Rogatkin DA. Functional studies of the blood microcirculation system by laser Doppler flowmetry in clinical medicine: problems and prospects. *The Almanac of Clinical Medicine*. 2016; 44 (2):249–59 (In Russ.).
<https://doi.org/10.18/786/2072-0505-2016-44-2-249-259>
 13. Сагайдачный АА. Окклюзионная проба: методы анализа, механизмы реакции, перспективы применения. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2018;17(3):1–18.
Sagaidachnyi A.A. Reactive hyperemia test: methods of analysis, mechanisms of reaction and prospects. *Regional blood circulation and microcirculation*. 2018;17(3):5–22 (In Russ.).
<https://doi.org/10.24884/1682-6655-2018-17-3-5-22>
 14. Носовский АМ, Попова ОВ, Смирнов ЮИ. Современные технологии статистического анализа медицинских данных и способы их графического представления. *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2023;57(5):149–54.
Nosovsky AM, Popova OV, Smirnov Yul. State-of-the-art technologies of medical data statistical analysis and methods of graphic presentation. *Aerospace and environmental medicine*. 2023;57(5):149–54 (In Russ.).
<https://doi.org/10.21687/0233-528X-2023-57-5-149-154>
 15. Григорьев АИ, Козловская ИБ. Годичная антиортостатическая гипокинезия (АНОГ) — физиологическая модель межпланетного космического полета. М: *Российская акад. наук*; 2018.
Grigoriev AI, Kozlovskaya IB. Annual head-down bed rest (HDBT) is a physiological model of interplanetary space flight. Moscow: *Russian Academy of Sciences*; 2018 (In Russ.).
EDN: [MWLHGQ](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00591.2007)
 16. Руденко ЕА, Баранов МВ, Захаров СЮ. Исследование параметров центральной и периферической гемодинамики при длительном пребывании в условиях ортостатической и антиортостатической гипокинезии. *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2019;53(7):40–7.
Rudenko EA, Baranov MV, Zakharov SYu. Investigation of the parameters of central and peripheral hemodynamics during prolonged stay in conditions of orthostatic and antiorthostatic hypokinesia. *Aerospace and environmental medicine*. 2019;53(7):40–7 (In Russ.).
<https://doi.org/10.21687/0233-528X-2019-53-7-40-47>
 17. Breit, GA., Watenpaugh DE., Ballard RE., Hargens AR. Acute cutaneous microvascular flow responses to whole-body tilting in humans. *Microvascular Research*. 1993;46:351–8.
<https://doi.org/10.1006/mvre.1993.1058>
 18. Kurazumi T, Kato T, Konishi T, Ogawa Y, Iwasaki K. Alteration in facial skin blood flow during acute exposure to -10 and -30° head-down tilt in young human volunteers *Experimental Physiology*. 2022;107(12):1432–9.
<https://doi.org/10.1113/EP090734>
 19. Носков ВБ, Ничипорук АИ, Васильева ГЮ, Смирнов ЮИ. Состав тела человека при длительном пребывании в невесомости. *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2015;49(1):19–25.
Noskov VB, Nichiporuk AI, Vasilyeva GYu, Smirnov Yul. The composition of the human body during prolonged stay in zero gravity. *Aerospace and environmental medicine*. 2015;49(1):19–25 (In Russ.).
EDN: [TJUDQH](https://doi.org/10.21687/0233-528X-2023-57-4-31-41)
 20. Navasolava N, Yuan M, Murphy R, Robin A, Coupé M, Wang L, Custaud MA. Vascular and Microvascular Dysfunction Induced by Microgravity and Its Analogs in Humans: Mechanisms and Countermeasures. *Frontiers in Physiology*. 2020.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00952>
 21. Власов ТД, Нестерович ИИ, Шиманьски ДА. Эндотелиальная дисфункция: от частного к общему. Возврат к «старой парадигме»? *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2019;18(2):19–27.
Vlasov TD, Nesterovich II, Shimanski DA. Endothelial dysfunction: from the particular to the general. Return to the «Old Paradigm»? *Regional blood circulation and microcirculation*. 2019;18(2):19–27 (In Russ.).
<https://doi.org/10.24884/1682-6655-2019-18-2-19-27>
 22. Coupé M, Fortrat JO, Larina I, Gauquelin-Koch G, Gharib C, Custaud MA. Cardiovascular deconditioning: From autonomic nervous system to microvascular dysfunctions. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 2009;169S:10–12.
<https://doi.org/10.1016/j.resp.2009.04.009>
 23. Demiot C, Dignat-George F, Fortrat JO, Sabatier F, Gharib C, Larina I, Gauquelin-Koch G, Hughson R, Custaud MA. WISE 2005: chronic bed rest impairs microcirculatory endothelium in women. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2007;293(5): H3159–H3164
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00591.2007>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Д.В. Пашкова — планирование исследования, сбор и анализ данных, интерпретация и обсуждение результатов, подготовка рукописи; Ю.А. Попова — планирование исследования, интерпретация и обсуждение результатов, редактирование текста; А.А. Федорович — интерпретация и обсуждение результатов, редактирование текста; А.В. Шпаков — ответственный исполнитель эксперимента, утверждение финального текста.

