

МЕДИЦИНА ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ СИТУАЦИЙ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ ФМБА РОССИИ

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.; Валентина Гейдебрект, к. б. н.

ТЕХНИЧЕСКИЙ РЕДАКТОР Евгений Лукьянов

ПЕРЕВОДЧИКИ Надежда Тихомирова, Вячеслав Витюк

ДИЗАЙН И ВЕРСТКА Марины Дорониной

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

В. К. Агапов, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

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

И. В. Борисевич, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

А. Ю. Бушманов, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Р. Валента, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

С. Э. Восканян, д. м. н., профессор, член-корр. РАН

Н. А. Дайхес, д. м. н., профессор, член-корр. РАН (Москва, Россия)

С. В. Дударенко, д. м. н., доцент (Санкт-Петербург, Россия)

К. А. Зыков, д. м. н., профессор, член-корр. РАН

Л. А. Ильин, д. м. н., профессор, академик РАН (Москва, Россия)

Н. Н. Каркищенко, д. м. н., профессор, член-корр. РАН

Р. Р. Каспранский, к. м. н.

М. А. Лагарькова, д. б. н., профессор, член-корр. РАН

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

А. С. Радилов, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)

В. Л. Рейнюк, д. м. н., доцент

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

В. И. Сергиенко, д. м. н., профессор, член-корр. РАН (Москва, Россия)

С. В. Сидоркевич, д. м. н. (Москва, Россия)

К. К. Стяжкин, д. б. н., профессор

А. В. Троицкий, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

А. Н. Усков, д. м. н., доцент

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. Араkelов, к. б. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)

В. П. Баклаушев, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

М. О. Дегтева, к. т. н. (Челябинск, Россия)

Н. В. Ефименко, д. м. н., профессор (Пятигорск, Россия)

Е. В. Казакевич, д. м. н., профессор (Архангельск, Россия)

В. П. Катунцев, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

В. А. Климанов, д. ф.-м. н., профессор (Москва, Россия)

Д. В. Клинов, к. ф.-м. н. (Москва, Россия)

Н. А. Кошурикова, д. м. н., профессор (Озерск, Россия)

И. П. Миннуллин, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)

И. Г. Мосягин, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)

О. М. Панасенко, д. б. н., профессор, член-корр. РАН (Москва, Россия)

В. А. Рогожников, д. м. н. (Москва, Россия)

С. А. Романов, к. б. н. (Озерск, Россия)

С. А. Сотниченко, д. м. н. (Владивосток, Россия)

Т. Г. Суранова, к. м. н., доцент (Москва, Россия)

Р. М. Тахауов, д. м. н., профессор (Северск, Россия)

Н. К. Шандала, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

С. М. Шинкарев, д. т. н. (Москва, Россия)

Г. А. Шипулин, к. м. н. (Москва, Россия)

Т. В. Яковлева, д. м. н. (Москва, Россия)

ПОДАЧА РУКОПИСЕЙ editor@fmba.press

ПЕРЕПИСКА С РЕДАКЦИЕЙ editor@fmba.press

СОТРУДНИЧЕСТВО manager@fmba.press

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

Журнал включен в Scopus в 2022 г.

Журнал включен в РИНЦ, IF 2018: 0,570

Журнал включен в Перечень 31.01.2020 (№ 1292)

Здесь находится открытый архив журнала



ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)



DOI выпуска: 10.47183/mes.2022-04

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

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

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



Подписано в печать 31.12.2022

Тираж 500 экз. Отпечатано в типографии Print.Formula
www.print-formula.ru

EXTREME MEDICINE

SCIENTIFIC AND PRACTICAL REVIEWED JOURNAL OF FMBA OF RUSSIA

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

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

EDITORS Vsevolod Belousov, DSc, professor, RAS corresponding member; Anton Keskinov, PhD; Valentina Geidebrekht, PhD

TECHNICAL EDITOR Evgeny Lukyanov

TRANSLATORS Nadezda Tikhomirova, Vyacheslav Vityuk

DESIGN AND LAYOUT Marina Doronina

EDITORIAL BOARD

Agapov VK, DSc, professor (Moscow, Russia)
Bogomolov AV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Boyko AN, DSc, professor (Moscow, Russia)
Bolekhan WN, DSc, docent
Borisevich IV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Bushmanov AY, DSc, professor (Moscow, Russia)
Valenta R, PhD, professor (Moscow, Russia)
Voskanyan S, member of RAS, DSc, professor
Daikhes NA, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Dudarenko SV, DSc (Saint-Petersburg, Russia)
Zykov KA, member of RAS, DSc, professor
Ilyin LA, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Karkischenko NN, member of RAS, DSc, professor
Kaspranskiy RR, PhD
Lagarkova MA, member of RAS, DSc, professor
Lobzin YV, member of RAS, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)
Nikiforov VV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Olesova VN, DSc, professor (Moscow, Russia)
Petrov RV, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Polyaev BA, DSc
Sadilov AS, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)
Rejniuk VL, DSc, docent
Rembovsky VR, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)
Samoilov AS, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Sergienko VI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Sidorenko SV, member of RAS, DSc, professor
Sidorcevich SV, DSc (Moscow, Russia)
Styazhkin KK, DSc, professor
Troitsky AV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Uskov AN, DSc, docent
Ushakov IB, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Khaitov MR, member of 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)
Degteva MO, PhD (Chelyabinsk, Russia)
Efimenko NV, DSc, professor (Pyatigorsk, Russia)
Kazakevich EV, DSc, professor (Arkhangelsk, Russia)
Katuntsev VP, DSc, professor (Moscow, Russia)
Klimanov VA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Klinov DV, PhD (Moscow, Russia)
Koshurnikova NA, DSc, professor (Ozersk, Russia)
Minnuliin IP, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)

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

SUBMISSION editor@fmba.press

CORRESPONDENCE editor@fmba.press

COLLABORATION manager@fmba.press

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

Indexed in Scopus in 2022

Indexed in RSCI. IF 2018: 0,570

Listed in HAC 31.01.2020 (№ 1292)

Open access to archive

Scopus®

НАУЧНАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ
БИБЛИОТЕКА
LIBRARY.RU



ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)

CYBERLENINKA

Issue DOI: 10.47183/mes.2022-04

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

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

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



Approved for print 31.12.2022

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

ОБЗОР	5
Технологии создания вируснейтрализующих антител человека на примере SARS-CoV-2 В. П. Бахлашев, Е. М. Самойлова, С. М. Кузнецова, Е. В. Ермолаева, Г. М. Юсубалиева, В. А. Кальсин, А. В. Липатова, А. В. Троицкий	
Neutralizing antibody creation technologies: case of SARS-CoV-2 Baklaushhev VP, SamoiloVA EM, Kuznetsova SM, Ermolaeva EV, YusubalievA GM, Kalsin VA, Lipatova AV, Troitsky AV	
ОБЗОР	14
Технические средства на основе иммунохроматографии для индикации патогенных микроорганизмов и токсинов С. П. Ярков, И. В. Шиленко, С. И. Третьяков, Ю. Н. Ишков, К. К. Стяжкин	
Immunochromatography-based portable equipment for indication of pathogenic microorganisms and toxins Yarkov SP, Shilenko IV, Tretyakov SI, Ishkov YN, Styazhkin KK	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	23
Регуляторные Т-клетки и Т-хелперы 17-го типа с экспрессией эктонуклеотидаз CD39 и CD73 при тяжелой механической травме у детей Р. Ш. Закиров, Д. Г. Купцова, Е. В. Фрейдлин, Е. Л. Семикина, С. В. Петричук, О. В. Карасева	
Regulatory T cells and T helper 17 cells expressing CD39 and CD73 ectonucleotidase in children with severe injury Zakirov RSh, Kuptsova DG, Freidlin EV, Semikina EL, Petrichuk SV, Karaseva OV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	31
Получение хрящеподобных структур из стволовых клеток с индуцированной плюрипотентностью А. В. Еремеев, А. С. Пикина, Е. С. Ручко, В. С. Сидоров, А. О. Рагозин	
Fabrication of cartilage tissue substitutes from cells with induced pluripotency Eremeev AV, Pikina AS, Ruchko ES, Sidorov VS, Ragozin AO	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	43
Оценка цитотоксичности и противовирусной активности смеси лактоферрина, артемизинина и азитромицина в отношении SARS-CoV-2 in vitro А. А. Рябченкова, В. В. Копать, Е. Р. Чирак, Е. Л. Чирак, И. А. Ленева, Е. А. Глубокова, Н. П. Карташова, Н. Н. Колмаков, И. В. Духовлинов	
Assessment of cytotoxicity and antiviral activity against SARS-CoV-2 of the mixture of lactoferrin, artemisinin, and azithromycin in vitro Ryabchenkova AA, Kopat VV, Chirak ER, Chirak EL, Leneva IA, Glubokova EA, Kartashova NP, Kolmakov NN, Dukhovlinov IV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	52
Выделение и характеристика бактериофагов <i>Klebsiella pneumoniae</i>, кодирующих полисахарид-деполимераза с уникальной капсульной специфичностью Р. Б. Городничев, М. А. Корниенко, Д. А. Беспятых, М. В. Малахова, В. А. Веселовский, О. В. Голощапов, А. Б. Чухловин, Ю. А. Беспятых, Е. А. Шитиков	
Isolation and characterization of <i>Klebsiella pneumoniae</i> bacteriophages encoding polysaccharide depolymerases with rare capsule specificity Gorodnichen RB, Kornienko MA, Bespyatykh DA, Malakhova MV, Veselovsky VA, Goloshchapov OV, Chukhlovin AB, Bespyatykh JA, Shitikov EA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	60
Оценка методов инактивирования вируса лейкоза птиц при производстве гриппозных вакцин Н. Н. Савина, А. А. Екимов, М. А. Шуклина, В. П. Трухин, А. Э. Евтушенко, Е. Н. Жиренкина, Л. А. Степанова	
Evaluation of methods of avian leucosis virus inactivation in production of influenza vaccines Savina NN, Ekimov AA, Shuklina MA, Trukhin VP, Evtushenko AE, Zhirenkina EN, Stepanova LA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	66
Решение задачи формирования безопасной конфигурации роботического протеза верхней конечности человека А. Ш. Буреев, Е. В. Голобокова, Д. С. Жданов, Я. В. Костелей, Р. В. Кошелев, Е. А. Фоменко	
Solution to the problem of designing a safe configuration of a human upper limb robotic prosthesis Bureev ASH, Golobokova EV, Zhdanov DS, Kosteley YaV, Koshelev RV, Seleznev AI, Fomenko EA	

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

74

Вычислительный фантом для дозиметрии красного костного мозга новорожденного ребенка от инкорпорированных бета-излучателей
П. А. Шарагин, Е. А. Шишкина, Е. И. Толстых

Computational phantom for red bone marrow dosimetry from incorporated beta emitters in a newborn baby
Sharagin PA, Shishkina EA, Tolstykh EI

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

83

Методическое сопровождение работ по выводу из эксплуатации объектов атомной отрасли
Д. Е. Калинин, А. Р. Тахауов, Л. Р. Тахауова, И. В. Мильто, Р. М. Тахауов

Methodological support of activities on decommissioning the nuclear facilities
Kalinkin DE, Takhaouov AR, Takhaouova LR, Milto IV, Takhaouov RM

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

90

Проблемы анализа смертности в городах Российской Федерации
М. М. Салтыкова, У. И. Антипина, А. В. Балакаева

Problems of mortality analysis in towns of the Russian Federation
Saltykova MM, Antipina UI, Balakaeva AV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

96

Показатели внимания как индикаторы утомления медицинских работников скорой медицинской помощи
Т. А. Болобонкина, А. А. Дементьев, Н. В. Минаева

Attention indicators as markers of fatigue in ambulance workers
Bolobonkina TA, Dementiev AA, Minaeva NV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

102

Метаболическая активность иммунокомпетентных клеток в оценке индивидуальной холодовой чувствительности
В. П. Патракеева, В. А. Штаборов

Metabolic activity of immunocompetent cells in assessment of individual cold sensitivity
Patrakeeva VP, Shtaborov VA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

107

Сравнительная оценка влияния погодно-климатических условий в Арктике по биоклиматическим индексам
Р. С. Рахманов, Д. А. Нарутдинов, Е. С. Богомолова, С. А. Разгулин

Comparative assessment of the impact of weather and climate conditions in the Arctic region by bioclimatic indices
Rakhmanov RS, Narutdinov DA, Bogomolova ES, Razgulin SA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

114

SWOT-анализ организации антидопинговых мероприятий при проведении медико-биологического обеспечения спортсменов
А. А. Деревоедов, А. В. Жолинский, В. С. Фещенко, И. Т. Выходец, К. А. Стащук, А. А. Павлова

SWOT analysis of organization of anti-doping measures in the context of medical and biological support of athletes
Derevoedov AA, Zholinsky AV, Feshchenko VS, Vykhodets IT, Stashchuk KA, Pavlova AA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

121

Влияние фактора интерференции социальных сетей на процессы консолидации памяти у подростков
Е. А. Петраш, В. Б. Никишина, Т. Н. Разуваева, М. В. Сокольская, А. А. Кузнецова, И. В. Запесоцкая

Effects of the social media interference factor on memory consolidation in adolescents
Petrash EA, Nikishina VB, Razuvaeva TN, Sokolyskaya MV, Kuznetsova AA, Zapesotskaya IV

ТЕХНОЛОГИИ СОЗДАНИЯ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ ЧЕЛОВЕКА НА ПРИМЕРЕ SARS-COV-2

В. П. Баклаушев^{1,2,3}✉, Е. М. Самойлова^{1,2}, С. М. Кузнецова¹, Е. В. Ермолаева², Г. М. Юсубалиева^{1,2}, В. А. Кальсин^{1,2}, А. В. Липатова², А. В. Троицкий¹

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

² Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

³ Научно-исследовательский институт пульмонологии Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Моноклональные антитела (мАт) — самый перспективный и наиболее интенсивно пополняемый вид биоактивных фармпрепаратов. В настоящее время более 100 различных мАт одобрены FDA и другими регуляторами для терапии онкологических, инфекционных, системных, аутоиммунных и других заболеваний. Отдельным современным направлением является получение вируснейтрализующих антител к возбудителям социально значимых инфекций, таких как ВИЧ, вирусы гепатита, SARS-CoV-2. Пандемия новой коронавирусной инфекции показала, насколько актуально может быть наличие технологической платформы по производству полностью гуманизированных антител человека. Развитие технологии рекомбинантных ДНК и разработка фагового дисплея антител позволили создавать библиотеки антигенсвязывающих фрагментов и проводить скрининг с целевыми антигенами. В обзоре обсуждаются достоинства и недостатки фагового дисплея, в том числе с применением технологии однодоменных антител на основе варибельного домена тяжелой цепи. Представлены описание и практические результаты наиболее современной технологии получения антител человека путем сортировки и секвенирования генома отдельных В-клеток памяти на примере получения моноклональных вируснейтрализующих антител против SARS-CoV-2. Описаны перспективы дальнейшего развития технологии получения рекомбинантных антител человека, в частности — создание последовательностей варибельных фрагментов антител с помощью искусственного интеллекта.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, вируснейтрализующие антитела, фаговый дисплей, В-клетки, NGS-секвенирование

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (договор № 075-15-2021-1086, контракт № RF----193021X0015, 15.ИП.21.0015).

✉ **Для корреспонденции:** Владимир Павлович Баклаушев
Ореховый бульвар, д. 28, г. Москва, 115682, Россия; baklaushev.vp@fnkc-fmba.ru

Статья получена: 29.11.2022 **Статья принята к печати:** 20.12.2022 **Опубликована онлайн:** 30.12.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.049

NEUTRALIZING ANTIBODY CREATION TECHNOLOGIES: CASE OF SARS-COV-2

Baklaushev VP^{1,2,3}✉, Samoilova EM^{1,2}, Kuznetsova SM¹, Ermolaeva EV², Yusubalieva GM^{1,2}, Kalsin VA^{1,2}, Lipatova AV², Troitsky AV¹

¹ Federal Scientific and Clinical Center of Specialized Types of Medical Care and Medical Technologies, Federal Medical Biological Agency of Russia, Moscow, Russia

² Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³ Research Institute of Pulmonology, Federal Medical Biological Agency of Russia, Moscow, Russia

Monoclonal antibodies (mAbs) are the most promising and most intensively replenished type of bioactive pharmaceuticals. Currently, there are over 100 different mAbs approved by the FDA and other regulating agencies for treatment of oncological, infectious, systemic, autoimmune and other diseases. Design of antibodies neutralizing pathogens of socially significant infections, such as HIV, hepatitis viruses, SARS-CoV-2, is a separate direction. The SARS-CoV-2 pandemic has shown how urgent it is to have a technological platform enabling production of fully human antibodies. The development of recombinant DNA technology and antibody phage display enabled compilation of libraries of antigen-binding fragments and screening with target antigens. This review discusses the advantages and disadvantages of phage display, including use of single-domain antibody technology based on the heavy chain variable domain. We describe the state-of-the-art (and practical results of its application) technology enabling production of human antibodies by sorting and sequencing the genome of individual memory B cells, using monoclonal virus-neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 as an example. The prospects of further development of the recombinant human antibody production technology are discussed; in particular, we consider creation of sequences of variable fragments of antibodies with the help of artificial intelligence.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, neutralizing antibodies, phage display, B cells, NGS sequencing

Funding: the study was supported financially by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (contract #075-15-2021-1086, contract #RF----193021X0015, 15.IP.21.0015).

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladimir P. Baklaushev
Orekhovyj bul'var, 28, g. Moscow, 115682, Russia; baklaushev.vp@fnkc-fmba.ru

Received: 29.11.2022 **Accepted:** 20.12.2022 **Published online:** 30.12.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.049

Со времен открытия гибридной технологии получения моноклональных антител Келлером и Милстейном в 1975 г. [1] созданы, испытаны, зарегистрированы, применены и выведены из употребления сотни диагностических и терапевтических антител [2]. Первые зарегистрированные терапевтические антитела Muromonab-CD3 были получены гибридной технологией в мыши [3]. Следующим этапом развития технологии получения терапевтических антител стала гуманизация мышиных иммуноглобулинов — частичная или полная, ставшая возможной в результате прогресса технологии рекомбинантных ДНК [4]. Примерно в то же

время, когда на человеке испытывали первые мышинные терапевтические антитела, был создан фаговый дисплей — сначала пептидов [5], а потом и антител [6]. Этот метод стал, пожалуй, самым мощным инструментом создания и «улучшения» терапевтических антител, постепенно вытеснившим гибридную технологию [2, 7]. Альтернатива фаговому дисплею появилась в результате развития технологии секвенирования отдельных клеток, когда стало возможным получение моноклональных антител человека путем клонирования варибельных фрагментов антител из определенного клона плазматических клеток [8].

Одно из самых перспективных направлений медицинского применения моноклональных антител человека — получение терапевтических нейтрализующих антител (нАТ) и использование их для профилактики и лечения социально значимых инфекционных заболеваний. Особую актуальность приобрела разработка вируснейтрализующих антител против возбудителя новой коронавирусной инфекции в период пандемии COVID-19 [9]. С начала пандемии COVID-19 было разработано, испытано в клинических исследованиях и зарегистрировано в FDA и у других регуляторов более 20 различных нАТ. Появление новых вариантов SARS-CoV-2 привело к тому, что большинство нАТ потеряли свою эффективность, вместе с тем ряд нАТ показали широкую нейтрализующую активность в отношении наиболее распространенных вариантов Омикрона [8, 11]. Несмотря на существенное уменьшение доли тяжелого течения COVID-19, нАТ по-прежнему остаются самым эффективным средством этиотропной терапии, особенно актуальной в когорте онкогематологических пациентов и пациентов с другими первичными и вторичными иммунодефицитами [12].

Цель настоящего обзора — на примере разработки вируснейтрализующих антител против SARS-CoV-2 осветить современное состояние проблемы получения рекомбинантных антител человека.

Фаговый дисплей антител

Метод фагового дисплея антител был независимо разработан несколькими научными группами, первой из которых стала группа McCafferty из Кембриджского университета [6]. Суть метода заключается в создании фаговой библиотеки, содержащей все возможные варианты вариабельных участков иммуноглобулинов. Это достигается путем клонирования антигенсвязывающих последовательностей антител в последовательность поверхностного белка pIII филаментных бактериофагов M13, fd или f1, в результате чего создается некоторое количество уникальных клонов, каждый из которых презентует на своей поверхности вариабельный фрагмент определенной специфичности. Дальнейшие этапы технологии включают скрининг фагов и отбор по тому или иному полезному свойству, например по коэффициенту аффинности связывания с антигеном, иммобилизованным на твердой фазе с последующим клонированием отобранных последовательностей в векторы для экспрессии антител [6]. Фаговая библиотека может быть создана из вариабельных участков последовательности иммуноглобулинов иммунизированного животного или человека, а может представлять собой и случайный набор синтетических пептидов [13].

Преимуществом фагового дисплея, по сравнению с другими аналогичными технологиями, такими как рибосомный дисплей [14], дрожжевой дисплей [15] или дисплей в клетках млекопитающих [16], является то, что библиотеки с разнообразием уникальных клонов больше чем 10¹¹ могут быть созданы и продолжительно сохранены в состоянии, готовом для скрининга с любой панелью антигенов [7]. Вариабельные фрагменты антител в фаговых библиотеках могут существовать в нескольких форматах: в виде антиген-связывающих Fab-фрагментов [17] или однодоменных scFv-фрагментов (single chain fragment variable) [18, 19]. ScFv — моновалентные фрагменты антител, имеющие молекулярную массу 25–27 кДа и состоящие из вариабельных доменов тяжелой

(VH) и легкой (VL) цепей иммуноглобулинов, соединенных пептидным линкером [20]. Fab — относительно большие фрагменты иммуноглобулинов, состоящие из VH, VL, CL, и CH1 доменов. Преимущество scFv — в более высоком уровне экспрессии в фагах по сравнению с Fab, однако в формате scFv всегда существует некоторый риск потери аффинности при переводе в Fab или в полноразмерный IgG [7]. Среди других вариантов фаговых библиотек антител однодоменные антитела (человека VH, верблюдовых VHH и акул VNAR соответственно), которым ниже посвящен отдельный раздел.

Методом фагового дисплея антител были получены нАТ против ВИЧ [21], токсина сибирской язвы [22], клещевого энцефалита [23] и, конечно, против SARS-CoV-2 [24]. В последнем исследовании продемонстрировано, что высокоаффинные нейтрализующие антитела против S-белка SARS-CoV-2 с показателем ID₅₀ < 2 нг/мл могут быть получены методом фагового дисплея из полусинтетической библиотеки вариабельных фрагментов наивных антител. Создание правильной библиотеки CDR наивных В-клеток, таким образом, является ключевым параметром, обеспечивающим стабильное спаривание VH и VL доменов и, как следствие, получение высокоаффинных нейтрализующих антител [24]. Вместе с тем, следует отметить, что данная проблема успешно решается далеко не всеми и подавляющее большинство высокоактивных нАТ получено из образцов гипериммунных реконвалесцентов [8].

Из недостатков фагового дисплея канонических олигомерных антител следует отметить, что получаемые антитела, как правило, не соответствуют естественному репертуару, поскольку генерируются из случайных пар VH и VL. Одним из вариантов решения проблемы спаривания VH/VL доменов является использование фаговых библиотек однодоменных антител семейства верблюдовых — так называемых нанотел [25, 26].

Однодоменные антитела как платформа для создания терапевтических иммунопрепаратов методом фагового дисплея

Однодоменные антитела, или нанотела, — рекомбинантные вариабельные домены тяжелых цепей VHH, получаемые из неканонических иммуноглобулинов, Fab-фрагмент которых состоит только из укороченной тяжелой цепи, без легкой цепи. В норме такие антитела присутствуют у хрящевых рыб и представителей семейства верблюдовых (Camelidae) в дополнение к «классическим» иммуноглобулинам G, состоящим из двух тяжелых и двух легких цепей [25]. Основное преимущество нанотел заключается в том, что VHH-домен, представленный одной полипептидной последовательностью, может быть легко клонирован в прокариотической или дрожжевой системах экспрессии. Размер нанотела составляет 12–15 кДа, они хорошо растворимы и способны к рефолдингу после очистки в денатурирующих условиях [25]. Повышенная растворимость VHH связана с особенностями их аминокислотного состава. По сравнению с обычными антителами, у которых интерфейс, обеспечивающий спаривание VH и VL доменов обогащен остатками гидрофобных аминокислот, у VHH в гомологичных участках гидрофобные аминокислоты заменены на более гидрофильные, что повышает растворимость рекомбинантных продуктов за счет уменьшения склонности к агрегации [27].

Небольшой размер и однодоменная природа позволяют нанотелам проникать в структуры, недоступные

для полноразмерных антител и связывать эпитопы, стерически экранированные для обычных антител [25, 28–30]. Успешное преодоление стерических ограничений однодоменными антителами обусловлено еще и тем, что петля, содержащая CDR3 регион в VHH-домене, длиннее, чем у обычных антител, что позволяет первым связывать антигены, расположенные, например, в каталитических расщелинах ферментов или в трехмерных конгруэнтных участках лиганд-рецепторного взаимодействия [7]. Благодаря большей мобильности, в частности, у SARS-CoV-2, однодоменные антитела могут распознавать RBD S-белка в неактивной «down»-конформации и нарушать переход в открытую «up»-конформацию, делая S-белок нефункциональным [31] (см. далее).

Аффинность однодоменных антител находится в том же диапазоне, что и у обычных антител, состоящих из тяжелой и легкой цепей, но при этом нанотела, в отличие от классических антител, обладают высокой стабильностью в широком диапазоне ионных сил, pH и температуры [32]. Производство нанотел в бактериях обходится дешевле, чем производство классических антител. Вследствие высокой гомологии каркасных участков однодоменных VHH верблюдовых и VH доменов подкласса IgG3 человека, первые могут быть легко гуманизированы без потери функциональных свойств [25]. Все перечисленное создает предпосылки для исследований и применения рекомбинантных однодоменных антител как для целей диагностики, так и для терапии [33, 34].

Би- и триспецифические/валентные нанотела

Вследствие малого размера однодоменные антитела характеризуются быстрой кинетикой в системном кровотоке и элиминацией через почки в течение нескольких часов. С одной стороны, это является преимуществом, например, при создании радиоизотопных диагностических инструментов [26], с другой стороны, ограничивает применение нанотел в качестве профилактических и терапевтических агентов и требует дополнительных усилий по увеличению периода их полувыведения из кровотока. Проблема быстрой системной элиминации нанотел решается путем их олигомеризации и/или создания би- и триспецифических антител. С помощью гетеродимеризации и создания би- и тривалентных нанотел их фармакокинетика может быть существенно пролонгирована. В качестве примера можно привести гетеродимерное биспецифическое нанотело ALX-0061, полученное компанией Ablynx и состоящее из высокоаффинного VHH-домена, связывающего рецептор IL6 с коэффициентом аффинности 0,19 пМ, и VHH-домена, специфичного к сывороточному альбумину. За счет последнего обеспечивается период полувыведения гетеродимерного комплекса, равного 6,6 суток, при молекулярной массе первого 26 кДа [35], и это явно не предел. Столь высокая аффинность нанотела ALX-0061 — продукт «аффинного созревания», выполненного также с помощью фагового дисплея, в результате которого удалось получить 200-кратное увеличение аффинности, по сравнению с исходным VHH-доменом [35]. Еще один пример терапевтического антитела на основе гетероолигомеризации нанотел — препарат Ozoralizumab, представляющий собой гуманизированное биспецифичное тривалентное антитело, состоящее из двух VHH-доменов, связывающих TNF α , и одного

VHH-домена, связывающего сывороточный альбумин [36]. Введение в состав би- и тривалентных антител VHH-домена, связывающего сывороточный альбумин, можно считать одним из стандартных подходов по увеличению периода полувыведения рекомбинантных нанотел [37].

Создание би- и тривалентных антител путем олигомеризации VHH-доменов не только имеет значение для увеличения периода полувыведения этих антител, но и сопровождается повышением их функциональности за счет увеличения авидности таких антител [38]. Еще одним вариантом повышения полужизни и функциональной активности нанотел является создание белков слияния с Fc-фрагментом иммуноглобулинов человека. Модификация нанотел Fc-фрагментом существенно увеличивает период полужизни в кровотоке, а также способствует включению Fc-опосредованных эффекторных функций (антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность, комплемент-зависимая цитотоксичность и т. д.) [39, 40].

Вируснейтрализующие нанотела

В допандемическую эпоху разными группами исследователей были получены терапевтические нейтрализующие нанотела против респираторного синцитиального вируса [41], MERS-CoV [42], пандемических вариантов вируса гриппа: H1N1 [43], H5N1 [44], а также мультидоменные широконейтрализующие нанотела против вируса гриппа, связывающие гемагглютинин [45]. С началом пандемии SARS-CoV-2 эти технологические разработки были применены для создания нейтрализующих нанотел против нового возбудителя. Так, с помощью технологии дрожжевого дисплея [46] были получены синтетические нейтрализующие нанотела mNb6-tri против S-белка SARS-CoV-2. Показано, что эти нанотела, связываясь с S-тримером в «down»-конформации, стабилизируют его в этой неактивной форме и таким образом делают невозможным взаимодействие с ACE2 [31]. В результате генноинженерной оптимизации тривалентные антитела mNb6-tri приобрели фемтомолярную аффинность и пикомолярную концентрацию полной вирус-нейтрализации SARS-CoV-2. Данные антитела сохраняют функциональность после лиофилизации, нагревания, перевода в аэрозоль и могут быть применены в ингаляционной форме для вирус-нейтрализации в бронхоальвеолярном дереве [31].

Получена панель RBD-специфичных нанотел из библиотеки фаговых дисплеев VHH, созданных из В-клеток бактериального верблюда, иммунизированного рекомбинантным RBD [47]. С помощью теста вирус-нейтрализации *in vitro* были отобраны три клона (P2C5, P5F8 и P2G1), полностью подавлявшие цитопатический эффект SARS-CoV-2 при концентрациях 12–48 нМ. Для улучшения противовирусных свойств антител были получены гомодимерные и гетеродимерные формы клонов нанотел, показавшие в 100 и более раз высокую вируснейтрализующую активность, по сравнению с мономерами [47].

В свете возникновения новых вариантов SARS-CoV-2, характеризующихся повышенной способностью избегания вируснейтрализующих антител, очень актуальны подходы по созданию широконейтрализующих антител, связывающих все возможные варианты SARS-CoV-2. По крайней мере один подход реализован с помощью технологии однодоменных антител. Группа исследователей

иммунизировали ламу поочередно S-белком SARS-CoV-1 и MERS-CoV, после чего получили фаговую библиотеку переменных доменов антител и провели скрининг в том числе против S-белка SARS-CoV-2. В результате получено нанотело VHH72, характеризующееся высокой кросснейтрализующей активностью по отношению к SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2. Авторы создали бивалентное антитело на основе VHH72 в виде белка слияния с Fc-фрагментом Ig человека и показали его перспективность в качестве кандидата для создания широконейтрализующего противовирусного препарата [48]. С помощью фагового дисплея и VHH получены и другие вируснейтрализующие нанотела, инактивирующие SARS-CoV-2 [49].

Таким образом, с помощью технологии однодоменных антител получен ряд перспективных гомо- и гетеродимерных нАт, которые являются многообещающими кандидатами для создания этиотропного препарата для лечения и профилактики COVID-19.

Получение рекомбинантных антител человека из отдельных В-клеток

Самый современный с исторической и методологической точек зрения подход к получению моноклональных антител человека заключается в прямом выделении специфических В-клеток с последующим секвенированием геномов отдельных клеток и идентификацией переменных фрагментов, продуцируемых ими мАт [50]. Этот подход имеет три варианта, различающихся методологией первого этапа (идентификация и наращивание антигенспецифического клона В-клеток). Например, с помощью гибридной технологии можно получить гибридомы целевых В-клеток с миеломными клетками и провести селекцию на среде НАТ с последующим отбором гибридом нужной специфичности (1); либо выделить, культивировать и отобрать В-клетки памяти (2); либо напрямую выделить В-клетки памяти с целевым BCR, взаимодействующим с флуоресцентно или магнитно меченым антигеном, с последующим анализом репертуара специфических клонов В-клеток с помощью технологии single cell sequence (3). Последний вариант является самым современным и технологичным и позволяет за сравнительно короткое время получать панели специфических нАт [8]. Антиген-специфические В-клетки памяти могут быть получены из плазмы гипериммунных пациентов или от трансгенных мышей, несущих локусы иммуноглобулина человека и продуцирующих полностью человеческие антитела в ответ на иммунизацию целевым антигеном [51]. С целью сделать скрининг отдельных антителопродуцирующих клеток высокопроизводительным применяют различные технологические решения, например, микрофлюидную сортировку В-клеток с оценкой специфичности BCR с последующим бар-кодированием пар VH и VL и высокопроизводительным секвенированием [52].

Преимуществом новой технологии является то, что ее результат не зависит от разнообразия библиотеки переменных доменов, но при этом всегда является вариантом естественного репертуара антител, вследствие чего характеризуется приемлемым профилем безопасности и существенно меньшей вероятностью неспецифических (off-target) взаимодействий с собственными антигенными детерминантами [50]. Применение высокопроизводительных технологических решений наряду с NGS-секвенированием в формате единичных клеток позволяет одновременно анализировать

сотни различных клонов В-клеток памяти, секретирующих антитела заданной специфичности, и производить отбор по различным полезным признакам (аффинность, авидность, перекрывание антигенных эпитопов и пр.) [8, 52].

Подход, основанный на получении нАТ из отдельных клонов В-клеток путем single cell sequence, показал свою высокую эффективность при создании широконейтрализующих антител, блокирующих сайт связывания CD4 в областях V1/V2 и V3 gp120, а также gp41 ВИЧ [53, 54]. Кроме того, с помощью данной технологии были получены мАт против цитомегаловируса [55] S-антигена вируса гепатита В (HBsAg) [56] и большое количество нАТ против S-белка SARS-CoV-2 [57–60].

С помощью технологии анализа отдельных В-клеток от иммунизированных гуманизированных мышей и реконвалесцентов после COVID-19 были получены одни из первых вируснейтрализующих антител REGN10933 (casirivimab) и REGN10897 (imdevimab) [58]. С помощью NGS-секвенирования и 3D-картирования антигенных эпитопов методом HDX-MS (от англ. hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry) была проанализирована панель из более чем 200 вируснейтрализующих антител, из которых в итоге отобрано четыре антитела, характеризующихся неперекрывающимися эпитопами. Применение пар этих антител в коктейле позволило эффективно нейтрализовать все известные на тот момент варианты SARS-CoV-2.

В 2021 г. было проведено аналогичное исследование по созданию панели вируснейтрализующих антител против SARS-CoV-2 [8]. В результате NGS-секвенирования клонов В-клеток пациентов, тяжело перенесших COVID-19, получено 18 высокоаффинных антител к RBD с KD в диапазоне 0,47–13,3 нМ и обладающих вируснейтрализующей активностью, причем четыре из них характеризовались 100%-й вируснейтрализацией при концентрации ниже 16 нг/мл [8]. Далее проводили конкурентный анализ взаимодействия полученных антител с панелью коммерчески доступных нейтрализующих антител, для которых известна 3D-структура антигенного эпитопа. Кроме уже упомянутых REGN10933 (casirivimab) и REGN10897 (imdevimab) [58], можно назвать еще COVA2-15 [59] и COV2-2504 [60]. Результаты конкурентного анализа, а также серии экспериментов по вируснейтрализации RBD SARS-CoV-2 с известными точечными мутациями позволили достаточно точно идентифицировать антигенные эпитопы полученных ультранейтрализующих антител. Комбинирование взаимодополняющих антител позволило подобрать коктейли нАт, обеспечивающие эффективную нейтрализацию всех исследованных вариантов SARS-CoV-2. Этот опыт показывает, что получение из индивидуальных В-клеток памяти исчерпывающей панели широконейтрализующих антител, перекрывающей все возможные антигенные эпитопы и обеспечивающей избегание точечных мутаций, может позволить быстро подбирать эффективные вируснейтрализующие коктейли против любых новых вариантов SARS-CoV-2. При необходимости, панель широконейтрализующих антител может быть дополнена с помощью направленного мутагенеза антигенсвязывающих участков.

Создано несколько микрофлюидных платформ, значительно увеличивающих производительность клонирования и экспрессию отдельных антител. Одной из них является платформа 10x Genomics, в которой в микрофлюидном устройстве генерируются капли, содержащие по одной антителопродуцирующей клетке, а

также лизирующий буфер с микрошариками, покрытыми бар-кодированными праймерами, для кодирования кДНК конкретных нативных пар VH и VL доменов [61].

Недавно была разработана LIBRA-seq (от англ. linking B cell receptor to antigen specificity through sequencing) — технология высокопроизводительного скрининга BCR путем связывания В-лимфоцитов с баркодированными с помощью олигонуклеотидов антигенами с последующим NGS-секвенированием [62]. Она позволила провести скрининг антигенной специфичности нескольких тысяч В-клеток ВИЧ-инфицированных пациентов и подтвердить предсказанную специфичность для антител к ВИЧ, гриппу и SARS-CoV-2, включая известные и неизвестные нАТ.

Получаемые с помощью технологии single B-cell мАТ могут быть точно так же генноинженерно модифицированы, как и антитела, полученные фаговым дисплеем. Так, возможна модификация Fc-фрагмента для увеличения циркуляции антител в кровотоке. Среди наиболее продвинутых модифицированных антител против SARS-CoV-2 можно отметить антитело сотровимаб (известное так же как VIR-7831 и GSK4182136), разработанное Vir Biotechnology и GlaxoSmithKline, одобренное FDA в 2021 г. Fc-фрагмент сотровимаба включает аминокислотные замены M428L и N434S (модификация LS) для пролонгирования периода полувыведения [63]. Другим примером является AZD7442, коктейль из антител к SARS-CoV-2 нАТ tixagevimab (AZD8895) и Cilgavimab (AZD1061) [64], разработанный AstraZeneca. Оба нАТ в комбинации имеют сконструированные Fc-домены, включающие замены L234F/L235/P331S (модификация TM), что приводит к незначительному связыванию или его полному отсутствию с различными FcγRs или белком комплемента C1q и незначительной эффекторной функции *in vitro* [64] или ее отсутствию.

Применение искусственного интеллекта как перспектива дальнейшего развития технологий создания антител человека

На роль принципиально новой технологии получения антител человека уже сейчас может претендовать вычислительная технология прогнозирования структуры антител *in silico* с помощью искусственного интеллекта [65]. Созданная в 2021 г. нейросеть AlphaFold2 позволяет прогнозировать пространственную структуру белков по первичной последовательности с атомарной точностью [66]. AlphaFold2 — это первый успешный пример применения машинного обучения для моделирования третичной структуры белка. AlphaFold2 использует так называемое множественное выравнивание последовательностей MSA (от англ. multiple sequence alignment), анализируя информацию о спаривании аминокислотных остатков и структурные шаблоны для первичной последовательности [67].

Специально для предсказания 3D-структуры антител и антигенных эпитопов был разработан сервис AbAdapt, объединяющий структурное моделирование антител и антигенов с моделированием их взаимодействия. По умолчанию AbAdapt принимает первичные последовательности в качестве входных данных и использует Repertoire Builder [68] — высокопроизводительный сервис

моделирования структуры антител. В 2022 г. с помощью объединения AlphaFold и AbAdapt была разработана система AbAdapt-AF [69], более точно предсказывающая структуру паратопов и антигенных эпитопов, специфичных для антител. Авторы применили разработанный сервис для анализа вирус-нейтрализующего антитела к RBD домену SARS-CoV-2 и показали, что их система наилучшим образом моделирует антиген-антительное взаимодействие. Недавно созданные специализированные нейросети Ablooper [70] и DeepAb [71] показали большую производительность, чем сети Rosetta Antibody Benchmark и AlphaFold2.

В августе 2022 г. была представлена нейросеть NanoNet, оптимизированная для предсказания 3D-структуры VHH [72]. Ее архитектура состоит из сверхточной нейросети (CNN) с двумя дополнительными нейросетями (ResNet). Первая ResNet анализирует каркасы и гипервариабельные циклы CDR, а вторая воспринимает взаимодействия между аминокислотными остатками. Сравнение NanoNet с AlphaFold2 по предсказанию 3D-структуры известных 16 VHH, депонированных в PDB в 2021 г., т. е. отсутствующих в обучении AlphaFold2, продемонстрировала более высокую атомарную точность NanoNet. Таким образом, NanoNet представляет собой весьма многообещающий новый инструмент для моделирования структуры VHH, нашедший применение в том числе для оптимизации предсказаний структуры петель CDR3 нейтрализующих VHH против SARS-CoV-2 [73].

Можно заключить, что уже сейчас существует теоретическая возможность создания высокоаффинных переменных доменов антител *in silico* — без использования В-клеток и иммунизации. Несомненно, в будущем подбор высокоаффинной последовательности к конкретным антигенным эпитопам с помощью машинного обучения станет рутинным методом получения антител человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Технологии получения моноклональных вируснейтрализующих антител человека в настоящее время базируются на применении фагового дисплея антител и технологии получения антител из отдельных В-клеток. Каждая из технологий имеет свои преимущества и ограничения. С помощью фагового дисплея можно быстро осуществлять скрининг фаговых библиотек с последовательностями антигенсвязывающих участков по отношению к новым антигенам. Технология однодоменных антител VHH позволяет создавать би- и триспецифичные антитела, оптимизировать аффинность и вируснейтрализацию новых вариантов SARS-CoV-2. Технология получения антител из отдельных В-клеток, усиленная высокопроизводительным скринингом на основе микрофлюидики и NGS-секвенирования, сделала возможным создание панелей вируснейтрализующих антител, комбинирование которых способно «перекрывать» любые модификации RBD SARS-CoV-2. Перспективы развития технологии получения моноклональных антител включают применение нейросетей и машинного обучения для прогнозирования первичной структуры переменных доменов антител по третичной структуре целевого антигена.

Литература

- Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975; 256 (5517): 495–7.
- Frenzel A, Kügler J, Helmsing S, Meier D, Schirrmann T, Hust M, et al. Designing human antibodies by phage display. *Transfus Med Hemother*. 2017; 44 (5): 312–8.
- Emmons C, Hunsicker LG. Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3): the first monoclonal antibody approved for therapeutic use. *Iowa Med*. 1987; 77 (2): 78–82.
- Presta LG. Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006; 58: 640–56.
- Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. 1985; 228: 1315–7.
- McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*. 1990; 348 (6301): 552–4.
- Ledsgaard L, Ljungars A, Rimbault C, Sørensen CV, Tulika T, Wade J, et al. Advances in antibody phage display technology. *Drug Discov. Today*. 2022; 27 (8): 2151–69.
- Gorchakov AA, Kulemzin SV, Guselnikov SV, Baranov KO, Belovezhets TN, Mechetina LV, et al. Isolation of a panel of ultra-potent human antibodies neutralizing SARS-CoV-2 and viral variants of concern. *Cell Discov*. 2021; 7 (1): 96.
- Baklaushv VP, Kulemzin SV, Gorchakov AA, Lesnyak VN, Yusubaliyeva GM, Sotnikova AG. COVID-19. Aetiology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Journal of Clinical Practice*. 2020; 11 (1): 7–20.
- Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. World Health Organization. 2021. Available from: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>.
- Баклаушев В. П., Юсубалиева Г. М., Бычинин М. В., Юсубалиева С. М., Кальсин В. А., Троицкий А. В. Рациональная стратегия поддержания противовирусного иммунитета к новым вариантам SARS-CoV-2. *Клиническая практика*. 2022; 13 (3): 43–55.
- Synowiec A, Szczepański A, Barreto-Duran E, Lie LK, Pyrc K. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): a systemic infection. *Clin Microbiol Rev*. 2021; 34: e00133–20.
- Hoogenboom HR. Overview of antibody phage-display technology and its applications. *Methods Mol Biol*. 2002; 178: 1–37.
- Hanes J, Plückthun A. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94 (10): 4937–42.
- Boder ET, Wittrup KD. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol*. 1997; 15 (6): 553–7.
- Beerli RR, Bauer M, Buser RB, Gwerder M, Muntwiler S, Maurer P, et al. Isolation of human monoclonal antibodies by mammalian cell display. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105 (38): 14336–41.
- Hoet RM, Cohen EH, Kent RB, Rookey K, Schoonbroodt S, Hogan S, et al. Generation of high-affinity human antibodies by combining donor-derived and synthetic complementarity-determining-region diversity. *Nat Biotechnol*. 2005; 23: 344–8.
- Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, Osbourn JK, Pope AR, Earnshaw JC, et al. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat Biotechnol*. 1996; 14: 309–14.
- Chan CE, Chan AH, Lim AP, Hanson BJ. Comparison of the efficiency of antibody selection from semi-synthetic scFv and non-immune Fab phage display libraries against protein targets for rapid development of diagnostic immunoassays. *J Immunol Methods*. 201; 373 (1–2): 79–88.
- Li K, Zettlitz KA, Lipianskaya J, Zhou Y, Marks JD, Mallick P, et al. A fully human scFv phage display library for rapid antibody fragment reformatting. *Protein Eng Des Sel*. 2015; 28 (10): 307–16.
- Burton DR, Pyati J, Koduri R, Sharp SJ, Thornton GB, Parren PW, et al. Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. *Science*. 1994; 266 (5187): 1024–7.
- Maynard JA, Maassen CB, Leppla SH, Brasky K, Patterson JL, Iverson BL, et al. Protection against anthrax toxin by recombinant antibody fragments correlates with antigen affinity. *Nat Biotechnol*. 2002; 20 (6): 597–601.
- Matveev AL, Kozlova IV, Stronin OV, Khlyusevich YA, Doroshchenko EK, Baykov IK, et al. Post-exposure administration of chimeric antibody protects mice against European, Siberian, and Far-Eastern subtypes of tick-borne encephalitis virus. *PLoS One*. 2019; 14 (4): e0215075.
- Ferrara F, Erasmus MF, D'Angelo S, Leal-Lopes C, Teixeira AA, Choudhary A, et al. A pandemic-enabled comparison of discovery platforms demonstrates a naive antibody library can match the best immune-sourced antibodies. *Nat Commun*. 2022; 13 (1): 462.
- Тиллиб С. В. Перспективы использования однодоменных антител в биомедицине. *Молекулярная биология*. 2020; 54 (3): 362–73.
- Iezzi ME, Policastro L, Werbach S, Podhajcer O, Canziani GA. Single-domain antibodies and the promise of modular targeting in cancer imaging and treatment. *Front Immunol*. 2018; 9: 273.
- Vincke C, Loris R, Saerens D, Martinez-Rodriguez S, Muyltermans S, Conrath K. General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. *J Biol Chem*. 2009; 284 (5): 3273–84.
- De Genst E, Silence K, Decanniere K, Conrath K, Loris R, Kinne J, et al. Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103 (12): 4586–91.
- Muyltermans S. Applications of nanobodies. *Annu Rev Anim Biosci*. 2021; 9: 401–21.
- Zavrtanik U, Lukan J, Loris R, Lah J, Hadži S. Structural basis of epitope recognition by heavy-chain camelid antibodies. *J Mol Biol*. 2018; 430 (21): 4369–86.
- Schoof M, Faust B, Saunders RA, Sangwan S, Rezelj V, Hoppe N, et al. An ultrapotent synthetic nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by stabilizing inactive Spike. *Science*. 2020; 370 (6523): 1473–9.
- Van der Linden RH, Frenken LG, de Geus B, Harmsen MM, Ruuls RC, Stok W, et al. Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1431 (1): 37–46.
- Jovčevska I, Muyltermans S. The therapeutic potential of nanobodies. *BioDrugs*. 2020; 34 (1): 11–26.
- Muyltermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem*. 2013; 82: 775–97.
- Van Roy M, Ververken C, Beirnaert E, Hoefman S, Kolkman J, Vierboom M, et al. The preclinical pharmacology of the high affinity anti-IL-6R Nanobody® ALX-0061 supports its clinical development in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2015; 17 (1): 135.
- Ishiwatari-Ogata C, Kyuuma M, Ogata H, Yamakawa M, Iwata K, Ochi M, et al. Ozoralizumab, a humanized anti-TNF α NANOBODY® Compound, exhibits efficacy not only at the onset of arthritis in a human TNF transgenic mouse but also during secondary failure of administration of an anti-TNF α IgG. *Front Immunol*. 2022; 13: 853008.
- Van Faassen H, Ryan S, Henry KA, Raphael S, Yang Q, Rossotti MA, et al. Serum albumin-binding VH Hs with variable pH sensitivities enable tailored half-life extension of biologics. *FASEB J*. 2020; 34 (6): 8155–71.
- Saerens D, Ghassabeh GH, Muyltermans S. Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. *Curr Opin Pharmacol*. 2008; 8 (5): 600–8.
- Godakova SA, Noskov AN, Vinogradova ID, Ugriumova GA, Solovyev AI, Esmagametov IB, et al. Camelid VHHs fused to human Fc fragments provide long term protection against botulinum neurotoxin A in mice. *Toxins (Basel)*. 2019; 11 (8): 464.
- Günaydin G, Yu S, Gräslund T, Hammarström L, Marcotte H. Fusion of the mouse IgG1 Fc domain to the VHH fragment (ARP1) enhances protection in a mouse model of rotavirus. *Sci Rep*. 2016; 6: 30171.
- Detalle L, Stohr T, Palomo C, Piedra PA, Gilbert BE, Mas V, et al. Generation and characterization of ALX-0171, a potent

- novel therapeutic nanobody for the treatment of respiratory syncytial virus infection. *antimicrob agents chemother.* 2015; 60 (1): 6–13.
42. Stalin Raj V, Okba NMA, Gutierrez-Alvarez J, Drabek D, van Dieren B, Widagdo W, et al. Chimeric camel/human heavy-chain antibodies protect against MERS-CoV infection. *Sci Adv.* 2018; 4 (8): eaas9667.
 43. Hufton SE, Risley P, Ball CR, Major D, Engelhardt OG, Poole S. The breadth of cross sub-type neutralisation activity of a single domain antibody to influenza hemagglutinin can be increased by antibody valency. *PLoS One.* 2014; 9 (8): e103294.
 44. Ibañez LI, De Filette M, Hultberg A, Verrips T, Temperton N, Weiss RA, et al. Nanobodies with in vitro neutralizing activity protect mice against H5N1 influenza virus infection. *J Infect Dis.* 2011; 203 (8): 1063–72.
 45. Laursen NS, Friesen RHE, Zhu X, Jongeneelen M, Blokland S, Vermond J, et al. Universal protection against influenza infection by a multidomain antibody to influenza hemagglutinin. *Science.* 2018; 362 (6414): 598–602.
 46. McMahon C, Baier AS, Pascolutti R, Wegrecki M, Zheng S, Ong JX, et al. Yeast surface display platform for rapid discovery of conformationally selective nanobodies. *Nat Struct Mol Biol.* 2018; 25 (3): 289–96.
 47. Favorskaya IA, Shcheblyakov DV, Esmagambetov IB, Dolzhikova IV, Alekseeva IA, Korobkova AI, et al. Single-Domain Antibodies Efficiently Neutralize SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Front Immunol.* 2022; 13: 822159.
 48. Wrapp D, De Vlieger D, Corbett KS, Torres GM, Wang N, Van Breedam W, et al. Structural basis for potent neutralization of betacoronaviruses by single-domain camelid antibodies. *Cell.* 2020; 181 (5): 1004–15.e15.
 49. Chen F, Liu Z, Jiang F. Prospects of Neutralizing Nanobodies Against SARS-CoV-2. *Front Immunol.* 2021; 12: 690742.
 50. Pedrioli A, Oxenius A. Single B cell technologies for monoclonal antibody discovery. *Trends Immunol.* 2021; 42: 1143–58.
 51. Lee EC, Liang Q, Ali H, Bayliss L, Beasley A, Bloomfield-Gerdes T, et al. Complete humanization of the mouse immunoglobulin loci enables efficient therapeutic antibody discovery. *Nat Biotechnol.* 2014; 32 (4): 356–63.
 52. Gérard A, Woolfe A, Mottet G, Reichen M, Castrillon C, Menrath V, et al. High-throughput single-cell activity-based screening and sequencing of antibodies using droplet microfluidics. *Nat Biotechnol.* 2020; 38 (6): 715–21.
 53. Scheid JF, Mouquet H, Feldhahn N, Seaman MS, Velinzon K, Pietzsch J, et al. Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature.* 2009; 458 (7238): 636–40.
 54. McCoy LE, Burton DR. Identification and specificity of broadly neutralizing antibodies against HIV. *Immunol Rev.* 2017; 275 (1): 11–20.
 55. Macagno A, Bernasconi NL, Vanzetta F, Dander E, Sarasini A, Revello MG, et al. Isolation of human monoclonal antibodies that potently neutralize human cytomegalovirus infection by targeting different epitopes on the gH/gL/UL128-131A complex. *J Virol.* 2010; 84 (2): 1005–13.
 56. Wang Q, Michailidis E, Yu Y, Wang Z, Hurley AM, Oren DA, et al. A combination of human broadly neutralizing antibodies against hepatitis B virus HBsAg with distinct epitopes suppresses escape mutations. *Cell Host Microbe.* 2020; 28 (2): 335–49.e6.
 57. Hartley GE, Edwards ESJ, Aui PM, Varese N, Stojanovic S, McMahon J, et al. Rapid generation of durable B cell memory to SARS-CoV-2 spike and nucleocapsid proteins in COVID-19 and convalescence. *Sci Immunol.* 2020; 5 (54): eabf8891.
 58. Hansen J, Baum A, Pascal KE, Russo V, Giordano S, Wloga E, et al. Studies in humanized mice and convalescent humans yield a SARS-CoV-2 antibody cocktail. *Science.* 2020; 369 (6506): 1010–4.
 59. Brouwer PJM, Caniels TG, van der Straten K, Snitselaar JL, Aldon Y, Bangaru S, et al. Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science.* 2020; 369 (6504): 643–50.
 60. Zost SJ, Gilchuk P, Case JB, Binshtein E, Chen RE, Nkolola JP, et al. Potently neutralizing and protective human antibodies against SARS-CoV-2. *Nature.* 2020; 584 (7821): 443–9.
 61. Tanno H, McDaniel JR, Stevens CA, Voss WN, Li J, Durrett R, et al. A facile technology for the high-throughput sequencing of the paired VH:VL and TCR β :TCR α repertoires. *Sci Adv.* 2020; 6 (17): eaay9093.
 62. Setliff I, Shiakolas AR, Pilewski KA, Murji AA, Mapengo RE, Janowska K, et al. High-throughput mapping of B cell receptor sequences to antigen specificity. *Cell.* 2019; 179 (7): 1636–46.e15.
 63. Gupta A, Gonzalez-Rojas Y, Juarez E, Crespo Casal M, Moya J, Falci DR, et al. Early treatment for covid-19 with SARS-CoV-2 neutralizing antibody sotrovimab. *N Engl J Med.* 2021; 385 (21): 1941–50.
 64. Loo YM, McTamney PM, Arends RH, Abram ME, Aksyuk AA, Diallo S, et al. The SARS-CoV-2 monoclonal antibody combination, AZD7442, is protective in nonhuman primates and has an extended half-life in humans. *Sci Transl Med.* 2022; 14 (635): eab18124.
 65. Vishwakarma P, Vattekatte AM, Shinada N, Diharce J, Martins C, Cadet F, et al. VHH structural modelling approaches: a critical review. *Int J Mol Sci.* 2022; 23 (7): 3721.
 66. Senior AW, Evans R, Jumper J, Kirkpatrick J, Sifre L, Green T, et al. Improved protein structure prediction using potentials from deep learning. *Nature.* 2020; 577: 706–10.
 67. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature.* 2021; 596 (7873): 583–9.
 68. Schrit D, Li S, Rozewicki J, Katoh K, Yamashita K, Volkmut W, et al. Repertoire Builder: high-throughput structural modeling of B and T cell receptors. *Mol Sys. Des Eng.* 2019; 4: 761–8.
 69. Xu Z, Davila A, Wilamowski J, Teraguchi S, Standley DM. Improved antibody-specific epitope prediction using AlphaFold and AbAdapt. *Chembiochem.* 2022; 23 (18): e202200303.
 70. Abanades B, Georges G, Bujotzek A, Deane CM. ABlooper: fast accurate antibody CDR loop structure prediction with accuracy estimation. *Bioinformatics.* 2022; 38 (7): 1877–80. DOI: 10.1093/bioinformatics/btac016.
 71. Ruffolo JA, Sulam J, Gray JJ. Antibody structure prediction using interpretable deep learning. *Patterns (NY).* 2021; 3 (2): 100406. DOI: 10.1016/j.patter.2021.100406. PMID: 35199061; PMCID: PMC8848015.
 72. Cohen T, Halfon M, Schneidman-Duhovny D. NanoNet: Rapid and accurate end-to-end nanobody modeling by deep learning. *Front Immunol.* 2022; 13: 958584. DOI: 10.3389/fimmu.2022.958584.
 73. Sun D, Sang Z, Kim YJ, Xiang Y, Cohen T, Belford AK, et al. Potent neutralizing nanobodies resist convergent circulating variants of SARS-CoV-2 by targeting diverse and conserved epitopes. *Nat Commun.* 2021; 12: 4676.

References

1. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975; 256 (5517): 495–7.
2. Frenzel A, Kügler J, Helmsing S, Meier D, Schirrmann T, Hust M, et al. Designing human antibodies by phage display. *Transfus Med Hemother.* 2017; 44 (5): 312–8.
3. Emmons C, Hunsicker LG. Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3): the first monoclonal antibody approved for therapeutic use. *Iowa Med.* 1987; 77 (2): 78–82.
4. Presta LG. Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006; 58: 640–56.
5. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* 1985; 228: 1315–7.
6. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature.* 1990; 348 (6301): 552–4.
7. Ledsgaard L, Ljungars A, Rimbault C, Sørensen CV, Tulika T,

- Wade J, et al. Advances in antibody phage display technology. *Drug Discov. Today*. 2022; 27 (8): 2151–69.
8. Gorchakov AA, Kulemzin SV, Gusel'nikov SV, Baranov KO, Belovezhets TN, Mechetina LV, et al. Isolation of a panel of ultra-potent human antibodies neutralizing SARS-CoV-2 and viral variants of concern. *Cell Discov*. 2021; 7 (1): 96.
 9. Baklaushv VP, Kulemzin SV, Gorchakov AA, Lesnyak VN, Yusubaliev GM, Sotnikova AG. COVID-19. Aetiology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Journal of Clinical Practice*. 2020; 11 (1): 7–20.
 10. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. World Health Organization. 2021. Available from: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>.
 11. Baklaushv VP, Yusubaliev GM, Bychinin MV, Yusubaliev SM, Kalsin VA, Troickij AV. Racional'naya strategiya podderzhaniya protivovirusnogo immuniteta k novym variantam SARS-CoV-2. *Klinicheskaya praktika*. 2022; 13 (3): 43–55. Russian.
 12. Synowiec A, Szczepański A, Barreto-Duran E, Lie LK, Pyrc K. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): a systemic infection. *Clin Microbiol Rev*. 2021; 34: e00133–20.
 13. Hoogenboom HR. Overview of antibody phage-display technology and its applications. *Methods Mol Biol*. 2002; 178: 1–37.
 14. Hanes J, Plückthun A. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94 (10): 4937–42.
 15. Boder ET, Wittrup KD. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol*. 1997; 15 (6): 553–7.
 16. Beerli RR, Bauer M, Buser RB, Gwerder M, Muntwiler S, Maurer P, et al. Isolation of human monoclonal antibodies by mammalian cell display. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105 (38): 14336–41.
 17. Hoet RM, Cohen EH, Kent RB, Rookey K, Schoonbroodt S, Hogan S, et al. Generation of high-affinity human antibodies by combining donor-derived and synthetic complementarity-determining-region diversity. *Nat Biotechnol*. 2005; 23: 344–8.
 18. Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, Osbourn JK, Pope AR, Earnshaw JC, et al. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat Biotechnol*. 1996; 14: 309–14.
 19. Chan CE, Chan AH, Lim AP, Hanson BJ. Comparison of the efficiency of antibody selection from semi-synthetic scFv and non-immune Fab phage display libraries against protein targets for rapid development of diagnostic immunoassays. *J Immunol Methods*. 201; 373 (1–2): 79–88.
 20. Li K, Zettlitz KA, Lipianskaya J, Zhou Y, Marks JD, Mallick P, et al. A fully human scFv phage display library for rapid antibody fragment reformatting. *Protein Eng Des Sel*. 2015; 28 (10): 307–16.
 21. Burton DR, Pyati J, Koduri R, Sharp SJ, Thornton GB, Parren PW, et al. Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. *Science*. 1994; 266 (5187): 1024–7.
 22. Maynard JA, Maassen CB, Leppla SH, Brasky K, Patterson JL, Iverson BL, et al. Protection against anthrax toxin by recombinant antibody fragments correlates with antigen affinity. *Nat Biotechnol*. 2002; 20 (6): 597–601.
 23. Matveev AL, Kozlova IV, Stronin OV, Khlusevich YA, Doroshchenko EK, Baykov IK, et al. Post-exposure administration of chimeric antibody protects mice against European, Siberian, and Far-Eastern subtypes of tick-borne encephalitis virus. *PLoS One*. 2019; 14 (4): e0215075.
 24. Ferrara F, Erasmus MF, D'Angelo S, Leal-Lopes C, Teixeira AA, Choudhary A, et al. A pandemic-enabled comparison of discovery platforms demonstrates a naïve antibody library can match the best immune-sourced antibodies. *Nat Commun*. 2022; 13 (1): 462.
 25. Tillib SV. Perspektivy ispol'zovaniya odnodomennyx antitel v biomedicine. *Molekulyarnaya biologiya*. 2020; 54 (3): 362–73.
 26. Iezzi ME, Policastro L, Werbañh S, Podhajcer O, Canziani GA. Single-domain antibodies and the promise of modular targeting in cancer imaging and treatment. *Front Immunol*. 2018; 9: 273.
 27. Vincke C, Loris R, Saerens D, Martinez-Rodriguez S, Muyldermans S, Conrath K. General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. *J Biol Chem*. 2009; 284 (5): 3273–84.
 28. De Genst E, Silence K, Decanniere K, Conrath K, Loris R, Kinne J, et al. Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103 (12): 4586–91.
 29. Muyldermans S. Applications of nanobodies. *Annu Rev Anim Biosci*. 2021; 9: 401–21.
 30. Zavrtnik U, Lukan J, Loris R, Lah J, Hadži S. Structural basis of epitope recognition by heavy-chain camelid antibodies. *J Mol Biol*. 2018; 430 (21): 4369–86.
 31. Schoof M, Faust B, Saunders RA, Sangwan S, Rezelj V, Hoppe N, et al. An ultrapotent synthetic nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by stabilizing inactive Spike. *Science*. 2020; 370 (6523): 1473–9.
 32. Van der Linden RH, Frenken LG, de Geus B, Harmsen MM, Ruuls RC, Stok W, et al. Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1431 (1): 37–46.
 33. Jovčevska I, Muyldermans S. The therapeutic potential of nanobodies. *BioDrugs*. 2020; 34 (1): 11–26.
 34. Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem*. 2013; 82: 775–97.
 35. Van Roy M, Ververken C, Beirnaert E, Hoefman S, Kolkman J, Vierboom M, et al. The preclinical pharmacology of the high affinity anti-IL-6R Nanobody® ALX-0061 supports its clinical development in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2015; 17 (1): 135.
 36. Ishiwatari-Ogata C, Kyuuma M, Ogata H, Yamakawa M, Iwata K, Ochi M, et al. Ozoralizumab, a humanized anti-TNFα NANOBODY® Compound, exhibits efficacy not only at the onset of arthritis in a human TNF transgenic mouse but also during secondary failure of administration of an anti-TNFα IgG. *Front Immunol*. 2022; 13: 853008.
 37. Van Faassen H, Ryan S, Henry KA, Raphael S, Yang Q, Rossotti MA, et al. Serum albumin-binding VH Hs with variable pH sensitivities enable tailored half-life extension of biologics. *FASEB J*. 2020; 34 (6): 8155–71.
 38. Saerens D, Ghassabeh GH, Muyldermans S. Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. *Curr Opin Pharmacol*. 2008; 8 (5): 600–8.
 39. Godakova SA, Noskov AN, Vinogradova ID, Ugriumova GA, Solovyev AI, Esmagambetov IB, et al. Camelid VHHs fused to human Fc fragments provide long term protection against botulinum neurotoxin A in mice. *Toxins (Basel)*. 2019; 11 (8): 464.
 40. Günaydin G, Yu S, Gräslund T, Hammarström L, Marcotte H. Fusion of the mouse IgG1 Fc domain to the VHH fragment (ARP1) enhances protection in a mouse model of rotavirus. *Sci Rep*. 2016; 6: 30171.
 41. Detalle L, Stohr T, Palomo C, Piedra PA, Gilbert BE, Mas V, et al. Generation and characterization of ALX-0171, a potent novel therapeutic nanobody for the treatment of respiratory syncytial virus infection. *antimicrob agents chemother*. 2015; 60 (1): 6–13.
 42. Stalin Raj V, Okba NMA, Gutierrez-Alvarez J, Drabek D, van Dieren B, Widagdo W, et al. Chimeric camel/human heavy-chain antibodies protect against MERS-CoV infection. *Sci Adv*. 2018; 4 (8): eaas9667.
 43. Hufton SE, Risleby P, Ball CR, Major D, Engelhardt OG, Poole S. The breadth of cross sub-type neutralisation activity of a single domain antibody to influenza hemagglutinin can be increased by antibody valency. *PLoS One*. 2014; 9 (8): e103294.
 44. Ibañez LI, De Filette M, Hultberg A, Verrips T, Temperton N, Weiss RA, et al. Nanobodies with in vitro neutralizing activity protect mice against H5N1 influenza virus infection. *J Infect Dis*. 2011; 203 (8): 1063–72.
 45. Laursen NS, Friesen RHE, Zhu X, Jongeneelen M, Blokland S, Vermond J, et al. Universal protection against influenza infection by a multidomain antibody to influenza hemagglutinin. *Science*. 2018; 362 (6414): 598–602.
 46. McMahon C, Baier AS, Pascolutti R, Wegrecki M, Zheng S, Ong JX, et al. Yeast surface display platform for rapid discovery of conformationally selective nanobodies. *Nat Struct Mol Biol*. 2018; 25 (3): 289–96.
 47. Favorskaya IA, Shcheblyakov DV, Esmagambetov IB, Dolzhikova IV,

- Alekseeva IA, Korobkova AI, et al. Single-Domain Antibodies Efficiently Neutralize SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Front Immunol.* 2022; 13: 822159.
48. Wrapp D, De Vlieger D, Corbett KS, Torres GM, Wang N, Van Breedam W, et al. Structural basis for potent neutralization of betacoronaviruses by single-domain camelid antibodies. *Cell.* 2020; 181 (5): 1004–15.e15.
 49. Chen F, Liu Z, Jiang F. Prospects of Neutralizing Nanobodies Against SARS-CoV-2. *Front Immunol.* 2021; 12: 690742.
 50. Pedrioli, A, Oxenius, A. Single B cell technologies for monoclonal antibody discovery. *Trends Immunol.* 2021; 42: 1143–58.
 51. Lee EC, Liang Q, Ali H, Bayliss L, Beasley A, Bloomfield-Gerdes T, et al. Complete humanization of the mouse immunoglobulin loci enables efficient therapeutic antibody discovery. *Nat Biotechnol.* 2014; 32 (4): 356–63.
 52. Gérard A, Woolfe A, Mottet G, Reichen M, Castrillon C, Menrath V, et al. High-throughput single-cell activity-based screening and sequencing of antibodies using droplet microfluidics. *Nat Biotechnol.* 2020; 38 (6): 715–21.
 53. Scheid JF, Mouquet H, Feldhahn N, Seaman MS, Velinzon K, Pietzsch J, et al. Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature.* 2009; 458 (7238): 636–40.
 54. McCoy LE, Burton DR. Identification and specificity of broadly neutralizing antibodies against HIV. *Immunol Rev.* 2017; 275 (1): 11–20.
 55. Macagno A, Bernasconi NL, Vanzetta F, Dander E, Sarasini A, Revello MG, et al. Isolation of human monoclonal antibodies that potently neutralize human cytomegalovirus infection by targeting different epitopes on the gH/gL/UL128-131A complex. *J Virol.* 2010; 84 (2): 1005–13.
 56. Wang Q, Michailidis E, Yu Y, Wang Z, Hurley AM, Oren DA, et al. A combination of human broadly neutralizing antibodies against hepatitis B virus HBsAg with distinct epitopes suppresses escape mutations. *Cell Host Microbe.* 2020; 28 (2): 335–49.e6.
 57. Hartley GE, Edwards ESJ, Aui PM, Varese N, Stojanovic S, McMahon J, et al. Rapid generation of durable B cell memory to SARS-CoV-2 spike and nucleocapsid proteins in COVID-19 and convalescence. *Sci Immunol.* 2020; 5 (54): eabf8891.
 58. Hansen J, Baum A, Pascal KE, Russo V, Giordano S, Wloga E, et al. Studies in humanized mice and convalescent humans yield a SARS-CoV-2 antibody cocktail. *Science.* 2020; 369 (6506): 1010–4.
 59. Brouwer PJM, Caniels TG, van der Straten K, Snitselaar JL, Aldon Y, Bangaru S, et al. Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science.* 2020; 369 (6504): 643–50.
 60. Zost SJ, Gilchuk P, Case JB, Binshtein E, Chen RE, Nkolola JP, et al. Potently neutralizing and protective human antibodies against SARS-CoV-2. *Nature.* 2020; 584 (7821): 443–9.
 61. Tanno H, McDaniel JR, Stevens CA, Voss WN, Li J, Durrett R, et al. A facile technology for the high-throughput sequencing of the paired VH:VL and TCR β :TCR α repertoires. *Sci Adv.* 2020; 6 (17): eaay9093.
 62. Setliff I, Shiakolas AR, Pilewski KA, Murji AA, Mapengo RE, Janowska K, et al. High-throughput mapping of B cell receptor sequences to antigen specificity. *Cell.* 2019; 179 (7): 1636–46.e15.
 63. Gupta A, Gonzalez-Rojas Y, Juarez E, Crespo Casal M, Moya J, Falci DR, et al. Early treatment for covid-19 with SARS-CoV-2 neutralizing antibody sotrovimab. *N Engl J Med.* 2021; 385 (21): 1941–50.
 64. Loo YM, McTamney PM, Arends RH, Abram ME, Aksyuk AA, Diallo S, et al. The SARS-CoV-2 monoclonal antibody combination, AZD7442, is protective in nonhuman primates and has an extended half-life in humans. *Sci Transl Med.* 2022; 14 (635): eabl8124.
 65. Vishwakarma P, Vattekatte AM, Shinada N, Diharce J, Martins C, Cadet F, et al. VHH structural modelling approaches: a critical review. *Int J Mol Sci.* 2022; 23 (7): 3721.
 66. Senior AW, Evans R, Jumper J, Kirkpatrick J, Sifre L, Green T, et al. Improved protein structure prediction using potentials from deep learning. *Nature.* 2020; 577: 706–10.
 67. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature.* 2021; 596 (7873): 583–9.
 68. Schrott D, Li S, Rozewicki J, Katoh K, Yamashita K, Volkmut W, et al. Repertoire Builder: high-throughput structural modeling of B and T cell receptors. *Mol Sys. Des Eng.* 2019; 4: 761–8.
 69. Xu Z, Davila A, Wilamowski J, Teraguchi S, Standley DM. Improved antibody-specific epitope prediction using AlphaFold and AbAdapt. *Chembiochem.* 2022; 23 (18): e202200303.
 70. Abanades B, Georges G, Bujotzek A, Deane CM. ABlooper: fast accurate antibody CDR loop structure prediction with accuracy estimation. *Bioinformatics.* 2022; 38 (7): 1877–80. DOI: 10.1093/bioinformatics/btac016.
 71. Ruffolo JA, Sulam J, Gray JJ. Antibody structure prediction using interpretable deep learning. *Patterns (NY).* 2021; 3 (2): 100406. DOI: 10.1016/j.patter.2021.100406. PMID: 35199061; PMCID: PMC8848015.
 72. Cohen T, Halfon M, Schneidman-Duhovny D. NanoNet: Rapid and accurate end-to-end nanobody modeling by deep learning. *Front Immunol.* 2022; 13: 958584. DOI: 10.3389/fimmu.2022.958584.
 73. Sun D, Sang Z, Kim YJ, Xiang Y, Cohen T, Belford AK, et al. Potent neutralizing nanobodies resist convergent circulating variants of SARS-CoV-2 by targeting diverse and conserved epitopes. *Nat Commun.* 2021; 12: 4676.

ТЕХНИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ИММУНОХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ И ТОКСИНОВ

С. П. Ярков ✉, И. В. Шиленко, С. И. Третьяков, Ю. Н. Ишков, К. К. Стяжкин

Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

В обзоре рассмотрены аналитические возможности и состав технических средств на основе иммунохроматографии для экспрессной индикации патогенных для человека бактерий, вирусов и токсинов, разработанных в Государственном научно-исследовательском институте биологического приборостроения ФМБА России. Рассмотрены технические характеристики и состав серийных упаковок УИХЭ-1, предназначенных для осуществления моноаналитного и мультианалитного иммунохроматографического анализа патогенных микроорганизмов и токсинов в смывах с поверхностей объектов окружающей среды, в культуральных средах, комплектов ЭкБ и ЭкБ-01 для анализа содержимого пробоотборников биологического аэрозоля. Приведены сведения об аналитических свойствах упаковки для люминесцентного иммунохроматографического анализа УЛИ-1, экспериментальном образце флуориметра-рефлектометра «Зондаж». Проведено сравнение технических характеристик индикационных упаковок и комплектов с зарубежными аналогами, указаны направления совершенствования технических средств на основе иммунохроматографии.

Ключевые слова: патогенные бактерии, вирусы, токсины, иммунохроматография, идентификация, упаковки и комплекты

Финансирование: исследования проводили в рамках государственных заказов Федерального медико-биологического агентства России (№ 42.128.11.6, № 42.133.12.6) и Министерства здравоохранения России (№ К-27-ФЦП/82-1).

Вклад авторов: С. П. Ярков — идея, планирование опытно-конструкторских работ, анализ результатов, участие в испытаниях, подготовка рукописи; И. В. Шиленко — создание мультианалитных иммунохроматографических тестов, осуществление испытаний комплектов ЭкБ, анализ полученных результатов; С. И. Третьяков — создание иммунохроматографических тестов, макетов и упаковок, проведение испытаний, анализ результатов исследований; Ю. Н. Ишков — руководство исследованием, редактирование рукописи; К. К. Стяжкин — руководство, редактирование рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Сергей Петрович Ярков
Волоколамское шоссе, д. 75, корпус 1, 125424, г. Москва, Россия; diasol@dol.ru

Статья получена: 26.11.2022 **Статья принята к печати:** 18.12.2022 **Опубликована онлайн:** 29.12.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.046

IMMUNOCHROMATOGRAPHY-BASED PORTABLE EQUIPMENT FOR INDICATION OF PATHOGENIC MICROORGANISMS AND TOXINS

Yarkov SP ✉, Shilenko IV, Tretyakov SI, Ishkov YN, Styazhkin KK

Federal State Unitary Enterprise "State Scientific Research Institute of Biological Engineering" FMBA of Russia (FSUE "SSRIBE"), Moscow, Russia

This review looks at analytical capabilities and composition of portable equipment based on lateral flow immunoassay for rapid indication of human pathogenic bacteria, viruses and toxins which was developed by the State Research Institute of Biological Instrumentation under the auspices of the Federal Medical and Biological Agency of Russia. The review presents technical characteristics and composition of portable test kits UIHE-1 designed for taking monoanalytical and multi-analytical lateral flow immunoassay on pathogenic microorganisms and toxins in washes from environmental objects surfaces and in culture media; it also describes kits EkB and EkB-01 for analysis of biological aerosol samplers contents. Information is given on the analytical properties of luminescence lateral flow immunoassay kit ULI-1, an on the experimental prototype of fluorimeter-refractometer "Zondazh". The technical characteristics of indication kits were compared with those of foreign origin, areas for improvement of portable equipment based on lateral flow immunoassay were indicated.

Keywords: pathogenic bacteria, viruses, toxins, immunochromatography, identification, sets and kits

Funding: the studies were carried out under government contracts with the Russian Federal Medical and Biological Agency (№ 42.128.11.6, № 42.133.12.6) and the Russian Ministry of Health (№ К-27-FTP/82-1).

Author contribution: Yarkov SP — idea, development planning, analysis of findings, participation in tests, manuscript preparation; Shilenko IV — creation of multi-analysis lateral flow immunoassays, implementation of tests of EkB sets, analysis of obtained results; Tretyakov SI — creation of lateral flow immunoassays, models and kits, tests, analysis of research results; Ishkov YN — study management, manuscript editing; Stiazhkin KK — management, manuscript editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Sergei P. Yarkov
Volokolamskoye, 75, str. 1, 125424, Moscow, Russia; diasol@dol.ru

Received: 26.11.2022 **Accepted:** 18.12.2022 **Published online:** 29.12.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.046

Иммунохимический анализ, в котором процессы жидкостной иммунохроматографии основаны на специфических (иммунных) взаимодействиях между аналитом и нанесенными на пористую тонкую мембрану специфическими рецепторными молекулами, получил название иммунохроматографического анализа (ИХА, или LFIA, от англ. lateral flow immunoassay). История развития метода началась в 1980-е годы с создания тест-полосок для выявления хорионического гонадотропина в моче, что позволяло выявлять беременность вне лаборатории [1]. Схема тест-полоски для проведения ИХА в «сэндвич»-варианте анализа показана на рис 1.

Как правило, в иммунохроматографическом тесте используют мультимембранный композит, состоящий из нескольких мембран разной химической структуры и пористости, закрепленных на подложке, обеспечивающей жесткость конструкции, и помещенный в полимерную оправу.

Принцип действия ИХА в «сэндвич»-варианте многократно описан в литературе [2–4]. Жидкую пробу, потенциально содержащую антигены аналитов, помещают на подложку для нанесения образца. Под действием капиллярных сил происходит перемещение жидкости по мультимембранному композиту. Сначала сольубилизируется конъюгат НКЗ со специфическими

антителами. Конъюгат НКЗ окрашен в вишневый цвет, его движение по мембране можно наблюдать визуально. При наличии определяемого антигена в пробе образуется антигенный иммунный комплекс, который с током жидкости начинает перемещаться по аналитической мембране вместе с избытком конъюгата. Далее иммунный комплекс иммобилизуется на аналитической мембране специфичными антителами в аналитической зоне (АЗ), образуя «сэндвич», а несвязанные антитела конъюгата — антителами, расположенными в контрольной зоне тест-полоски (КЗ), что приводит к образованию двух окрашенных линий. В случае отсутствия антигена в пробе антигенный иммунный комплекс не образуется, поэтому единственная видимая линия формируется за счет связывания антител конъюгата и антител КЗ (антивидовых по отношению к антителам конъюгата) только в КЗ.

В зависимости от решаемых задач в тест-полоску могут быть добавлены дополнительные реагенты, а некоторые мембраны можно добавлять, комбинировать или исключать. Однако общая конструкция и принцип проведения аналитических взаимодействий во время движения реагентов вдоль мембран сохраняются. Упростить анализ по отношению к твердофазному иммуноферментному анализу (ТИФА) можно отказом от дополнительных обработок, промывок, инкубации, усиливающей сигнал, а также визуальной оценкой результатов. Типичное время ИХА составляет 10–25 мин, чувствительность при анализе бактериальных суспензий — 10^5 – 10^6 кл./мл, вирусных суспензий — 10^4 – 10^6 БОЕ/мл; по белковым токсинам чувствительность метода лежит в диапазоне 1–100 нг/мл, в зависимости от вида токсина. Поскольку иммунохимические взаимодействия на мембране идут в неравновесном режиме, считается, что ИХА уступает ТИФА по чувствительности. В то же время существуют приемы и методы, позволяющие поднять чувствительность ИХА по белковым антигенам до 0,1 нг/мл, а по клеткам до 10^3 кл./мл, однако это требует либо дополнительных реагентов, либо приборной регистрации и существенно увеличивает время анализа.

Пристальное внимание к методу ИХА возникло на фоне внешних глобальных событий, затрагивающих интересы ведущих экономических держав мира и мирового здравоохранения. Можно выделить четыре волны интереса к средствам ИХА, связанные с массовым применением патогенных для человека бактерий, токсинов и возникновением новых вирусных инфекционных заболеваний.

1. Операция армии США «Буря в пустыне» в январе–феврале 1991 г. Были созданы иммунофильтрационные индивидуальные устройства для выявления спор сибирской

язвы, которые входили в экипировку военнослужащих. Предполагалось, что в случае применения иракской армией спор сибирской язвы быстрая их индикация уменьшит потери личного состава.

2. Акты индивидуального биотерроризма — рассылки почтовых конвертов в правительственные учреждения США со спорами сибирской язвы в августе–октябре 2001 г. Несколькими фирмами в США были созданы тест-полоски на принципе «сэндвич» ИХА для выявления спор сибирской язвы и других возбудителей опасных инфекций (чумы, туляремии, бруцеллеза).

3. Иракская война США 2003–2011 гг. Произошло расширение номенклатуры тестов для выявления патогенов в объектах окружающей среды.