ОБ АВТОРАХ

Пашкова Дарья Валерьевна

<https://orcid.org/0009-0000-8209-4175>
dashapashkova1@yandex.ru

Федорович Андрей Александрович, канд. мед. наук

<https://orcid.org/0000-0001-5140-568X>
faa-micro@yandex.ru

Попова Юлия Александровна, канд. мед. наук

<https://orcid.org/0000-0002-7778-307X>
julija.popova@gmail.com

Шпаков Алексей Васильевич, канд. биол. наук

<https://orcid.org/0000-0002-0073-2944>
avshpakov@gmail.com

<https://doi.org/10.47183/mes.2025-269>

УДК 618.1-089



ЛАПАРОСКОПИЧЕСКИЙ ДОСТУП ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ ЖЕНЩИН ПРИ ВЫРАЖЕННОМ СПАЕЧНОМ ПРОЦЕССЕ

Е.А. Соловьева¹, О.С. Филиппов^{2,3}, А.П. Урюпина¹, Н.А. Чугунова¹, Д.А. Иванова¹, А.М. Уткина¹¹ Новороссийский клинический центр Федерального медико-биологического агентства, Новороссийск, Россия² Федеральный научно-клинический центр детей и подростков Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия³ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Введение. Развитие абдоминальной хирургии и оперативной гинекологии определило значительное увеличение числа больных с послеоперационными спайками брюшной полости. Частота встречаемости спаечного процесса после абдоминальных операций достигает 67–95%. Абдоминальные спайки представляют собой серьезную проблему для здоровья. При необходимости повторных операций при наличии спаечного процесса значительно возрастает риск интра- и послеоперационных осложнений.

Цель. Изучить возможность и результаты применения лапароскопического доступа при хирургическом лечении женщин с заболеваниями репродуктивной системы в сочетании с выраженным спаечным процессом брюшной полости и малого таза.

Материалы и методы. Проведен ретроспективный анализ 265 историй болезни пациенток. В основную группу была включена 91 женщина, прооперированная по поводу заболеваний репродуктивной системы на фоне спаечного процесса брюшной полости и малого таза. Вторую группу (контрольная) составили 174 пациентки, прооперированные по поводу заболеваний репродуктивной системы и не имеющие спаечного процесса. Средний возраст пациенток основной группы составил $47,1 \pm 12,8$ года, контрольной группы — $46,5 \pm 8,1$ года. Предоперационное обследование включало в себя ультразвуковое исследование и динамическое магнитно-резонансное исследование (МРТ) брюшной полости и малого таза. Для выполнения лапароскопических операций использовали видеосистему высокого разрешения компании STORZ (Германия), энергетическую установку компании BOWA (Германия), включающую электрохирургию высокой частоты (ЭХВЧ), лазерную и аргонно-плазменную энергию. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы Statistica 13 и MS Office Excel. Результат считался статистически значимым при $p < 0,05$.

Результаты. Проведенный сравнительный анализ продемонстрировал возможность применения лапароскопического доступа для лечения женщин с патологией органов репродуктивной системы в сочетании с выраженным спаечным процессом брюшной полости и малого таза. Длительность оперативного вмешательства, объем кровопотери, выраженность болевого синдрома, длительность госпитализации и реконвалесценции не имели статистически значимых различий между основной ($n = 91$) и контрольной группами ($n = 174$). Отсутствие различий частоты интра- и послеоперационных осложнений доказывает, что лапароскопический доступ в условиях выраженного спаечного процесса является безопасным, что обеспечивается предоперационными подготовкой и обследованием пациента, применением необходимого современного оборудования и инструментария, оперативными навыками и опытом хирурга.

Выводы. Применение лапароскопического доступа для выполнения оперативного лечения пациенток с заболеваниями органов репродуктивной системы в сочетании с выраженным спаечным процессом может рассматриваться как предпочтительный и безопасный метод лечения.

Ключевые слова: спаечный процесс; лапароскопия; адгезиолизис; гистерэктомия; миомэктомия; противоспаечный барьер

Для цитирования: Соловьева Е.А., Филиппов О.С., Урюпина А.П., Чугунова Н.А., Иванова Д.А., Уткина А.М. Лапароскопический доступ для лечения заболеваний репродуктивной системы женщин при выраженном спаечном процессе. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2025;27(1):131–137. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-269>

Финансирование: исследование выполнено без спонсорской поддержки.

Соответствие принципам этики: исследование выполнено ретроспективно, поэтому не нуждается в этическом одобрении. Все пациенты дали информированное согласие на операцию и другие виды лечения. С учетом ретроспективного характера исследования для анализа результатов не требовалось специального согласия.

Потенциальный конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

✉ Соловьева Елена Анатольевна solovevaln@inbox.ru

Статья поступила: 11.07.2024 **После доработки:** 26.12.2024 **Принята к публикации:** 06.02.2025 **Online first:** 25.02.2025

LAPOSCOPIC ACCESS IN TREATMENT OF REPRODUCTIVE SYSTEM DISEASES IN WOMEN WITH MULTIPLE ADHESIONS

Elena A. Soloveva¹, Oleg S. Filippov^{2,3}, Anna P. Uryupina¹, Nina A. Chugunova¹, Daria A. Ivanova¹, Anna M. Utkina¹¹ Novorossiysk Clinical Center, Novorossiysk, Russia² Federal Scientific and Clinical Center for Children and Adolescents, Moscow, Russia³ Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

Introduction. Recent progress in abdominal surgery and operative gynecology has led to a significant increase in the number of patients with postoperative abdominal adhesions. The incidence of adhesions after abdominal surgery reaches 67–95%, a serious health problem. In their presence, any following operations may be associated with an increased risk of intra- and postoperative complications.

Objective. To study the possibility of laparoscopic access and its outcome in the surgical treatment of women with reproductive system diseases concomitant with pronounced abdominal and pelvic adhesions.