4. Пандемия COVID-19 с конца 2020 г. — по настоящее время. Появились быстрые ИХА-тесты для выявления нуклеокапсидного антигена коронавируса SARS-CoV-2 и антител к нему у переболевших людей в смывах с носоглотки и в сыворотке крови. Масштаб производства иммунохроматографических тест-полосок в мире достиг сотен миллионов.

Биобезопасность чрезвычайно важна в современном обществе. Информацию о наличии патогенных микроорганизмов и токсинов в объектах внешней среды желательно получать незамедлительно и непосредственно в месте отбора проб. Помимо биологических угроз, связанных с индивидуальным биотерроризмом, опасение вызывает наличие биологических лабораторий, работающих с возбудителями особо опасных инфекций, финансируемых недружественными государствами, в странах СНГ. Деятельность этих биологических лабораторий непрозрачна и не контролируется местной администрацией.

Применение ИХА в санитарии и гигиене обусловлено не только вопросами биобезопасности, но и потребностью в оперативном получении информации о товарах массового потребления, например о качестве сельскохозяйственного сырья, поступающего на предприятие и готовой пищевой продукции, направляемой в торговую сеть [5]. В последнее десятилетие активизировалась разработка модификаций ИХА, позволяющих проводить высокочувствительный анализ, сохраняя при этом основные достоинства — скорость исполнения, простоту внедрения и интерпретацию результатов [6–8].

Сказанное выше делает актуальным разработку и серийный выпуск отечественных технических средств экспресс-индикации патогенных микроорганизмов и токсинов, пригодных как для медицинских нужд, так и для контроля объектов окружающей среды.

Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный научно-исследовательский институт

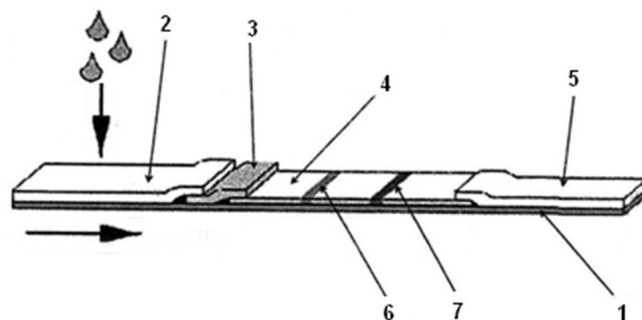


Рис. 1. Схема тест-полоски для проведения ИХА. 1 — пластиковая подложка жесткости; 2 — подложка для нанесения образца; 3 — конъюгатная подложка с высушенным конъюгатом наночастиц коллоидного золота (НКЗ) со специфичными антителами; 4 — аналитическая мембрана с нанесенными линиями растворов антител; 6 — аналитическая зона; 7 — контрольная зона; 5 — адсорбирующая подложка. Вертикальной стрелкой указано нанесение жидкой пробы на подложку, горизонтальной — направление движения потока анализируемой пробы

Таблица 1. Сравнительная характеристика отечественных и зарубежных технических средств индикации патогенов в объектах окружающей среды на основе иммунохроматографического анализа

Характеристики 1	Отечественные упаковки и комплекты				Зарубежные				KBTB			
	ЭкБ, ЭкБ-01		УИХЭ-1		Pro Strips™	RAID	NIDS*	Toxin Screen		IMASS	RAMP**	BADD
	376.00.00.000	376.00.00.000-01*	304.00.00.000	304.00.00.000-01								
Разработчик и производитель	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Количество выявляемых патогенов	17	5	10	5	6	3, 5, 8	3, 5	3	9	5	3	6
Наименование патогенных микроорганизмов, возбудителей инфекционных болезней и токсинов, выявляемых с помощью технического средства индикации	Возбудители сибирской язвы, чумы, бруцеллеза, туляремии, сальмонеллы, ботулинические токсины типов А и В, риккетсии, СЭВ***, холерный экзотоксин, вирус Эбола, вирус Мечумо, вирус денге, среда наcopления вирусом и риккетсией на основе растущего куриного эмбриона	В зависимости от комплектации: возбудители сибирской язвы, чумы, бруцеллеза, сальмонеллы, риккетсии Бернета, ботулинические токсины типов А и В, риккетсии, СЭВ, холерный экзотоксин	Возбудители сибирской язвы, чумы, бруцеллеза, туляремии, сальмонеллы, мелиоидоза, ботулинические токсины типов А и В, риккетсии, СЭВ, холерный экзотоксин	МИУ Бактерии: возбудители сибирской язвы, чумы, бруцеллеза, туляремии, сальмонеллы, МЛУ токсинами ботулинические токсины типов А и В, риккетсии, СЭВ, холерный экзотоксин	Возбудители сибирской язвы, чумы, ботулинические токсины типов А и В, риккетсии, СЭВ	В зависимости от комплектации: возбудители сибирской язвы, чумы, бруцеллеза, туляремии, ботулинические токсины, СЭВ	В зависимости от комплектации: возбудители сибирской язвы, чумы, бруцеллеза, туляремии, ботулинические токсины, СЭВ	Ботулинические токсины, риккетсии, СЭВ	Возбудители сибирской язвы, чумы, бруцеллеза, туляремии, сальмонеллы, мелиоидоза, ботулинические токсины, риккетсии, СЭВ	Возбудители сибирской язвы, чумы, ботулинические токсины, риккетсии, СЭВ	Osborne Scientific, США	CEA, Франция
Порог чувствительности:												
- спорные формы бактерий, кл/мл	1×10^6	1×10^6	1×10^6	1×10^6	1×10^6	1×10^6	1×10^6	не выявляют	1×10^6	$1,5 \times 10^4$	1×10^6	н/д
- вегетативные формы бактерий, кл/мл	1×10^6	1×10^6	1×10^6	1×10^6	1×10^6	1×10^6	1×10^6	не выявляют	$3,6 \times 10^6$	н/д	1×10^6	н/д
- вирусы, БОЕ/мл	$(1 \dots 100) \times 10^3$	1×10^6 ООЕ/мл	не выявляют	не выявляют	$1,0 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	н/д	не выявляют	$1,6 \times 10^6$	н/д	не выявляют	н/д
- бактериальные и растительные токсины, нг/мл	30-250	50-1000	20-500	20-500	10-500	6-30	н/д	400	10-20	19-38	10-500	н/д
Время быстрого ответа, мин	25	25-30	25-30	25-30	15	15	н/д	15	н/д	15	15-25	15
Количество анализируемых проб	50/5	10	4	1	1	1	10	3	10	5	5	5
Наличие средств отбора пробы	Средства отбора проб имеются											
Наличие средств подготовки проб к анализу	да	да	да	нет	да	да	нет	да	нет	да	да	да
Рабочий температурный диапазон, °С	+10...+40	+10...+35	2	2	от 4	н/д	н/д	+20...42	н/д	н/д	от 4	н/д
Срок годности, годы	2	2	2	2	2	н/д	2	1	н/д	н/д	2	2
Масса, кг	30/0,405	5,5	2	0,03	н/д	н/д	4,54	н/д	н/д	9,08	н/д	н/д
Габариты, мм	994 × 600 × 445 200 × 128 × 90	480 × 390 × 190	235 × 195 × 108	140 × 140 × 20	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д
Способ регистрации результатов анализа	Мульти	Мульти	Мульти	Мульти	Мульти	Мульти	Мульти	Мульти	Мульти	Мульти	Мульти	Мульти
Моно / мультианалитические тесты	Мульти	Моно	Мульти	Мульти	Мульти	Мульти	Мульти	Мульти	Мульти	Моно	Моно	Моно

Примечания: * — указаны десятичные номера конструкторской документации; ** — в иммунохроматографических тестах применяется люминесцентная метка; ***СЭВ — стафилококковый энтеротоксин типа В; н/д — нет данных. В таблице приведены сведения производителей о технических средствах индикации в виде комплектов и упаковок для противодействия биотеррористической угрозе. Перечень индивидуальных иммунохроматографических тестов, выпускаемых в России и за рубежом в медицинских целях для диагностики особо опасных и опасных инфекционных заболеваний, более обширен.

Таблица 2. Сравнительные характеристики укладки УИХЭ-1 и других методов экспресс-индикации патогенов [9]

Концентрация млн кл./мл	ПЦР время (2,0 ч)	РНГА время (3,5 ч)	ТИФА время (2,0 ч)	УИХЭ-1 время (15–20 мин)
<i>Y. pestis</i> 0,1	+	+	+	+
<i>Y. pestis</i> 0,01	+	–	–	+/-
<i>B. anthracis</i> 1,0	+	+	+	+
<i>B. anthracis</i> 0,1	+	+/-	+	+/-
<i>B. anthracis</i> 0,01	+	–	–	–
<i>Fr. tularensis</i> 0,1	+	+	+	+
<i>Fr. tularensis</i> 0,01	+	–	–	+/-

Примечания: ПЦР — полимеразная цепная реакция, РНГА — реакция непрямой геммагглютинации, ТИФА — твердофазный иммуноферментный анализ.

биологического приборостроения» (ФГУП «ГосНИИБП») ФМБА России является единственным в нашей стране предприятием, ведущим разработки и серийный выпуск технических средств индикации патогенов в объектах окружающей среды, основанных на принципе ИХА.

Цель обзора — представить характеристики отечественных средств на основе ИХА для индикации патогенных микроорганизмов и токсинов в объектах окружающей среды (смывы с поверхностей, жидкости, содержимое пробоотборников биологического аэрозоля), разработанные ФГУП «ГосНИИБП» ФМБА России, и провести сравнение с зарубежными аналогами.

Укладка иммунохроматографических индикаторных элементов УИХЭ-1

Укладка УИХЭ-1 была разработана для индикации возбудителей чумы, сибирской язвы, туляремии, сапа и ботулинического токсина типа А в смывах с поверхностей объектов окружающей среды. Укладка представляет собой иммунохроматографические индикаторные элементы и средства отбора пробы с поверхности, кисти, емкость с буфером анализа, стерильный тампон и схему анализа, уложенные в пылевлагозащищенный полимерный кейс. Расходные элементы укладки позволяют осуществить 10 анализов по пяти разновидностям патогенов. Имеется комплект пополнения, позволяющий быстро заменить израсходованные индикаторные элементы и буфер для проведения анализа и другие одноразовые аксессуары. В нормативных документах ФМБА России укладка рекомендована для использования в практической деятельности центров гигиены и санитарии ФМБА России. Основные технические характеристики укладки представлены в табл. 1.

Характеристики иммунохроматографических индикаторных элементов укладки по чувствительности и быстродействию, в сравнении с другими иммунохимическими экспресс-методами индикации патогенов, приведены в табл. 2. Данные были получены в ходе учений по выявлению микробных клеток вакцинных штаммов возбудителей сибирской язвы, чумы, туляремии [9].

Как видно из сравнительных испытаний, метод ИХА и индикаторные иммунохроматографические элементы укладки УИХЭ-1 обладают чувствительностью, сравнимой с РНГА и ТИФА, а по быстродействию опережают их. Номенклатура иммунохроматографических индикаторных элементов, которыми можно опционально комплектовать укладку, в настоящее время расширена до 15 наименований [10, 11]. Дальнейшим развитием этого технического средства индикации было создание варианта укладки УИХЭ-1 с комплектацией мультианалитными иммунохроматографическими

индикаторными устройствами (МИУ), рассчитанными на выявление бактерий и токсинов [12]. Конструктивно в МИУ тест-полоски расположены в полимерных разъемных оправах по 5 штук, при этом отобранную жидкую пробу необходимо вносить в отверстие для нанесения образца и равномерно распределять по всем тест-полоскам. Верхняя крышка полимерной оправы МИУ имеет прямоугольные прорези для визуальной регистрации результатов анализа и соответствующую маркировку. Применение МИУ позволило сделать укладку компактной, а также увеличить номенклатуру выявляемых бактерий (пять наименований) и токсинов (пять наименований) в едином цикле анализа. Возбудители сапа и мелиоидоза не имеют видовой различия при проведении ИХА, ввиду близкой антигенной структуры рода *Burkholderia*. Оба варианта исполнения укладки УИХЭ-1 обладают высокой устойчивостью к воздействию механических и климатических факторов и используются для комплектования мобильных биологических лабораторий. Полимерные кейсы укладки стойки к воздействию дезинфицирующих средств. Небольшие размеры и масса 5,5 кг и 2,0 кг позволяют использовать их также как переносное средство специфической индикации.

Комплект «Экспресс-комплект-Био»

Комплект «Экспресс-комплект-Био» (ЭКБ) предназначен для:

- отбора и подготовки проб содержимого пробоотборников биологических аэрозолей, культуральных сред после стадии биологического обогащения, смывов с поверхностей объектов окружающей среды;
- индикации методом ИХА вирусов (ортопоксвирусов, возбудителей геморрагических лихорадок Ласса и Мачупо, денге, лихорадки Западного Нила, среды накопления вирусов и риккетсий (антигенов растущих куриных эмбрионов), вегетативных и споровых форм бактерий (возбудителей чумы, сапа и мелиоидоза, бруцеллеза, спор сибирской язвы, туляремии), бактериальных и растительных токсинов (ботулинического токсина типа А (БТА), ботулинического токсина типа В (БТВ), стафилококкового энтеротоксина типа В (СЭВ), холерного экзотоксина, рицина;
- регистрации и фиксации результатов ИХА, передачи результатов органам управления.

Комплект рассчитан для отбора, подготовки и анализа 50 проб и эксплуатируется при температуре от +10 до +40 °С [13]. Он состоит из набора принадлежностей для подготовки отобранных проб к анализу, в который входит устройство для элюирования пробы с твердых сорбирующих сред пробоотборников аэрозоля; набора мультианалитных иммунохроматографических тестов (МИТ). Индикационные возможности комплекта

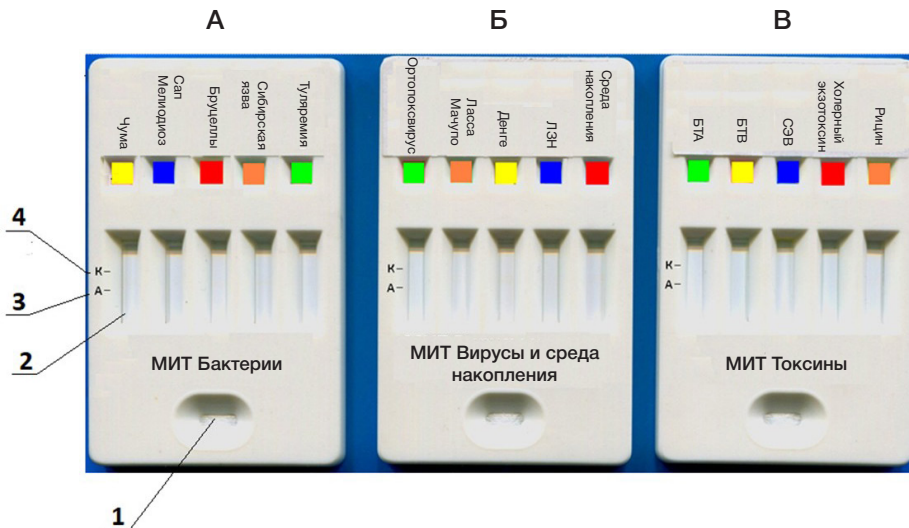


Рис. 2. Внешний вид мультианалитных иммунохроматографических тестов, входящих в комплекты ЭкБ и ЭкБ-01. А. МИТ Бактерии. Б. МИТ Вирусы и среда накопления. В. МИТ Токсины. 1 — отверстие для внесения пробы; 2 — отверстие для регистрации результата анализа; 3 — аналитическая зона; 4 — контрольная зона

обеспечены тремя видами МИТ: МИТ «Бактерии», МИТ «Вирусы и среда накопления», МИТ «Токсины» (рис. 2).

Индикация возбудителей сапа и мелиоидоза проходит без различия вида бактерий. В случае ортопоксвирусов, вирусов возбудителей лихорадок Ласса и Мачупо индикация методом ИХА также проходит без различия вида. Это обусловлено отсутствием антител, способных дифференцировать антигены указанных возбудителей на уровне вида. Комплект снабжен рефлектометрическим устройством (рис. 3), программное обеспечение которого позволяет автоматически распознавать положительные результаты анализа, задавать пороги интенсивности окрашивания зон МИТ, архивировать данные анализа и передавать их по электронной почте в вышестоящие органы для принятия решения.

Компьютер, используемый в рефлектометрическом устройстве, имеет повышенную стойкость к механическим воздействиям и воздействию влаги. Комплект ЭкБ полностью автономен, имеет собственный источник питания рефлектометра, может быть развернут как в лаборатории, так и в полевых условиях. Конструктивно комплект размещен в четырех ударопрочных водонепроницаемых полимерных кейсах и содержит все необходимые аксессуары для анализа содержимого пробоотборника аэрозоля при отборе в жидкость, на фильтры или плотные сорбирующие среды. Комплект снабжен также транспортной тарой, что позволяет перевозить его любыми видами воздушного и наземного транспорта.

Носимый вариант комплекта «Экспресс-комплект-Био»

Носимый вариант комплекта «Экспресс-комплект-Био» (ЭкБ-01) (рис. 4) позволяет использовать его как средство индивидуального контроля биологической обстановки. Комплект ЭкБ-01 рассчитан на анализ пяти проб по 17 видам патогенов. Прибор предназначен для ИХА подготовленных проб содержимого пробоотборников аэрозоля, иммунохимической верификации колоний микроорганизмов после обогащения пробы на культуральных средах, осуществления смывов с поверхностей объектов окружающей среды и их анализа.

В носимом варианте комплекта применены те же МИТ, что и для ЭкБ, корпус комплекта пылевлагозащищенный, выполнен из углеродного композиционного материала, общая масса комплекта — 0,405 кг.

Разработки средств индикации на основе люминесцентных меток в иммунохроматографии

Люминесцирующие маркерные молекулы также успешно используют в ИХА, наряду с НКЗ. Так, фирмой Responce Biomedical Corp. (Канада) создан анализатор RAMP для иммунохроматографического выявления патогенных бактерий, ортопоксвирусов и токсинов. Технические характеристики представлены в табл. 1.

В ФГУП «ГосНИИБП» ФМБА России разработан и испытан опытный образец укладки люминесцентной иммунохроматографической УЛИ-1, содержащей в своем составе люминесцентные иммунохроматографические индикаторные элементы на основе функционализированных карбоксильными группами латексных субмикронных частиц. Получение конъюгатов антител с латексными частицами происходило за счет ковалентного связывания. Укладка УЛИ-1 содержит также светодиодное визуализирующее устройство, работающее на батарее, позволяющее оператору наблюдать люминесценцию аналитической и тестовой зоны иммунохроматографического индикаторного элемента и проводить визуальную регистрацию результатов анализа [14]. Преимущество относительно чувствительности обнаружения при использовании люминесцентных меток, по сравнению с иммунохроматографическими тестами на основе НКЗ, для споровой формы возбудителя сибирской язвы было в 2 раза, для вегетативных форм возбудителей чумы — в 2 раза, антигена Ф1 чумного микроба — в 5 раз, различных типов ботулинического токсина — 2–4 раза.

Для целей регистрации результатов ИХА был также разработан экспериментальный образец рефлектометра-флуориметра «Зондаж», позволяющий регистрировать интенсивность отражения света от аналитической или контрольной зоны иммунохроматографического теста в четырех спектральных диапазонах видимого света: белом (400–800 нм), красном (650 нм), зеленом (525 нм), синем (470 нм). Спектральный диапазон прибора позволяет

регистрировать рефлектограммы не только конъюгатов НКЗ, но и различных по окраске цветных латексных частиц, часто используемых в качестве дисперсной фазы в ИХА. В режиме измерения интенсивности люминесценции прибор «Зондаж» позволяет регистрировать люминесцентные иммунохроматограммы. Он обеспечивает длину волны возбуждения люминесценции, равную 380 нм, эмиссии — 490 нм. Принцип действия прибора основан на рефлектометрии цифровых снимков иммунохроматограмм, либо регистрации интенсивности свечения люминесценции в случае люминесцентных тестов. В качестве источников света использованы излучающие светодиоды. Приемником изображения служит твердотельная видеокамера. Прибор питается от электрической сети (220В/50 Гц), имеет массу 1,30 кг. Программное обеспечение позволяет не только задавать параметры регистрации, но и определять интегральную интенсивность пиков иммунохроматограмм и проводить количественное сравнение различных образцов. Протоколы регистрации ИХА хранятся в памяти прибора и могут быть переданы по электронной почте.

Направления совершенствования ИХА для индикации патогенов

Пути совершенствования ИХА — это повышение чувствительности, специфичности, быстродействия метода. Анализ литературы позволяет сделать вывод, что для этой цели перспективны процедура концентрирования пробы на преаналитическом этапе, выбор рецепторных молекул высокой аффинности, использование коллоидных меток с низким порогом обнаружения, приборные средства и методы регистрации этих меток. На преаналитическом этапе эффективно применение магнитосорбентов для концентрирования бактерий и вирусов [15, 16]. Для выбора наиболее эффективных рецепторных молекул следует учитывать, что иммунные реакции в ИХА осуществляются в кинетическом режиме. Поэтому неважно, будут ли обнаруживаемые комплексы диссоциировать в течение часов или дней. Их количество определяется, прежде всего, кинетическими константами ассоциации, которые для одинаковых по строению рецепторов и антигенов схожи по величине и изменяются в ограниченном диапазоне. Дополнительно увеличить аффинность можно генетической модификацией (направленным дизайном) активного центра антител. Использование этих методов еще очень ограничено, несмотря на подтверждение их эффективности [17].

С развитием молекулярно-биологических методов становится доступным получение модифицированных традиционных рецепторов (антител) и новых рецепторов — аптамеров [18–20], однодоменных антител [21]. Осуществление направленной иммобилизации антител на дисперсной фазе через рецепторные стафилококковые белки А и стрептококковый белок G, взаимодействия авидин–биотин [22–25], происходит без утраты аффинности антител, как это зачастую протекает при физической сорбции на дисперсной фазе, что свидетельствует о полезности такого подхода.

На этапе поиска оптимальных маркеров следует обратить внимание на применение новых оптических маркеров на основе высоко разветвленного коллоидного золота [26, 27] коллоидного углерода [28–30], оксида графена и карбоксилированного оксида графена [31]. Ограничение по регистрации только поверхностных молекул метки, существующее в ИХА, отсутствует у аналитических



Рис. 3. Внешний вид рефлектометрического устройства комплекта ЭкБ

методов, в которых регистрация метки основана на других физических принципах. Разработан амплификатор-ридер температурного контраста для регистрации наночастиц золота на иммунохроматографических мембранах [32]. Такой ридер позволяет уменьшить предел обнаружения в восемь раз для ИХА вируса гриппа, также при диагностике малярии, ИХА выявлению *Clostridium difficile*, по сравнению с оптическим считывателем.

Для регистрации сигнала ИХА используют также магнитные свойства нанодисперсной метки [33–35]. В последних исследованиях предложен серийный глюкометр с электрохимическим детектированием в качестве регистратора результатов ИХА [36].

Для учета и регистрации результатов следует ожидать, что тестовые системы будущего будут интегрированы с регистрирующими системами (рефлектометры, флуориметры), а также с инструментами для сбора, хранения и обработки информации. В литературе обобщены тенденции трансформации ИХА из визуального в инструментальный метод [37] и представлено современное состояние аналитических технологий на основе использования мобильных телефонов/смартфонов [38, 39].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные литературных источников и собственные исследования авторов показывают, что ИХА широко применяют для целей идентификации патогенных для человека бактерий, вирусов и токсинов.

Сравнение технических характеристик разработанных укладок и комплектов для индикации патогенов с аналогичными зарубежными образцами (табл. 1) показало, что наши работы следовали в русле мировой тенденции развития метода — от создания отдельных иммунохроматографических монотестов к мультиплексному анализу, поиску наиболее чувствительных методов регистрации, расширению номенклатуры выявляемых патогенов [40]. Комплекты ЭкБ и ЭкБ-01 выгодно отличаются от зарубежных аналогов более широкой номенклатурой выявляемых патогенов, автоматизацией учета результатов анализа (комплект ЭкБ)



Рис. 4. Внешний вид комплекта ЭкБ-01. А. Комплект с открытой крышкой. Б. Крепление комплекта к обмундированию оператора

при сравнимом, либо лучшем пороге чувствительности. Указанные средства индикации патогенов востребованы в практике центров гигиены и эпидемиологии, специализированных лабораторий других ведомств, обеспечивающих биологическую безопасность.

Рассмотренные в обзоре пути совершенствования позволяют утверждать, что иммунохроматографические

аналитические системы смогут более эффективно выявлять патогены бактериальной, вирусно-рикетсиозной и токсинной природы. При этом повысится специфичность анализа до уровня штамма, в случае бактериальных возбудителей, что позволит осуществить процесс специфичной индикации патогенных микроорганизмов и токсинов на новой технологической базе.

Литература

1. Leavitt SA. A Thin Blue Line: The History of the Pregnancy Test Kits. 2003 (cited 2022, Nov. 14); Available from: <https://www.history.nih.gov/exhibits/thinblueline/introduction.html>.
2. de Puig H, Bosch I, Gehrke L, Hamad-Schifferli K. Challenges of the nano-bio interface in lateral flow and dipstick immunoassays. *Trends in Biotechnology*. 2017; 35 (12):1169–80.
3. Li J, Macdonald J. Multiplexed lateral flow biosensors: Technological advances for radically improving point-of-care diagnoses. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016; 83: 177–92.
4. Posthuma-Trumpie GA, Korf J, van Amerongen A. Lateral flow (immuno) assay: Its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009; 393 (2): 569–82.
5. Dzantiev BB, Byzova NA, Urusov AE, Zherdev AV. Immunochromatographic methods in food analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2014; 55: 81–93.
6. Bahadır EB, Sezgintürk MK. Lateral flow assays: Principles, designs and labels. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016; 82: 286–306.
7. Quesada-González D, Merkoçi A. Nanoparticle-based lateral flow biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015; 73: 47–63.
8. Zherdev AV, Dzantiev BB. Ways to Reach Lower Detection Limits of Lateral Flow Immunoassays. *Rapid Test - Advances in Design, Format and Diagnostic Applications*, 2018. DOI: 10.5772/intechopen.76926.
9. Каримова Т. В., Прядкина Е. Н., Якунина О. Ю., Иванова Л. К., Дубень Л. Г., Кузубов В. И., и др. Использование иммунохроматографического анализа для индикации патогенных биологических агентов. В сборнике: Материалы IX Межгосударственной научно-практической конференции «Современные технологии в реализации глобальной стратегии борьбы с инфекционными болезнями на территории государств-участников Содружества Независимых Государств»; 2 октября 2008 г. Российская Федерация, г. Волгоград. 87–88.
10. Ярков С. П., Башарова Л. А., Третьяков С. И., Злобин В. Н. Создание индикаторных иммунохроматографических элементов для выявления риккетсий Бернета. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; 4: 79–81.
11. Шиленко И. В., Ярков С. П., Артемов А. В., Смирнов А. М., Кононенко А. Б. Отечественный иммунохроматографический тест для выявления сальмонелл различных серогрупп. *Ветеринария и кормление*. 2011; 4: 12–13.
12. Ярков С. П., Шиленко И. В., Титов А. А., Бровкина А. Н., Третьяков С. И., Храмов Е. Н. Разработка мультианалитного иммунохроматографического теста для индикации токсинов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 4: 103–08.
13. Ярков С. П., Шиленко И. В., Третьяков С. И., Наумов П. В. Носимый комплект биологического контроля для специфической индикации биологических поражающих агентов в объектах окружающей среды ЭкБ-01. В сборнике: II Всероссийская научно-практическая конференция «Исследование вопросов радиационной, химической и биологической защиты в мирное и военное время». 14–15 сентября 2021 г. Кострома; с. 301–306.
14. Шиленко И. В., Ярков С. П., Злобин В. Н. Носимый комплект для выявления возбудителей особо опасных инфекций на принципе люминесцентной иммунохроматографии. *Журнал инфекционной патологии*. 2009; 16 (3): 222–23.
15. Li Q, Zhang S, Cai Y, Yang Y, Hu F, Liu X, et al. Rapid

- detection of *Listeria monocytogenes* using fluorescence immunochromatographic assay combined with immunomagnetic separation technique. *International Journal of Food Science & Technology*. 2017; 52 (7): 1559–66.
16. Razo SC, Panferov VG, Safenkova IV, Varitsev YA, Zherdev AV, Dzantiev BB. Double enhanced lateral flow immunoassay for potato virus X based on a combination of magnetic and gold nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*. 2018; 1007: 50–60.
 17. Kim H-Y, Stojadinovic A, Izadjoo MJ. Affinity maturation of monoclonal antibodies by multi-site-directed mutagenesis. In: *Monoclonal Antibodies*. Totowa, NJ, USA: Springer, Humana Press, 2014; p. 407–20. Available from: <https://link.springer.com/book/10.1007%2F978-1-62703-992-5#about>.
 18. Dias AM, Roque AC. The future of protein scaffolds as affinity reagents for purification. *Biotechnology and Bioengineering*. 2017; 114 (3): 481–91.
 19. Jauset-Rubio M, El-Shahawi MS, Bashammakh AS, Alyoubi AO. Advances in aptamers-based lateral flow assays. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2017; 97: 385–98.
 20. Chen A, Yang S. Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015; 71: 230–42.
 21. Leow CH, Fischer K, Leow CY, Cheng Q, Chuah C, McCarthy J. Sigle domain antibodies as new biomarker detectors. *Diagnostics*. 2017; 7 (4): 52.
 22. Welch NG, Scoble JA, Muir BW, Pigram PJ. Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays. *Biointerphases*. 2017; 12 (2): 02D301.
 23. Shen M, Rusling JF, Dixit CK. Site-selective orientated immobilization of antibodies and conjugates for immunodiagnosics development. *Methods*. 2017; 116: 95–111.
 24. Iijima M, Si K. Scaffolds for oriented and close-packed immobilization of immunoglobulins. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017; 89: 810–21.
 25. Kruljec N, Bratkovič T. Alternative affinity ligands for immunoglobulins. *Bioconjugate Chemistry*. 2017; 28 (8): 2009–30.
 26. Serebrennikova KV, Samsonova JV, Osipov AP, Senapati D, Kuznetsov DV. Gold nanoflowers and gold nanospheres as labels in lateral flow immunoassay of prolactin. *Nano Hybrids and Composites*. 2017; 13: 47–53.
 27. Xu P, Li J, Huang X, Duan H, Ji Y, Xiong Y. Effect of the tip length of multi-branched AuNFs on the detection performance of immunochromatographic assays. *Analytical Methods*. 2016; 8 (16): 3316–24.
 28. van Amerongen A, Besselink G, Blazkova M, Posthuma-Trumpie GA, Koets M, Beelen-Thomissen M. Chapter 19: Carbon nanoparticles as detection label for diagnostic antibody microarrays. In: *Abuelzein E, Editor. Trends in Immunolabelled and Related Techniques*. Rijeka, Croatia: InTech, 2012; p. 311–330.
 29. Suárez-Pantaleón C, Wichers J, Abad-Somovilla A, van Amerongen A, Abad-Fuentes A. Development of an immunochromatographic assay based on carbon nanoparticles for the determination of the phytohormone forchlorfenuron. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013; 42: 170–6.
 30. Liu B, Wang L, Tong B, Zhang Y, Sheng W, Pan M, et al. Development and comparison of immunochromatographic strips with three nanomaterial labels: Colloidal gold, nanogold-polyaniline-nanogold microspheres (GPGs) and colloidal carbon for visual detection of salbutamol. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016; 85: 337–42.
 31. Yu L, Li P, Ding X, Zhang Q. Graphene oxide and carboxylated graphene oxide: Viable two-dimensional nanolabels for lateral flow immunoassays. *Talanta*. 2017; 165: 167–75.
 32. Wang Y, Qin Z, Boulware DR, Pritt BS, Sloan LM, González IJ, et al. Thermal contrast amplification reader yielding 8-fold analytical improvement for disease detection with lateral flow assays. *Analytical Chemistry*. 2016; 88 (23): 11774–82.
 33. Barnett JM, Wraith P, Kiely J, Persad R, Hurley K, Hawkins P, et al. An inexpensive, fast and sensitive quantitative lateral flow magneto-immunoassay for total prostate specific antigen. *Biosensors*. 2014; 4 (3): 204–20.
 34. Chen Y, Wang K, Liu Z, Sun R, Cui D, He J. Rapid detection and quantification of tumor marker carbohydrate antigen 72-4 (CA72-4) using a superparamagnetic immunochromatographic strip. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016; 408 (9): 2319–27.
 35. Lago-Cachón D, Oliveira-Rodríguez M, Rivas M, Blanco-López MC, Martínez-García JC, Moyano A, et al. Scanning magneto-inductive sensor for quantitative assay of prostate-specific antigen. *IEEE Magnetics Letters*. 2017; 8: 1–5.
 36. Zhao Y, Chen X, Lin S, Du D, Lin Y. Integrated immunochromatographic strip with glucometer readout for rapid quantification of phosphorylated proteins. *Analytica Chimica Acta*. 2017; 964: 1–6.
 37. Mak WC, Beni V, Turner AP. Lateral-flow technology: From visual to instrumental. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016; 79: 297–305.
 38. Quesada-González D, Merkoçi A. Mobile phone-based biosensing: An emerging “diagnostic and communication” technology. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017; 92: 549–62.
 39. Zarei M. Portable biosensing devices for point-of-care diagnostics: Recent developments and applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2017; 91: 26–41.
 40. Yarkov SP, Tretyakov SI, Shilenko IV, Titov AA, Basharova LA, Khramov EN. Experience of pathogens identification tools development in the environment using immunochromatography. *The 13th CBRNe Protection Symposium. Science for Safety&Security. September 24th–26th Malmö, Sweden, 2019; p. 118.*

References

1. Leavitt SA. A Thin Blue Line: The History of the Pregnancy Test Kits. 2003 (cited 2022, Nov. 14); Available from: www.history.nih.gov/exhibits/thinblueline/introduction.html.
2. de Puig H, Bosch I, Gehrke L, Hamad-Schifferli K. Challenges of the nano-bio interface in lateral flow and dipstick immunoassays. *Trends in Biotechnology*. 2017; 35 (12):1169–80.
3. Li J, Macdonald J. Multiplexed lateral flow biosensors: Technological advances for radically improving point-of-care diagnoses. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016; 83: 177–92.
4. Posthuma-Trumpie GA, Korf J, van Amerongen A. Lateral flow (immuno) assay: Its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009; 393 (2): 569–82.
5. Dzantiev BB, Byzova NA, Urusov AE, Zherdev AV. Immunochromatographic methods in food analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2014; 55: 81–93.
6. Bahadır EB, Sezgentürk MK. Lateral flow assays: Principles, designs and labels. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016; 82: 286–306.
7. Quesada-González D, Merkoçi A. Nanoparticle-based lateral flow biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015; 73: 47–63.
8. Zherdev AV, Dzantiev BB. Ways to Reach Lower Detection Limits of Lateral Flow Immunoassays. *Rapid Test - Advances in Design, Format and Diagnostic Applications*, 2018. DOI: 10.5772/intechopen.76926.
9. Karimova TV, Pryadkina EN, Yakunina OYu, Ivanova LK, Duben LG, Kuzubov VI, i dr. Ispol'zovanie immunoxromatograficheskogo analiza dlya indikacii patogennykh biologicheskix agentov. V sbornike: *Materialy IX Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferencii «Sovremennye tekhnologii v realizacii global'noj strategii bor'by s infekcionnymi boleznyami na territorii gosudarstv-uchastnikov Sodruzhestva Nezavisimyx Gosudarstv»*; 2 oktyabrya 2008 g. Rossijskaya Federaciya, g. Volgograd. 87–88. Russian.
10. Yarkov SP, Basharova LA, Tretyakov SI, Zlobin VN. Sozdanie indikatornykh immunoxromatograficheskix ehlementov dlya vyavleniya rikketsij Berneta. *Problemy osobo opasnykh infekcij*. 2013; 4: 79–81. Russian.
11. Shilenko IV, Yarkov SP, Artemov AV, Smirnov AM, Kononenko AB. Otechestvennyj immunoxromatograficheskij test dlya vyavleniya sal'monell razlichnykh serogrupp. *Veterinariya i kormlenie*. 2011; 4:

- 12–13. Russian.
12. Yarkov SP, Shilenko IV, Titov AA, Brovkina AN, Tret'yakov SI, Xramov EN. Razrabotka mul'tianal'nogo immunoxromatograficheskogo testa dlya indikatsii toksinov. *Problemy osobo opasnykh infektsij*. 2015; 4: 103–08. Russian.
 13. Yarkov SP, Shilenko IV, Tret'yakov SI, Naumov PV. Nosimyj komplekt biologicheskogo kontrolya dlya specificheskoy indikatsii biologicheskix porazhayushhix agentov v ob'ektax okruzhayushhej sredy EhkB-01. V sbornike: II Vserossiyskaya nauchno-prakticheskaya konferenciya «Issledovanie voprosov radiacionnoj, ximicheskoy i biologicheskoy zashhity v mirnoe i voennoe vremya». 14–15 sentyabrya 2021 g. Kostroma; s. 301–306. Russian.
 14. Shilenko IV, Yarkov SP, Zlobin VN. Nosimyj komplekt dlya vyavleniya vzbuditelej osobo opasnykh infektsij na principe lyuminescentnoj immunoxromatografii. *Zhurnal infektsionnoj patologii*. 2009; 16 (3): 222–23. Russian.
 15. Li Q, Zhang S, Cai Y, Yang Y, Hu F, Liu X, et al. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* using fluorescence immunochromatographic assay combined with immunomagnetic separation technique. *International Journal of Food Science & Technology*. 2017; 52 (7): 1559–66.
 16. Razo SC, Panferov VG, Safenkova IV, Varitsev YA, Zherdev AV, Dzantiev BB. Double enhanced lateral flow immunoassay for potato virus X based on a combination of magnetic and gold nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*. 2018; 1007: 50–60.
 17. Kim H-Y, Stojadinovic A, Izadjoo MJ. Affinity maturation of monoclonal antibodies by multi-site-directed mutagenesis. In: *Monoclonal Antibodies*. Totowa, NJ, USA: Springer, Humana Press, 2014; p. 407–20. Available from: <https://link.springer.com/book/10.1007%2F978-1-62703-992-5#about>.
 18. Dias AM, Roque AC. The future of protein scaffolds as affinity reagents for purification. *Biotechnology and Bioengineering*. 2017; 114 (3): 481–91.
 19. Jauset-Rubio M, El-Shahawi MS, Bashammakh AS, Alyoubi AO. Advances in aptamersbased lateral flow assays. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2017; 97: 385–98.
 20. Chen A, Yang S. Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015; 71: 230–42.
 21. Leow CH, Fischer K, Leow CY, Cheng Q, Chuah C, McCarthy J. Sigle domain antibodies as new biomarker detectors. *Diagnostics*. 2017; 7 (4): 52.
 22. Welch NG, Scoble JA, Muir BW, Pigram PJ. Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays. *Biointerphases*. 2017; 12 (2): 02D301.
 23. Shen M, Rusling JF, Dixit CK. Site-selective orientated immobilization of antibodies and conjugates for immunodiagnosics development. *Methods*. 2017; 116: 95–111.
 24. Iijima M, Si K. Scaffolds for oriented and close-packed immobilization of immunoglobulins. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017; 89: 810–21.
 25. Kruljec N, Bratković T. Alternative affinity ligands for immunoglobulins. *Bioconjugate Chemistry*. 2017; 28 (8): 2009–30.
 26. Serebrennikova KV, Samsonova JV, Osipov AP, Senapati D, Kuznetsov DV. Gold nanoflowers and gold nanospheres as labels in lateral flow immunoassay of prolactinin. *Nano Hybrids and Composites*. 2017; 13: 47–53.
 27. Xu P, Li J, Huang X, Duan H, Ji Y, Xiong Y. Effect of the tip length of multi-branched AuNFs on the detection performance of immunochromatographic assays. *Analytical Methods*. 2016; 8 (16): 3316–24.
 28. van Amerongen A, Besselink G, Blazkova M, Posthuma-Trumpie GA, Koets M, Beelen-Thomissen M. Chapter 19: Carbon nanoparticles as detection label for diagnostic antibody microarrays. In: Abuelzein E, Editor. *Trends in Immunolabelled and Related Techniques*. Rijeka, Croatia: InTech, 2012; p. 311–330.
 29. Suárez-Pantaleón C, Wichers J, Abad-Somovilla A, van Amerongen A, Abad-Fuentes A. Development of an immunochromatographic assay based on carbon nanoparticles for the determination of the phyto regulator forchlorfenuron. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013; 42: 170–6.
 30. Liu B, Wang L, Tong B, Zhang Y, Sheng W, Pan M, et al. Development and comparison of immunochromatographic strips with three nanomaterial labels: Colloidal gold, nanogold-polyaniline-nanogold microspheres (GPGs) and colloidal carbon for visual detection of salbutamol. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016; 85: 337–42.
 31. Yu L, Li P, Ding X, Zhang Q. Graphene oxide and carboxylated graphene oxide: Viable two-dimensional nanolabels for lateral flow immunoassays. *Talanta*. 2017; 165: 167–75.
 32. Wang Y, Qin Z, Boulware DR, Pritt BS, Sloan LM, González IJ, et al. Thermal contrast amplification reader yielding 8-fold analytical improvement for disease detection with lateral flow assays. *Analytical Chemistry*. 2016; 88 (23): 11774–82.
 33. Barnett JM, Wraith P, Kiely J, Persad R, Hurley K, Hawkins P, et al. An inexpensive, fast and sensitive quantitative lateral flow magneto-immunoassay for total prostate specific antigen. *Biosensors*. 2014; 4 (3): 204–20.
 34. Chen Y, Wang K, Liu Z, Sun R, Cui D, He J. Rapid detection and quantification of tumor marker carbohydrate antigen 72–4 (CA72–4) using a superparamagnetic immunochromatographic strip. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016; 408 (9): 2319–27.
 35. Lago-Cachón D, Oliveira-Rodríguez M, Rivas M, Blanco-López MC, Martínez-García JC, Moyano A, et al. Scanning magneto-inductive sensor for quantitative assay of prostate-specific antigen. *IEEE Magnetics Letters*. 2017; 8: 1–5.
 36. Zhao Y, Chen X, Lin S, Du D, Lin Y. Integrated immunochromatographic strip with glucometer readout for rapid quantification of phosphorylated proteins. *Analytica Chimica Acta*. 2017; 964: 1–6.
 37. Mak WC, Beni V, Turner AP. Lateral-flow technology: From visual to instrumental. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016; 79: 297–305.
 38. Quesada-González D, Merkoçi A. Mobile phone-based biosensing: An emerging “diagnostic and communication” technology. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017; 92: 549–62.
 39. Zarei M. Portable biosensing devices for point-of-care diagnostics: Recent developments and applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2017; 91: 26–41.
 40. Yarkov SP, Tret'yakov SI, Shilenko IV, Titov AA, Basharova LA, Khramov EN. Experience of pathogens identification tools development in the environment using immunochromatography. The 13th CBRNe Protection Symposium. Science for Safety&Security. September 24th–26th Malmö, Sweden, 2019; p. 118.

РЕГУЛЯТОРНЫЕ Т-КЛЕТКИ И Т-ХЕЛПЕРЫ 17-ГО ТИПА С ЭКСПРЕССИЕЙ ЭКТОНУКЛЕОТИДАЗ CD39 И CD73 ПРИ ТЯЖЕЛОЙ МЕХАНИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ У ДЕТЕЙ

Р. Ш. Закиров^{1,2}✉, Д. Г. Купцова¹, Е. В. Фрейдлин¹, Е. Л. Семикина¹, С. В. Петричук¹, О. В. Карасева^{1,2}¹ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей, Минздрава России, Москва, Россия² Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии, Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия

Исследование механизмов развития иммунного ответа при тяжелой механической травме (ТМТ) у детей — актуальная и социально значимая задача по причине высокой инвалидизации и летальности. Целью работы было определение информативных иммунологических критериев тяжести и прогноза исхода травматической болезни у детей ($n = 43$) на основе оценки экспрессии эктонуклеотидаз CD39 и CD73 в популяциях регуляторных Т-клеток (T_{reg} , $CD4^+CD127^{low}CD25^{high}$) и Т-хелперов 17-го типа ($Th17$, $CD4^+CD161^+CD3^+$) при ТМТ в группах с благоприятным (ТМТбл, $n = 24$), неблагоприятным (ТМТнебл, $n = 17$) и летальным исходом ($n = 2$). С помощью метода проточной цитофлуориметрии было выявлено выраженное снижение абсолютного количества T_{reg} и $Th17$, а также T_{reg} и $Th17$, экспрессирующих CD39 и CD73, в раннем посттравматическом периоде ТМТ. В группах ТМТбл и ТМТнебл относительное число T_{reg} и $Th17$, экспрессирующих CD39, значимо различалось ($p < 0,05$) и было существенно повышено с первых по трети сутки после травмы для ТМТнебл. Уровень T_{reg} CD39 (44,4 %) является предпосылкой неблагоприятного исхода у выживших детей при ТМТ. Для больных с летальным исходом были получены крайне низкие показатели экспрессии эктонуклеотидаз: $CD39^+T_{reg}$ — 9,52% (9,52–13,75) и $CD39^+Th17$ — 0,92% (0,74–1,1). Для ТМТнебл интенсивность флуоресценции (FL) CD39 на T_{reg} в раннем посттравматическом периоде была повышена в сравнении с ТМТбл. Для средней интенсивности флуоресценции (FL) CD39 на T_{reg} пороговое значение составило 8,25 у.е. Для пациентов с летальным исходом значения FL CD39 на T_{reg} выявлены крайне низкие: 3,95 у.е. (3,7–4,67). Полученные результаты показывают, что экспрессия CD39 и CD73 в популяциях T_{reg} и $Th17$ в значительной степени связана с тяжестью и исходом травматической болезни у детей.

Ключевые слова: дети, тяжелая травма, регуляторные Т-лимфоциты, Т-хелперы 17-го типа, CD39, CD73, иммуносупрессия**Финансирование:** исследование проведено в рамках государственного задания Минздрава России, № АААА–А19–119021190051–6, № 122040800163–9.**Благодарности:** авторы выражают благодарность всем пациентам, участвовавшим в исследовании, а также признательность за сотрудничество коллегам из отдела сочетанной травмы, анестезиологии и реанимации НИИ неотложной детской хирургии и травматологии Департамента здравоохранения города Москвы.**Вклад авторов:** Р. Ш. Закиров, О. В. Карасева, С. В. Петричук — планирование работы, анализ литературы, набор экспериментальных данных, анализ и интерпретация результатов, подготовка и редактирование рукописи; Е. Л. Семикина — планирование работы; Д. Г. Купцова, Е. В. Фрейдлин — набор экспериментальных данных.**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом Научно-исследовательского института неотложной детской хирургии и травматологии ДЗ г. Москвы (протокол № 2 от 26 мая 2020 г.). Для всех участников исследования было получено добровольное информированное согласие родителей в соответствии с принципами Хельсинкской декларации.✉ **Для корреспонденции:** Рустам Шакирович Закиров
Ломоносовский проспект, д. 2/1, г. Москва, 119296, Россия; zakirov.rsh@nczd.ru**Статья получена:** 21.11.2022 **Статья принята к печати:** 11.12.2022 **Опубликована онлайн:** 24.12.2022**DOI:** 10.47183/mes.2022.042

REGULATORY T CELLS AND T HELPER 17 CELLS EXPRESSING CD39 AND CD73 ECTONUCLEOTIDASE IN CHILDREN WITH SEVERE INJURY

Zakirov RSh^{1,2}✉, Kuptsova DG¹, Freidlin EV¹, Semikina EL¹, Petrichuk SV¹, Karaseva OV^{1,2}¹ National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia² Institute of Urgent Children Surgery and Traumatology, Moscow, Russia

Frequent resulting disability and case mortality support the urgency of investigation of the immune response mechanisms triggered by severe injury (SI) in children. This study aimed to determine the informative immunological criteria of traumatic injury severity and prognosis in children ($n = 43$) based on the assessment of expression of CD39 and CD73 ectonucleotidase in populations of regulatory T cells (T_{reg} , $CD4^+CD127^{low}CD25^{high}$) and T-helper 17 cells ($Th17$, $CD4^+CD161^+CD3^+$) in SI cases grouped by the outcome (favorable (Slfav, $n = 24$), unfavorable (Slunfav, $n = 17$) and lethal ($n = 2$)). With the help of flow cytometry, we identified a pronounced decrease in the absolute number of T_{reg} and $Th17$, as well as T_{reg} and $Th17$ expressing CD39 and CD73, in the early post-traumatic period. In the Slfav and Slunfav groups the relative number of T_{reg} and $Th17$ cells expressing CD39 differed significantly ($p < 0,05$); it was substantially higher from the first to the third day post injury in the Slunfav group. The level of T_{reg} CD39 (44.4%) is a premise for an unfavorable outcome in children surviving an SI. In fatality cases, we registered extremely low ectonucleotidase expression rates: $CD39^+T_{reg}$ — 9.52% (9.52–13.75) and $CD39^+Th17$ — 0.92% (0.74–1.1). In the Slunfav group, the intensity of fluorescence (FL) of CD39 on T_{reg} cells in the early post-traumatic period was higher than seen in the Slfav group. The threshold value for the average fluorescence intensity (FL) of CD39 on T_{reg} was 8.25 c.u. In fatality cases, the T_{reg} CD39 FL values were extremely low: 3.95 c.u. (3.7–4.67). The results of the study indicate that in children, the expression of CD39 and CD73 in T_{reg} and $Th17$ populations is significantly associated with the severity of injury and outcome of the traumatic disease.

Keywords: children, severe injury, T_{reg} , $Th17$, CD39, CD73, immune suppression**Funding:** the study was supported under the State Assignment by the Ministry of Health of Russia, #АААА–А19–119021190051–6, #122040800163–9**Acknowledgments:** the authors express their gratitude to all patients who participated in the study, as well as to colleagues from the department of concomitant injury, anesthesiology and resuscitation of the Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Traumatology of the Moscow Department of Health for their cooperation.**Author contribution:** Zakirov RSh, Karaseva OV, Petrichuk SV — study planning, analysis of literature, collection of experimental data, analysis and interpretation of the results, manuscript authoring and editing; Semikina EL — study planning; Kuptsova DG, Freidlin EV — collection of experimental data.**Compliance with the ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Institute of Urgent Children Surgery and Traumatology of the Department of Health of Moscow (Minutes #2 of May 26, 2020). Parents of all participants of the study have signed the informed consent form in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki.✉ **Correspondence should be addressed:** Rustam Shakirovich Zakirov
Lomonosovsky prospect, 2/1, Moscow, 119296, Russia; zakirov.rsh@nczd.ru**Received:** 21.11.2022 **Accepted:** 11.12.2022 **Published online:** 24.12.2022**DOI:** 10.47183/mes.2022.042

В этиологической структуре детской инвалидизации и смертности одно из первых мест принадлежит тяжелой механической травме (ТМТ) [1, 2]. ТМТ сопровождается развитием декомпенсации систем жизнеобеспечения организма в результате комплексного воздействия таких факторов повреждения, как травматическое механическое повреждение, кровопотеря и гипоксия. Иницирующим фактором является механическое повреждение. Оно ведет к выбросу ассоциированных с повреждением молекулярных паттернов DAMP (от англ. damage-associated molecular pattern), которые в свою очередь способны нарушать клеточный иммунный ответ на экзогенные антигены и патоген-ассоциированные молекулярные паттерны PAMP (от англ. pathogen-associated molecular pattern), что вносит свой вклад в развитие дисфункции иммунной системы. Одним из таких эндогенных тканевых сигналов DAMP, запускающих и регулирующих иммунный ответ на повреждение, является внеклеточный АТФ (еАТФ) [3]. При травматическом воздействии наблюдается стойкое повышение уровня еАТФ в очаге повреждения [4, 5]. Являясь одним из основных компонентов пуринергической системы и сильным провоспалительным сигналом, еАТФ важен при регуляции функционирования Т-клеток. Как мощный молекулярный паттерн, связанный с повреждениями, еАТФ играет ключевую роль в иницировании воспалительной реакции через пуринергические рецепторы P2R. В то же время конечный продукт расщепления еАТФ — внеклеточный аденозин, являясь иммуносупрессором, играет важную роль в ограничении воспалительного ответа. Он осуществляет свои функции через аденозиновые рецепторы A2A, блокируя сигнал Т-клеточного рецептора (TCR) путем ингибирования фосфорилирования зета-ассоциированного белка 70 (ZAP-70) и активации активирующего белка 1 (AP-1), что приводит к снижению продукции IL2, экспрессии CD25 и ингибированию пролиферации Т-клеток. Уровни еАТФ и внеклеточного аденозина, а также их биологические эффекты жестко регулируются каталитическими эффектами эктоферментов, экспрессируемых на плазматической мембране иммунных клеток, — CD39 (E-NTPDase1) и CD73 (Ecto5'NTase). CD39 метаболизирует АТФ до АДФ, пирофосфата и АМФ. АМФ расщепляется с помощью эктонуклеотидазы CD73 до аденозина и фосфата. Таким образом, активность экзонуклеотидаз CD39 и CD73 обеспечивает баланс провоспалительного действия АТФ и противовоспалительного аденозина в очаге воспаления [6–9]. Тяжелая травма обычно сопровождается периодом выраженной иммуносупрессии, в патогенезе которой ключевую роль занимает снижение уровня Т-лимфоцитов. Оценка абсолютного и относительного количества субпопуляций Т-хелперов — значимый маркер для определения тяжести и прогноза исхода патологического процесса [10–13]. По причине высокой клинической значимости определения уровней экспрессии экзонуклеотидаз CD39 и CD73 на различных популяциях циркулирующих лимфоцитов в диагностике и прогнозе широкого круга заболеваний [14] целью настоящего исследования было выявить информативные иммунологические критерии тяжести и прогноза исхода травматической болезни у детей на основе оценки абсолютного и относительного количества субпопуляций Т-лимфоцитов, а также уровня экспрессии эктонуклеотидаз CD39 и CD73 в популяциях T_{reg} и Th17 при тяжелой механической травме у детей.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В ходе исследования было обследовано 43 пациента (28 мальчиков (65,1%), 15 девочек (34,9%); 116 наблюдений) с ТМТ, проходивших лечение в отделении анестезиологии-реанимации НИИ НДХИТ ДЗ г. Москвы в период с 2020–2021 г. Лабораторное обследование выполняли на базе лабораторного отдела ФГАУ НМИЦ здоровья детей Минздрава РФ в динамике травматической болезни от 1 до 5 раз в зависимости от длительности пребывания ребенка в отделении анестезиологии-реанимации (ОАР) НИИ НДХИТ ДЗ г. Москвы. Средний возраст детей составлял 13,0 (6,0–15,0) лет (Me (Q_{25} – Q_{75})). В качестве декретированных сроков лабораторного обследования были выбраны первые, третьи, пятые, седьмые, 14-е сутки с момента получения травмы.

Контрольную группу в исследовании составил 41 условно здоровый ребенок. Все дети, вошедшие в контрольную группу, проходили диспансеризацию на базе ФГАУ НМИЦ здоровья детей Минздрава России и были сопоставимы по возрасту и полу: возраст — 12,41 (7,4–16,2) лет; 26 мальчиков (63,4%), 15 девочек (36,6%).

Для объективной оценки тяжести повреждения в работе использовали шкалу тяжести повреждения (Injury severity score, ISS), шкалу комы Глазго — Glasgow Coma Scale (ШКГ, GCS) и ее модификацию для пациентов младше двух лет педиатрическую ШКГ — Pediatric GCS (pGCS) [15].

Для оценки исхода ТМТ использовали шкалу исходов комы Глазго — Glasgow Outcome Scale (ШИГ, GOS) и шкалу исходов тяжелой травмы — Severe Injury Outcomes Scale (ШИИТ, OISS) [16]: категория 1 — полное восстановление (способность вести прежний уровень жизни с прежним уровнем активности); категория 2 — хорошее восстановление (имеются последствия, не ограничивающие уровень социальной адаптации, но ограничивающие прежний уровень функциональной активности, требующие продолжения этапного или восстановительного лечения); категория 3 — умеренная инвалидизация (имеются последствия, не позволяющие восстановить прежний функциональный уровень, не нуждается в уходе посторонних); категория 4 — тяжелая инвалидизация (нуждается в постороннем уходе); категория 5 — смерть. Оценку по ШИИТ и ШИГ проводили при выписке пациента.

Критерии включения пациентов в исследование: пациенты с ТМТ (ISS \geq 16), проходившие лечение в отделении ОПИТ. Критерии исключения: наличие сопутствующих острых воспалительных и хронических заболеваний.

На первом этапе проводили анализ полученных результатов для контрольной группы и группы детей с ТМТ. На втором этапе — для двух групп больных, разделенных по ШИГ и ШИИТ: ТМТ с благоприятным исходом (ТМТбл, $n = 24$), ТМТ с неблагоприятным исходом (ТМТнебл, $n = 17$) (табл. 1). Благоприятным исходом при ТМТ считали по ШИГ 4–5 балла или ШИИТ 1–2 балла, неблагоприятным исходом по ШИГ 2–3 балла или по ШИИТ 3–4 балла. Отдельно была описана группа ТМТ с летальным исходом (ТМТли, $n = 2$) (табл. 1).

У пациентов оценивали количество Th17-лимфоцитов (Th17 — $CD3^+CD4^+CD161^+$), количество регуляторных Т-лимфоцитов (T_{reg} — $CD4^+CD127^{low}CD25^{high}$), а также определяли уровень экспрессии рецепторов пуринергического сигналинга на T_{reg} ($CD39^+T_{reg}$ — $CD4^+CD127^{low}CD25^{high}CD39^+$ и $CD73^+T_{reg}$ —

Таблица 1. Клиническая характеристика больных

Фактор		Исход ТМТ		
		ТМТбл	ТМТнебл	ТМТли
<i>n</i>		24	17	2
Пол, %	д	9 (37,5)	6 (35,3)	–
	м	15 (62,5)	11 (64,7)	2 (100,0)
Возраст (Me [IQR]), лет		12,5 [6,0–15,0]	13,0 [8,0–14,0]	7,5 [4,7–10,2]
Койко-дни ОАР (Me [IQR]), дни		9,00 [7,00–13,25]	16,00 [10,00–25,00]	6,00 [6,00–6,00]
Койко-дни общее кол-во (Me [IQR]), дни		23,00 [16,00–29,25]	53,00 [23,00–58,00]	6,00 [6,00–6,00]
ISS (Me [IQR])		26 (19–29)	27 (26–34)	25 и 35
ЧМТ, %		21 (87,5)	16 (94,1)	100
ШКГ (Me [IQR]), баллы		12 (8–12)	7 (4–13)	7 и 3
Кома, %		5 (20,8)	8 (47,0)	2 (100)
Сочетанная травма, %		21 (87,5)	16 (94,1)	2 (100)
Множественная травма, %		11 (45,8)	7 (41,1)	1 (50)
Кровопотеря, %		16 (66,6)	13 (76,4)	1 (50)
Нестабильная гемодинамика, %		8 (33,3)	12 (70,5)	2 (100)
Респираторная поддержка (ИВЛ), %		16 (66,6)	16 (94,1)	2 (100)
Полиорганная недостаточность, %		1 (4,1)	2 (11,7)	2 (100)

CD4⁺CD127^{low}CD25^{high}CD73⁺) и Th17-лимфоцитах (CD39⁺Th17 — CD3⁺CD4⁺CD161⁺CD39⁺ и CD39⁺Th17 — CD3⁺CD4⁺CD161⁺CD73⁺). Оценку количественных показателей субпопуляционного состава Т-лимфоцитов периферической крови выполняли с использованием двухплатформенной технологии. Для подсчета абсолютного числа лимфоцитов в работе использовали гематологический анализатор Sysmex XT-2000i (Sysmex Corporation; Япония). Пробоподготовка цитофлуориметрического анализа включала в себя инкубирование в течение 20 мин в темном месте 100 мкл цельной крови с 10 мкл моноклональных антител, меченных флуорохромами. Для лизирования эритроцитов

использовали лизирующий раствор BD FACS™ Lysing Solution (BD Biosciences; США), длительность инкубации с которым в темноте при комнатной температуре не превышала 10–12 мин. Запись полученного образца и анализ результатов выполняли на проточном цитофлуориметре Novocyte (ACEA Biosciences; США). Для определения субпопуляций лимфоцитов использовали следующие поверхностные маркеры: CD45, IgG1, IgG2a, CD3, CD4, CD25, CD127, CD161, CD39, CD73 (Beckman Coulter, США; BD Biosciences, США; SONY corp., Япония).

Обработку полученных данных проводили с помощью компьютерных программ MS Excel 2016 (Microsoft corp.; США), Statistica 10 (StatSoft, Inc.; США), IBM SPSS Statistics 25

Таблица 2. Субпопуляции CD4⁺-лимфоцитов, T_{рег} и Th17, экспрессирующие CD39 и CD73, а также интенсивность флуоресценции эктонуклеотида на T_{рег} и Th17 для контрольной группы и детей с ТМТ вне зависимости от исхода травматической болезни

Показатели	Контрольная группа	ТМТ (сутки, прошедшие с момента травмы)				
		1-е сутки	3-и сутки	5-е сутки	7-е сутки	14-е сутки
	<i>n</i> = 41	<i>n</i> = 18	<i>n</i> = 33	<i>n</i> = 16	<i>n</i> = 21	<i>n</i> = 24
T _{рег} , abs	72,2 [57,3–86,2]	34,9 [22–48]*	38,3 [24,2–54,4]*	36,5 [24–67,2] *	36,5 [24–67,2]*	61 [49,1–78,9]
Th17, abs	144,6 [97,7–150,6]	78,1 [54,7–97,2]*	87,2 [64,4–136,3]*	93,2 [75,3–145,9]	93,2 [75,3–145,9]	163,3 [118,4–232,9]
T _{рег} /Th17	0,6 [0,5–0,8]	0,4 [0,3–0,7]	0,4 [0,3–0,5]*	0,4 [0,3–0,5]*	0,4 [0,3–0,5]	0,4 [0,3–0,5]*
CD39 ⁺ , % T _{рег}	35,2 [29,1–39,4]	27,6 [17,3–43,1]	33,3 [15,4–53,2]*	36,4 [15,8–49,6]	36,4 [15,8–49,6]	43,4 [28–52]
CD39 ⁺ , abs T _{рега}	27 [18,3–31,7]	9,3 [5,9–13,1]*	10 [7–14,2]*	12,4 [6,7–18,8]*	12,4 [6,7–18,8] *	23,2 [10,9–38,7]
CD39 ⁺ , % Th17	9,6 [8,6–12,1]	9,8 [6,5–12,4]	7,7 [3,4–10,6]*	6,8 [5,3–10,7]*	6,8 [5,3–10,7]	7,3 [4–8,9] *
CD39 ⁺ , abs Th17	12,5 [10,9–14,7]	7,9 [3,5–9,2]*	6,0 [2,2–9,6]*	7,1 [4–10,5]*	7,1 [4–10,5]	11,3 [4,3–18,5]
CD73 ⁺ , % T _{рег}	8,9 [7,3–11,1]	6,5 [4,1–13,1]	6,9 [4,9–11,8]	11,2 [5,1–22,3]	11,2 [5,1–22,3]	6,7 [4,6–16,9]
CD73 ⁺ , abs T _{рега}	8 [3–10]	2,7 [1,3–3,3]*	2,2 [1,6–4,7]*	5,2 [2,7–6,5]	5,2 [2,7–6,5]	4,3 [2,5–8]
CD73 ⁺ , % Th17	10,2 [7,3–14,4]	8,1 [6,1–13,7]	10,8 [7,4–19]	13,8 [10,6–16,5]	13,8 [10,6–16,5]	15* [9,2–19,8]
CD73 ⁺ , abs Th17	13,6 [8,4–17]	6,5 [3,3–9,2]*	10,3 [4,3–22,4]	14,7 [11,9–28,2]	14,7 [11,9–28,2]	26,7 [12,3–34,9]*
CD39/CD73 T _{рег}	3,4 [2,6–5,1]	3,9 [1,9–6,9]	4,5 [1,9–7,8]	2,8 [1,6–5,4]	2,8 [1,6–5,4]	4,6 [2,5–9,1]
CD39/CD73 Th17	1,1 [0,7–1,7]	1,4 [0,5–2,2]	0,7 [0,2–1,3]	0,5 [0,2–1,3]	0,5 [0,2–1,3]	0,5 [0,1–0,7]*
FL CD39 T _{рег}	7,9 [7–9,2]	8 [6,7–13]	8,4 [6,2–11,3]	8,1 [5,6–10]	8,1 [5,6–10]	9,4 [7,1–12]
FL CD39 Th17	7,2 [5,8–8,9]	6,6 [5,4–7,7]	7,8 [6,2–9,3]	7,2 [6,6–9,1]	7,2 [6,6–9,1]	7,8 [6,8–8,8]
FL CD73 T _{рег}	3,3 [2,7–3,7]	3,2 [2,7–4,1]	4,2 [3,2–6,2]*	3,3 [2,8–4,7]	3,3 [2,8–4,7]	4,4 [3,6–5,7]*
FL CD73 Th17	3,6 [3,3–4,7]	4 [3,2–6,1]	4,6 [3,2–5,7]	4,1 [3,9–6,8]	4,1 [3,9–6,8]	4 [3,3–6,4]

Примечание: Me [Q₂₅–Q₇₅%]; * — *p* < 0,05, *U*-критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони, группы сравнения (здоровые дети, ТМТ).

Таблица 3. Скорректированный уровень достоверности анализируемых параметров с учетом поправки Бонферрони для контрольной группы и детей с ТМТ вне зависимости от исхода травматической болезни

Параметр	U-критерий Манна-Уитни (контрольная группа/ТМТ)				
	1	3	5	7	14
Сутки с момента травмы					
Число наблюдений	18	33	16	21	24
T _{reg} ⁺ , abs	0,0000*	0,0000*	0,006*	0,03 *	0,605
Th17, abs	0,0000*	0,003*	0,215	1,407	0,232
T _{reg} /Th17	0,1035	0,005*	0,015*	0,3665	0,011*
CD39 ⁺ , % T _{reg}	0,509	4,1445	3,206	4,2395	0,3365
CD39 ⁺ , abs T _{reg}	0,0000*	0,0000*	0,002*	0,017*	1,9045
CD39 ⁺ , % Th17	4,13	0,0335*	0,0125*	1,9935	0,0015*
CD39 ⁺ , abs Th17	0,0005*	0,0000*	0,0165*	0,2125	1,091
CD73 ⁺ , % T _{reg}	2,2375	1,0035	2,6035	1,836	3,6035
CD73 ⁺ , abs T _{reg}	0,0015*	0,0000*	0,206	0,98	0,926
CD73 ⁺ , % Th17	1,6255	1,418	0,758	2,152	0,063
CD73 ⁺ , abs Th17	0,006*	2,032	1,1885	4,7335	0,0065*
CD39/CD73 T _{reg}	4,3845	4,1865	1,2375	1,4005	1,9915
CD39/CD73 Th17	4,462	0,1255	0,0885	1,2715	0,007*
FL CD39 T _{reg}	4,8375	4,8275	3,333	3,079	1,4725
FL CD39 Th17	1,936	1,105	2,7475	2,547	2,438
FL CD73 T _{reg}	2,5445	0,0245 *	3,462	0,1695	0,0005*
FL CD73 Th17	1,584	0,5755	0,223	2,6665	0,993

Примечание: Ме [Q₂₅-Q₇₅%]; * — $p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни, группы сравнения (контрольная группа, ТМТ).

(IBM corp.; США). Результаты представлены в виде медианы (Ме) и квартилей (Q₂₅-Q₇₅). Анализ различия признаков проводили при помощи U-критерия Манна-Уитни с корректировкой уровня достоверности с учетом поправки Бонферрони для множественных сравнений. Для оценки связи между признаками использовали корреляционный анализ с вычислением матрицы коэффициентов ранговых корреляций Спирмена R. Оценку значимости количественных показателей и выбор пороговых значений (cut-off point) выполняли по рабочей характеристической

кривой (ROC-кривой). Пороговые значения определяли исходя из требований максимальной чувствительности и специфичности. Критерием статистической достоверности получаемых выводов считали величину $p < 0,05$ (*).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ, проведенный в контрольной группе и у детей с ТМТ, выявил выраженное снижение абсолютного количества T_{reg} и Th17 в раннем посттравматическом периоде.

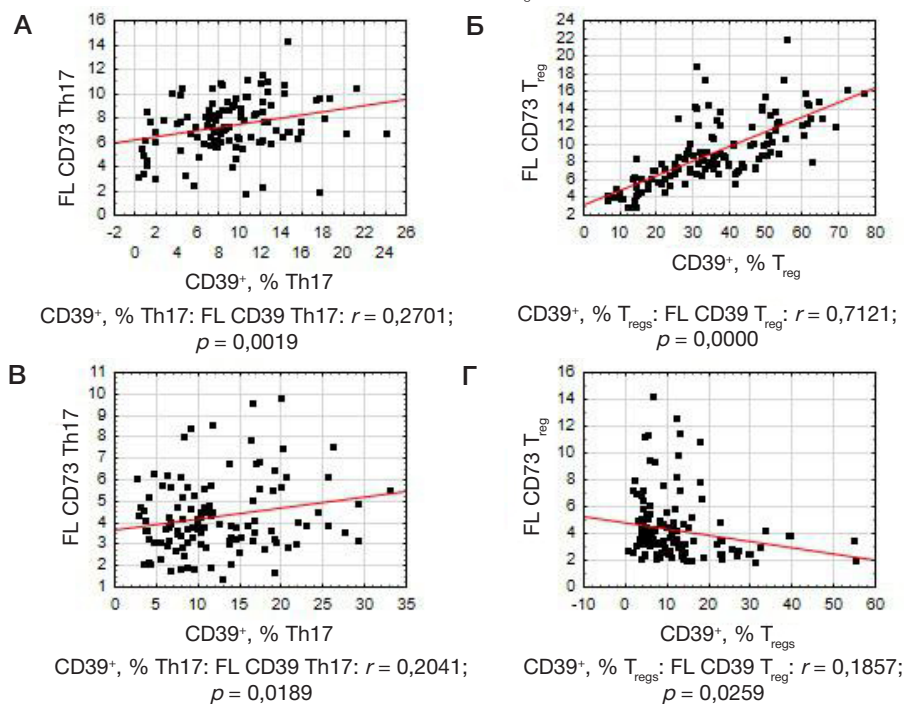


Рис. 1. Зависимость процентного содержания T_{reg} и Th17, экспрессирующих ферменты CD39 и CD73, от уровня флюоресценции (FL) CD39 и CD73. **А.** FL CD39 Th17: CD39⁺, Th17%. **Б.** FL CD39 T_{reg}: CD39⁺, T_{reg}%. **В.** FL CD73 Th17: CD73⁺, Th17%. **Г.** FL CD73 T_{reg}: CD73⁺, %T_{reg}

Таблица 4. Относительное количество T_{reg} и Th17, экспрессирующих ферменты CD39 и CD73, в периоде с первых по третьи сутки у детей с ТМТ

Показатель	ТМТнебл	ТМТбл	ТМТли	Уровень статистической значимости p , ТМТнебл и ТМТбл
Число наблюдений	19	28	3	
T_{reg} , % CD4	9,24 [8,12–10,84]	8,9 [8,48–11,4]	9,9 [8,84–10,5]	0,968
CD39, % T_{reg}	52,33 [43,7–62,2]*	21,7 [14,9–25,2]	9,52 [9,52–13,75]	0,000026
CD73, % T_{reg}	6,24 [3,2–8,8]	6,54 [4,0–9,2]	4,9 [3,53–7,2]	0,84
Th17, % CD4	30,76 [25,2–35,2]*	15,5 [12,2–17,8]	19,5 [17,91–28,5]	0,0008
CD39, % Th17	14,55 [8,9–19,1]*	6,72 [3,14–9,0]	0,92 [0,74–1,1]	0,012
CD73, % Th17	12,38 [7,7–19,21]	10,38 [4,15–15,77]	5,7 [4,7–6,7]	0,599

Примечание: Ме [Q_{25} – Q_{75} %]; U -критерий Манна-Уитни, группы сравнения: ТМТнебл, ТМТбл.

Значения данных показателей для больных с ТМТ значимо отличались от показателей контрольной группы (табл. 2, 3). При этом соотношение T_{reg} /Th17 с третьих по пятые сутки с момента травмы было снижено в сравнении с контрольной группой, за счет постепенного повышения уровня Th17 начиная с третьих суток (табл. 2, 3).

Динамика абсолютного количества T_{reg} и Th17, экспрессирующих ферменты CD39 и CD73, повторяла динамику малых субпопуляций CD4⁺-лимфоцитов в остром посттравматическом периоде, однако для T_{reg} изменения были более выражены (табл. 2, 3). Относительное количество CD39⁺ T_{reg} у детей с ТМТ изменялось от 6,3 до 76,6% и существенно превышало значение CD39⁺Th17 (диапазон изменчивости: 0,3–24,1%) (табл. 2). Для CD73 относительное количество было существенно выше на Th17 (диапазон изменчивости — 2,6–99,9%), чем на T_{reg} (диапазон изменчивости — 0,5–55,2%). Достоверных отличий от контрольной группы выявлено не было. Однако для части наблюдений значения существенно превышали максимальные уровни контрольной группы (табл. 2).

Анализ средней интенсивности флюоресценции (FL) эктонуклеотидаза на T_{reg} и Th17 выявил различия для CD73 на T_{reg} . Значения FL для CD73 для 3-х суток после травмы было повышенным по сравнению с контрольной группой (табл. 2, 3).

Корреляционный анализ позволил выявить зависимость процентного содержания T_{reg} и Th17, экспрессирующих CD39 и CD73, и уровня флюоресценции маркеров. Для Th17 процентное содержание клеток, экспрессирующих ферменты, незначительно увеличивается с повышением уровня флюоресценции CD39 ($r = 0,27$; $p = 0,002$) и CD73 ($r = 0,20$; $p = 0,018$) (рис. 1 А, В). Процентное содержание T_{reg} , экспрессирующих ферменты, увеличивается с повышением уровня флюоресценции: CD39 ($r = 0,71$; $p < 0,001$), а для CD73 незначительно снижается ($r = -0,18$; $p < 0,025$; рис. 1). Для CD39⁺ T_{reg} выявлена наиболее сильная прямая зависимость (рис. 1 Б).

При сравнительном анализе посттравматического периода в группах с ТМТбл и ТМТнебл показано существенное повышение относительного количества Th17 с первых по третьи сутки в группе с неблагоприятным течением, при этом по количеству T_{reg} группы не различались (табл. 4). Показатели экспрессии CD39 на T_{reg} и Th17-лимфоцитах значимо различались в группах ТМТбл и ТМТнебл и были существенно повышены у пациентов с неблагоприятным течением посттравматического периода (табл. 4, рис. 2). Для двух пациентов с летальным исходом сравнительный анализ не проводили по причине недостаточного числа наблюдений (число наблюдений — три), но для данной категории больных при сопоставимых

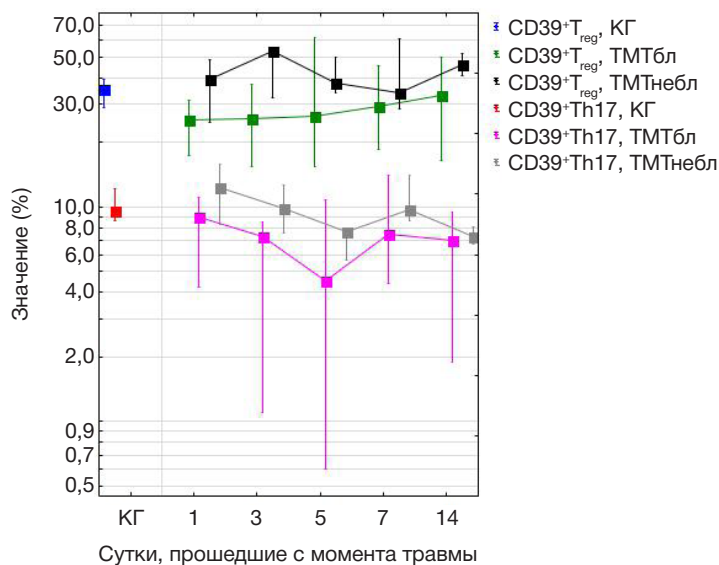


Рис. 2. Относительное количество Th17 и T_{reg} , экспрессирующих CD39 в группах ТМТбл, ТМТнебл и контрольной группе. Ме [Q_{25} – Q_{75} %]; группы сравнения: ТМТнебл, ТМТбл и контрольная группа (КГ)

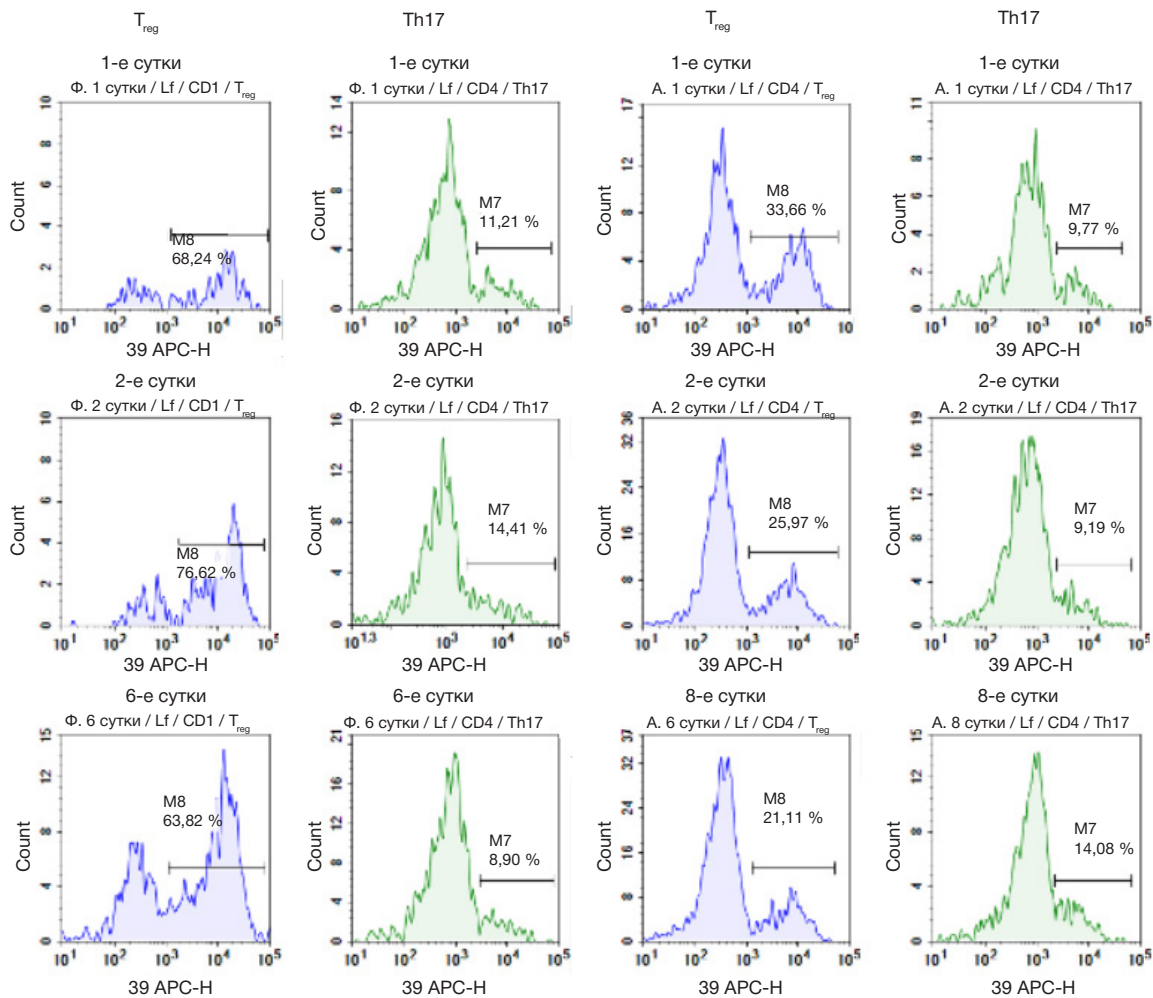


Рис. 3. Динамика относительного количества Th17 и T_{reg}, экспрессирующих CD39, в критическом периоде тяжелой травмы у детей с неблагоприятным (клинический пример 1) и благоприятным исходом травмы (клинический пример 2)

значениях относительного количества T_{reg} и Th17 были получены крайне низкие показатели экспрессии эктонуклеотидаз на T_{reg} и Th17 (табл. 4).

Приведенные ниже клинические примеры показывают динамику экспрессии CD39 на T_{reg} и Th17 у пациентов с неблагоприятным (клинический пример 1, рис. 3) и с благоприятным (клинический пример 2, рис. 3) исходом травмы.

Анализ параметров флуоресценции эктонуклеотидаз на T_{reg} и Th17 у детей с ТМТбл и ТМТнебл выявил достоверные различия для CD39 на T_{reg}. Для ТМТнебл отмечалось повышение флуоресценции CD39 на T_{reg} с 1 по 7 сутки после травмы (табл. 5). Для 2-х пациентов с летальным исходом значения параметров флуоресценции составили: FL CD39 T_{reg} — 3,95 (3,7–4,67), FL CD73 T_{reg} — 4 (2,55–4,55), FL CD39 Th17 — 6,77 (5–8,55), FL CD73 Th17 — 3,52 (3,1–3,95), значения FL CD39 T_{reg} оказались крайне низкими при сопоставлении с ТМТбл и ТМТнебл (табл. 5).