Materials and methods. A retrospective analysis of 265 patient medical records was performed. The general group included 91 women who had undergone surgery for diseases of the reproductive system in the setting of pronounced abdominal and pelvic adhesions. The second group (control) comprised 174 patients who had undergone surgery for diseases of the reproductive system and had no adhesions. The average age of the patients in the general and control groups was 47.1 ± 12.8 and 46.5 ± 8.1 years, respectively. The preoperative examination included ultrasonography and dynamic magnetic resonance imaging (MRI) of the abdominal cavity and lesser pelvis. For laparoscopic surgery, a STORZ high-resolution video system (Germany) and a BOWA power plant

© Е.А. Соловьева, О.С. Филиппов, А.П. Урюпина, Н.А. Чугунова, Д.А. Иванова, А.М. Уткина, 2025

(Germany), including high-frequency (HF) electric, laser, and argon plasma energy, were used. Statistical data processing was carried out using the Statistica 13 and MS Office Excel software. The result was considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results. The conducted comparative analysis demonstrated the possibility of using laparoscopic access for the treatment of women with reproductive system pathologies in combination with pronounced abdominal and pelvic adhesions. The duration of surgery, the volume of blood loss, the severity of pain, the duration of hospitalization, and convalescence had no statistically significant differences between the general ($n = 91$) and control groups ($n = 174$). The absence of differences in the frequency of intra- and postoperative complications proves laparoscopic access to be safe in the setting of severe adhesions. The safety is ensured by preoperative patient preparation and examination, use of necessary modern equipment and tools, surgical skills and experience.

Conclusions. The use of laparoscopic access for performing surgical treatment of patients with reproductive system diseases in combination with pronounced adhesions can be considered as the preferred and safe treatment method.

Keywords: adhesive process; laparoscopy; adhesiolysis; hysterectomy; myomectomy; anti-adhesive barrier

For citation: Soloveva E.A., Filippov O.S., Uryupina A.P., Chugunova N.A., Ivanova D.A., Utkina A.M. Laparoscopic access in treatment of reproductive system diseases in women with multiple adhesions. *Extreme Medicine*. 2025;27(1):131–137. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-269>

Funding: the study was carried out without sponsorship.

Compliance with the ethical standards: the study was carried out retrospectively, therefore requiring no ethical approval. All patients signed informed consent for surgery and other types of treatment. Taking into account the retrospective nature of the study, no special consent was required to analyze the results.

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

✉ Elena A. Soloveva solovevaln@inbox.ru

Received: 11 Jul. 2024 **Revised:** 26 Dec. 2024 **Accepted:** 6 Feb. 2025 **Online first:** 25 Feb. 2025

ВВЕДЕНИЕ

Развитие абдоминальной хирургии и оперативной гинекологии определило значительное увеличение числа больных с послеоперационными спайками брюшной полости [1].

Развитие брюшных спаек встречается в 67–95% случаев после общехирургических абдоминальных операций и до 97% после гинекологических операций лапаротомным доступом [2, 3]. По данным ряда авторов, 63% длины лапаротомического доступа участвует в образовании адгезии к передней брюшной стенке сальника и петель кишечника [4, 5].

По данным специалистов Международного общества изучения спаек (International Adhesion Society), послеоперационный спаечный процесс в брюшной полости является наиболее частым осложнением и представляет собой серьезную проблему для здоровья пациентов, существенно снижая качество их жизни. Наиболее значимыми последствиями спаечного процесса являются кишечная непроходимость (32–85%), женское бесплодие (15–40%), диспареуния и хронический абдоминальный болевой синдром (20–50%) [6]. Необходимость выполнения адгезиолизиса при последующих хирургических вмешательствах увеличивает длительность операции в среднем на 24–50 мин. Кроме того, возрастает риск ятрогенного повреждения кишечника, кровотечения, формирования в последующем фистул, что увеличивает сроки выздоровления, при этом повторная лапаротомия и адгезиолизис могут только усугубить процесс образования спаек [2, 7–10]. В то же время, по данным ряда авторов, в условиях выраженного спаечного процесса лапароскопический адгезиолизис приводил к снижению риска рецидива спайкообразования, присоединения вторичных хирургических инфекций (инфекционно-септических осложнений, раневой инфекции) [11, 12].

В настоящее время подчеркивается необходимость профилактики спаечного процесса путем применения противоспаечных барьеров из гиалуроновой кислоты и карбоксицеллюлозы, выполнения тщательного

гемостаза во время оперативного вмешательства, деликатного обращения с тканями [2, 13–15].

Большинство публикаций о характеристике спаечного процесса в брюшной полости посвящено особенностям диагностики, методам лечения и анализу осложнений кишечного-спаечной непроходимости, возникающих после оперативных вмешательств на органах брюшной полости [16–18].

Несмотря на интенсивный прогресс малоинвазивных технологий, позволивших минимизировать травматичность оперативных вмешательств, применение современных мультимодальных программ послеоперационной реабилитации и многообразие средств и способов, направленных на профилактику спаечного процесса, результаты лечебно-профилактических мероприятий нельзя считать достаточными [6, 19]. Вопрос наличия спаечного процесса в полости малого таза и брюшной полости при выполнении хирургических вмешательств на органах репродуктивной системы у женщин менее изучен, но очень актуален в связи с определяющим значением при выборе тактики и хирургического доступа.

На сегодняшний день не существует стандартизированных диагностических критериев и рекомендаций по выбору хирургического доступа в лечении женщин с патологией репродуктивных органов, сочетающейся с распространенным спаечным процессом, что диктует необходимость изучения технических возможностей малоинвазивной хирургии для понимания перспектив развития и расширения спектра ее внедрения в гинекологической практике.

Цель исследования — изучить возможность и результаты применения лапароскопического доступа при хирургическом лечении женщин с заболеваниями репродуктивной системы в сочетании с выраженным спаечным процессом брюшной полости и малого таза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведен ретроспективный анализ 265 историй болезни пациенток, оперированных в гинекологическом

отделении ФГБУЗ «Новороссийский клинический центр ФМБА России» по поводу заболеваний органов репродуктивной системы с использованием лапароскопического доступа.

В основную группу была включена 91 женщина, прооперированная по поводу заболеваний репродуктивной системы на фоне имеющегося выраженного спаечного процесса брюшной полости и малого таза (III–IV степень по О.И. Блинникову). Вторую группу (контрольная) составили 174 пациентки, прооперированные по поводу заболеваний репродуктивной системы и не имеющие спаечного процесса или с незначительной степенью его выраженности (I–II степень по О.И. Блинникову) (табл. 1).

Критериями отбора пациенток в группу исследования были возраст женщин старше 18 лет, наличие заболеваний органов репродуктивной системы, требующих хирургического лечения, наличие спаечного процесса брюшной полости различной степени выраженности.

В основной группе средний возраст пациенток составил $47,1 \pm 12,8$ года. В основной группе 55 (60,4%) женщин имели избыточный вес или ожирение различной степени выраженности со средним значением ИМТ $27,5 \pm 5,9$ кг/м² (макс. 42,4 кг/м²), с морбидным ожирением ИМТ более 40 кг/м² было прооперировано 5 (5,4%) пациенток. Дефицит массы тела был всего в 1 (1,1%) случае. Из всей выборки лишь 30 (32,3%) женщин имели нормальный вес.

В контрольной группе из 174 пациенток средний возраст составлял $46,5 \pm 8,1$ года. Преобладали женщины с избыточной массой тела и различной степенью ожирения: 113 (64,9%) пациенток со средним ИМТ $30,1 \pm 6,7$ кг/м² (макс. 52,6 кг/м²), из них с морбидным ожирением было 30 (17,2%) женщин. Большинство прооперированных пациенток имели сочетанную гинекологическую патологию.

Предоперационное обследование пациенток и планирование хода операции включало в себя ультразвуковое исследование и динамическое магнитно-резонансное исследование (МРТ) брюшной полости и малого таза. Одной из задач исследования было определение наличия, локализации и распространенности спаечного процесса, вовлеченность передней брюшной стенки и петель кишечника для выбора наиболее безопасного доступа в брюшную полость (места введения троакара для оптики и троакаров для инструментов).

Ультразвуковое исследование (УЗИ) органов брюшной полости выполнено всем пациенткам. Изолированное предоперационное УЗИ у пациенток с ожирением зачастую сопровождалось техническими сложностями и имело объективную диагностическую погрешность. В таких случаях 16 (17,6%) пациенткам дополнительно проводили динамическую МРТ брюшной полости и малого таза. В данную группу вошли женщины с ожирением 3–4 ст.

Для выполнения лапароскопических операций использовали видеосистему высокого разрешения компании STORZ (Германия), энергетическую установку компании BOWA (Германия), включающую ЭХВЧ, лазерную и аргонплазменную энергию.

Лапароскопический доступ с применением оптики переднебокового видения 30° обеспечивал более достоверную информацию о состоянии органов брюшной полости, наличии, локализации и распространенности спаечного процесса. Объем рассекаемых сращений в каждом случае определялся индивидуально.

С целью профилактики повреждения внутренних органов при введении троакара для оптики с учетом данных ультразвукового исследования и МРТ-картирования в 18 (19,9%) случаях троакар устанавливался «открытым» путем по средней линии на 3–5 см выше пупка, в 9 (9,8%) случаях оптический троакар вводился не в классической точке околопупочной области. Игла Вереша для создания карбоксиперитонеума не применялась. Для минимизации патологического влияния карбоксиперитонеума давление в брюшной полости поддерживалось на уровне 6–8 мм рт. ст.

Для рассечения сращений применяли комбинацию различных способов и инструментария: ультразвуковой скальпель (BOWA, Германия), ножницы, механическую тракцию. После выполнения адгезиолизиса и получения доступа к органам малого таза выполнялся необходимый объем оперативного вмешательства для решения поставленной клинической задачи. Для профилактики образования спаечного процесса в послеоперационном периоде большое значение уделяли гемостазу и санации брюшной полости. Для создания противоспаечного барьера в брюшную полость вводился противоспаечный препарат на основе полиэтиленоксида и карбоксиметилцеллюлозы. В конце оперативного вмешательства проводился осмотр места введения первого троакара для оптики, чтобы удостовериться в отсутствии повреждений кишечника.

Сравнительная оценка результатов оперативного лечения проводилась путем анализа продолжительности оперативного лечения, объема кровопотери, оценки выраженности болевого синдрома по шкале ВАШ, длительности госпитализации. В послеоперационном периоде для оценки болевого синдрома использовали классическую визуально-аналоговую шкалу боли [21, 22].

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы Statistica 13 и MS Office Excel. Результат считался статистически значимым при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведенного исследования установлено, что в основной группе в 34 (37,4%) случаях и в контрольной группе в 86 (49,4%) значимо преобладали доброкачественные опухолевые процессы матки и доброкачественные новообразования яичников, а именно, у 23 (25,3%) пациенток основной группы и 29 (16,7%) женщин из группы контроля. Соответствующие данные представлены в таблице 2.