Для показателей, продемонстрировавших высокую прогностическую значимость при травматической болезни у детей, был проведен ROC-анализ для групп ТМТбл и ТМТнебл. Получено хорошее качество разделительной модели для CD39⁺ T_{reg} % (AUC = 0,741) и FL CD39 T_{reg} (AUC = 0,721). В результате для CD39⁺ T_{reg} cut-off составил 44,4% (чувствительность — 66,6 и специфичность — 84,7) и FL CD39 T_{reg} — 8,25 у.е. (чувствительность — 87,5 и специфичность — 62,5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В исследовании показано, что в результате травматического повреждения у детей с ТМТ развивается дисбаланс T_{reg}/Th17 в раннем посттравматическом периоде с незначительным смещением в сторону Th17 на фоне выраженного снижения абсолютного количества T_{reg} и Th17, что согласуется с данными других авторов [11–13, 17]. Среди T_{reg} и Th17 абсолютное число клеток, экспрессирующих CD39 и CD73, также пропорционально снижается в критическом периоде травматической болезни.

Анализ содержания клеток, экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73 в популяциях CD4⁺-лимфоцитов, у детей с ТМТ выявил наибольшую экспрессию CD39 в популяции T_{reg} до 76,6%, а CD73 — Th17 до 99,9%, в отличие от условно здоровых детей, для которых экспрессия CD39 в популяции T_{reg} колебалась от 19 до 49%, а экспрессия CD73 Th17 — от 7 до 35% [18].

В нашей работе мы обнаружили различия в экспрессии эктонуклеотидаз в раннем посттравматическом периоде ТМТ у детей в зависимости от исхода травматической болезни. Для детей с неблагоприятным исходом ТМТ отмечалось увеличение процентного содержания CD39 на T_{reg} и Th17, а также отмечалось повышение интенсивности флуоресценции CD39 на T_{reg} с первых по седьмые сутки после травмы в отличие от группы пациентов с благоприятным исходом. Это может быть связано с ролью эктонуклеотидаз, особенно

Таблица 5. Параметры флюоресценции (FL) пуринергического сигналинга CD39 и CD73 на T_{reg} и Th17 в критическом периоде ТМТ у детей

Показатели	ТМТбл, сутки с момента травмы					ТМТнебл, сутки с момента травмы				
	1	3	5	7	14	1	3	5	7	14
	n = 10	n = 18	n = 6	n = 14	n = 12	n = 6	n = 13	n = 8	n = 7	n = 12
FL CD39 T _{reg}	7,7 [5,1–9,3]*	7,3 [6,2–9] *	9,7 [5,6–14,8]	7,7 [5,6–9,9] *	7,5 [6,3–11,8]	10,7 [8,5–14]	10,8 [8,8–12,4]	8,5 [7,9–8,8]	12,9 [9,4–14,1]	10,3 [8,3–12]
FL CD39 Th17	6,5 [5,4–7]	7,3 [5,7–8,4]	9,9 [6,1–10,6]	7,9 [6,4–8,2]	7,3 [6,1–8,8]	7,3 [6–8,7]	8,7 [7,1–9,8]	7 [6,8–7,9]	9,3 [5,3–10,3]	8,2 [7,1–9]
FL CD73 T _{reg}	3,2 [2,7–5,9]	3,8 [3–4,8]	3,2 [3,1–4,9]	3,9 [2,4–4,8]	4,6 [2,8–6]	3,2 [2,6–3,7]	5,1 [3,7–8,7]	3,4 [2,8–5,5]	4,7 [4,3–7,1]	4,4 [3,8–5,6]
FL CD73 Th17	3,7 [3,1–6,1]	4,2 [3,7–4,8]	4,1 [3,9–5,1]	3,9 [3,1–5,7]	4,3 [3,3–7,4]	4,3 [4–6,9]	5,1 [3,3–8,4]	4,5 [3,9–7,9]	4,7 [3,3–5,9]	3,9 [3,2–5,3]

Примечание: Ме [Q₂₅–Q₇₅%]; p — скорректированный уровень значимости с учетом поправки Бонферрони; * — p < 0,05 уровень значимости, U-критерий Манна–Уитни, группы сравнения (ТМТбл и ТМТнебл на первые, третьи, пятые, седьмые, 14-е сутки после травмы).

CD39, в усилении гидролиза eATФ и накопления в очаге повреждения внеклеточного аденозина, что приводит к запуску через систему аденозиновых рецепторов A2R каскада реакций, приводящего к подавлению иммунного ответа для предотвращения массивного повреждения тканей [14]. Выявленная нами прямая корреляционная связь между уровнем флюоресценции CD39 и процентным содержанием CD39⁺T_{reg} указывает на то, что в ответ на повреждение увеличивается доля T_{reg}⁺ высокоэкспрессирующих эктонуклеотидазу CD39. В более ранних работах на взрослых здоровых донорах было показано, что клетки с большим количеством CD39 на T_{reg} более эффективно гидролизуют АТФ [8]. Для эктонуклеотидазы CD73 связи процентного содержания с интенсивностью флюоресценции выявлено не было, вероятно, из-за того, что CD73 присутствует как на мембране клеток, так и в растворимой форме [19]. Для

пациентов с летальным исходом были обнаружены крайне низкие значения экспрессии эктонуклеотидаз, что может свидетельствовать о развитии декомпенсации функций иммунной системы при крайне тяжелых повреждениях.

Выводы

Полученные результаты показывают, что экспрессия CD39 и CD73 в популяциях T_{reg} и Th17 в значительной степени связана с тяжестью повреждения и может быть использована для прогноза исхода травматической болезни у детей. Более глубокое понимание роли пуринергического сигналинга в патогенезе травматической болезни позволяет задуматься о терапевтическом потенциале биопрепаратов на основе растворимых форм эктонуклеотидаз для воздействия на иммунную систему при таких критических состояниях, как тяжелое травматическое повреждение [20].

Литература

1. Тимофеев В. В., Бондаренко А. В. Эпидемиологические аспекты политравмы у детей в крупном городе. Политравма. 2012; (4): 5–8.
2. Бондаренко А. В. Организация специализированной помощи при политравме в крупном городе. Вестник травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова. 2005; (4): 81–84.
3. Cauwels A, Rogge E, Vandendriessche B, Shiva S, Brouckaert P. Extracellular ATP drives systemic inflammation, tissue damage and mortality. Cell Death Dis. 2014; 5 (3): e1102.
4. Moro N, Ghavim SS, Sutton RL. Massive efflux of adenosine triphosphate into the extracellular space immediately after experimental traumatic brain injury. Exp Ther Med. 2021; 21 (6): 575.
5. Faroqi AH, Lim MJ, Kee EC, Lee JH, Burgess JD, Chen R, Di Virgilio F, Delenclos M, McLean PJ. In Vivo Detection of Extracellular Adenosine Triphosphate in a Mouse Model of Traumatic Brain Injury. J Neurotrauma. 2021; 38 (5): 655–64.
6. Головкин А. С., Серебрякова М. К., Жидулева Е. В., Муртазалиева П. М., Титов В. А. Экспрессия рецепторов пуринергического сигналинга на Т-лимфоцитах периферической крови здоровых доноров. Трансляционная медицина. 2017; 4 (5): 46–60.
7. Takenaka MC, Robson S, Quintana FJ. Regulation of the T Cell Response by CD39. Trends Immunol. 2016; 37 (7): 427–39.
8. Timperi E, Barnaba V. CD39 Regulation and Functions in T Cells. Int J Mol Sci. 2021; 22 (15): 8068.
9. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺Treg cells: Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. Blood. 2007; 110 (4): 1225–32.
10. Zhang C, Li L, Feng K, Fan D, Xue W, Lu J: 'Repair' Treg Cells in Tissue Injury. Cell Physiol Biochem. 2017; 43: 2155–69.
11. Sturm R, Xanthopoulos L, Heftrig D, Oppermann E, Vrdoljak T, Dunay IR, et al. Regulatory T Cells Modulate CD4 Proliferation after Severe Trauma via IL10. J Clin Med. 2020; 9 (4): 1052.
12. Zhang Y, Li XF, Wu W, Chen Y. Dynamic changes of circulating T-helper cell subsets following severe thoracic trauma. Int J Clin Exp Med. 2015; 8 (11): 21106–13.
13. Hein F, Massin F, Cravoisy-Popovic A, Barraud D, Levy B, Bollaert PE, et al. The relationship between CD4⁺CD25⁺CD127[−]regulatory T cells and inflammatory response and outcome during shock states. Crit Care. 2010; 14 (1): R19.
14. Han L, Sugiyama H, Zhang Q, Yan K, Fang X, McCormick TS, et al. Phenotypical analysis of ectoenzymes CD39/CD73 and adenosine receptor 2A in CD4⁺ CD25^{high} Foxp3⁺ regulatory T-cells in psoriasis. Australas J Dermatol. 2018; 59 (1): e31–e38.
15. Holmes JF, Palchak MJ, MacFarlane T, Kuppermann N. Performance of the pediatric Glasgow coma scale in children with blunt head trauma. Acad Emerg Med. 2005; 12: 814.
16. Karaseva O, Roshal L. Pediatric Trauma in Earthquakes: General Principles of Care in Pediatric Trauma During Earthquakes. In: Wolfson N, Lerner A, Roshal L, eds. Orthopedics in Disasters: Orthopedic Injuries in Natural Disasters and Mass Casualty Events. Berlin Heidelberg: Springer, 2016.
17. Zhou X, Yao J, Lin J, Liu J, Dong L, Duan M. Th17/Regulatory T-Cell Imbalance and Acute Kidney Injury in Patients with Sepsis. J Clin Med. 2022; 11 (14): 4027.
18. Радьгина Т. В., Купцова Д. Г., Петричук С. В., Семикина Е. Л., Фисенко А. П. Экспрессия эктонуклеотидаз CD39 и CD73 в популяциях CD4⁺ лимфоцитов у условно здоровых детей. Российский иммунологический журнал. 2022; 25 (3): 283–90.

19. Vaara ST, Hollmén M, Korhonen AM, Maksimow M, Ala-Kokko T, Salmi M, et al. FINNAKI Study Group. Soluble CD73 in Critically Ill Septic Patients — Data from the Prospective FINNAKI Study. *PLoS One*. 2016; 11 (10): e0164420.
20. Zhai X, Chen K, Yang H, Li B, Zhou T, Wang H, et al. Extracellular vesicles derived from CD73 modified human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate inflammation after spinal cord injury. *J Nanobiotechnology*. 2021; 19 (1): 274.

References

1. Timofeev VV, Bondarenko AV. Epidemiological aspects of polytrauma in children in major city. *Polytrauma*. 2012; (4): 5–8. Russian.
2. Bondarenko AV The organization of specialized care for polytrauma in a large city. *N.N. Priorov Journal of Traumatology and Orthopedics*. 2005; (4): 81–84. Russian.
3. Cauwels A, Rogge E, Vandendriessche B, Shiva S, Brouckaert P. Extracellular ATP drives systemic inflammation, tissue damage and mortality. *Cell Death Dis*. 2014; 5 (3): e1102.
4. Moro N, Ghavim SS, Sutton RL. Massive efflux of adenosine triphosphate into the extracellular space immediately after experimental traumatic brain injury. *Exp Ther Med*. 2021; 21 (6): 575.
5. Farooqi AH, Lim MJ, Kee EC, Lee JH, Burgess JD, Chen R, Di Virgilio F, Delenclos M, McLean PJ. In Vivo Detection of Extracellular Adenosine Triphosphate in a Mouse Model of Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*. 2021; 38 (5): 655–64.
6. Golovkin AS, Serebryakova MK, Zhiduleva EV, Murtazaliev PM, Titov VA, Irtuga OB, Moiseeva OM, Krobinec II, Kudryavtsev IV. Purinergic signaling receptors expression on peripheral T-lymphocytes of healthy donors. *Translational Medicine*. 2017; 4 (5): 46–60. Russian.
7. Takenaka MC, Robson S, Quintana FJ. Regulation of the T Cell Response by CD39. *Trends Immunol*. 2016; 37 (7): 427–39.
8. Timperi E, Barnaba V. CD39 Regulation and Functions in T Cells. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 (15): 8068.
9. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+Treg cells: Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 2007; 110 (4): 1225–32.
10. Zhang C, Li L, Feng K, Fan D, Xue W, Lu J: 'Repair' Treg Cells in Tissue Injury. *Cell Physiol Biochem*. 2017; 43: 2155–69.
11. Sturm R, Xanthopoulos L, Heftrig D, Oppermann E, Vrdoljak T, Dunay IR, et al. Regulatory T Cells Modulate CD4 Proliferation after Severe Trauma via IL10. *J Clin Med*. 2020; 9 (4): 1052.
12. Zhang Y, Li XF, Wu W, Chen Y. Dynamic changes of circulating T-helper cell subsets following severe thoracic trauma. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8 (11): 21106–13.
13. Hein F, Massin F, Cravoisy-Popovic A, Barraud D, Levy B, Bollaert PE, et al. The relationship between CD4+CD25+CD127-regulatory T cells and inflammatory response and outcome during shock states. *Crit Care*. 2010; 14 (1): R19.
14. Han L, Sugiyama H, Zhang Q, Yan K, Fang X, McCormick TS, et al. Phenotypical analysis of ectoenzymes CD39/CD73 and adenosine receptor 2A in CD4+ CD25high Foxp3+ regulatory T-cells in psoriasis. *Australas J Dermatol*. 2018; 59 (1): e31–e38.
15. Holmes JF, Palchak MJ, MacFarlane T, Kuppermann N. Performance of the pediatric Glasgow coma scale in children with blunt head trauma. *Acad Emerg Med*. 2005; 12: 814.
16. Karaseva O, Roshal L. Pediatric Trauma in Earthquakes: General Principles of Care in Pediatric Trauma During Earthquakes. In: Wolfson N, Lerner A, Roshal L, eds. *Orthopedics in Disasters: Orthopedic Injuries in Natural Disasters and Mass Casualty Events*. Berlin Heidelberg: Springer, 2016.
17. Zhou X, Yao J, Lin J, Liu J, Dong L, Duan M. Th17/Regulatory T-Cell Imbalance and Acute Kidney Injury in Patients with Sepsis. *J Clin Med*. 2022; 11 (14): 4027.
18. Radygina TV, Kuptsova DG, Petrichuk SV, et al. Expression of CD39 and CD73 ectonucleotidases in CD4+ lymphocyte populations in healthy children. *Russian Journal of Immunology*. 2022; 25 (3): 283–290. Russian.
19. Vaara ST, Hollmén M, Korhonen AM, Maksimow M, Ala-Kokko T, Salmi M, et al. FINNAKI Study Group. Soluble CD73 in Critically Ill Septic Patients — Data from the Prospective FINNAKI Study. *PLoS One*. 2016; 11 (10): e0164420.
20. Zhai X, Chen K, Yang H, Li B, Zhou T, Wang H, et al. Extracellular vesicles derived from CD73 modified human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate inflammation after spinal cord injury. *J Nanobiotechnology*. 2021; 19 (1): 274.

ПОЛУЧЕНИЕ ХРЯЩЕПОДОБНЫХ СТРУКТУР ИЗ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК С ИНДУЦИРОВАННОЙ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТЬЮ

А. В. Еремеев^{1,3} ✉, А. С. Пикина^{1,2}, Е. С. Ручко^{1,3}, В. С. Сидоров¹, А. О. Рагозин¹

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Институт биологии развития имени Н. К. Кольцова, Москва, Россия

Одним из подходов для решения проблемы восстановления хрящевой ткани является использование клеточных технологий с применением ИПСК, обладающих большим потенциалом к дифференцировке и являющихся неограниченным источником клеточного материала для тканевой инженерии. Однако стандартизированных протоколов хондрогенной дифференцировки ИПСК нет. Целью работы было получить хрящеподобные образцы ткани с помощью метода 3D-культивирования сфероидов с использованием четырех протоколов хондрогенной дифференцировки, сравнить характеристики хрящеподобных образцов, полученных с помощью разных протоколов, и определить наиболее эффективный способ дифференцировки. ИПСК дифференцировали по хондрогенному пути с помощью четырех протоколов («долгий», «короткий», «комбинированный», с кондиционированной средой от первичной культуры аутологичных хондроцитов) при различном сочетании факторов TGFβ1, BMP2, Chir 99021 и PK. Для получения сфероидов использовали планшеты с микролулками. Профили синтеза и экспрессии оценивали с помощью методов иммуноцитохимического окрашивания, ПЦР в реальном времени, а также гистологического окрашивания. Высокие показатели синтеза и экспрессии хондрогенных маркеров Sox9, агрекана, коллагена II типа наблюдали в сфероидах «долгого», «комбинированного» протоколов и протокола с кондиционированной средой. Хондрогенез наиболее эффективно проходит при использовании «комбинированного» протокола дифференцировки. Высокую эффективность показало также использование кондиционированной среды для индукции и поддержания хондрогенной дифференцировки.

Ключевые слова: тканевая инженерия, суставной хрящ, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), сфероиды, хондрогенез

Финансирование: работа выполнена при поддержке РФФИ #22-15-00250.

Благодарности: авторы благодарят член-корр. РАН М. А. Лагаркову за предоставление научной базы для проведения исследования.

Вклад авторов: А. В. Еремеев — дизайн эксперимента, общее руководство, написание статьи; А. С. Пикина — обзор литературы, сбор материала, участие в экспериментальной части работы, анализ полученных данных; Е. С. Ручко — участие в экспериментальной части работы; В. С. Сидоров, А. О. Рагозин — предоставление материала для эксперимента.

Соблюдение этических стандартов: работа выполнена с соблюдением принципов Хельсинкской декларации Всемирной медицинской организации (2000 г.) и последующих ее пересмотров.

✉ **Для корреспонденции:** Артём Валерьевич Еремеев
ул. Малая Пироговская, д. 1а, 119435, г. Москва, Россия; art-eremeev@yandex.ru

Статья получена: 12.10.2022 **Статья принята к печати:** 28.10.2022 **Опубликована онлайн:** 23.11.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.037

FABRICATION OF CARTILAGE TISSUE SUBSTITUTES FROM CELLS WITH INDUCED PLURIPOTENCY

Eremeev AV^{1,3} ✉, Pikina AS^{1,2}, Ruchko ES¹, Sidorov VS¹, Ragozin AO¹

¹ Federal State Budgetary Institution Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Koltzov Institute of Developmental Biology, Moscow, Russia

One of the approaches to cartilage tissue restoration problem relies on cellular technologies that use iPSCs, induced pluripotency stem cells that are an unlimited source of cellular material for tissue engineering with significant differentiation potential. However, there are no standardized protocols for chondrogenic differentiation of iPSCs. This study aimed to make cartilage tissue samples using 3D spheroid cultures and following four chondrogenic differentiation protocols, then compare characteristics of the cartilage samples made under different protocols and isolate the most effective way of differentiation. The iPSCs were differentiated chondrogenically, the four protocols were "long", "short", "combined" and with conditioned medium from a primary culture of autologous chondrocytes; the combinations of TGFβ1, BMP2, Chir 99021, and PK factors varied. Microwell plates were used to make spheroids. Immunocytochemical staining, real-time PCR and histological staining enabled assessment of the synthesis and expression profiles. High rates of synthesis and expression of chondrogenic markers Sox9, aggrecan, type II collagen were observed in spheroids experimented with under the "long", "combined" protocols and the conditioned medium protocol. The "combined" differentiation protocol made chondrogenesis most effective, and conditioned medium was highly efficient in inducing and supporting chondrogenic differentiation.

Keywords: tissue engineering, articular cartilage, induced pluripotency stem cells (iPSCs), spheroids, chondrogenesis

Funding: the study was supported with an allocation #22-15-00250 by the Russian Science Foundation.

Acknowledgments: the authors thank Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences M.A. Lagarkova for providing research facilities for the study

Author contribution: Eremeev AV — design of the experiment, general guidance, article authoring; Pikina AS — literature review, collection of the material, participation in the experimental part of the work, analysis of the resulting data; Ruchko ES — participation in the experimental part of the work; Sidorov VS, Ragozin AO — provision of material for the experiment.

Compliance with ethical standards: the study was performed in conformity with the principles of the Declaration of Helsinki (2000) and its subsequent revisions.

✉ **Correspondence should be addressed:** Artem V. Eremeev
Malaya Pirogovskaya, 1a, 119435, Moscow, Russia; art-eremeev@yandex.ru

Received: 12.10.2022 **Accepted:** 28.10.2022 **Published online:** 23.11.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.037

Ткань гиалинового хряща обладает достаточно низкой способностью к заживлению из-за особенностей своей организации. В связи с этим большая часть дефектов хряща, вызванных травмами, очаговыми поражениями или процессами дегенерации без должной терапии прогрессирует до таких заболеваний, как, например, артроз, что негативно влияет на качество жизни. Многообещающий подход для решения этой проблемы — применение клеточных технологий, позволяющих компенсировать потерю функционально активных клеток в зоне повреждения ткани и вызывающих эффективное заживление.

Такая клеточная терапия в клинике проводится уже более 10 лет компанией CO.DON (Германия), в которой лечение поврежденных суставных хрящей реализуется с использованием аутологичных хондроцитов, что позволяет получить фенотипически стабильный хрящ при заживлении [1–3]. Однако трансплантация аутологичных хондроцитов хоть и является доказанным успешным методом восстановления повреждений гиалинового хряща, но достаточно инвазивна: для получения донорского материала необходимо проведение биопсии [4, 5]. Кроме того, из-за ограниченного количества клеточного материала требуется длительное культивирование, при котором имеется риск потери клетками хондрогенных свойств и их дифференцировки в фибробласты, что может привести к фиброзу после трансплантации [4, 5]. В связи с этими недостатками выбор альтернативных клеточных ресурсов особенно актуален.

Одним из перспективных клеточных источников на данный момент являются индуцированные плюрипотентные

клетки (ИПСК). Благодаря таким свойствам, как плюрипотентность, широкий потенциал дифференцировки во все типы соматических клеток, включая хондроциты, а также неограниченная способность к самообновлению, ИПСК имеют сходство с эмбриональными стволовыми клетками (ЭСК), при этом их получение не связано с этическими проблемами [4, 6, 7]. В технологии получения ИПСК могут быть использованы любые соматические клетки организма [5, 8]. Хондроциты, дифференцированные из ИПСК, проявляют ювенильный фенотип, что выражается в высокой скорости пролиферации и усиленной выработке внеклеточного матрикса (ВКМ). Данная особенность способствует более эффективному заживлению суставных дефектов [4, 5]. Таким образом, ИПСК представляют собой перспективный источник клеток, позволяющий получить большое количество биоматериала для клеточных технологий. Однако, несмотря на большое число исследований, отсутствует стандартизированный протокол, обеспечивающий качественную дифференцировку по хондрогенному пути [9]. Активно используется метод направленной дифференцировки, что в грубом приближении воспроизводит события хондрогенеза [10]. При этом чаще применяют рекомбинантные белки, соответствующие основным хондроиндукторам в процессах развития, а также их различные комбинации (рис. 1).

Для дифференцировки по хондрогенному пути *in vitro* широко применяют белки надсемейства трансформирующего фактора роста — (TGFβ), такие как, собственно, TGFβ и семейство костных морфогенетических

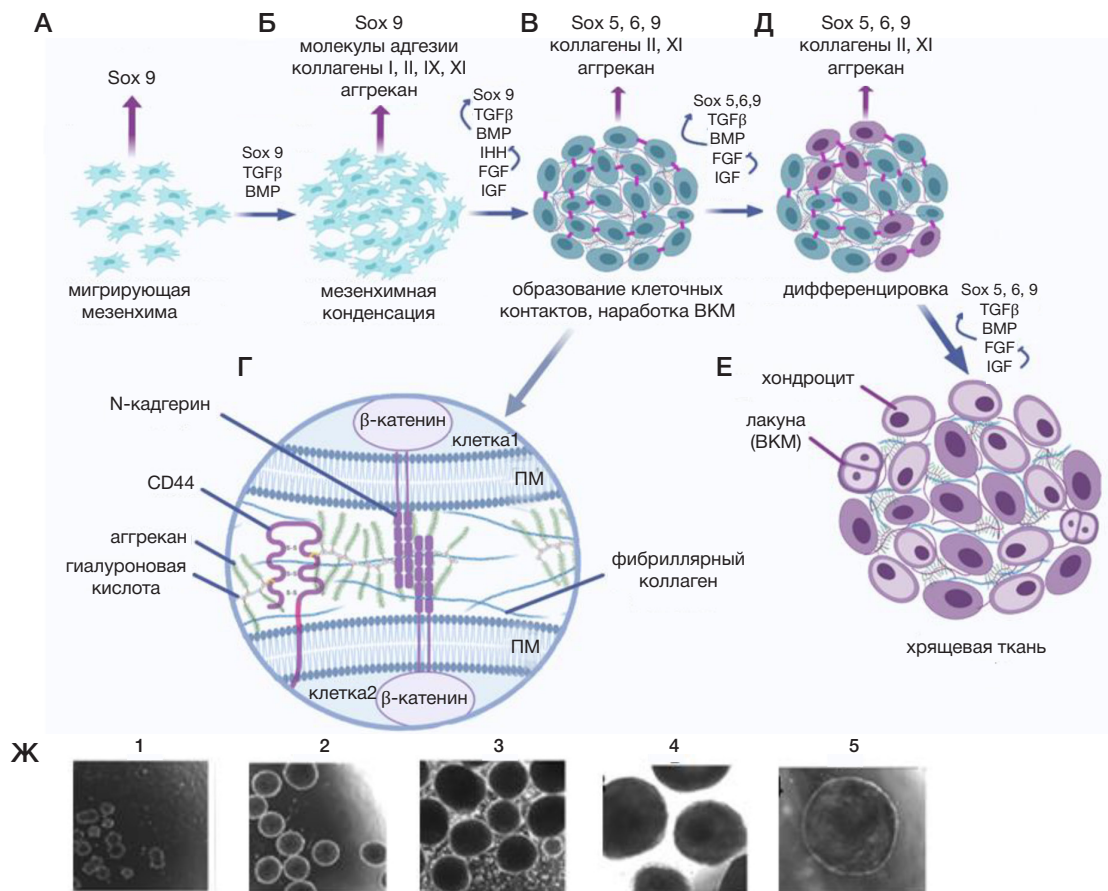


Рис. 1. Общая схема процессов хондрогенеза. **А.** Миграция мезенхимы. **Б.** Прехондрогенная мезенхимная конденсация. **В.** Образование клеточных контактов, синтез ВКМ. **Г.** Межклеточное пространство и микроокружение дифференцирующихся клеток. **Д.** Начало дифференцировки по хондрогенному пути. **Е.** Образование хрящевой ткани. **Ж.** Фотографии, полученные методом фазово-контрастной микроскопии 1-5 — внешний вид сфероидов через 1, 2, 3, 4 и 5 недель культивирования после перевода их в условия 3D-культивирования. Увеличение X100

белков (BMP2). В исследовании, где в качестве фактора дифференцировки использовали только TGFβ3, в культурах ИПСК наблюдали неполный хондрогенез [11]. Более качественные результаты были получены в работах с применением комбинации TGFβ1 и BMP2 [12]. Еще одним подходом к увеличению эффективности хондрогенеза *in vitro* является включение предварительного этапа дифференцировки в МСК-подобную популяцию клеток. Эту стратегию использовали в «классическом» протоколе [3] с предварительной индукцией мезенхимных предшественников с помощью Wnt3a и Активина А. Затем проводили хондрогенную индукцию с помощью TGFβ1 и BMP2, что позволило получить хрящеподобные структуры с высокой экспрессией хондрогенных маркеров и низким уровнем гипертрофии. Тот же протокол, но с увеличенным временем культивирования, тоже привел к результатам, демонстрирующим эффективный хондрогенез, а при подкожной пересадке полученных структур мыши образовывался хрящ ювенильного фенотипа с большим содержанием протеогликанов [4]. Ретиноевая кислота (РК) и ретиноиды необходимы для развития конечностей, поскольку отвечают за активацию Нох-генов, участвующих в определении области формирования зачатка [13]. Так, комбинация Chir 99021 (6-[[2-[[4-(2,4-дихлорфенил)-5-(5-метил-1Н-имидазол-2-yl)-2-пиримидинил]амино]этил]амино]-3-пиридинкарбонитрил — ингибитор киназы гликоген-синтазы-3 (GSK-3)) и РК *in vitro* способствовала направленной дифференцировке в хондроциты за короткие сроки [14]. К тому же низкомолекулярные соединения достаточно просты в использовании, эффективно доставляются в клетки и неиммуногенны [15].

Стандартный подход 2D-культивирования не соответствует естественному окружению клеток и значительно ограничивает дифференцировку [16]. Клетки в условиях как *in vivo*, так и *in vitro*, нуждаются в трехмерном окружении.

Одним из распространенных методов 3D-культивирования и дифференцировки клеток является получение сфероидов [17, 18]. Было продемонстрировано, что использование культур сфероидов значительно улучшает пролиферацию клеток с сохранением фенотипа и ключевых сигналов [16, 19]. К тому же данная методика 3D-культивирования имитирует процесс мезенхимной конденсации в раннем развитии хряща [20]. Способы получения сфероидов разнообразны и включают метод висячей капли [21, 22], центрифугирования суспензии клеток определенной плотности [23–25], самоагрегации в сфероиды в суспензионных культурах [2], с помощью планшетов с U-образными лунками или микролунками [26–28], а также с использованием биоматериалов [29, 30]. Готовые

конструкции эффективно культивировать в динамических условиях, например на орбитальном 3D-шейкере [8].

В этой работе образцы хрящеподобной ткани создавали методом 3D-культивирования сфероидов при использовании четырех различных протоколов, два из которых разработаны нашей лабораторией. Основной целью исследования было выявить и сравнить особенности полученных конструкций и определить наиболее эффективный способ дифференцировки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуры ИПСК

В работе использовали линию ИПСК FD4S, которая ранее была получена из фибробластов кожи человека с применением по методу, описанному в работе (41), с использованием неинтеграционного вектора вируса Сендай, несущего гены транскрипционных факторов OCT3/4, SOX2, KLF4 и C-MYC. Клетки были криоконсервированы при температуре –80 °С.

Культивирование проводили при 37 °С и 5% CO₂ в смеси ростовых сред без фидера mTeSR1 (STEMCELL Technologies; Канада) и Essential 8 (Thermo Fisher Scientific; США) в соотношении 1 : 3 с добавлением 40 мкг/мл антибиотика гентамицина («ПанЭко»; Россия). Смену среды проводили раз в сутки. При достижении клетками монослоя культуру пассировали в соотношении 1 : 3, для улучшения жизнеспособности клеток после данной процедуры использовали 10 мкМ ингибитора Rock-киназы Y27632 (StemMACS, Miltenyi Biotec; Германия).

Протоколы дифференцировки

Хондрогенную дифференцировку ИПСК проводили с тестированием четырех протоколов (табл. 1):

- «долгий» [3];
- «короткий» [14];
- «комбинированный»;
- с кондиционированной средой.

В качестве положительного контроля использовали культуры хондроцитов человека, а также фрагменты суставного хряща человека. В качестве отрицательного контроля — культуры ИПСК и 3D-структуры из них.

Монослойные культуры

Монослойные культуры ИПСК дифференцировали в течение 7 суток при использовании базовой среды Advanced DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific; США)

Таблица 1. Протоколы хондрогенной дифференцировки

Название протокола	Дифференцировка (35 суток)	
	В монослойной культуре (7 суток)	В 3D-культуре (28 суток)
«Долгий»	TGFβ1, BMP2, FBS 10%	
«Короткий»	Chir 99021, RA — 2 суток РК — 5 суток	Базовая среда с добавками
«Комбинированный»		TGFβ1, BMP2, FBS 10%
С кондиционированной средой		Кондиционированная среда из-под хондроцитов, GlutaMAX
Контрольные группы		
Положительный контроль	Базовая среда с добавками, FBS 15%	Базовая среда с добавками, FBS 10%
Отрицательный контроль	TeSR1, Essential8 (1 : 3)	Базовая среда без добавок

с добавлением 10 нг/мл bFGF (STEMCELL Technologies; Канада), 100× GlutaMAX (Gibco, Thermo Fisher Scientific; США), 50× B27 (Gibco, Thermo Fisher Scientific; США), 1% инсулин-трансферрин-селенита (ИТС) («ПанЭко»; Россия), 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты (Sigma Aldrich; США), 50 мкМ β-меркаптоэтанола, 5 мкг/мл плазмоцина, гентамицина («ПанЭко»; Россия) и 40 мкг/мл раствора гентамицина («ПанЭко»; Россия).

Для дифференцировки по «долгому» протоколу к базовой среде добавляли также 10 нг/мл TGFβ1 (Miltenyi Biotec; Германия), 10 нг/мл BMP2, 10% FBS. По «короткому», «комбинированному» протоколам и протоколу с кондиционированной средой — 10 мкМ Chir 99021 (Miltenyi Biotec; Германия) и 10 нМ PK (Sigma Aldrich; США) в течение двух суток, затем только 10 нМ PK.

Смену среды проводили раз в сутки. На третьи–четвертые сутки проводили пассирование культур 1 : 3 с использованием 0,25%-го раствора трипсина.

Полученную ранее культуру хондроцитов человека размораживали из криобанка ФНКЦ ФХМ. Для этого криовиалу нагревали на водяной бане до полного исчезновения льда, после чего клетки отмывали от криопротектора DMSO в 10 мл предварительно нагретой до +37 °С чистой среды Advanced DMEM, путем центрифугирования в 15 мл пробирке (Servicebio; Китай) при 1000 об./мин 5 мин. Осадок с хондроцитами разводили для последующего культивирования в среде Advanced DMEM с добавлением 15% FBS или 10% сыворотки человека. Смену среды проводили раз в 4 суток, при этом кондиционированную среду отбирали и фильтровали дважды через шприцевые фильтры размера пор 0,45 мкм, затем 0,22 мкм.

3D-культуры

Для получения сфероидов использовали планшет с микролунками AggreWell 800 (STEMCELL Technologies; Канада) и раствор Anti-Adherence Rinsing Solution (STEMCELL Technologies; Канада) по протоколу производителя [31]. С учетом количества клеток добавляли 1 или 2 мл среды с 10 мкМ Y27632, соответствующей протоколу хондрогенной дифференцировки в 3D-культурах, до концентрации 1–1,5 × 10⁶ кл/мл. На одну лунку планшета приходился 1 мл суспензии данной концентрации. Планшеты с равномерно распределенными в микролунках клетками инкубировали при 37 °С и 5% CO₂ 24 ч.

Для изготовления чашек Петри для культивирования сфероидов на 60 мм чашки Петри Ultra Low Attachment (Corning Inc.; США) наносили клей из хлороформа и пластика строго по центру в виде капли диаметром около 1 см. Затем чашки в открытом виде помещали под ультрафиолет на 6 ч. Перед использованием несколько раз ополаскивали поверхность раствором Версена [32].

Через 24 ч инкубирования в планшетах с микролунками сферические агрегаты клеток собирали осторожным пипетированием с помощью носиков с отрезанным кончиком для избежания повреждения сфероидов, а затем переносили в заготовленные чашки Петри со средой, соответствующей протоколу дифференцировки. Чашки со сфероидом помещали в динамические условия на орбитальный 3D-шейкер при 37 °С и 5% CO₂.

Для дифференцировки 3D-культур по «долгому», «короткому» и «комбинированному» протоколам, а также для культивирования сфероидов положительного контроля использовали базовую среду Advanced DMEM

с добавлением 10 нг/мл bFGF (STEMCELL Technologies; Канада), 100× GlutaMAX (Gibco, Thermo Fisher Scientific; США), 50× B27 (Gibco, Thermo Fisher Scientific; США), 1% инсулин-трансферрин-селенита (ИТС) («ПанЭко»; Россия), 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты (Sigma Aldrich; США), 50 мкМ β-меркаптоэтанола, 5 мкг/мл плазмоцина, гентамицина («ПанЭко»; Россия) и 10 мл/л 100×-раствора пенициллина/стрептомицина («ПанЭко»; Россия). В «долгом» и «комбинированном» протоколах к среде также добавляли 10 нг/мл TGFβ1 (Miltenyi Biotec; Германия), 10 нг/мл BMP2, 10% FBS. В протоколе с кондиционированной средой использовали кондиционированную среду от культуры суставных хондроцитов человека с добавлением 200× GlutaMAX. Для культивирования сфероидов положительного контроля к среде добавляли 10% FBS. Сфероиды отрицательного контроля культивировали в среде Advanced DMEM с добавлением антибиотиков и 200× GlutaMAX.

Дифференцировку сфероидов проводили в течение 28 суток. Смену среды осуществляли раз в 4 суток. Каждые 7 суток оценивали морфологию сфероидов с помощью микроскопа с фазовым контрастом Olympus IX53F (Olympus; Япония) и программного обеспечения для морфометрии CellSens Standart.

Иммунофлуоресцентный анализ

Для иммуноцитохимического окрашивания 3D-культур каждые 7 суток в течение культивирования сфероиды пересаживали в 48-луночные планшеты, дно лунок которых предварительно покрывали 0,1%-м раствором желатина. В течение 1–2 суток сфероиды прикреплялись и распластывались по поверхности.

Фиксированные 4%-м параформальдегидом (PFA) монослойные культуры и прикрепленные органоиды обрабатывали 0,1%-м Triton: для окрашивания на ядерный маркер — в течение 20 мин, на поверхностные и цитоплазматические — 10 мин. После пермеабилзации культуры обрабатывали блокирующим раствором на основе 0,01M PBS, содержащим 3% козьей сыворотки и 0,1% Tween в течение 30 мин.

Монослойные культуры, а также сфероиды на всех стадиях дифференцировки окрашивали первичными антителами к ядерному маркеру хондрогенеза Sox 9 (Rabbit, 1 : 400, Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, США), к маркеру протеогликанового хрящевого ВКМ агрекану (Mouse, 1 : 500, Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, США), маркеру фибриллярного ВКМ гиалинового хряща коллагену II типа (Rabbit, 1 : 200; Abcam, Великобритания) и маркеру волокнистого хряща коллагену I типа (Rabbit, 1 : 800, Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, США), а также поверхностному маркеру прехондрогенной мезенхимы CD105 (Human, 1 : 500; Sony, Япония). Окрашивали растворами первичных антител на основе блокирующего раствора в течение 1,5 ч при комнатной температуре или 12 ч при 4 °С.

Для окрашивания вторичными антителами использовали Alexa Fluor 488 (Goat, Anti-Mouse, 1 : 500), Alexa Fluor 555 (Goat, Anti-Rabbit, 1 : 500) и Alexa Fluor 546 (Goat, Anti-Human, 1 : 500) (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, США). Окрашивание проводили в течение 1 ч в темноте. Для окрашивания ядер использовали 100 нг/мл DAPI (Sigma Aldrich; США).

Анализ окрашенных препаратов проводили на флуоресцентном микроскопе Olympus IX53F с четырьмя фильтрами флуоресценции (Olympus; Япония), используя

программное обеспечение для морфометрии CellSens Standart.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени

Для лизиса клеток в монослойных культурах и сфероидах использовали буфер RLT (QIAGEN; Германия), к которому добавляли 10 мкл/мл β-меркаптоэтанола. Сфероиды по 3–5 штук, в зависимости от размера, а также монослойные культуры лизировали в 600 мкл RLT пипетированием.

Для выделения тотальной РНК использовали RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN; Германия) соответственно с прилагающейся инструкцией [33]. От геномной ДНК тотальную РНК очищали с помощью обработки раствором ДНКазы (СибЭнзим; Россия).

Для синтеза первой цепи кДНК с матрицы РНК использовали MMLV RT kit («Евроген»; Россия) в соответствии с инструкцией [34].

Для проведения ПЦР в реальном времени на одну лунку 96-луночного планшета (SIBio, Scientific Specialities; США) добавляли 5 мкл 5× qPCRmix-HS SYBR («Евроген»; Россия), 0,8 мкл 10 мкМ праймера (табл. 2), 18,2 мкл воды и 1 мкл кДНК матрицы. Реакцию проводили при использовании термоциклера для амплификации нуклеиновых кислот 1000 CFX Manager исполнения C10000 Touch (Bio-Rad; США) и программного обеспечения CFX Manager. Количество циклов — 39. В качестве зонда использовали SYBR («Евроген»; Россия). Для увеличения специфичности реакции использовали полимеразу с «горячим стартом» — HS Taq ДНК-полимеразу («Евроген»; Россия), а также подобрали оптимальную температуру отжига праймеров (60 °С). В качестве отрицательного контроля для оценивания специфичности реакции после получения результатов использовали кДНК, выделенную из ИПСК.