У 81 (89%) пациентки основной группы ранее были выполнены различные оперативные вмешательства на органах брюшной полости и малого таза, только у 10 (10,9%)

Таблица 1. Степень распространенности спаечного процесса в брюшной полости по О.И. Блинникову

I степень	Локальный спаечный процесс, ограниченный областью послеоперационного рубца или частью брюшной полости. Занимает не более 1/3 одного этажа при отсутствии спаек в других областях
II степень	Локальный спаечный процесс в сочетании с одиночными редкими спайками в других областях
III степень	Спаечный процесс, занимающий более 1/3 брюшной полости
IV степень	Диффузный спаечный процесс, занимающий 2/3 брюшной полости

Таблица составлена авторами по данным источника [20]

Таблица 2. Основные заболевания — показания к оперативному лечению

	Основная группа n = 91		Контрольная группа n = 174	
	n	%	n	%
Миома матки	34	37,4	86	49,4
Новообразования яичников	23	25,3	29	16,7
Наружный генитальный эндометриоз	11	12,1	18	10,3
Хронические воспалительные заболевания органов малого таза с образованием гидросальпинксов	8	8,8	7	4,0
Бесплодие	6	6,6	17	9,7
Пролапс тазовых органов	4	4,4	12	6,9
Атипическая гиперплазия эндометрия, аденоматоз	2	2,2	5	2,9
Синдром хронической тазовой боли	3	3	0	0

Таблица составлена авторами по собственным данным ($p > 0,05$)

из этой группы не было в анамнезе никаких оперативных вмешательств. В таблице 3 представлены виды оперативных вмешательств ранее проведенных у пациенток основной группы с выраженным спаечным процессом. Общее количество проведенных операций составило 180, из них большая часть, 123 (68,3%) выполнена по поводу гинекологической патологии; на органах брюшной полости — 57 (31,7%) операций. Предшествующие оперативные вмешательства в абсолютном большинстве — 149 (82,8%) случаев — были выполнены лапаротомным доступом. Лапароскопическим доступом выполнено лишь 29 (16,1%) операций, влагалищным доступом — 2 (1,4%) операции.

Для решения поставленной клинической задачи пациенткам основной и контрольной групп выполнялись различные объемы оперативного вмешательства. В таблице 4 представлены основные виды проведенного хирургического лечения. Большую долю составляли радикальные операции — тотальная гистерэктомия с придатками или маточными трубами.

В ходе анализа данных историй болезни пациенток обеих групп установлено, что во всех случаях при введении троакара для оптики и инструментов повреждений

внутренних органов не было. При сравнении особенностей течения операционного вмешательства и течения послеоперационного периода в случаях хирургического лечения у пациенток основной и контрольной групп не выявлено статистически значимых различий (табл. 5).

Так, среднее время проведения хирургического вмешательства было больше на 25–40 мин. в основной группе пациенток за счет времени, затраченного на проведение адгезиолизиса. Показатели среднего объема кровопотери и длительности госпитализации значимо не отличались в обеих группах. Во всех случаях хирургического вмешательства был выполнен требуемый клинической ситуацией объем оперативного лечения, что дополнительно подтверждает возможность выполнения необходимого объема хирургического вмешательства при наличии выраженного спаечного процесса в брюшной полости. Конверсий на лапаротомию не было в обеих группах пациенток.

Активизация пациенток в обеих группах проводилась с первых суток послеоперационного периода, щадящее питание организовано со вторых суток. У всех пациенток перистальтика кишечника восстанавливалась на 1–2-е сутки.

В первые сутки после операции лишь 6 (6,6%) пациенток из основной группы оценивали боль по шкале VAS на уровне 7–8 баллов. Умеренная боль — на уровне 5–6 баллов по VAS — отмечена у 38 (41,8%), при этом слабый уровень боли — 3–4 балла — отмечали 42 (46,2%) женщины. Совсем отсутствовали жалобы на боль у 5 (5,4%) пациенток из основной группы наблюдения. К третьим суткам у всех пациенток уровень боли достигал 2–3 балла, что позволяло отменить применение обезболивающих средств. В контрольной группе были получены аналогичные данные.

Средняя длительность госпитализации пациенток в обеих группах статистически не отличалась, соответствующие данные представлены в таблице 5. Необходимость выполнения адгезиолизиса во время операции не приводила к увеличению послеоперационного койко-дня. Значимых интраоперационных и послеоперационных осложнений, таких как ранение смежных органов, кровотечения из поврежденных сосудов, гнойно-септические осложнения в раннем и позднем послеоперационном периоде, не зарегистрировано в обеих группах. В основной группе в одном случае при выполнении адгезиолизиса было проведено десерозирование стенки сигмовидной кишки без вскрытия просвета. Дефект был ушит лапароскопически и не повлиял на течение послеоперационного

Таблица 3. Общее количество и виды ранее проведенных оперативных вмешательств у пациенток основной группы из данных анамнеза

Оперативные вмешательства	Количество вмешательств
На органах репродуктивной системы, из них:	123
операции на придатках матки	43
кесарево сечение	38
тубная беременность	13
гистерэктомия	12
эндометриоз	10
миомэктомия	5
воспалительные заболевания	2
На органах брюшной полости, из них:	57
аппендэктомия	30
холецистэктомия	9
операции на кишечнике	6
ранения и травмы органов брюшной полости	5
операции по поводу разлитого перитонита	4
операции на печени	3

Таблица составлена авторами по собственным данным

Таблица 4. Виды оперативных вмешательств

Виды оперативных вмешательств	Основная группа n = 91		Контрольная группа n = 174	
	n	%	n	%
Тотальная гистерэктомия с придатками или с маточными трубами	38	41,8	99	55,2
Удаление новообразования яичника	13	14,3	20	11,5
Аднексэктомия	11	12,1	13	7,5
Операции по поводу эндометриоза	8	8,7	8	4,6
Миомэктомия	7	7,8	20	11,5
Тубэктомия	5	5,5	0	0
Рассечение спаечного процесса (бесплодие)	5	5,5	4	2,3
Промонтофиксация с применением сетчатого импланта	4	4,4	12	6,9
Метропластика рубца после кесарева сечения	0	0	1	0,6

Таблица составлена авторами по собственным данным

Таблица 5. Основные показатели оперативного вмешательства

Показатели	Основная группа	Контрольная группа
Средняя длительность операции, мин	107,90 ± 34,38	81,90 ± 25,60
Средний объем кровопотери, мл	65,0 ± 32,5	61,9 ± 29,2
Средняя продолжительность госпитализации, койко-дни	5,6 ± 1,8	6,1 ± 1,3
Пребывание в первые сутки после операции в палате интенсивной терапии, количество пациентов (%)	28 (30,8%)	59 (33,9%)
Конверсия на лапаротомию (%)	0	0

Таблица составлена авторами по собственным данным

периода. В течение последующего года наблюдения за пациентками обеих групп случаев кишечно-спаечной непроходимости не было.