Анализ результатов проводили в программе Microsoft Excel по методу ΔΔCt. Показаны средние значения и доверительные интервалы. Для статистического анализа использовали *t*-критерий Уэлча, учитывающий, что у средних значений двух групп независимых выборок могут быть неодинаковые стандартные отклонения.

Гистологический анализ

Для изготовления парафиновых срезов последовательно проводили процедуры фиксации сфероидов и фрагментов хряща, гистологической проводки через ксилол и этанол концентраций 70, 80, 96 и 100%, а также заливки в жидкий парафин. Затем создавали серии парафиновых срезов толщиной 4 мкм. Криосрезы сфероидов толщиной

7 мкм изготавливали по описанному ранее протоколу [35]. Для создания гистологического блока в этом случае использовали заливочную смолу Shandon Cryotome FSE (Thermo Fisher Scientific; США). Срезы окрашивали гематоксилин-эозином, пикросириусом красным и сафранином О. После окрашивания срезы обезвоживали и заключали в полистирол.

Фотографии срезов получали с использованием микроскопа DM4000 B LED (Leica; Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дифференцировка в монослойных культурах

Недифференцированные культуры ИПСК представляли собой плотные колонии мелких клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, морфология колоний описана ранее [36]. На вторые сутки после начала дифференцировки путем воздействия Chir 99021 и РК или рекомбинантных факторов TGFβ1, BMP2 и 10% FBS клетки приняли округлую форму. При этом при дифференцировке по протоколам с Chir 99021 наблюдали усиление клеточной гибели, оцененной с помощью окраски раствором трипанового синего (возрастание метвых, включивших краситель, клеток достигало до 30–35% популяции). На 4-е сутки дифференцировки клетки приобрели полигональную и вытянутую форму. На 7-е сутки заметили отдельные популяции хондроцитоподобных клеток, которые имели округлую форму и крупное ядро. Также на 2–3-и сутки в культурах экспериментальных групп наблюдали почкующиеся скопления клеток, что было особенно выражено в культурах, дифференцированных по протоколу с Chir 99021.

При анализе результатов иммуноцитохимии наблюдали значительную флуоресценцию агрекана и коллагенов I и II типа в монослойных культурах протоколов как с применением рекомбинантных факторов TGF-1 и BMP2, так и Chir 99021 и РК (рис. 2). Однако синтез Sox9 оказался наиболее выраженным в культурах, дифференцированных с задействованием TGF-1 и BMP2 (рис. 2A1). Синтез мезодермального маркера CD105 был низким в экспериментальных и контрольных группах (рис. 2A4–D4), хотя небольшой сигнал наблюдали в культурах, дифференцированных Chir 99021 (рис. 2B4).

При анализе результатов ПЦР в реальном времени в образцах наблюдали показатели экспрессии хондрогенных маркеров, сопоставимые с таковыми в положительной контрольной группе. При использовании белковых факторов TGFβ1 и BMP2 показатели экспрессии SOX9 были выше, чем при использовании Chir 99021 и РК (рис. 3).

Таблица 2. Использованные в работе праймеры

Название гена	Последовательность 5'→3'	Длина продукта, п.н.
SOX9	F: GAAGTCGGTGAAGAACGGGC R: CACGTCGCGGAAGTCGATAG	283
ACAN	F: AGGAGTCCCTGACCTGGTTT R: CCTGACAGATCTGCCTCTCC	167
COL1A2	F: AGGGTGAGACAGGCGAACA R: CCGTTGAGTCCATCTTTGC	184
COL2A1	F: TGGACGCCATGAAGGTTTCT R: CCATTGATGGTTTCTCCAAACC	142
YWHAZ	F: ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA R: CCGCCAGGACAAACCAGTAT	94

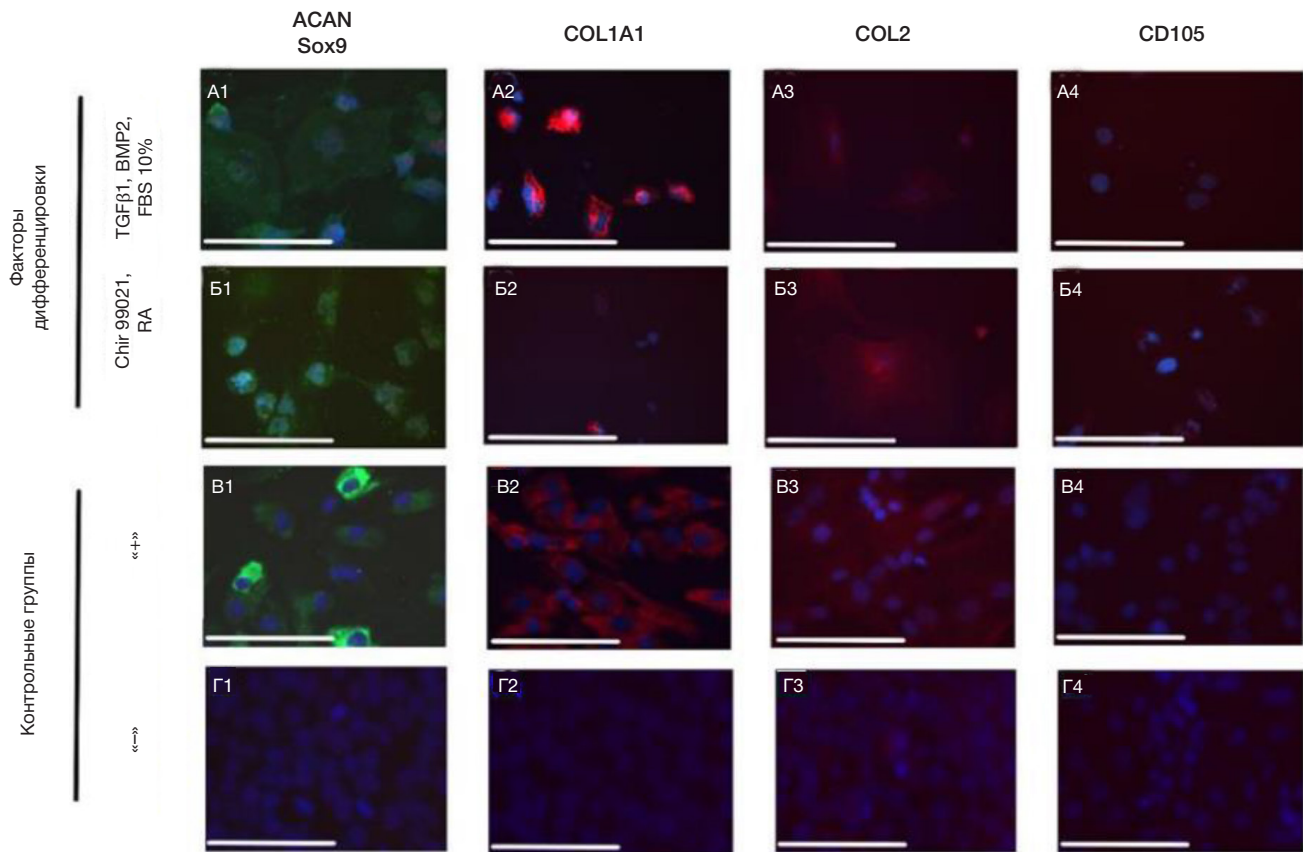


Рис. 2. Иммуноцитохимический анализ монослойных культур. **А.** Использование TGFβ1, BMP2 и 10% FBS. **Б.** Использование Chir99021 и РК. **В.** Культура «суставных» хондроцитов, положительный контроль. **Д.** Культура ИПСК FD4S, отрицательный контроль. 1 — агрекан (зеленый) и Sox9 (красный), 2 — коллаген I типа (красный), 3 — коллаген II типа (красный), 4 — CD105 (красный). Масштабный отрезок — 200 мкм

Дифференцировка в культурах сфероидов

Сразу после перемещения сформированных клеточных агрегатов в условиях 3D-культивирования они приобретали неправильную форму и неровную поверхность, но на 35-е сутки дифференцировки сфероиды всех протоколов и контрольных групп приобрели вид беловатых полупрозрачных конструкций с гладкой блестящей

поверхностью (рис. 1Ж). Этого не происходило в 3D-культурах протокола с кондиционированной средой.

В 3D-культурах сфероидов на 14-е и 21-е сутки дифференцировки наблюдали неинтенсивную флуоресценцию агрекана в конструкциях всех протоколов (рис. 4). Наибольшую интенсивность флуоресценции данного маркера фиксировали на 28-е и 35-е сутки в сфероидах «комбинированного» протокола (рис. 4B3, 4).

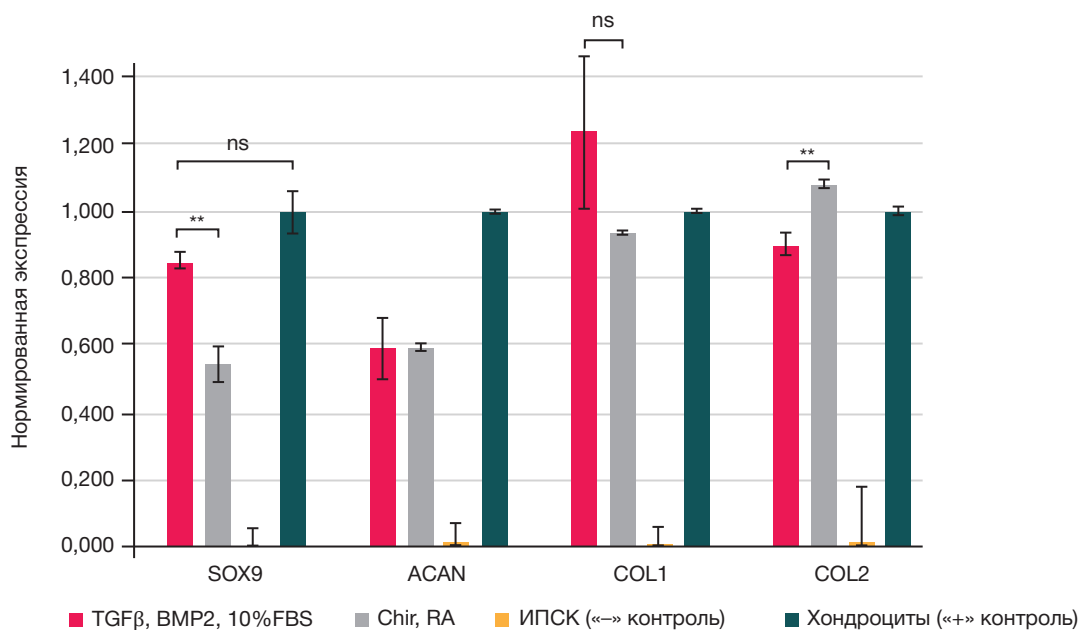


Рис. 3. Показатели экспрессии генов хондрогенных маркеров в монослойных культурах. «Усы» — стандартное отклонение. Достоверность различия между группами: ns — $p > 0,05$; * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$

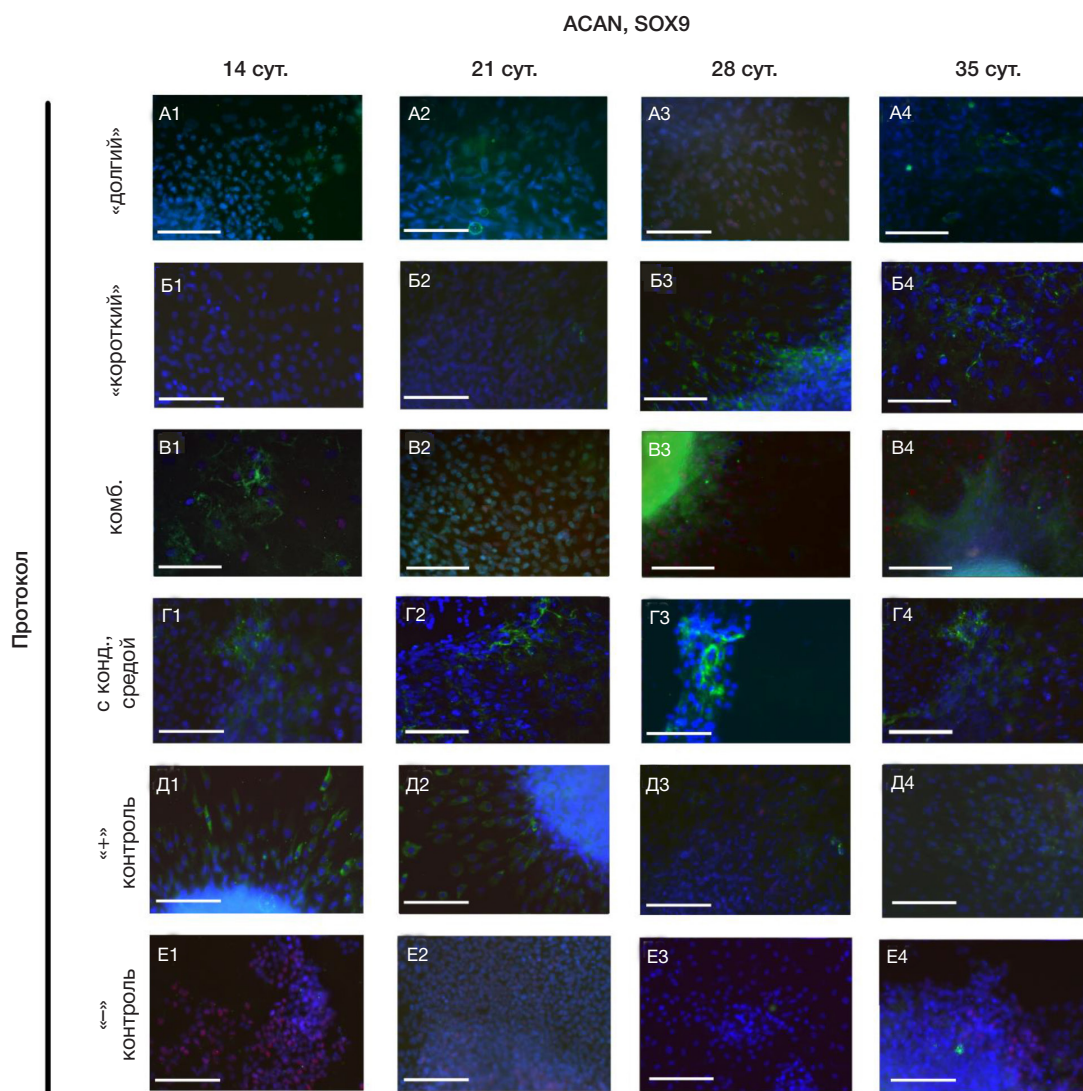


Рис. 4. Иммуноцитохимический анализ синтеза агрекана (зеленый) и Sox9 (красный) в 3D-культурах сфероидов разных протоколов. А–Г. Протоколы дифференцировки: «долгий» (А), «короткий» (Б), «комбинированный» (В), с кондиционированной средой (Г). Д. Сфероиды положительной контрольной группы. Е. Сфероиды отрицательной контрольной группы. Продолжительность дифференцировки: 1 — 14 суток, 2 — 21 сутки, 3 — 28 суток, 4 — 35 суток. Масштабный отрезок — 200 мкм

На 21-е и 28-е сутки наблюдали также высокий синтез агрекана в сфероиде протокола с кондиционированной средой (рис. 4Г1–3). Уровень экспрессии ACAN, сопоставимый с показателями в сфероиде положительной контрольной группы, наблюдали в образцах «долгого», «комбинированного» протоколов и протокола с кондиционированной средой. При этом на 28-е и 35-е сутки дифференцировки экспрессия ACAN значительно увеличилась в сфероиде «комбинированного» протокола и протокола с кондиционированной средой (рис. 5А).

Синтез Sox9 наблюдали в сфероиде «комбинированного» протокола на каждом временном этапе, при этом прослеживалось увеличение интенсивности флуоресценции этого маркера по мере дифференцировки (рис. 4В1–4). Интенсивные флуоресцентные сигналы Sox9 отмечали и на 28-е сутки в сфероиде «долгого» протокола и на 35-е сутки в сфероиде протокола с кондиционированной средой (рис. 4А3, Г4). В сфероиде группы отрицательного контроля тоже зафиксировали флуоресценцию данного маркера (рис. 4Е1–4). Проведенный ПЦР-анализ экспрессии SOX9 сравним с показателями в группе положительного контроля, что наблюдали в образцах «долгого» и «комбинированного» протоколов (рис. 5Б).

Высокую интенсивность флуоресценции коллагена I типа фиксировали во всех экспериментальных группах, но наибольшую — в сфероиде «долгого» и «комбинированного» протоколов. Экспрессия COL1A2 увеличивалась по мере дифференцировки в сфероиде, полученных по всем протоколам (рис. 6А). Наиболее высокие показатели наблюдали в образцах «долгого» и «комбинированного» протоколов.

В сфероиде «долгого», «комбинированного» протоколов и протокола с кондиционированной средой наблюдали высокую интенсивность флуоресценции коллагена II типа, при этом можно отметить, что она увеличивалась со временем. Выраженную экспрессию COL2A1 наблюдали в сфероиде всех протоколов дифференцировки (рис. 6Б). Максимальные показатели были отмечены в образцах «долгого» и «комбинированного» протоколов — они превышали экспрессию в положительной контрольной группе в несколько раз.

Синтез CD105 выявлен в начале культивирования в 3D-условиях, при этом флуоресценция данного маркера была хорошо выражена в сфероиде «долгого» и «комбинированного» протоколов, но к концу дифференцировки значительно снизилась.

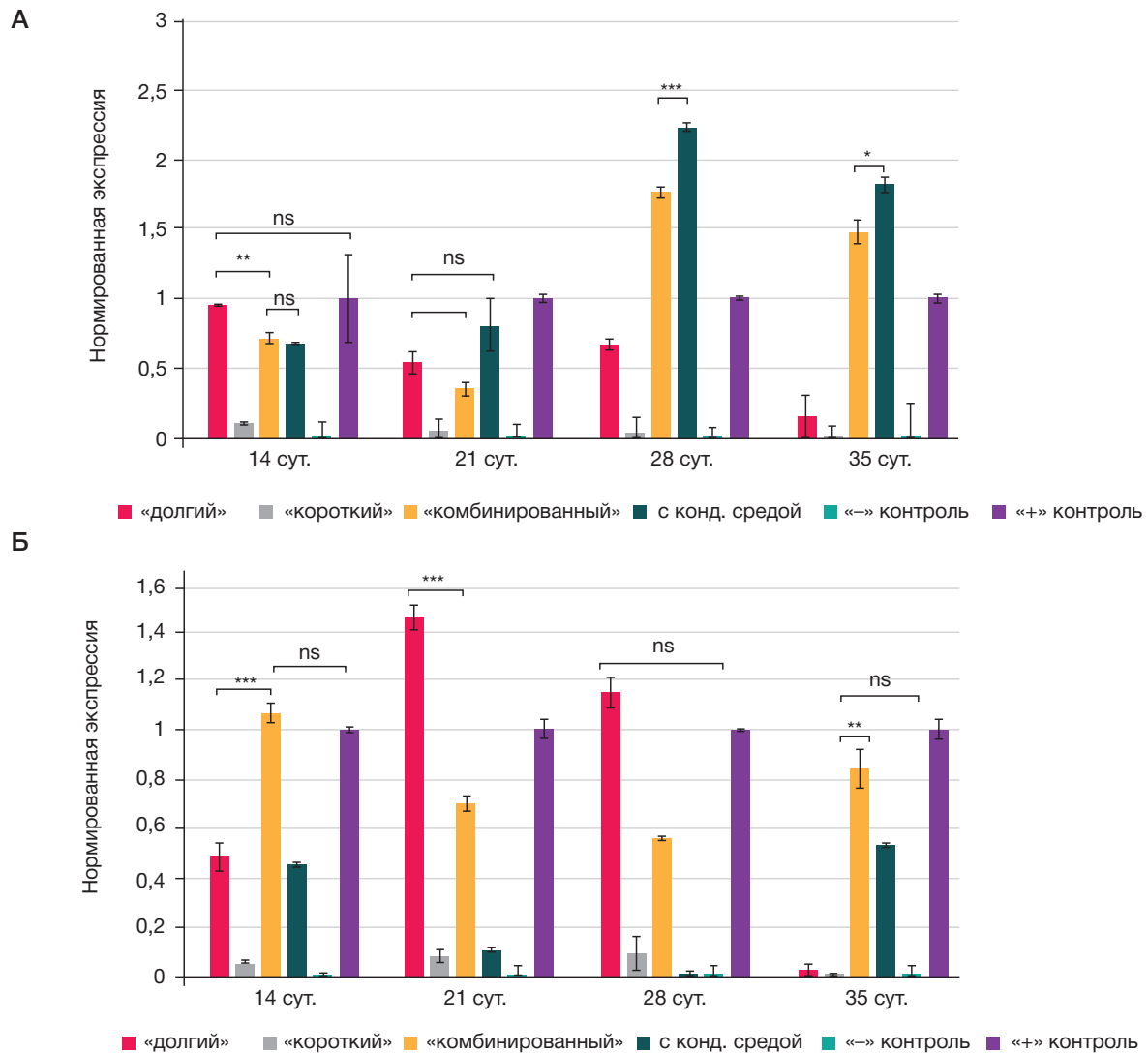


Рис. 5. А. Показатели экспрессии ACAN в 3D-культурах сфероидов различных протоколов. **Б.** Показатели экспрессии SOX9. По оси абсцисс — продолжительность дифференцировки, по оси ординат — величина нормированной экспрессии. «Усы» — стандартное отклонение. Достоверность различия между группами: ns — $p > 0,05$; * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$

При анализе результатов гистологического окрашивания пикросириусом красным сфероидов, полученных с помощью «долгого» и «комбинированного» протоколов, наблюдали ярко-розовые коллагеновые волокна по всей площади среза (рис. 7). Однако окрашивание сфероидов всех протоколов сафранином O было неинтенсивным (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При сравнении морфологических характеристик монослойных культур мы отметили, что дифференцировка ИПСК происходит при использовании как Chir 99021 и PK, так и TGF β , BMP2 и 10% FBS. Вытянутая полигональная форма клеток на 4-е сутки может говорить о приобретении клетками МСК-подобной морфологии при хондрогенной индукции. Усиленная клеточная гибель, которую мы наблюдали в культурах, дифференцированных с помощью Chir 99021 и PK, скорее всего, связана с действием Chir 99021, так как по данным прошлых экспериментов эта молекула усиливает апоптическую активность [14]. Самоагрегирование клеток с образованием гиалиноподобных структур характерно для ранних этапов хондрогенной дифференцировки, когда происходит активное образование и накопление молекул адгезии [10].

Положительное влияние экзогенного присутствия TGF β 1 и BMP2 на синтез и экспрессию Sox9 в монослойных культурах, скорее всего, связано с участием этих молекул в стимуляции и стабилизации выработки данного транскрипционного фактора [37]. Поскольку Chir имитирует сигналы, индуцирующие мезодерму, присутствие CD105 может быть объяснено соответствием культуры на данной стадии дифференцировки ранней прехондрогенной мезенхиме [1, 14]. Можно заключить, что использование как TGF β 1, BMP2 и 10% FBS, так и Chir 99021 и PK, приводит к достаточно эффективной дифференцировке в монослойных культурах.

Для получения сфероидов мы использовали планшеты с микролунками. Клетки в таких планшетах агрегируют под действием силы тяжести, образуя клеточные конгломераты, которые иногда могут иметь неправильную форму [27]. Хрящеподобные структуры, которые были получены другими исследователями с помощью культур сфероидов, в итоге имели вид полупрозрачных беловатых структур с гладкой поверхностью [3]. Мы наблюдали подобные характеристики у сфероидов всех протоколов на последних этапах культивирования, кроме протокола с кондиционированной средой. Это может быть связано с тем, что при использовании данного протокола темпы

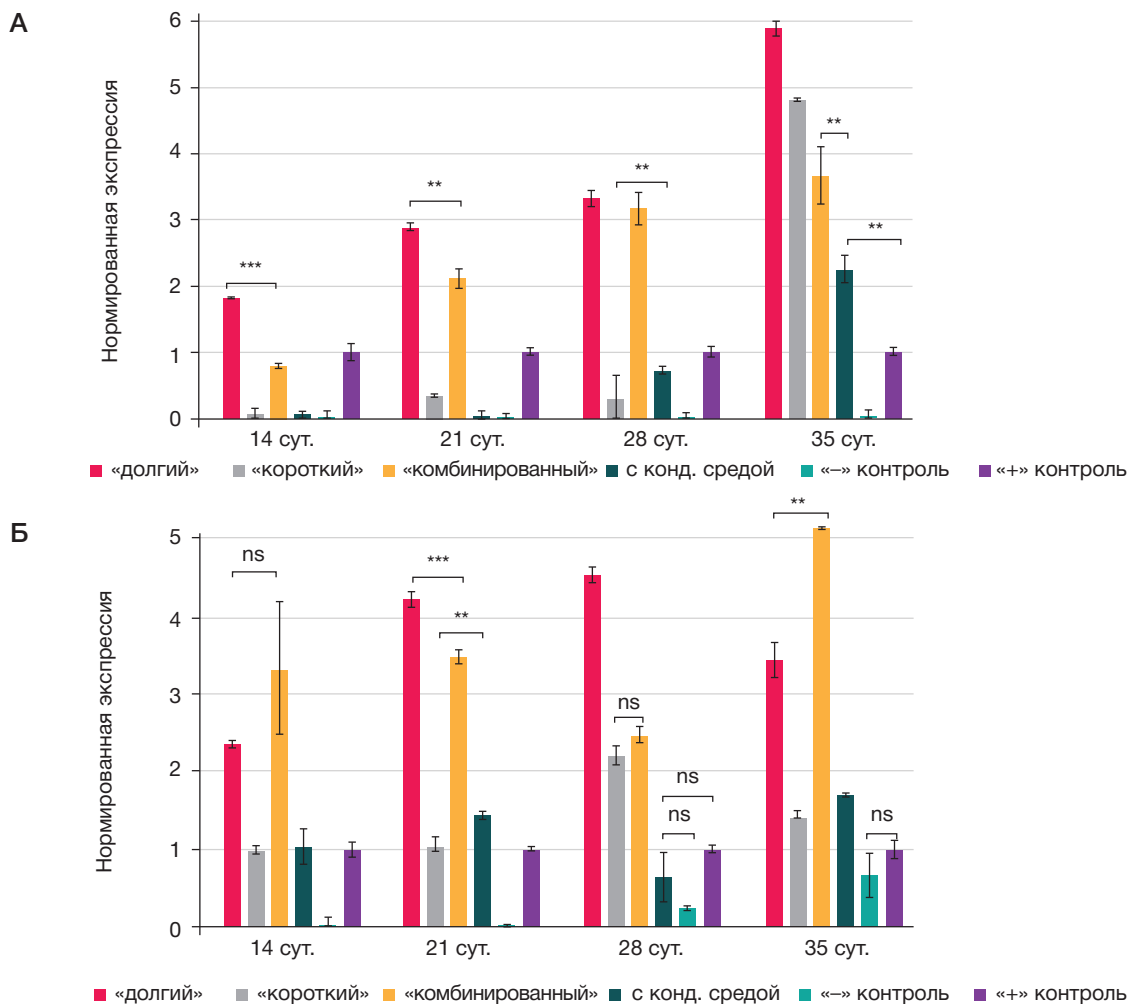


Рис. 6. А. Показатели экспрессии *COL1A2* в 3D-культурах сфероидов различных протоколов. **Б.** Показатели экспрессии *COL2A1*. По оси абсцисс — продолжительность дифференцировки, по оси ординат — величина нормированной экспрессии. «Усы» — стандартное отклонение. Достоверность различия между группами: ns — $p > 0,05$; * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$

компактизации более медленные, и клетки внешнего слоя не наработали достаточного количества молекул межклеточных контактов.

В нашем исследовании в протоколах с использованием TGFβ1 и BMP2 мы наблюдали достаточно высокие показатели экспрессии хондрогенных маркеров. Кроме того, мы имели дело с самопроизвольной

дифференцировкой ИПСК в сфероиде отрицательного контроля, так как отмечали флуоресцентные сигналы Sox9 и коллагена II типа, а также экспрессию *COL2A1*. Выработка хрящевого ВКМ — во многом механозависимый процесс, поэтому мы могли наблюдать синтез коллагена II типа в ответ на нахождение клеток в динамических условиях [38, 39].

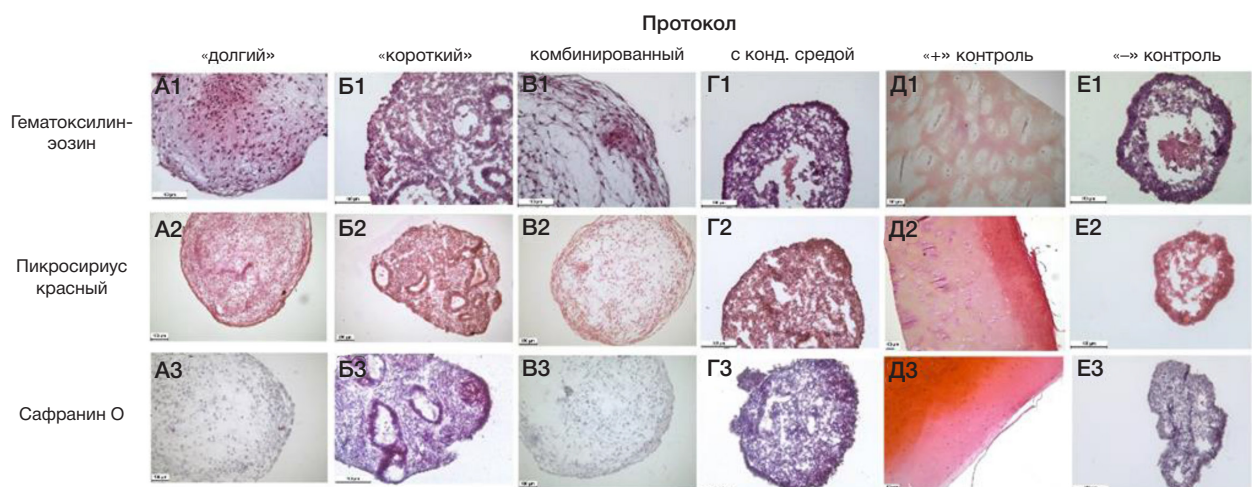


Рис. 7. Гистологический анализ 3D-культур сфероидов различных протоколов дифференцировки. Протоколы дифференцировки: «долгий» (А), «короткий» (Б), «комбинированный» (В), с кондиционированной средой (Г). Контрольные группы: положительный контроль (фрагменты суставного хряща) (Д), отрицательный контроль (Е). Тип гистологического окрашивания: 1 — гематоксилин-эозин, 2 — пикросириус красный, 3 — сафранин О

Синтез CD105 на 14-е и 21-е сутки в культурах сфероидов можно объяснить переходом от МСК-подобного фенотипа к хондроцитарному по мере дифференцировки клеточек в сфероидах. *In vivo* CD105 наряду с другими поверхностными маркерами, такими как CD34, CD44, CD45, служит одним из маркеров, характерных для прехондрогенных мезенхимных клеток [1, 18].

Повышенный синтез и экспрессия коллагена I типа в сфероидах всех протоколов говорят о том, что конечные хрящеподобные структуры обладают смешанным фенотипом, совмещающим гиалиновую и волокнистую ткани. Наиболее сильная экспрессия COL1A2 наблюдается в образцах сфероидов протоколов, в которых использовали 10% FBS. В некоторых исследованиях упоминается фибротический эффект сыворотки, связанный с усилением синтеза коллагена I типа, поэтому вероятно, что высокие показатели этого коллагена могут быть обусловлены ее присутствием в среде для дифференцировки [40, 41].

При гистологическом анализе мы не обнаружили значимого присутствия протеогликанового матрикса в препаратах, окрашенных сафранином O. В связи с этим можно предположить, что полученные структуры соответствуют хрящам на ранней стадии хондрогенеза. Возможно, для выработки большего количества протеогликанового матрикса, детектируемого сафранином O, возможно, необходимо более длительное время культивирования. Так, в предыдущих работах сфероиды в возрасте 28 суток культивирования слабо окрашивались сафранином O, в то время как в возрасте 42 суток окрашивались интенсивно [3].

ВЫВОДЫ

В ходе нашего исследования были получены образцы хрящеподобной ткани с использованием четырех

протоколов, сравнительный анализ которых показал, что хондрогенез наиболее эффективно протекает в культурах 3D-сфероидов, дифференцированных с использованием «комбинированного» протокола, в котором мы предлагаем применение Chir 99021 и PK для дифференцировки монослойных культур и TGFβ1, BMP2 и 10% FBS для дифференцировки культур сфероидов. Высокими показателями синтеза и экспрессии хондрогенных маркеров обладали также конструкции, полученные с помощью «долгого» протокола и протокола с использованием кондиционированной среды. Использование кондиционированной среды, полученной от первичной культуры хондроцитов донорской ткани после экспозиции с Chir 99021 и PK, повышает эффективность дифференцировки. По нашему мнению, использование кондиционированной среды снижает себестоимость технологии, но делает ее трудно стандартизированной из-за вариативности различных культур хондроцитов, полученных от разных доноров. Эту проблему можно решить при использовании культур ИПСК производных хондроцитов. Данный протокол нуждается в дальнейшей оптимизации, поскольку позволяет получить образцы, похожие на хрящ со смешанным фенотипом, сочетающим характеристики как гиалиновой, так и волокнистой хрящевой ткани, что соответствует незрелой ткани ранних стадий хондрогенеза. Тем не менее образцы хрящеподобной ткани, полученные с помощью изученных протоколов, можно эффективно использовать для моделирования процессов хондрогенеза в фундаментальных исследованиях. После оптимизации протоколов дифференцировки возможно использование получаемых хрящеподобных структур для получения прототипов клеточных продуктов для доклинической и, возможно, последующей клинической апробации.

Литература

- Diederichs S, Gabler J, Autenrieth J. Differential regulation of SOX9 protein during chondrogenesis of induced pluripotent stem cells versus mesenchymal stromal cells: a shortcoming for cartilage formation. *Stem Cells and Development*. 2016; (April): 1–34.
- Tsumaki N, Okada M, Yamashita A. iPSC cell technologies and cartilage regeneration. *Bone*. 2015; 70: 48–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2014.07.011>.
- Yamashita A, Morioka M, Yahara Y, Okada M, Kobayashi T, Kuriyama S, et al. Generation of scaffoldless hyaline cartilaginous tissue from human iPSCs. *Stem Cell Reports*. 2015; 4 (3): 404–18.
- Kimura T, Yamashita A, Ozono K, Tsumaki N. Limited Immunogenicity of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cartilages. *Tissue Engineering — Part A*. 2016; 22 (23–24): 1367–75.
- Lietman SA. Induced pluripotent stem cells in cartilage repair. *World Journal of Orthopedics*. 2016; 7 (3): 149–55.
- Narsinh KH, Plews J, Wu JC. Comparison of human induced pluripotent and embryonic stem cells: Fraternal or identical twins? *Molecular Therapy*. 2011; 19 (4): 635–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2011.41/nature06264>.
- Cheng B, Tu T, Shi X, Liu Y, Zhao Y, Zhao Y, et al. A novel construct with biomechanical flexibility for articular cartilage regeneration. *Stem Cell Research and Therapy*. 2019; 10 (1): 1–16.
- Limraksasin P, Kosaka Y, Zhang M, Horie N, Kondo T, Okawa H, et al. Shaking culture enhances chondrogenic differentiation of mouse induced pluripotent stem cell constructs. *Scientific Reports*. 2020; 10 (1): 1–15. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72038-y>.
- Suchorska WM, Augustyniak E, Richter M, Trzeciak T. Comparison of Four Protocols to Generate Chondrocyte-Like Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells (hiPSCs). *Stem Cell Reviews and Reports*. 2017; 13 (2): 299–308.
- Castro-Viñuelas R, Sanjurjo-Rodríguez C, Piñeiro-Ramil M, Hermida-Gómez T, Fuentes-Boquete IM, de Toro-Santos FJ, et al. Induced pluripotent stem cells for cartilage repair: Current status and future perspectives. *European Cells and Materials*. 2018; 36 (2006): 96–109.
- Qu C, Puttonen KA, Lindeberg H, Ruponen M, Hovatta O, Koistinaho J, et al. Chondrogenic differentiation of human pluripotent stem cells in chondrocyte co-culture. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2013; 45 (8): 1802–12.
- Chijimatsu R, Ikeya M, Yasui Y, Ikeda Y, Ebina K, Moriguchi Y, et al. Characterization of Mesenchymal Stem Cell-Like Cells Derived from Human iPSCs via Neural Crest Development and Their Application for Osteochondral Repair. *Stem Cells International*. 2017: 1–18.
- Karen Niederreither JV, Vermot J, Schuhbauer B, Chambon P, Dollé P. Embryonic retinoic acid synthesis is required for forelimb growth and anteroposterior patterning in the mouse. *Development*. 2002; 129 (15): 3563–74.
- Kawata M, Mori D, Kanke K, Hojo H, Ohba S, Chung U il, et al. Simple and Robust Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells toward Chondrocytes by Two Small-Molecule Compounds. *Stem Cell Reports*. 2019; 13 (3): 530–44.
- Kreuser U, Buchert J, Haase A, Richter W, Diederichs S. Initial WNT/β-Catenin Activation Enhanced Mesoderm Commitment, Extracellular Matrix Expression, Cell Aggregation and Cartilage Tissue Yield From Induced Pluripotent Stem Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020; 8: 581331. DOI: 10.3389/fcell.2020.581331.

16. Lee NH, Bayaraa O, Zechu Z, Kim HS. Biomaterials-assisted spheroid engineering for regenerative therapy. *BMB Reports*. 2021; 54 (7): 356–67.
17. Martin I, Suetterlin R, Baschong W, Heberer M, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Enhanced cartilage tissue engineering by sequential exposure of chondrocytes to FGF-2 during 2D expansion and BMP-2 during 3D cultivation. *J Cell Biochem*. 2001; 83 (1): 121–8. DOI: 10.1002/jcb.1203.
18. Kim J, Tomida K, Matsumoto T, Adachi T. Spheroid culture for chondrocytes triggers the initial stage of endochondral ossification. *Biotechnol Bioeng*. 2022; 119 (11): 3311–8. DOI: 10.1002/bit.28203.
19. Sulaiman S, Chowdhury SR, Fauzi MB, Rani RA, Mohamadyahaya NH, Tabata Y, et al. 3d culture of MSCs on a gelatin microsphere in a dynamic culture system enhances chondrogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21 (8): 1–17.
20. Gionet-Gonzales MA, Leach JK. Engineering principles for guiding spheroid function in the regeneration of bone, cartilage, and skin. *Biomedical Materials (Bristol)*. 2018; 13 (3): 034109. DOI: 10.1088/1748-605X/aab0b3.
21. Sridharan BP, Laffin AD, Detamore MS. Generating Chondromimetic Mesenchymal Stem Cell Spheroids by Regulating Media Composition and Surface Coating. *Cellular and Molecular Bioengineering*. 2018; 11 (2): 99–115.
22. Wang G, An Y, Zhang X, Ding P, Bi H, Zhao Z. Chondrocyte Spheroids Laden in GelMA/HAMA Hybrid Hydrogel for Tissue-Engineered Cartilage with Enhanced Proliferation, Better Phenotype Maintenance, and Natural Morphological Structure. *Gels*. 2021; 7 (4): 247. Available from: <https://www.mdpi.com/2310-2861/7/4/247>.
23. Jang Y, Jung H, Ju JH. Chondrogenic differentiation induction of adipose-derived stem cells by centrifugal gravity. *Journal of Visualized Experiments*. 2017; 2017 (120). DOI: 10.3791/54934.
24. Jang J, Lee J, Lee E, Lee EA, Son Y. Disc-type hyaline cartilage reconstruction using 3D-cell sheet culture of human bone marrow stromal cells and human costal chondrocytes and maintenance of its shape and phenotype after transplantation. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2016; 13 (4): 352–63.
25. Saloni E, Kontturi L, Laitinen A, Haaparanta AM, Korhonen M, Nystedt J, et al. Chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in a three-dimensional environment. *Journal of Cellular Physiology*. 2020; 235 (4): 3497–507.
26. Markway BD, Tan GK, Brooke G, Hudson JE, Cooper-White JJ, Doran MR. Enhanced chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in low oxygen environment micropellet cultures. *Cell Transplantation*. 2010; 19 (1): 29–42.
27. Rogan H, Ilagan F, Yang F. Comparing Single Cell Versus Pellet Encapsulation of Mesenchymal Stem Cells in Three-Dimensional Hydrogels for Cartilage Regeneration. *Tissue Engineering — Part A*. 2019; 25 (19–20): 1404–12.
28. Zhang M, Shi J, Xie M, Wen J, Niibe K, Zhang X, et al. Recapitulation of cartilage/bone formation using iPSCs via biomimetic 3D rotary culture approach for developmental engineering. *Biomaterials*. 2020; 260. DOI: 10.1016/j.biomaterials.
29. Zhang K, Yan S, Li G, Cui L, Yin J. In-situ birth of MSCs multicellular spheroids in poly(L-glutamic acid)/chitosan scaffold for hyaline-like cartilage regeneration. *Biomaterials*. 2015; 71: 24–34.
30. Stuart MP, Matsui RAM, Santos MFS, Côrtes I, Azevedo MS, Silva KR, et al. Successful low-cost scaffold-free cartilage tissue engineering using human cartilage progenitor cell spheroids formed by micromolded nonadhesive hydrogel. *Stem Cells International*. 2017. 2017; DOI: 10.1155/2017/7053465. Epub 2017 Dec 20.
31. STEMCELL Technologies. Reproducible and Uniform Embryoid Bodies Using AggreWell™ Plates. 2011. Available from: https://www.stemcell.com/media/files/brochure/BR29150-AggreWell_Reproducible_Uniform_Embryoid_Bodies.pdf.
32. Ereemeev AV, Volovikov EA, Shuvalova LD, Davidenko AV, Khomyakova EA, Bogomiakova ME, Lebedeva OS, Zubkova OA, Lagarkova MA. “Necessity is the Mother of Invention” or Inexpensive, Reliable, and Reproducible Protocol for Generating Organoids. *Biochemistry (Moscow)*. 2019; 84 (3): 321–28. DOI: 10.1134/S0006297919030143.
33. QIAGEN. RNeasy * Plus Mini Handbook. 2020, 47 p. <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=16b8f578-d192-4613-ae32-8e02e0b0fa77&lang=en>
34. Evrogen. MMLV RT kit. 2021. Available from: www.evrogen.ru.
35. Molecular Cellular and Developmental Biology. Cryostat Procedure. 2012; 5 p. Available from: <https://labs.mcdb.ucsb.edu/fisher/steven/Website/protocols/Cryosectioning.pdf>.
36. Shuvalova LD, Ereemeev AV, Bogomazova AN, Novosadova EV, Zerkalenkova EA, Olshanskaya YV, et al. Generation of induced pluripotent stem cell line RCPCMI004-A derived from patient with Parkinson’s disease with deletion of the exon 2 in PARK2 gene. *Stem Cell Res*. 2020; 44: 101733. DOI: 10.1016/j.scr.2020.101733.
37. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. The control of chondrogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2006; 97: 33–44.
38. Rutgers M, Saris DB, Vonk LA, van Rijen MH, Akrum V, Langeveld D, et al. Effect of collagen type I or type II on chondrogenesis by cultured human articular chondrocytes. *Tissue Engineering — Part A*. 2013; 19 (1–2): 59–65.
39. Theodoropoulos JS, DeCroos AJN, Petrera M, Park S, Kandel RA. Mechanical stimulation enhances integration in an in vitro model of cartilage repair. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2016; 24 (6): 2055–64.
40. Endo K, Fujita N, Nakagawa T, Nishimura R. Effect of Fibroblast Growth Factor-2 and Serum on Canine Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis. *Tissue Engineering — Part A*. 2019; 25 (11–12): 901–10.
41. Wu CL, Dicks A, Steward N, Tang R, Katz DB, Choi YR, et al. Single cell transcriptomic analysis of human pluripotent stem cell chondrogenesis. *Nature Communications*. 2021; 12 (1): 1–18.