До настоящего времени выраженный спаечный процесс остается противопоказанием для выбора лапароскопического доступа при хирургическом лечении. Считается, что спаечный процесс ухудшает визуализацию, увеличивает риски повреждения внутренних органов брюшной полости (кишечника, крупных сосудов и др.), ухудшает результаты хирургического лечения пациенток с заболеваниями органов женской репродуктивной системы. Кроме того, арсенал неинвазивной предоперационной диагностики спаек ограничен и не имеет широкого применения в рутинной практике [23, 24].

Разработка и внедрение стандартизированных диагностических критериев и хирургической тактики, позволяющих безопасно выполнять хирургическое лечение пациенток с заболеваниями органов репродуктивной системы в сочетании с выраженным спаечным процессом брюшной полости и малого таза, дадут возможность расширить группу пациенток с заболеваниями органов репродуктивной системы для применения лапароскопических технологий [24–26].

Предоперационное картирование спаечного процесса при помощи ультразвукового исследования и МРТ брюшной полости и малого таза с высокой долей вероятности облегчает выбор наиболее безопасных точек введения троакаров в брюшную полость. Отказ от применения иглы Вереша и прямое введение троакара в брюшную полость с последующим созданием карбоксиперитонеума не увеличивает частоту повреждений органов брюшной полости. Применение оптики переднебокового видения в 30° значительно улучшает визуализацию в условиях спаечного процесса. Использование хирургами комбинации

современного инструментария с различными видами энергий улучшает качество адгезиолизиса, снижает риски повреждения органов брюшной полости и малого таза, травматизации окружающих тканей и возникновения кровотечения. Все вышеперечисленное повышает безопасность выполняемого оперативного вмешательства в условиях спаечного процесса лапароскопическим методом. Представленные выводы согласуются с данными литературы [12, 25–27].

Проведенный сравнительный анализ демонстрирует возможность применения лапароскопического доступа для лечения женщин с патологией органов репродуктивной системы в сочетании с выраженным спаечным процессом брюшной полости и малого таза. Лапароскопический доступ в условиях выраженного спаечного процесса является безопасным, что обеспечивается предоперационными подготовкой и обследованием пациента, применением необходимого современного оборудования и инструментария, оперативными навыками и опытом хирурга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение лапароскопического доступа для выполнения оперативного лечения пациенток с заболеваниями органов репродуктивной системы в сочетании с выраженным спаечным процессом может рассматриваться как предпочтительный и безопасный метод лечения. Применение современных методов предоперационного картирования спаечного процесса (УЗИ, МРТ), использование современного оборудования способствуют повышению безопасности проведения лапароскопических методов и снижению риска интраоперационных и послеоперационных осложнений.

Литература / References

1. Лаврешин ПМ, Боташева ВС, Гобеджишвили ВВ, Келасов ИГ. Динамика морфологических изменений в брюшине при ее механическом повреждении. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2010;4:59–62.
Lavreshin PM, Botasheva VS, Gobedzhishvili VV, Kelasov IG. Dynamics of morphologic changes in the peritoneum at its mechanical damage. *Medical Bulletin of the North Caucasus*. 2010;4:59–62 (In Russ.).
EDN: [NBXMFP](#)
2. Catena F, Di Saverio, S, Kelly MD. et al. Bologna Guidelines for Diagnosis and Management of Adhesive Small Bowel Obstruction (ASBO): 2010 Evidence-Based Guidelines of the World Society of Emergency Surgery. *World J. Emerg Surg*. 2011;5:1–24.
<https://doi.org/10.1186/1749-7922-6-5>
3. Беженарь ВФ, Цыпурдеева АА, Байлюк ЕН. Спаечная болезнь органов малого таза у гинекологических больных: от патогенеза к профилактике. *Онкогинекология*, 2014;4:68–74.
Bezhenar VF, Tsyurdeeva AA, Baylyuk EN. Adhesive disease pelvic organs in gynecological patients: from pathogenesis to prevention. *Oncogynecology*. 2014;(4):68–74 (In Russ.).
EDN: [TDXGYJ](#)
4. Behman R, Nathens AB, Byrne JP, Mason S, Look HN, Karanicolas PJ. Laparoscopic Surgery for Adhesive Small Bowel Obstruction Is Associated With a Higher Risk of Bowel Injury: A Population-based Analysis of 8584. *Patients Annals of Surgery*. 2017;266(3):489–98.
<https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000002369>
5. Szomstein S, Menzo E, Simpfendorfer C, Zundel N, Rosenthal RJ. Laparoscopic Lysis of Adhesions. *World J Surg*. 2006;30:1–7.
<https://doi.org/10.1007/s00268-005-7778-0>
6. Назаренко АА, Акимов ВП, Малышкин ПО. Эпидемиология, патогенез и профилактика послеоперационного спаечного процесса в брюшной полости. *Вестник хирургии имени И.И. Грекова*. 2016;175(5):114–8.
Nazarenko AA, Akimov VP, Malyshevskiy PO. Epidemiology, pathogenesis and prevention of postoperative adhesions in the abdominal cavity. *Bulletin of Surgery named after I.I. Grekov*. 2016; 175(5):114–8 (In Russ.).
EDN: [XBVPAJ](#)
7. Беженарь ВФ, Айламазян ЭК, Байлюк ЕН, Цыпурдеева АА, Поленов НИ. Этиология, патогенез и профилактика спайкообразования при операциях на органах малого таза. *Российский вестник акушера-гинеколога*. 2011;11(2):90–101.
Bezhenar VF, Ailamazyan EK, Baylyuk EN, Tsyurdeeva AA, Polenov NI. Etiology, pathogenesis and prevention of adhesions in surgery of the pelvic. *Russian Obstetrician-Gynecologist Gazette*. 2011;11(2):90–101 (In Russ.).
EDN: [PZAVRV](#)
8. Адамян ЛВ, Козаченко АВ, Кондратович ЛМ. Спаечный процесс в брюшной полости: история изучения, классификация, патогенез (обзор литературы). *Проблемы репродукции*. 2013;6:7–13.
Adamyan LV, Kozachenko AV, Kondratovich LM. Peritoneal adhesions: the history of research, classification and pathogenesis (a review). *Russian Journal of Human Reproduction*. 2013;6:7–13 (In Russ.).
EDN: [RZQNGR](#)
9. Луцевич ОЭ, Акимов ВП, Ширинский ВГ, Бичев АА. Вопросы патогенеза спаечной болезни брюшины и современные подходы к ее предупреждению. Обзор литературы. *Московский хирургический журнал*. 2017;3:11–26
Lutsevich OE, Akimov VP, Shirinsky VG, Bichev AA. Issues of pathogenesis of adhesive peritoneal disease and modern approaches to its prevention. Literature review. *Moscow Surgical Journal*. 2017;3:11–26 (In Russ.).
EDN: [YSTFQI](#)
10. Юсубов ИА. Роль малоинвазивных технологий в диагностике и лечении непроходимости кишечника послеоперационного спаечного происхождения. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2023;43(4):132–8.
Yusubov IA. The role of minimally invasive technologies in the diagnosis and treatment of intestinal obstruction of postoperative adhesive origin. *Siberian Scientific Medical Journal*. 2023;43(4):132–8 (In Russ.).
<https://doi.org/10.18699/SSMJ20230414>
11. Sikirica V, Bapat B, Candrilli SD, Davis KL, Wilson M, Johns A. The inpatient burden of abdominal and gynecological adhesiolysis in the US. *Sikirica et al. BMC Surgery*. 2011;11:2–9.
<https://doi.org/10.1186/1471-2482-11-13>
12. Звягинцев ВВ, Горпинюк ВП, Фомов ГВ и др. Особенности проведения лапароскопических операций у больных после проведения абдоминальных полостных вмешательств. *Современные проблемы науки и образования*. 2019;4:128.
Zvyagintsev VV, Gorpinyuk VP, Fomov GV, et al. Features of laparoscopic operations in patients after abdominal cavity interventions. *Modern problems of science and education*. 2019;4:128 (In Russ.).
<https://doi.org/10.17513/spno.29013>
13. Ahmad G, Kim K, Thompson M et al. Barrier agents for adhesion prevention after gynaecological surgery. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2020;3(4):CD000475.
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD000475.pub4>
14. Ahmad G, Thompson M, Kim K, et al. Fluid and pharmacological agents for adhesion prevention after gynaecological surgery. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2020;7:CD001298.
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD001298.pub5>
15. Бондаревский ИЯ, Шалмагамбетов МС, Бордуновский ВН. Современное состояние проблемы прогнозирования и профилактики послеоперационного адгезиогенеза брюшины (обзор литературы). *Урал. мед. журн*. 2018;1(156):69–78.
Bondarevskiy IYa, Shalmagambetov MS, Bordunovskiy VN. The current state of the problem of forecasting and prevention of postoperative peritoneal adhesiogenesis (literature review). *Ural Medical Journal. Ural medical journal*. 2018;1(156):69–78 (In Russ.).
EDN: [YODEDL](#)
16. Шкердина МИ, Антонян СЖ, Жариков ЮО. Аспекты лапароскопического лечения больных спаечной тонкокишечной непроходимостью (обзор литературы). *Вестник хирургии имени И. И. Грекова*. 2020;179(2):79–84.
Shkerdina MI, Antonyan SZh, Zharikov Yu O. Aspects of laparoscopic treatment of patients with adhesive small bowel obstruction (literature review). *Bulletin of surgery named after I. I. Grekov*. 2020;179(2):79–84 (In Russ.).
<https://doi.org/10.24884/0042-4625-2020-179-2-79-84>
17. Тарасенко СВ, Зайцев ОВ, Соколов ПВ. и др. Лапароскопический доступ при лечении спаечной тонкокишечной непроходимости. *Вестник хирургии им. И.И. Грекова*. 2018;177(2):30–3
Tarasenko SV, Zaitsev OV, Sokolov PV, et al. Laparoscopic access in the treatment of adhesive small bowel obstruction. *Bulletin of Surgery named after I.I. Grekov*. 2018; 177(2):30–3 (In Russ.).
<https://doi.org/10.24884/0042-4625-2018-177-2-30-33>
18. Behman R, Nathens AB, Byrne JP, Mason S, Look Hong N, Karanicolas PJ. Laparoscopic Surgery for Adhesive Small Bowel Obstruction Is Associated With a Higher Risk of Bowel Injury: a Population-based Analysis of 8584 Patients. *Ann. Surg*. 2017;266(3):489–98.
<https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000002369>
19. Schaefer SD, Alkatout I, Dornhoefer N, Herrmann J, Klapdor R, Meinhold-Heerlein I, Meszaros J, Mustea A, Oppelt P, Wallwiener M, Kraemer B. Prevention of peritoneal adhesions after gynecological surgery: a systematic review. *Arch Gynecol Obstet*. 2024;310(2):655–72.
<https://doi.org/10.1007/s00404-024-07584-1>
20. Аюшинова НИ, Шурыгина ИА, Шурыгин МГ, Глинская ЕВ. Оценка выраженности спаечного процесса в брюшной полости. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. 2014;7:10–14.
Ayushinova NI, Shurygina IA, Shurygin MG, Glinskaya EV. Assessment of the severity of the adhesive process in the