References

1. Diederichs S, Gabler J, Autenrieth J. Differential regulation of SOX9 protein during chondrogenesis of induced pluripotent stem cells versus mesenchymal stromal cells: a shortcoming for cartilage formation. *Stem Cells and Development*. 2016; (April): 1–34.
2. Tsumaki N, Okada M, Yamashita A. iPSC cell technologies and cartilage regeneration. *Bone*. 2015; 70: 48–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2014.07.011>.
3. Yamashita A, Morioka M, Yahara Y, Okada M, Kobayashi T, Kuriyama S, et al. Generation of scaffoldless hyaline cartilaginous tissue from human iPSCs. *Stem Cell Reports*. 2015; 4 (3): 404–18.
4. Kimura T, Yamashita A, Ozono K, Tsumaki N. Limited Immunogenicity of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cartilages. *Tissue Engineering — Part A*. 2016; 22 (23–24): 1367–75.
5. Lietman SA. Induced pluripotent stem cells in cartilage repair. *World Journal of Orthopedics*. 2016; 7 (3): 149–55.
6. Narsinh KH, Plews J, Wu JC. Comparison of human induced pluripotent and embryonic stem cells: Fraternal or identical twins? *Molecular Therapy*. 2011; 19 (4): 635–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2011.41/nature06264>.
7. Cheng B, Tu T, Shi X, Liu Y, Zhao Y, Zhao Y, et al. A novel construct with biomechanical flexibility for articular cartilage regeneration. *Stem Cell Research and Therapy*. 2019; 10 (1): 1–16.
8. Limraksasin P, Kosaka Y, Zhang M, Horie N, Kondo T, Okawa H, et al. Shaking culture enhances chondrogenic differentiation of mouse induced pluripotent stem cell constructs. *Scientific Reports*. 2020; 10 (1): 1–15. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72038-y>.
9. Suchorska WM, Augustyniak E, Richter M, Trzeciak T. Comparison of Four Protocols to Generate Chondrocyte-Like Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells (hiPSCs). *Stem Cell Reviews and Reports*. 2017; 13 (2): 299–308.
10. Castro-Viñuelas R, Sanjurjo-Rodríguez C, Piñeiro-Ramil M,

- Hermida-Gómez T, Fuentes-Boquete IM, de Toro-Santos FJ, et al. Induced pluripotent stem cells for cartilage repair: Current status and future perspectives. *European Cells and Materials*. 2018; 36 (2006): 96–109.
11. Qu C, Puttonen KA, Lindeberg H, Ruponen M, Hovatta O, Koistinaho J, et al. Chondrogenic differentiation of human pluripotent stem cells in chondrocyte co-culture. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2013; 45 (8): 1802–12.
 12. Chijimatsu R, Ikeya M, Yasui Y, Ikeda Y, Ebina K, Moriguchi Y, et al. Characterization of Mesenchymal Stem Cell-Like Cells Derived from Human iPSCs via Neural Crest Development and Their Application for Osteochondral Repair. *Stem Cells International*. 2017: 1–18.
 13. Karen Niederreither JV, Vermot J, Schuhbaur B, Chambon P, Dollé P. Embryonic retinoic acid synthesis is required for forelimb growth and anteroposterior patterning in the mouse. *Development*. 2002; 129 (15): 3563–74.
 14. Kawata M, Mori D, Kanke K, Hojo H, Ohba S, Chung U il, et al. Simple and Robust Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells toward Chondrocytes by Two Small-Molecule Compounds. *Stem Cell Reports*. 2019; 13 (3): 530–44.
 15. Kreuser U, Buchert J, Haase A, Richter W, Diederichs S. Initial WNT/ β -Catenin Activation Enhanced Mesoderm Commitment, Extracellular Matrix Expression, Cell Aggregation and Cartilage Tissue Yield From Induced Pluripotent Stem Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020; 8: 581331. DOI: 10.3389/fcell.2020.581331.
 16. Lee NH, Bayaraa O, Zechu Z, Kim HS. Biomaterials-assisted spheroid engineering for regenerative therapy. *BMB Reports*. 2021; 54 (7): 356–67.
 17. Martin I, Suetterlin R, Baschong W, Heberer M, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Enhanced cartilage tissue engineering by sequential exposure of chondrocytes to FGF-2 during 2D expansion and BMP-2 during 3D cultivation. *J Cell Biochem*. 2001; 83 (1): 121–8. DOI: 10.1002/jcb.1203.
 18. Kim J, Tomida K, Matsumoto T, Adachi T. Spheroid culture for chondrocytes triggers the initial stage of endochondral ossification. *Biotechnol Bioeng*. 2022; 119 (11): 3311–8. DOI: 10.1002/bit.28203.
 19. Sulaiman S, Chowdhury SR, Fauzi MB, Rani RA, Mohamadyahaya NH, Tabata Y, et al. 3d culture of MSCs on a gelatin microsphere in a dynamic culture system enhances chondrogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21 (8): 1–17.
 20. Gionet-Gonzales MA, Leach JK. Engineering principles for guiding spheroid function in the regeneration of bone, cartilage, and skin. *Biomedical Materials (Bristol)*. 2018; 13 (3): 034109. DOI: 10.1088/1748-605X/aab0b3.
 21. Sridharan BP, Laffin AD, Detamore MS. Generating Chondromimetic Mesenchymal Stem Cell Spheroids by Regulating Media Composition and Surface Coating. *Cellular and Molecular Bioengineering*. 2018; 11 (2): 99–115.
 22. Wang G, An Y, Zhang X, Ding P, Bi H, Zhao Z. Chondrocyte Spheroids Laden in GelMA/HAMA Hybrid Hydrogel for Tissue-Engineered Cartilage with Enhanced Proliferation, Better Phenotype Maintenance, and Natural Morphological Structure. *Gels*. 2021; 7 (4): 247. Available from: <https://www.mdpi.com/2310-2861/7/4/247>.
 23. Jang Y, Jung H, Ju JH. Chondrogenic differentiation induction of adipose-derived stem cells by centrifugal gravity. *Journal of Visualized Experiments*. 2017; 2017 (120). DOI: 10.3791/54934.
 24. Jang J, Lee J, Lee E, Lee EA, Son Y. Disc-type hyaline cartilage reconstruction using 3D-cell sheet culture of human bone marrow stromal cells and human costal chondrocytes and maintenance of its shape and phenotype after transplantation. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2016; 13 (4): 352–63.
 25. Salenius E, Kontturi L, Laitinen A, Haaparanta AM, Korhonen M, Nystedt J, et al. Chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in a three-dimensional environment. *Journal of Cellular Physiology*. 2020; 235 (4): 3497–507.
 26. Markway BD, Tan GK, Brooke G, Hudson JE, Cooper-White JJ, Doran MR. Enhanced chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in low oxygen environment micropellet cultures. *Cell Transplantation*. 2010; 19 (1): 29–42.
 27. Rogan H, Ilagan F, Yang F. Comparing Single Cell Versus Pellet Encapsulation of Mesenchymal Stem Cells in Three-Dimensional Hydrogels for Cartilage Regeneration. *Tissue Engineering — Part A*. 2019; 25 (19–20): 1404–12.
 28. Zhang M, Shi J, Xie M, Wen J, Niibe K, Zhang X, et al. Recapitulation of cartilage/bone formation using iPSCs via biomimetic 3D rotary culture approach for developmental engineering. *Biomaterials*. 2020; 260. DOI: 10.1016/j.biomaterials.
 29. Zhang K, Yan S, Li G, Cui L, Yin J. In-situ birth of MSCs multicellular spheroids in poly(L-glutamic acid)/chitosan scaffold for hyaline-like cartilage regeneration. *Biomaterials*. 2015; 71: 24–34.
 30. Stuart MP, Matsui RAM, Santos MFS, Côrtes I, Azevedo MS, Silva KR, et al. Successful low-cost scaffold-free cartilage tissue engineering using human cartilage progenitor cell spheroids formed by micromolded nonadhesive hydrogel. *Stem Cells International*. 2017; 2017. DOI: 10.1155/2017/7053465. Epub 2017 Dec 20.
 31. STEMCELL Technologies. Reproducible and Uniform Embryoid Bodies Using AggreWell™ Plates. 2011. Available from: https://www.stemcell.com/media/files/brochure/BR29150-AggreWell_Reproducible_Uniform_Embryoid_Bodies.pdf.
 32. Ereemeev AV, Volovikov EA, Shuvalova LD, Davidenko AV, Khomyakova EA, Bogomiakova ME, Lebedeva OS, Zubkova OA, Lagarkova MA. “Necessity is the Mother of Invention” or Inexpensive, Reliable, and Reproducible Protocol for Generating Organoids. *Biochemistry (Moscow)*. 2019; 84 (3): 321–28. DOI: 10.1134/S0006297919030143.
 33. QIAGEN. RNeasy® Plus Mini Handbook. 2020, 47 p. <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=16b8f578-d192-4613-ae32-8e02e0b0fa77&lang=en>
 34. Evrogen. MMLV RT kit. 2021. Available from: www.evrogen.ru. Russian.
 35. Molecular Cellular and Developmental Biology. Cryostat Procedure. 2012; 5 p. Available from: <https://labs.mcdb.ucsb.edu/fisher/steven/Website/protocols/Cryosectioning.pdf>.
 36. Shuvalova LD, Ereemeev AV, Bogomazova AN, Novosadova EV, Zerkalenkova EA, Olshanskaya YV, et al. Generation of induced pluripotent stem cell line RCPMi004-A derived from patient with Parkinson's disease with deletion of the exon 2 in PARK2 gene. *Stem Cell Res*. 2020; 44: 101733. DOI: 10.1016/j.scr.2020.101733.
 37. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. The control of chondrogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2006; 97: 33–44.
 38. Rutgers M, Saris DB, Vonk LA, van Rijen MH, Akrum V, Langeveld D, et al. Effect of collagen type I or type II on chondrogenesis by cultured human articular chondrocytes. *Tissue Engineering — Part A*. 2013; 19 (1–2): 59–65.
 39. Theodoropoulos JS, DeCroos AJN, Petrera M, Park S, Kandel RA. Mechanical stimulation enhances integration in an in vitro model of cartilage repair. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2016; 24 (6): 2055–64.
 40. Endo K, Fujita N, Nakagawa T, Nishimura R. Effect of Fibroblast Growth Factor-2 and Serum on Canine Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis. *Tissue Engineering — Part A*. 2019; 25 (11–12): 901–10.
 41. Wu CL, Dicks A, Steward N, Tang R, Katz DB, Choi YR, et al. Single cell transcriptomic analysis of human pluripotent stem cell chondrogenesis. *Nature Communications*. 2021; 12 (1): 1–18.

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ И ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ СМЕСИ ЛАКТОФЕРРИНА, АРТЕМИЗИНИНА И АЗИТРОМИЦИНА В ОТНОШЕНИИ SARS-COV-2 *IN VITRO*

А. А. Рябченкова¹✉, В. В. Копать¹, Е. Р. Чирак¹, Е. Л. Чирак¹, И. А. Ленева², Е. А. Глубокова², Н. П. Карташова², Н. Н. Колмаков³, И. В. Духовлинов¹

¹ Общество с ограниченной ответственностью «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия

² Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова Минобрнауки России, Москва, Россия

³ Институт экспериментальной медицины Минобрнауки России, Санкт-Петербург, Россия

Лактоферрин, артемизинин и азитромицин обладают широким спектром противовирусного, иммуномодулирующего и противовоспалительного действия. Экспериментально показанное частичное ингибирование ими инфекции, вызванной SARS-CoV-2 *in vitro*, позволяет заключить, что влияния на проникновение вирионов в клетки, опосредованное каждым из этих веществ в отдельности, недостаточно для полного ингибирования инфекции SARS-CoV-2. Целью работы было оценить *in vitro* цитотоксичность и противовирусную активность смеси активных действующих веществ лактоферрина, артемизинина и азитромицина в отношении лабораторного штамма SARS-CoV-2. Использовали перевиваемую культуру клеток Vero CCL81 (ATCC) и лабораторный штамм коронавируса SARS-CoV-2 «Дубровка» (идентификационный № GenBank: MW161041.1), выделенный на культуре клеток Vero CCL81 из назофарингеального мазка больного COVID-19. Определение цитотоксического действия смеси препаратов и изучение противовирусной активности в отношении вируса SARS-CoV-2 оценивали по эффекту цитопатического действия с использованием МТТ (метилтиазолилдибензилтетразолия бромид). В качестве препарата сравнения использовали гидроксихлорохин. Показано, что при высокой множественности заражения (100 MOI) и низкой (20 MOI) в культуре клеток Vero CCL81 смеси артемизинина, лактоферрина и азитромицина оказывает значимый эффект на вирусную репродукцию SARS-CoV-2, ИК50 (полумаксимальная ингибирующая концентрация) оценивается в обоих случаях как разведение 1 : 2. Полученные результаты позволяют сделать вывод о низкой цитотоксичности изучаемой смеси и о наличии значимого противовирусного действия *in vitro*.

Ключевые слова: артемизинин, азитромицин, лактоферрин, цитотоксичность, противовирусная активность, SARS-CoV-2, COVID-19, перепрофилирование препарата

Благодарности: Евгению Бахтиеровичу Файзулову (ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова) за предоставленный вирус. Исследование выполнено с использованием оборудования центра коллективного пользования НИИВС им. И. И. Мечникова.

Вклад авторов: А. А. Рябченкова — концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; В. В. Копать — концепция, дизайн и организация проведения исследования, подготовка текста; Е. Р. Чирак, Е. Л. Чирак — дизайн исследования, подготовка образцов и материалов; И. А. Ленева — проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных; Н. П. Карташова, Е. А. Глубокова — проведение экспериментов; Н. Н. Колмаков — концепция исследования, корректировка текста; И. В. Духовлинов — инициация, руководство проектом, подготовка концепции состава препарата, организация финансирования проекта.

Соблюдение этических стандартов: исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации.

✉ **Для корреспонденции:** Анастасия Андреевна Рябченкова
пр-кт Малый В. О., д. 57, к. 4, литера Ж, помещение 5-Н, г. Санкт-Петербург, 199178, Россия; riabchenkova@service-gene.ru

Статья получена: 23.09.2022 **Статья принята к печати:** 14.11.2022 **Опубликована онлайн:** 25.12.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.043

ASSESSMENT OF CYTOTOXICITY AND ANTIVIRAL ACTIVITY AGAINST SARS-COV-2 OF THE MIXTURE OF LACTOFERRIN, ARTEMISININ, AND AZITHROMYCIN *IN VITRO*

Ryabchenkova AA¹✉, Kopat VV¹, Chirak ER¹, Chirak EL¹, Leneva IA², Glubokova EA², Kartashova NP², Kolmakov NN³, Dukhovlinov IV¹

¹ ATG Service Gen LLC, St. Petersburg, Russia

² Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

³ Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

Lactoferrin, artemisinin, and azithromycin exhibit a broad spectrum of antiviral, immunomodulatory, and anti-inflammatory effects. The experiments show that these drugs partially inhibit the infection caused by SARS-CoV-2 *in vitro*. This allows us to conclude that the effects on the entry of virions into cells mediated by each of these substances taken separately are insufficient for complete inhibition of the SARS-CoV-2 infection. The study was aimed to perform *in vitro* assessment of cytotoxicity and antiviral activity against the laboratory SARS-CoV-2 strain of the mixture of active ingredients: lactoferrin, artemisinin, and azithromycin. We used the Vero CCL81 (ATCC) cell line and the Dubrovka laboratory strain of SARS-CoV-2 (GenBank ID: MW161041.1), isolated in the Vero CCL81 cell culture from the nasopharyngeal swab of patient with COVID-19. Cytotoxic effects and antiviral activity against SARS-CoV-2 of the drug mixture were assessed based on the cytopathic effects using the MTT (methylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium bromide) assay. Hydroxychloroquine was used as a reference drug. It has been shown that at high (MOI 100) and low (MOI 20) multiplicity of infection used in the Vero CCL 81 cell culture, the mixture of artemisinin, lactoferrin and azithromycin has a significant effect on the SARS-CoV-2 reproduction, and IC50 (half maximal inhibitory concentration) is estimated as the 1 : 2 dilution in both cases. The findings make it possible to conclude that the studied mixture is low toxic and shows significant antiviral effects *in vitro*.

Keywords: artemisinin, azithromycin, lactoferrin, cytotoxicity, antiviral activity, SARS-CoV-2, COVID-19, drug repurposing

Acknowledgements: we would like to express our gratitude to Evgeny B. Faizulov (Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera) for the provided virus. The study was performed using the equipment provided by the Center for Collective Use of the Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera.

Author contribution: Ryabchenkova AA — study concept and design, data analysis and interpretation, manuscript writing; Kopat VV — concept, design, and organization of research, manuscript writing; Chirak ER, Chirak EL — study design, preparation of samples and materials; Leneva IA — experimental procedures, data acquisition, analysis, and interpretation; Kartashova NP, Glubokova EA — experimental procedures; Kolmakov NN — study concept, manuscript editing; Dukhovlinov IV — initiation, project management, developing the concept of drug composition, organization of research funding.

Compliance with ethical standards: the study was performed in accordance with the principles of the World Medical Association Declaration of Helsinki.

✉ **Correspondence should be addressed:** Anastasia A. Ryabchenkova
Prospect Maly V.O., 57, k. 4, litera Zh, k. 5-H, St. Petersburg, 199178, Russia; riabchenkova@service-gene.ru

Received: 23.09.2022 **Accepted:** 14.11.2022 **Published online:** 25.12.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.043

В настоящее время не теряет актуальности проблема распространения коронавирусной инфекции COVID-19, вызываемой SARS-CoV-2. Несмотря на то что своевременная вакцинация способна снизить риски тяжелого протекания инфекции, разработка дополнительных средств, способных облегчить тяжелое течение или предотвратить заражение COVID-19, по-прежнему имеет высокий приоритет, в том числе потому, что антитела на вакцинные антигены могут не распознавать новые варианты вируса.

На сегодняшний день профилактика и лечение COVID-19 преимущественно заключались в применении и разработке вакцинных препаратов для формирования нейтрализующих антител к спайковому белку, препаратов иммунных сывороток и моноклональных антител, противовирусных препаратов [1] и препаратов, направленных против гиперактивации иммунного ответа [2] при симптоматической поддерживающей терапии и респираторной поддержке инфицированных. Во время борьбы с пандемией COVID-19 особое внимание было уделено перепрофилированию лекарственных препаратов, поскольку их известные профили безопасности и фармакокинетики позволили своевременно внедрить их в применение в отличие от новых лекарственных средств, требующих полного спектра испытаний и регистрации. В настоящее время в последнюю 16-ю версию Временных методических рекомендаций «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» в качестве химиопрепаратов прямого противовирусного действия включены фавипиравир, молнупиравир, нирматрелвир + ритонавир, ремдесивир, умифеновир. Рекомендованы также биотехнологические препараты: интерферон-альфа, синтетическая малая интерферирующая рибонуклеиновая кислота (двухцепочечная) [3]. Однако для каждого из этих препаратов в отношении COVID-19 клинические исследования ограничены, часто противоречивы, нет бесспорной доказательной базы и опыта применения. Наличие многочисленных мутаций в S-белке указывает на его возможность приобретать новые свойства лигандной специфичности [4].

Механизм проникновения SARS-CoV-2 в клетки, связанный с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (АПФ2), представляет собой сложный многофакторный процесс, требующий вовлечения многих вспомогательных молекул — протеиназ, корецепторов и активаторов их экспрессии. Наличие корецепторов позволяет SARS-CoV-2 инфицировать клетки с низкой экспрессией АПФ2 на мембранах.

Так, S-белок как гликопротеин может взаимодействовать с рецепторами не только белковой частью, но и путем связывания с лектиновыми рецепторами своей углеводной составляющей (N-гликаны S1-субъединицы, содержащие олигоманнозу и сложные сахара, защищающие вирус от антител) [5, 6]. Связывание лектиноподобных S1-сайтов с гликокаликсом клетки-мишени через O-ацетилированные сиаловые кислоты [7] и гепарансульфат [8] может способствовать инфицированию клетки. Было показано, что гепарансульфат усиливает проникновение многих типов вирусов в клетки [9], в том числе и SARS-CoV-2 [10]. Полисахаридные цепи гепарансульфатпротеогликанов в большинстве случаев имеют большой отрицательный заряд, что позволяет рекрутировать вирусные частицы SARS-CoV-2 на поверхность клетки вследствие взаимодействия с S-белком, что увеличивает его локальную концентрацию для последующего связывания с АПФ2. Есть основания

полагать, что положительно заряженная связывающая бороздка, расположенная на RBD-домене S-белка, может служить сайтом связывания для отрицательно заряженных полисахаридных цепей гепарансульфатпротеогликанов [8, 11], при этом специфичность связывания в значительной степени зависит от комплементарного пространственного расположения основных групп белка и сульфатных и карбоксильных групп полисахарида [12–14].

В качестве мощных ингибиторов проникновения SARS-CoV-2 в клетки скрининг перепрофилирования имеющихся лекарств позволил выявить несколько соединений, нацеленных на гепарансульфатпротеогликаны и зависимые от них пути эндоцитоза. Одним из таких соединений является лактоферрин (ЛФ) — встречающийся в природе нетоксичный гликопротеин, который доступен в качестве пищевой добавки [15].

Оценка противовирусной активности ЛФ на модели инфицирования коронавирусом иммортализованной линии клеток колоректальной аденокарциномы человека Caco-2 и клеток почечного эпителия африканской зеленой мартышки Vero 6 показала, что ЛФ частично ингибирует заражение и репликацию SARS-CoV-2 [16]. В ряде исследований эффектов связывания ЛФ с рецептором показано его влияние на различные сигнальные системы и пути, включающие NF-κB и различные регуляторные факторы интерферона, что приводит к модуляции противовирусного иммунного ответа [17]. Показано влияние ЛФ и на регуляцию TLR, особенно TLR3 и TLR7, участвующих в распознавании РНК-вирусов [18, 19], и ингибирование катепсина L [20], что приводит к блокировке проникновения SARS-CoV-2 в клетки эмбриональной почки человека 293/hАПФ2 [21]. В экспериментальных условиях [16] показано, что ЛФ может ингибировать экспрессию иммуносупрессивного цитокина TGFB1, подавлять экспрессию тимического стромального лимфопоэтина, высокие уровни которого были обнаружены на слизистой оболочке бронхов у пациентов с астмой и хронической обструктивной болезнью легких, и снижать экспрессию провоспалительных цитокинов IL1B и IL6. Эти иммуномодулирующие эффекты ЛФ могут противодействовать активации цитокинового шторма.

Еще одним перспективным перепрофилированным соединением является азитромицин, оказывающий влияние на множество процессов. Прежде всего, азитромицин, влияющий на снижение экспрессии матриксных металлопротеиназ, связанных с CD147, привлек внимание исследователей, сформировавших гипотезу о том, что азитромицин может ингибировать CD147 и, в итоге, блокировать проникновение вируса в клетки-хозяева [22]. Было продемонстрировано, что CD147 индуцирует активацию сигнального пути PI3K/AKT, способствуя индукции NF-κB и продукции провоспалительных цитокинов [23, 24]. Сигнальный путь PI3K/AKT увеличивает экспрессию сериновой протеазы TMPRSS2, что способствует большему проникновению вируса в клетки.

Имуномодулирующие свойства азитромицина [25] могут играть важную роль при лечении гипертрофического состояния, вызванного цитокиновым штормом, при тяжелых стадиях протекания COVID-19. *In vitro* азитромицин показал снижение секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов [26, 27]. Кроме того, азитромицин уменьшает накопление инфильтрирующих воспалительных клеток в бронхоальвеолярном лаваже [28]. В фибробластах азитромицин ингибирует пролиферацию и выработку коллагена за счет снижения

концентрации трансформирующего фактора роста (TGFB) и демонстрации легочной антифибротической активности [29, 30]. Азитромицин оказывает мукорегуляторное действие, снижая гиперсекрецию слизи и улучшая мукоцилиарный клиренс [31].

Исследования показали, что азитромицин может изменять гликозилирование АПФ2 и тем самым предотвращать проникновение вируса SARS-CoV-2 внутрь клетки. Другой предполагаемый механизм противовирусного действия — молекулярная мимикрия азитромицина и клеточного ганглиозида GM1 (липидный ганглиозид, действующий как кофактор прикрепления вируса к клетке-хозяину для респираторных вирусов). Азитромицин способен связываться с ганглиозидсвязывающим доменом S-белка, таким образом блокируя взаимодействие S-белок-GM1 на плазматической мембране хозяина [32].

Еще один механизм действия азитромицина — непрямо блокирование фуриновой системы, способствующей проникновению вируса в клетку после связывания S1-ACE2. Фуриновая система активируется в кислой среде трансотдела аппарата Гольджи и отделяет S1-субъединицу S-белка. Предполагается, что азитромицин снижает активность фуринов путем повышения внутриорганельного pH [33]. Кроме того, азитромицин может подщелачивать везикулы, содержащие вирионы SARS-CoV-2, что предотвращает pH-зависимое слияние мембран.

Третье кандидатное средство против SARS-CoV-2 — противомаларийный иммуномодулирующий препарат артемизинин, который наряду с хлорохином и хинином имеет долгую историю клинического применения и обладает противовирусным потенциалом широкого спектра действия. Показано, что противомаларийный препарат с иммуномодулирующей активностью хлорохин, которому уже несколько десятилетий, и его производное гидроксихлорохин могут эффективно ингибировать SARS-CoV-2 *in vitro* [34, 35].

Помимо роли в борьбе с малярией, артемизинин изучали на предмет его потенциального влияния на иммунные реакции при физиологических и патологических состояниях [36–38]. Многие бактерии и вирусы, в том числе SARS-CoV-2, активируют сигнальный путь NF-κB в клетках человека. Активация передачи сигналов NF-κB приводит к последующей активации факторов транскрипции p50/p65. Артемизинин и артезунат могут действовать как ингибиторы сигнального пути NF-κB, блокируя функцию p50/p65. Исследования показывают, что артемизинин может воздействовать на клеточную поверхность путем ингибирования связывания S-белка SARS-CoV-2 с рецепторами клеточной поверхности, что потенциально предотвращает как эндоцитоз вируса, так и активацию передачи сигналов NF-κB. Таким образом, артемизинин может предотвращать цитоклинический шторм путем ингибирования IκB-киназы [39–41]. Однако исследования молекулярной стыковки показывают, что артемизинины могут также связываться с белками коронавируса, такими как E-белок, белок геликазы, N-белок, белок 3CL PRO, S-белок, неструктурный белок 3 (nsp3), nsp10, nsp14, nsp15, катепсин-L, и GRP78 [42, 43]. Соответственно, часть биологической активности артемизинина может быть частично основана на ингибировании функции этих вирусных белков.

Частичное ингибирование инфекции, вызванной SARS-CoV-2 *in vitro*, лактоферрином, артемизинином и азитромицином, позволяет предположить, что потенциальной блокировки проникновения вирионов в клетки,

опосредованной каждым из этих веществ в отдельности, недостаточно для полного ингибирования инфекции SARS-CoV-2. Комбинированный же прием данных препаратов может оказаться более перспективным в клинической практике. Поэтому поиск и создание новых препаратов, эффективных в отношении новой коронавирусной инфекции продолжается, и актуальность этих исследований не вызывает сомнений. Первым этапом такого поиска является изучение их противовирусной активности в культуре клеток.

Целью настоящей работы было исследование цитотоксичности и противовирусной активности смеси активных действующих веществ — лактоферрина, артемизинина и азитромицина — в отношении коронавируса SARS-CoV-2 в сравнении с гидроксихлорохином, поскольку ограничением многих проведенных исследований *in vitro* было отсутствие использования препаратов сравнения для оценки противовирусной эффективности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирусы и клетки

В опытах использовали перевиваемую культуру клеток эпителия почки африканской зеленой марышки Vero CCL81 (ATCC) из коллекции ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова и лабораторный штамм коронавируса SARS-CoV-2 «Дубровка» (идентификационный № GenBank: MW161041.1), выделенный на культуре клеток Vero CCL81 из назофарингеального мазка больного COVID-19. Культивирование вируса проводили при 37 °C в питательной среде ДМЕМ с глутамином и глюкозой 4,5 г/л и 5% фетальной бычьей сыворотки (ФСБ), L-глутамином (300 мкг/мл), гентамицином (40 мкг/мл) в атмосфере 5% CO₂ (культуральная среда, КС). Штамм прошел 20 последовательных пассажей и вызывал выраженное цитопатическое действие вируса (ЦПД). Образцы вирусного материала для проведения работы хранили при температуре –80 °C в виде аликвот. Во всех экспериментах были использованы аликвоты из одного стока.

Приготовление смеси препаратов

К 45 мг азитромицина добавили 10 мл ДМСО для получения раствора с концентрацией 6 мкмоль/мл. К 10 мг лактоферрина добавили 0,5 мл фосфатного буфера для получения раствора с концентрацией 20 мг/мл. К 21 мг артемизинина добавили 5 мл ДМСО для получения раствора с концентрацией 15 мкмоль/мл. Для приготовления рабочего раствора смешали 5 мкл раствора азитромицина, 125 мкл раствора лактоферрина и 50 мкл раствора артемизинина, объем довели культуральной средой до 5 мл.

Концентрированный раствор контрольного препарата гидроксихлорохина готовили из лекарственной формы (таблетка), растворяя ее в стерильной дистиллированной воде отдельно для каждого опыта непосредственно в день использования в эквивалентных количествах, соответствующих количеству чистого вещества в препарате. Все соединения, а также гидроксихлорохин взвешивали с точностью до 0,1 мг на аналитических весах.

Определение цитотоксического действия препаратов в культуре клеток

Клетки рассаживали в 96-луночных планшетах фирмы «Corning» со средней плотностью 20 000 клеток на лунку

и выращивали в питательной среде DMEM с глутамином и глюкозой 4,5 г/л и 5% фетальной бычьей сыворотки (ФСБ), L-глутамином (300 мкг/мл), гентамицином (40 мкг/мл) в атмосфере 5% CO₂ (КС) в течение трех суток до полного монослоя. Затем среду удаляли и в планшеты вносили по 100 мкл испытуемых препаратов в соответствующей среде без сыворотки (рабочая среда, РС) в указанных концентрациях (по восемь концентраций). Затем в каждую лунку планшета добавляли по 100 мкл РС. Каждая точка эксперимента была поставлена в четырех повторностях ($n = 4$). В качестве отрицательного контроля использовали клетки, содержащие 200 мкл питательной среды РС. Для определения цитотоксической дозы 50 (ЦТД₅₀) планшеты инкубировали 72 ч при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Поскольку при определении противовирусной активности инкубация клеток с препаратами проводится в течение пяти дней, для исключения эффекта токсического влияния изучаемых образцов в течение этого времени в другой серии экспериментов определение цитотоксичности проводили при таком же времени инкубации, как и при определении противовирусной активности (пять суток). Оценку цитотоксического действия препаратов учитывали визуально по состоянию клеточного монослоя и в количественном тесте МТТ. Для этого в каждую лунку добавляли по 160 мкл среды DMEM без фенолового красного, а также 40 мкл раствора тетразолиевого красителя МТТ с концентрацией 5 мг/мл и инкубировали 2 ч при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Далее культуральную жидкость удаляли и в лунки вносили по 100 мкл ДМСО с последующей инкубацией в течение 20 мин при комнатной температуре и постоянном покачивании на шейкере. С помощью планшетного спектрофотометра определяли оптическую плотность каждой лунки при 530 нм с учетом фоновых значений при 620 нм. Максимальную концентрацию препарата, не изменяющую значение ОП более чем на 10–15% по сравнению с контролем клеток, принимали за максимально переносимую концентрацию (МПК). Концентрацию субстанций, уменьшающую значение ОП на 50% по сравнению с контролем клеток, принимали за ЦТД₅₀.

Изучение противовирусной активности препаратов в отношении вируса SARS-CoV-2 по эффекту ЦПД с использованием МТТ

Для изучения противовирусной активности образцов культуру клеток Vero CCL81 рассаживали в 96-луночные планшеты для культивирования клеток с плоским дном (20 000 клеток/лунка) и выращивали в соответствующей КС. На третьи сутки после достижения полного монослоя из лунок планшета удаляли РС с последующим внесением 100 мкл исследуемых препаратов неразведенных или в указанных разведениях на РС (семь концентраций). Часть лунок использовали для контроля вируса и клеток. Каждая точка эксперимента была поставлена в четырех повторностях ($n = 4$). Параллельно для исключения цитотоксического эффекта препаратов в опытах по противовирусной активности к незараженным лункам были добавлены препараты в таких же условиях и при тех же концентрациях. После инкубации в течение 2 ч во все лунки, за исключением лунок клеточного контроля, вносили вирус в дозе 20 или 100 MOI (в 100 мкл) и клетки инкубировали в течение 5 суток при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ до появления четкого ЦПД в клетках вирусного контроля. Учет результата проявления ЦПД в клетках

проводили с использованием количественного теста МТТ, как описано ранее. Вычисление ИК₅₀ учитывали в программе Excel по формуле:

$$\text{Ингибирование} = \frac{100 - (\text{ОП}_{\text{кл. контроль}} - \text{ОП}_{\text{опыт}})}{(\text{ОП}_{\text{кл. контроль}} - \text{ОП}_{\text{вир. контроль}})} \times 100 (\%)$$

Значимым для проявления противовирусной активности считали ингибирование вирусной репродукции 30% и более. Концентрацию препарата, уменьшающую значение величины ОП на 50% принимали за ИК₅₀.

В качестве препарата сравнения использовали лекарственную форму гидроксихлорохина, для исследования была выбрана концентрация 10 мкг/мл, соответствующая его ИК₅₀ [34, 44].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение цитотоксического действия образцов в культуре клеток Vero CCL81

В первой серии опытов была изучена цитотоксичность различных разведений тестируемых препаратов. Использовали линию клеток Vero CCL81, в которой в дальнейшем определяли противовирусную активность. После инкубации в течение 72 ч визуальная оценка при помощи инвертированного микроскопа показала, что в клеточных контролях не было отмечено цитотоксических и морфологических изменений, а также нарушений клеточного монослоя. В экспериментальных лунках при части концентраций соединений было отмечено частичное разрушение монослоя, клетки были более округлые и морфологически отличались от клеточного контроля, в части лунок наблюдалось полное разрушение клеточного монослоя. Проведенные исследования с использованием более точного количественного метода с окрашиванием клеток МТТ подтвердили данные, полученные при визуальном изучении состояния клеток. На основании полученных данных определения цитотоксического действия смеси в культуре клеток с использованием метода окрашивания красителем МТТ построены кривые доза-ответ (рис. 1), из которых выведены значения МПК и ЦТД₅₀, составляющие 1 : 500 и менее 1 : 2 для трехдневной инкубации и 1 : 50 и менее 1 : 2 для пятидневной инкубации соответственно. Поскольку метод с использованием МТТ применяют и для определения противовирусной активности, при инкубации в течение пяти суток для исключения эффекта цитотоксичности смеси для контроля к клеткам были добавлены такие же разведения образцов в таком же объеме и при таком же времени инкубации, как и в методе определения противовирусной активности при отсутствии инфицирования клеток.

Противовирусная активность смеси активных действующих веществ в отношении коронавируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero CCL81

Изучение противовирусного действия препаратов в культуре клеток Vero CCL81 в отношении коронавируса SARS-CoV-2 было проведено с использованием метода ингибирования ЦПД вируса, выявляемого окрашиванием МТТ. Для заражения клеток использовали две множественности заражения — 100 MOI и 20 MOI. Ингибирование наблюдали при разведении не более чем в 15 раз для обоих вариантов заражения. Полученные

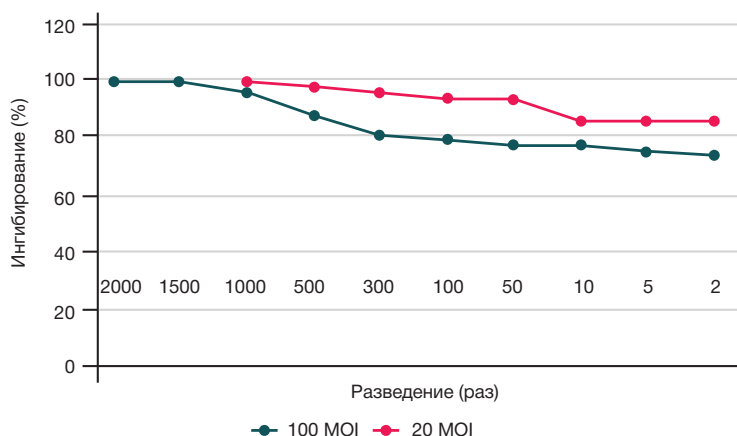


Рис. 1. Цитотоксичность различных разведений смеси активных действующих веществ в культуре клеток Vero CCL81 при инкубации в течение трех и пяти суток

данные представлены на рис. 2. Добавление смеси к клеткам значительно (более 30% ингибирования вирусной репродукции) подавляло размножение коронавируса SARS-CoV-2. При этом взятый в качестве препарата сравнения гидроксихлорохин в концентрации 10 мкг/мл ингибировал размножение коронавируса SARS-CoV-2 на 65% (данные не показаны).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ряд исследований показал, что в дополнение к АПФ2 для инфекции SARS-CoV-2 необходимы другие корецепторы или клеточные молекулы [45]. На данный момент полный их перечень неизвестен. Первичный этап проникновения вируса в клетку часто инициирован низкоаффинным связыванием с сайтами прикрепления, что способствует концентрации вирионов на поверхности клетки. Последующее связывание с высокоаффинным рецептором запускает проникновение в клетку [46, 47]. Исследование задействованных SARS-CoV-2 молекулярных механизмов при инфицировании клеток выявило ряд препаратов, с помощью которых можно ингибировать инфекцию.