- abdominal cavity. *Siberian Medical Journal (Irkutsk)*. 2014;7:10–14 (In Russ.).
EDN: [TQPYQJ](#)
21. Мохов ЕМ, Кадыков ВА, Сергеев АН. Оценочные шкалы боли и особенности их применения в медицине (обзор литературы). *Верхневолжский медицинский журнал*. 2019;18(2):34–7. Mokhov EM, Kadykov VA, Sergeev AN, et al. Pain assessment scales and features of their application in medicine (literature review). *Verkhnevolzhsky Medical Journal*. 2019;18(2):34–7 (In Russ.).
EDN: [DEYKPY](#)
 22. Hawker GA, Mian S, Kendzerska T, French M. Measures of adult pain: Visual Analog Scale for Pain (VAS Pain), Numeric Rating Scale for Pain (NRS Pain), McGill Pain Questionnaire (MPQ), Short-Form McGill Pain Questionnaire (SF-MPQ), Chronic Pain Grade Scale (CPGS), Short Form-36 Bodily Pain Scale (SF-36 BPS), and Measure of Intermittent and Constant Osteoarthritis Pain (ICOAP). *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2011;63(11):S240–52. <https://doi.org/10.1002/acr.20543>
 23. Ghonge NP, Ghonge SD. Computed tomography and magnetic resonance imaging in the evaluation of pelvic peritoneal adhesions: What radiologists need to know? *Indian J Radiol Imaging*. 2014;24(2):149–55. <https://doi.org/10.4103/0971-3026.134400>
 24. Армашов ВП, Белоусов АМ, Вавшко МВ, Мадрахимов ШН, Армашов ГВ, Матвеев НЛ. Возможна ли ультразвуковая диагностика перитонеальных спаек до проведения абдоминальной операции? *Инновационная медицина Кубани*. 2022;(4):75–81. Armashov VP, Belousov AM, Vavshko MV, Madрахimov ShN, Armashov GV, Matveev NL. Is ultrasound diagnosis of peritoneal adhesions possible before abdominal surgery? *Innovative medicine of Kuban*. 2022;(4):75–8 (In Russ.). <https://doi.org/10.35401/2541-9897-2022-25-4-75-81>
 25. Луцевич ОЭ, Галлямов ЭА, Попов СВ. и соавт. Особенности лапароскопических операций в условиях спаечной болезни брюшины и возможности ее лапароскопического лечения и профилактики. *Тихоокеан. мед. журн.* 2017;1(67):69–73. Lutsevich OE, Gallyamov EA, Popov SV, et al. Features of laparoscopic operations in conditions of adhesive peritoneal disease and the possibility of its laparoscopic treatment and prevention. *Pacific Medical Journal*. 2017;1(67):69–73 (In Russ.). <https://doi.org/10.17238/PmJ1609-1175.2017.1.69-73>
 26. Di Saverio S, Birindelli A, Broek RT. et al. Laparoscopic adhesiolysis: not for all patients, not for all surgeons, not in all centres. *Updates Surg*. 2018;70(4):557–61. <https://doi.org/10.1007/s13304-018-0534-4>
 27. Byrne J, Saleh F, Ambrosini L, Quereshy F, Jackson TD, Okrainec A. Laparoscopic versus open surgical management of adhesive small bowel obstruction: a comparison of outcomes. *Surg Endosc*. 2015;29(9):2525–32. <https://doi.org/10.1007/s00464-014-4015-7>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Е.А. Соловьева — концепция и дизайн исследования, обзор литературы, сбор и обработка материалов, анализ полученных данных, написание текста; О.С. Филиппов — концепция и дизайн исследования, внесение окончательной правки; А.П. Урюпина — сбор и обработка материалов, анализ полученных данных, написание текста; Н.А. Чугунова — концепция и дизайн исследования; Д.А. Иванова — обзор литературы, анализ полученных данных; А.М. Уткина — обзор литературы, анализ полученных данных.

ОБ АВТОРАХ

Соловьева Елена Анатольевна, канд. мед. наук
<https://orcid.org/0009-0004-9442-8645>
solovevaln@inbox.ru

Урюпина Анна Петровна
<https://orcid.org/0009-0008-3348-3631>
anna.petra3@mail.ru

Иванова Дарья Андреевна
<https://orcid.org/0009-0006-1942-7516>
daria.andreevna1995@mail.ru

Филиппов Олег Семенович, д-р мед. наук, профессор
<https://orcid.org/0000-0003-2654-1334>
ilippovolesem@yandex.ru

Чугунова Нина Александровна
<https://orcid.org/0009-0003-3345-579X>
nkc@nkc-fmba.ru

Уткина Анна Михайловна
<https://orcid.org/0009-0000-1757-0307>
annautkina83@gmail.com



Научно-практический рецензируемый журнал
ФМБА России
extrememedicine.ru