Исследуемая смесь на основе артемизинина, азитромицина и лактоферрина малотоксична и значимо ингибирует заражение и репликацию SARS-CoV-2 *in vitro*. Предполагается, что механизмы его действия опосредованы

входящими в состав активными действующими веществами. Связывание с рецепторами проникновения SARS-CoV-2 и ингибирование функций вирусных белков могут лежать в основе профилактики инфицирования клеток SARS-CoV-2, так как влияют на ассоциированные с ними сигнальные системы и пути, включающие NF-κB, PI3K/AKT, различные регуляторные факторы интерферона и продукцию провоспалительных цитокинов [23, 24]. Кроме того, снижение активности фурина азитромицином значительно снижает клеточное инфицирование, при этом азитромицин может подщелачивать везикулы, содержащие вирионы SARS-CoV-2, и предотвращать pH-зависимое слияние мембран.

ВЫВОДЫ

Нами было показано, что смесь активных действующих веществ на основе азитромицина, лактоферрина и артемизинина при инкубации в культуре клеток Vero CCL 81 в течение трех и пяти суток малотоксична. Жизнеспособность клеток при всех разведениях была не нарушена более чем на 10–30%, значения ЦТД₅₀ оценивались ниже, чем минимально возможное для изучения разведение 1 : 2. При высокой (100 MOI) и низкой (20 MOI) множественностях заражения в культуре клеток Vero CCL 81 исследованная смесь оказывала значимый эффект на вирусную репродукцию SARS-CoV-2, ИК50 оценивалась в обоих случаях как разведение 1 : 2.

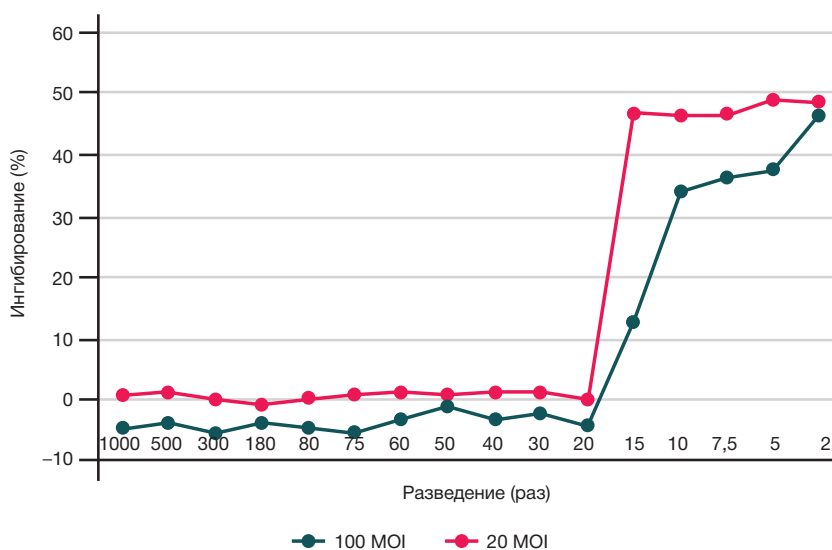


Рис. 2. Противовирусная активность смеси активных действующих веществ в культуре клеток Vero CCL81, инфицированных 20 MOI и 100 MOI коронавируса SARS-CoV-2

Таким образом, ИК₅₀ смеси достигается при следующей концентрации действующих веществ: азитромицин — 3 ммоль/л, лактоферрин — 5 мг/л и артемизинин — 7,5 ммоль/л.

Подробные молекулярные механизмы инфицирования клеток вирионами SARS-CoV-2 остаются до конца нераскрытыми, однако комбинированные смеси имеют преимущества за счет синергических эффектов входящих в состав компонентов. Полученные результаты для смеси на основе артемизинина, азитромицина и лактоферрина *in vitro* демонстрируют, что она представляет собой

перспективный действенный адьювантный терапевтический инструмент для лечения и профилактики COVID-19. Теоретические предпосылки и продемонстрированная в настоящем исследовании противовирусная активность смеси артемизинина, азитромицина и лактоферрина побуждают к планированию дальнейших доклинических и клинических исследований, направленных на изучение безопасности, реальной противовирусной активности *in vivo* против SARS-CoV-2, а также на определение режимов дозирования препарата и его комбинирование с другими противовирусными лекарственными средствами.

Литература

- Martinez MA. Compounds with Therapeutic Potential against Novel Respiratory 2019 Coronavirus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020; 64 (5): e00399-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00399-20>.
- Convertino I, Tuccori M, Ferraro S, Valdiserra G, Cappello E, Focosi D, et al. Exploring pharmacological approaches for managing cytokine storm associated with pneumonia and acute respiratory distress syndrome in COVID-19 patients. *Crit Care.* 2020; 24 (1): 331. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03020-3>.
- Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» версия 16 от 18.08.2022. 2022; 249 с.
- Weisblum Y, Schmidt F, Zhang F, DaSilva J, Poston D, Lorenzi JC, et al. Escape from neutralizing antibodies by SARS-CoV-2 spike protein variants. *Elife.* 2020; 9: e61312. Available from: <https://doi.org/10.7554/eLife.61312>.
- Zhang Q, Xiang R, Huo S, Zhou Y, Jiang S, Wang Q, et al. Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2021; 6 (1): 233. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00653-w>.
- Lokhande KB, Apte GR, Shrivastava A, Singh A, Pal JK, K Venkateswara Swamy, et al. Sensing the interactions between carbohydrate-binding agents and N-linked glycans of SARS-CoV-2 spike glycoprotein using molecular docking and simulation studies. *J Biomol Struct Dyn.* 2022; 40 (9): 3880–98. Available from: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1851303>.
- Kim CH. SARS-CoV-2 Evolutionary Adaptation toward Host Entry and Recognition of Receptor O-Acetyl Sialylation in Virus-Host Interaction. *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (12): 4549. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms21124549>.
- Clausen TM, Sandoval DR, Spliid CB, Pihl J, Perrett HR, Painter CD, et al. SARS-CoV-2 Infection Depends on Cellular Heparan Sulfate and ACE2. *Cell.* 2020; 183 (4): 1043–57. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.033>.
- Cagno V, Tseligka ED, Jones ST, Tapparel C. Heparan Sulfate Proteoglycans and Viral Attachment: True Receptors or Adaptation Bias? *Viruses.* 2019; 11 (7): 596. Available from: <https://doi.org/10.3390/v11070596>.
- Tree JA, Turnbull JE, Buttigieg KR, Elmore MJ, Coombes N, Hogwood J, et al. Unfractionated heparin inhibits live wild type SARS-CoV-2 cell infectivity at therapeutically relevant concentrations. *Br J Pharmacol.* 2021; 178 (3): 626–35. <https://doi.org/10.1111/bph.15304>.
- Kim SY, Jin W, Sood A, Montgomery DW, Grant OC, Fuster MM, et al. Characterization of heparin and severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) spike glycoprotein binding interactions. *Antiviral Res.* 2020; 181: 104873. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104873>.
- Ori A, Wilkinson MC, Fernig DG. The heparanome and regulation of cell function: structures, functions and challenges. *Front Biosci.* 2008; 13: 4309–38. Available from: <https://doi.org/10.2741/3007>.
- Rudd TR, Preston MD, Yates EA. The nature of the conserved basic amino acid sequences found among 437 heparin binding proteins determined by network analysis. *Mol Biosyst.* 2017; 13 (5): 852–65. Available from: <https://doi.org/10.1039/c6mb00857g>.
- Meneghetti MC, Hughes AJ, Rudd TR, Nader HB, Powell AK, Yates EA, et al. Heparan sulfate and heparin interactions with proteins. *J R Soc Interface.* 2015; 12 (110): 0589. Available from: <https://doi.org/10.1098/rsif.2015.0589>.
- Zhang Q, Chen CZ, Swaroop M, Xu M, Wang L, Lee J, et al. Heparan sulfate assists SARS-CoV-2 in cell entry and can be targeted by approved drugs *in vitro*. *Cell Discov.* 2020; 6 (1): 80. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41421-020-00222-5>.
- Salaris C, Scarpa M, Elli M, Bertolini A, Guglielmetti S, Pregliasco F, et al. Protective Effects of Lactoferrin against SARS-CoV-2 Infection *In Vitro*. *Nutrients.* 2021; 13 (2): 328. Available from: <https://doi.org/10.3390/nu13020328>.
- Kell DB, Heyden EL, Pretorius E. The Biology of Lactoferrin, an Iron-Binding Protein That Can Help Defend Against Viruses and Bacteria. *Front Immunol.* 2020; 11: 1221. Available from: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01221>.
- Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol.* 2014; 5: 461. Available from: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>.
- Channappanavar R, Fehr AR, Zheng J, Wohlford-Lenane C, Abrahante JE, Mack M, et al. IFN-I response timing relative to virus replication determines MERS coronavirus infection outcomes. *J Clin Invest.* 2019; 129 (9): 3625–39. Available from: <https://doi.org/10.1172/JCI126363>.
- Sano E, Miyauchi R, Takakura N, Yamauchi K, Murata E, Trang Le Q, et al. Cysteine protease inhibitors in various milk preparations and its importance as a food. *Food Research International*, 2005: 38 (4): 427–33, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.10.011>.
- Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun.* 2020; 11 (1): 1620. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15562-9>.
- Ulrich H, Pillat MM. CD147 as a Target for COVID-19 Treatment: Suggested Effects of Azithromycin and Stem Cell Engagement. *Stem Cell Rev Rep.* 2020; 16 (3): 434–40. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12015-020-09976-7>.
- Chen Y, Zhang H, Gou X, Horikawa Y, Xing J, Chen Z. Upregulation of HAb18G/CD147 in activated human umbilical vein endothelial cells enhances the angiogenesis. *Cancer Lett.* 2009; 278 (1): 113–21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.01.004>.
- Fang F, Wang L, Zhang S, Fang Q, Hao F, Sun Y. CD147 modulates autophagy through the PI3K/Akt/mTOR pathway in human prostate cancer PC-3 cells. *Oncol Lett.* 2015; 9 (3): 1439–43. Available from: <https://doi.org/10.3892/ol.2015.2849>.
- Wilms EB, Touw DJ, Heijerman HG. Pharmacokinetics of azithromycin in plasma, blood, polymorphonuclear neutrophils and sputum during long-term therapy in patients with cystic fibrosis. *Ther Drug Monit.* 2006; 28 (2): 219–25. Available from: <https://doi.org/10.1097/01.ftd.0000195617.69721.a5>.
- Tsai WC, Rodriguez ML, Young KS. Azithromycin blocks neutrophil recruitment in *Pseudomonas* endobronchial infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 170 (12): 1331–9. Available

- from: <https://doi.org/10.1164/rccm.200402-2000C>
27. Culic O, Erakovic V, Cepelak I. Azithromycin modulates neutrophil function and circulating inflammatory mediators in healthy human subjects. *Eur J Pharmacol.* 2002; 450 (3): 277–89. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)02042-3](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)02042-3).
 28. Tsai WC, Standiford TJ. Immunomodulatory effects of macrolides in the lung: lessons from in-vitro and in-vivo models. *Curr Pharm des.* 2004; 10 (25): 3081–93. Available from: <https://doi.org/10.2174/1381612043383430>.
 29. Stamatou R, Paraskeva E, Boukas K, Gourgoulianis KI, Molyvdas PA, Hatziefthimiou AA. Azithromycin has an antiproliferative and autophagic effect on airway smooth muscle cells. *Eur Respir J.* 2009; 34 (3): 721–30. Available from: <https://doi.org/10.1183/09031936.00089407>.
 30. Cigana C, Assael BM, Melotti P. Azithromycin selectively reduces tumor necrosis factor alpha levels in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51 (3): 975–81. Available from: <https://doi.org/10.1128/AAC.01142-06>.
 31. Halldorsson S, Gudjonsson T, Gottfredsson M, Singh PK, Gudmundsson GH, Baldursson O. Azithromycin maintains airway epithelial integrity during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010; 42 (1): 62–8. Available from: <https://doi.org/10.1165/rncmb.2008-0357OC>
 32. Pani A, Lauriola M, Romandini A, Scaglione F. Macrolides and viral infections: focus on azithromycin in COVID-19 pathology. *Int J Antimicrob Agents.* 2020; 56 (2): 106053. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106053>
 33. Khoshnood S, Shirani M, Dalir A, Moradi M, Haddadi M, Sadeghifard N, et al. Antiviral effects of azithromycin: A narrative review. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2022; 147: 112682. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112682>.
 34. Wang M, Cao R, Zhang L, Yang X, Liu J, Xu M, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res.* 2020; 30 (3): 269–71. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0282-0>.
 35. Hedy SA, Safar MM, Bahgat AK. Hydroxychloroquine antiparkinsonian potential: Nurr1 modulation versus autophagy inhibition. *Behav Brain Res.* 2019; 365: 82–88. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.02.033>.
 36. Efferth T, Marschall M, Wang X, Huong SM, Hauber I, Olbrich A, et al. Antiviral activity of artesunate towards wild-type, recombinant, and ganciclovir-resistant human cytomegaloviruses. *J Mol Med (Berl).* 2002; 80 (4): 233–42. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00109-001-0300-8>.
 37. Aldieri E, Atragne D, Bergandi L, Riganti C, Costamagna C, Bosia A, et al. Artemisinin inhibits inducible nitric oxide synthase and nuclear factor NF- κ B activation. *FEBS Lett.* 2003; 552: 141–4. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00905-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00905-0)
 38. Nunes JJ, Pandey SK, Yadav A, Goel S, Ateeq B. Targeting NF- κ B Signaling by Artesunate Restores Sensitivity of Castrate-Resistant Prostate Cancer Cells to Antiandrogens. *Neoplasia.* 2017; 19 (4): 333–45. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.02.002>.
 39. Gendrot M, Duflot I, Boxberger M, Delandre O, Jardot P, Le Bideau M, et al. Antimalarial artemisinin-based combination therapies (ACT) and COVID-19 in Africa: In vitro inhibition of SARS-CoV-2 replication by mefloquine-artesunate. *Int J Infect Dis.* 2020; 99: 437–40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.08.032>.
 40. Rolta R, Salaria D, Sharma P, Sharma B, Kumar V, Rathi B, et al. Phytocompounds of *Rheum emodi*, *Thymus serpyllum*, and *Artemisia annua* Inhibit Spike Protein of SARS-CoV-2 Binding to ACE2 Receptor: In Silico Approach. *Curr Pharmacol Rep.* 2021; 7 (4): 135–49. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40495-021-00259-4>.
 41. Uckun FM, Saund S, Windlass H, Trieu V. Repurposing Anti-Malaria Phytomedicine Artemisinin as a COVID-19 Drug. *Front Pharmacol.* 2021; 12: 649532. Available from: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.649532>.
 42. Fuzimoto AD. An overview of the anti-SARS-CoV-2 properties of *Artemisia annua*, its antiviral action, protein-associated mechanisms, and repurposing for COVID-19 treatment. *J Integr Med.* 2021; 19 (5): 375–88. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joim.2021.07.003>.
 43. Ribaud G, Coghi P, Yang LJ, Ng JPL, Mastinu A, Memo M, et al. Computational and experimental insights on the interaction of artemisinin, dihydroartemisinin and chloroquine with SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain (RBD). *Nat Prod Res.* 2021; 12: 1–6. Available from: <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1925894>.
 44. Gendrot M, Andreani J, Boxberger M, Jardot P, Fonta I, Le Bideau M, et al. Antimalarial drugs inhibit the replication of SARS-CoV-2: An in vitro evaluation. *Trav Med Infect Dis.* 2020; 37: 101873. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101873>.
 45. Chen J, Subbarao K. The Immunobiology of SARS*. *Annu Rev Immunol.* 2007; 25: 443–72. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141706>.
 46. Sapp M, Bienkowska-Haba M. Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *FEBS J.* 2009; 276 (24): 7206–16. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07400.x>.
 47. Leistner CM, Gruen-Bernhard S, Glebe D. Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. *Cell Microbiol.* 2008; 10 (1): 122–33. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01023.x>.

References

1. Martinez MA. Compounds with Therapeutic Potential against Novel Respiratory 2019 Coronavirus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020; 64 (5): e00399-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00399-20>.
2. Convertino I, Tuccori M, Ferraro S, Valdiserra G, Cappello E, Focosi D, et al. Exploring pharmacological approaches for managing cytokine storm associated with pneumonia and acute respiratory distress syndrome in COVID-19 patients. *Crit Care.* 2020; 24 (1): 331. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03020-3>.
3. Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» версия 16 от 18.08.2022. 2022; 249 с.
4. Weisblum Y, Schmidt F, Zhang F, DaSilva J, Poston D, Lorenzi JC, et al. Escape from neutralizing antibodies by SARS-CoV-2 spike protein variants. *Elife.* 2020; 9: e61312. Available from: <https://doi.org/10.7554/eLife.61312>.
5. Zhang Q, Xiang R, Huo S, Zhou Y, Jiang S, Wang Q, et al. Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2021; 6 (1): 233. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00653-w>.
6. Lokhande KB, Apte GR, Shrivastava A, Singh A, Pal JK, K Venkateswara Swamy, et al. Sensing the interactions between carbohydrate-binding agents and N-linked glycans of SARS-CoV-2 spike glycoprotein using molecular docking and simulation studies. *J Biomol Struct Dyn.* 2022; 40 (9): 3880–98. Available from: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1851303>.
7. Kim CH. SARS-CoV-2 Evolutionary Adaptation toward Host Entry and Recognition of Receptor O-Acetyl Sialylation in Virus-Host Interaction. *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (12): 4549. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms21124549>.
8. Clausen TM, Sandoval DR, Spliid CB, Pihl J, Perrett HR, Painter CD, et al. SARS-CoV-2 Infection Depends on Cellular Heparan Sulfate and ACE2. *Cell.* 2020; 183 (4): 1043–57. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.033>.
9. Cagno V, Tseligka ED, Jones ST, Tapparel C. Heparan Sulfate Proteoglycans and Viral Attachment: True Receptors or Adaptation Bias? *Viruses.* 2019; 11 (7): 596. Available from: <https://doi.org/10.3390/v11070596>.
10. Tree JA, Turnbull JE, Buttigieg KR, Elmore MJ, Coombes N, Hogwood J, et al. Unfractionated heparin inhibits live wild type SARS-CoV-2 cell infectivity at therapeutically relevant

- concentrations. *Br J Pharmacol*. 2021; 178 (3): 626–35. <https://doi.org/10.1111/bph.15304>.
11. Kim SY, Jin W, Sood A, Montgomery DW, Grant OC, Fuster MM, et al. Characterization of heparin and severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) spike glycoprotein binding interactions. *Antiviral Res*. 2020; 181: 104873. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104873>.
 12. Ori A, Wilkinson MC, Fernig DG. The heparanome and regulation of cell function: structures, functions and challenges. *Front Biosci*. 2008; 13: 4309–38. Available from: <https://doi.org/10.2741/3007>.
 13. Rudd TR, Preston MD, Yates EA. The nature of the conserved basic amino acid sequences found among 437 heparin binding proteins determined by network analysis. *Mol Biosyst*. 2017; 13 (5): 852–65. Available from: <https://doi.org/10.1039/c6mb00857g>.
 14. Meneghetti MC, Hughes AJ, Rudd TR, Nader HB, Powell AK, Yates EA, et al. Heparan sulfate and heparin interactions with proteins. *J R Soc Interface*. 2015; 12 (110): 0589. Available from: <https://doi.org/10.1098/rsif.2015.0589>.
 15. Zhang Q, Chen CZ, Swaroop M, Xu M, Wang L, Lee J, et al. Heparan sulfate assists SARS-CoV-2 in cell entry and can be targeted by approved drugs in vitro. *Cell Discov*. 2020; 6 (1): 80. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41421-020-00222-5>.
 16. Salaris C, Scarpa M, Elli M, Bertolini A, Guglielmetti S, Pregliasco F, et al. Protective Effects of Lactoferrin against SARS-CoV-2 Infection *In Vitro*. *Nutrients*. 2021; 13 (2): 328. Available from: <https://doi.org/10.3390/nu13020328>.
 17. Kell DB, Heyden EL, Pretorius E. The Biology of Lactoferrin, an Iron-Binding Protein That Can Help Defend Against Viruses and Bacteria. *Front Immunol*. 2020; 11: 1221. Available from: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01221>.
 18. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol*. 2014; 5: 461. Available from: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>.
 19. Channappanavar R, Fehr AR, Zheng J, Wohlford-Lenane C, Abrahamte JE, Mack M, et al. IFN-I response timing relative to virus replication determines MERS coronavirus infection outcomes. *J Clin Invest*. 2019; 129 (9): 3625–39. Available from: <https://doi.org/10.1172/JCI126363>.
 20. Sano E, Miyauchi R, Takakura N, Yamauchi K, Murata E, Trang Le Q, et al. Cysteine protease inhibitors in various milk preparations and its importance as a food. *Food Research International*, 2005; 38 (4): 427–33, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.10.011>.
 21. Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun*. 2020; 11 (1): 1620. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15562-9>.
 22. Ulrich H, Pillat MM. CD147 as a Target for COVID-19 Treatment: Suggested Effects of Azithromycin and Stem Cell Engagement. *Stem Cell Rev Rep*. 2020; 16 (3): 434–40. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12015-020-09976-7>.
 23. Chen Y, Zhang H, Gou X, Horikawa Y, Xing J, Chen Z. Upregulation of HAB18G/CD147 in activated human umbilical vein endothelial cells enhances the angiogenesis. *Cancer Lett*. 2009; 278 (1): 113–21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.01.004>.
 24. Fang F, Wang L, Zhang S, Fang Q, Hao F, Sun Y. CD147 modulates autophagy through the PI3K/Akt/mTOR pathway in human prostate cancer PC-3 cells. *Oncol Lett*. 2015; 9 (3): 1439–43. Available from: <https://doi.org/10.3892/ol.2015.2849>.
 25. Wilms EB, Touw DJ, Heijerman HG. Pharmacokinetics of azithromycin in plasma, blood, polymorphonuclear neutrophils and sputum during long-term therapy in patients with cystic fibrosis. *Ther Drug Monit*. 2006; 28 (2): 219–25. Available from: <https://doi.org/10.1097/01.ftd.0000195617.69721.a5>.
 26. Tsai WC, Rodriguez ML, Young KS. Azithromycin blocks neutrophil recruitment in *Pseudomonas* endobronchial infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004; 170 (12): 1331–9. Available from: <https://doi.org/10.1164/rccm.200402-2000C>.
 27. Culic O, Erakovic V, Cepelak I. Azithromycin modulates neutrophil function and circulating inflammatory mediators in healthy human subjects. *Eur J Pharmacol*. 2002; 450 (3): 277–89. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)02042-3](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)02042-3).
 28. Tsai WC, Standiford TJ. Immunomodulatory effects of macrolides in the lung: lessons from in-vitro and in-vivo models. *Curr Pharm des*. 2004; 10 (25): 3081–93. Available from: <https://doi.org/10.2174/1381612043383430>.
 29. Stamatou R, Paraskeva E, Boukas G, Gourgoulialis KI, Molyvdas PA, Hatziefthimiou AA. Azithromycin has an antiproliferative and autophagic effect on airway smooth muscle cells. *Eur Respir J*. 2009; 34 (3): 721–30. Available from: <https://doi.org/10.1183/09031936.00089407>.
 30. Cigana C, Assael BM, Melotti P. Azithromycin selectively reduces tumor necrosis factor alpha levels in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51 (3): 975–81. Available from: <https://doi.org/10.1128/AAC.01142-06>.
 31. Halldorsson S, Gudjonsson T, Gottfredsson M, Singh PK, Gudmundsson GH, Baldursson O. Azithromycin maintains airway epithelial integrity during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010; 42 (1): 62–8. Available from: <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0357OC>.
 32. Pani A, Lauriola M, Romandini A, Scaglione F. Macrolides and viral infections: focus on azithromycin in COVID-19 pathology. *Int J Antimicrob Agents*. 2020; 56 (2): 106053. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106053>.
 33. Khoshnood S, Shirani M, Dalir A, Moradi M, Haddadi M, Sadeghifard N, et al. Antiviral effects of azithromycin: A narrative review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022; 147: 112682. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112682>.
 34. Wang M, Cao R, Zhang L, Yang X, Liu J, Xu M, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res*. 2020; 30 (3): 269–71. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0282-0>.
 35. Hedy SA, Safar MM, Bahgat AK. Hydroxychloroquine antiparkinsonian potential: Nurr1 modulation versus autophagy inhibition. *Behav Brain Res*. 2019; 365: 82–88. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.02.033>.
 36. Eferth T, Marschall M, Wang X, Huong SM, Hauber I, Olbrich A, et al. Antiviral activity of artesunate towards wild-type, recombinant, and ganciclovir-resistant human cytomegaloviruses. *J Mol Med (Berl)*. 2002; 80 (4): 233–42. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00109-001-0300-8>.
 37. Aldieri E, Atragene D, Bergandi L, Riganti C, Costamagna C, Bosia A, et al. Artemisinin inhibits inducible nitric oxide synthase and nuclear factor NF- κ B activation. *FEBS Lett*. 2003; 552: 141–4. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00905-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00905-0).
 38. Nunes JJ, Pandey SK, Yadav A, Goel S, Ateeq B. Targeting NF- κ B Signaling by Artesunate Restores Sensitivity of Castrate-Resistant Prostate Cancer Cells to Antiandrogens. *Neoplasia*. 2017; 19 (4): 333–45. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.02.002>.
 39. Gendrot M, Duflo I, Boxberger M, Delandre O, Jardot P, Le Bideau M, et al. Antimalarial artemisinin-based combination therapies (ACT) and COVID-19 in Africa: In vitro inhibition of SARS-CoV-2 replication by mefloquine-artesunate. *Int J Infect Dis*. 2020; 99: 437–40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.08.032>.
 40. Roita R, Salaria D, Sharma P, Sharma B, Kumar V, Rathi B, et al. Phytocompounds of *Rheum emodi*, *Thymus serpyllum*, and *Artemisia annua* Inhibit Spike Protein of SARS-CoV-2 Binding to ACE2 Receptor: In Silico Approach. *Curr Pharmacol Rep*. 2021; 7 (4): 135–49. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40495-021-00259-4>.
 41. Uckun FM, Saund S, Windlass H, Trieu V. Repurposing Anti-Malaria Phytomedicine Artemisinin as a COVID-19 Drug. *Front Pharmacol*. 2021; 12: 649532. Available from: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.649532>.
 42. Fuzimoto AD. An overview of the anti-SARS-CoV-2 properties of *Artemisia annua*, its antiviral action, protein-associated mechanisms, and repurposing for COVID-19 treatment. *J Integr Med*. 2021; 19 (5): 375–88. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joim.2021.07.003>.
 43. Ribaudo G, Coghi P, Yang LJ, Ng JPL, Mastinu A, Memo M, et al. Computational and experimental insights on the interaction of artemisinin, dihydroartemisinin and chloroquine with SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain (RBD). *Nat Prod Res*. 2021; 12: 1–6. Available from: <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1925894>.

44. Gendrot M, Andreani J, Boxberger M, Jardot P, Fonta I, Le Bideau M, et al. Antimalarial drugs inhibit the replication of SARS-CoV-2: An in vitro evaluation. *Trav Med Infect Dis.* 2020; 37: 101873. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101873>.
45. Chen J, Subbarao K. The Immunobiology of SARS*. *Annu Rev Immunol.* 2007; 25: 443–72. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141706>.
46. Sapp M, Bienkowska-Haba M. Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *FEBS J.* 2009; 276 (24): 7206–16. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07400.x>.
47. Leistner CM, Gruen-Bernhard S, Glebe D. Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. *Cell Microbiol.* 2008; 10 (1): 122–33. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01023.x>.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИОФАГОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, КОДИРУЮЩИХ ПОЛИСАХАРИД-ДЕПОЛИМЕРАЗЫ С УНИКАЛЬНОЙ КАПСУЛЬНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ

Р. Б. Городничев¹✉, М. А. Корниенко¹, Д. А. Беспятых¹, М. В. Малахова¹, В. А. Веселовский¹, О. В. Голощапов², А. Б. Чухловин^{2,3}, Ю. А. Беспятых¹, Е. А. Шитиков¹

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

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

³ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

Бактериальные инфекции, вызываемые устойчивыми к антибиотикам штаммами *Klebsiella pneumoniae*, входят в список самых опасных угроз для мирового общественного здравоохранения. Одним из альтернативных способов терапии инфекций, вызванных *K. pneumoniae*, может стать терапия бактериофагами и/или их производными. Целью работы было выделить из внешней среды и охарактеризовать капсуло-специфичные бактериофаги *K. pneumoniae*, пригодные для терапевтического применения и несущие гены полисахарид-деполимераз. Бактериофаги выделяли из проб речной воды методом накопительных культур. Спектр хозяев бактериофагов оценивали на коллекции из 180 клинических штаммов *K. pneumoniae*. Полногеномное секвенирование бактериофагов выполняли на платформе MiSeq (Illumina). В рамках исследования выделено и охарактеризовано четыре новых бактериофага, принадлежащих к различным таксономическим группам: vB_KpnM_NDO71 (подсемейство *Vequintavirinae*), vB_KpnS_MAG26fr (семейство *Casjensviridae*), vB_KpnS_MDA2066 (семейство *Ackermannviridae*) и vB_KpnS_PMM-G3 (семейство *Drexelviridae*). Бактериофаги vB_KpnM_NDO71, vB_KpnS_MAG26fr и vB_KpnS_PMM-G3 обладали узким спектром литической активности и лизировали все штаммы с капсульным типом штамма хозяина: KL45, KL19 или KL28 соответственно. Бактериофаг vB_KpnS_MDA2066 проявлял литическую активность в отношении штаммов двух различных капсульных типов: KL19 и KL107. Бактериофаги обладали строго вирулентной природой и не несли в своем составе генов интеграз, а также потенциально опасных генов токсинов и детерминант устойчивости к антибиотикам, что позволяет применять их в терапевтической практике. Для каждого бактериофага предсказаны рецептор-связывающие белки, представленные полисахарид-деполимеразы.

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

Финансирование: исследование выполнено за счет средств, предоставленных для выполнения государственного задания «Разработка комплексной схемы терапии лекарственно-устойчивых возбудителей инфекционных заболеваний с применением бактериофагов или их производных в сочетании с антибактериальными препаратами» (шифр: Бактериофаг-2). Типирование штаммов *Klebsiella pneumoniae* выполнено за счет гранта Российского научного фонда №22-15-00149, <https://rscf.ru/project/22-15-00149/>.

Вклад авторов: Р. Б. Городничев, М. А. Корниенко — план исследований, набор и обработка данных, написание статьи; Д. А. Беспятых — обработка данных; М. В. Малахова — набор данных; В. А. Веселовский, О. В. Голощапов, А. Б. Чухловин, Ю. А. Беспятых — набор и обработка данных, Е. А. Шитиков — план исследований, обработка данных, написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: экспериментальная работа выполнена с соблюдением норм Санитарно-эпидемиологических правил «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» СП 1.3.2322-08; Санитарно-эпидемиологических правил 1.3.2518-09 — «Дополнения и изменения № 1 к санитарно-эпидемиологическим правилам «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» СП 1.3.2322-08; Санитарно-эпидемиологических правил «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» СанПиН 2.1.7.2790-10, СанПиН 3.3686-21, СанПиН 2.1.3684-21, а также Федеральных клинических рекомендаций «Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике».

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

Статья получена: 17.10.2022 **Статья принята к печати:** 05.11.2022 **Опубликована онлайн:** 01.12.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.038

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* BACTERIOPHAGES ENCODING POLYSACCHARIDE DEPOLYMERASES WITH RARE CAPSULE SPECIFICITY

Gorodnichev RB¹✉, Kornienko MA¹, Bespiatykh DA¹, Malakhova MV¹, Veselovsky VA¹, Goloshchapov OV², Chukhlovin AB^{2,3}, Bespyatykh JA¹, Shitikov EA

¹ Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

³ Pediatric Research and Clinical Center of Infectious Diseases of the Federal Medical Biological Agency, Saint Petersburg, Russia

Bacterial infections caused by antibiotic resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* are among the most dangerous threats for the world's public healthcare. Treatment with bacteriophages and/or their derivatives could become one of the alternative methods for therapy of infections caused by *K. pneumoniae*. The study was aimed to isolate from the environment and characterize the capsule-specific *K. pneumoniae* bacteriophages that are useful for therapy and possess the polysaccharide depolymerase genes. Bacteriophages were isolated from the river water samples by enrichment method. The host range of bacteriophages were assessed using the collection of 180 *K. pneumoniae* clinical strains. Bacteriophage whole genome sequencing was performed on the MiSeq platform (Illumina). Four new bacteriophages from different taxonomic groups were isolated and characterized during the study: vB_KpnM_NDO71 (*Vequintavirinae* family), vB_KpnS_MAG26fr (*Casjensviridae* family), vB_KpnS_MDA2066 (*Ackermannviridae* family), and vB_KpnS_PMM-G3 (*Drexelviridae* family). Bacteriophages vB_KpnM_NDO71, vB_KpnS_MAG26fr, and vB_KpnS_PMM-G3 had a narrow lytic spectrum and lysed all strains with the capsular type of the host: KL45, KL19 or KL28, respectively. Bacteriophage vB_KpnS_MDA2066 showed lytic activity against strains with two different capsular types: KL19 and KL107. Bacteriophages were strictly virulent and contained no integrase genes, potentially dangerous toxin genes or antibiotic resistance determinants. This allows them to be used in therapeutic practice. Receptor-binding proteins represented by polysaccharide depolymerases were predicted for each bacteriophage.

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

Funding: the study was supported by the funds of the State Assignment "Development of the Scheme for Complex Therapy of Infectious Diseases Caused by Antibiotic Resistant Pathogens Involving the Use of Bacteriophages or Their Derivatives in Combination with Antibacterials" (code: Bacteriophage-2). Typing of *Klebsiella pneumoniae* strains was supported by the Russian Science Foundation (project No. 22-15-00149, <https://rscf.ru/project/22-15-00149/>).

Author contribution: Gorodnichev RB, Kornienko MA — study plan, data acquisition and processing, manuscript writing; Bespiatykh DA — data processing; Malakhova MV — data acquisition; Veselovsky VA, Goloshchapov OV, Chukhlovin AB, Bespyatykh JA — data acquisition and processing, Shitikov EA — study plan, data processing, manuscript writing.

Compliance with ethical standards: experimental work was carried out in compliance with the guidelines SP 1.3.2322-08 "Safety of Working With Microorganisms of III–IV Groups of Pathogenicity (Danger) and Causative Agents of Parasitic Diseases"; guidelines SP 1.3.2518-09 "Additions and Amendments № 1 to the guidelines SP 1.3.2322-08 "Safety of Working With Microorganisms of III–IV Groups of Pathogenicity (Danger) and Causative Agents of Parasitic Diseases"; guidelines "Sanitary and Epidemiologic Requirements for the Handling of Medical Waste" (SanPiN 2.1.7.2790-10 SanPiN 3.3686-21, SanPiN 2.1.3684-21); Federal Clinical Guidelines "Rational Use of Bacteriophages in Clinical and Epidemiological Practice".

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

Received: 17.10.2022 **Accepted:** 05.11.2022 **Published online:** 01.12.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.038

Klebsiella pneumoniae представляет собой грамотрицательную неподвижную факультативно-анаэробную бактерию, которая встречается повсеместно в природе и может быть обнаружена в составе нормальной флоры человека и животных [1, 2]. В то же время *K. pneumoniae* — второй по распространенности внутрибольничный патоген в мире, способный вызывать широкий спектр инфекций, таких как абсцессы, гнойные раны, септицемия, пневмония, инфекции мочевыводящих путей и желудочно-кишечного тракта [3]. В рамках российского исследования «Марафон 2015–2016» было показано, что штаммы *K. pneumoniae* преобладают (47,2%) среди всех нозокомиальных штаммов *Enterobacterales* [4]. По данным того же исследования и карты антибиотикорезистентности России [5], доля изолятов, устойчивых к карбапенемам, составляет 6,9–41,6%, к цефалоспорином III–IV поколения резистентны 80,1–90,2%, а к колистину — до 6,11%. Ассоциированные с устойчивостью к антибиотикам штаммы *K. pneumoniae* занимают третье место по уровню смертности среди бактерий, устойчивых к антибиотикам [6].

Одним из альтернативных видов терапии инфекций, вызванных *K. pneumoniae*, может стать терапия бактериофагами и/или их производными [7]. Бактериофаги — это наиболее распространенная и многочисленная группа вирусов, которые являются естественными паразитами бактерий в природных популяциях [8]. Благодаря способности бактериофагов заражать и лизировать клетки бактерий, их использовали в качестве антимикробного средства с момента открытия в начале XX в. [9]. Фаготерапия имеет ряд преимуществ, таких как способность лизировать бактерии вне зависимости от их устойчивости к антибиотикам и отсутствие побочных эффектов на организм пациента, что позволяет использовать бактериофаги даже для лечения детей и иммунокомпрометированных пациентов [10]. На сегодняшний день применение бактериофагов в терапевтических целях переживает второй подъем, и все чаще в литературе появляются описания успешных случаев лечения [11–13].

Помимо использования бактериофагов, на данный момент пристальное внимание уделяется отдельным фаговым белкам, эффективным против поверхностных структур бактерий. Одним из примеров могут служить полисахарид-деполимеразы [14]. Белки обладают способностью разрушать бактериальные капсульные полисахариды, тем самым сенсibiliзируют бактерии к действию антимикробных препаратов и иммунной системы [15]. Как правило, деполимеразы обладают узкой специфичностью, ограниченной конкретным типом полисахарида бактериальной капсулы [14]. В связи с этим поиск и описание бактериофагов, кодирующих деполимеразы против широкого круга капсульных типов клинически значимых бактерий, являются актуальной задачей новейших подходов к терапии инфекций, вызванных бактериями с множественной лекарственной устойчивостью.

Целью данной работы было выделить из внешней среды и охарактеризовать капсуло-специфичные бактериофаги бактерии *K. pneumoniae*, пригодные для терапевтического применения и несущие гены полисахарид-деполимераз.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы бактерий и их характеристика

В работе было использовано 180 клинических изолятов *K. pneumoniae*, собранных в течение 2019–2022 гг. в НИИ

детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачевой (Санкт-Петербург, Россия), Клинической больнице № 123 (Одинцово, Россия) и в том числе 12 штаммов, полученных из Государственной коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Оболensk, Россия).

Бактериальные штаммы культивировали в лизогенном бульоне (LB) (Himedia; Индия) при 37 °С. Видовую идентификацию проводили с помощью метода прямого масс-спектрометрического профилирования бактериального лизата по методике, описанной ранее [16]. Масс-спектры получали на времяпролетном масс-спектрометре Microflex (Bruker Daltonics; Германия). Для записи, обработки и анализа масс-спектров применяли программное обеспечение flexControl 3.0 и flexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics; Германия). Видовую идентификацию проводили с помощью программного обеспечения MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics; Германия). Тип капсулы *K. pneumoniae* определяли методом секвенирования гена *wzi* [17].

Выделение и очистка бактериофагов

В качестве источника фагов использовали образец речной воды. Для удаления бактериальной фракции образец центрифугировали (4000 g, 10 мин), супернатант фильтровали через фильтры 0,22 мкм (Merk Millipore; США). Равные аликвоты (15 мл) фильтрованной воды и бульона LB двойной концентрации смешивали и инокулировали 20 мкл ночной культурой потенциального штамма хозяина. Смесь инкубировали в течение ночи на шейкере-качалке при 37 °С. Полученную суспензию стерилизовали с помощью фильтра 0,22 мкм, а наличие бактериофагов в фильтрате проверяли методом спот-тестирования [18]. Фаговые изоляты очищали тройным проведением через единичную колонию.

Определение спектра литической активности

Спектр литической активности для бактериофагов был установлен методом спот-тестирования [18]. Для этого 100 мкл культуры каждого штамма на логарифмической фазе роста добавляли к 5 мл незастывшего полужидкого LB-агара (0,7% агара) и наносили на чашки Петри, содержащие тонкий слой LB агара (1,5% агара). Тестирование проводили путем нанесения по 5 мкл серийных разведений бактериофагов на поверхность свежезасеянных газонов штаммов. Чашки инкубировали в течение ночи при 37 °С, наличие литической активности у бактериофага определяли по наличию зоны сплошного лизиса бактериальных клеток, совпадающей с формой капли. Наличие полупрозрачного ареола вокруг зоны лизиса или единичной колонии бактериофага интерпретировали как полисахарид-деполимеразную активность бактериофага.

Полногеномное секвенирование бактериофагов и биоинформатический анализ данных

Экстракцию геномной ДНК фага проводили с использованием стандартного протокола фенол-хлороформной экстракции [19]. Процедуру секвенирования осуществляли с помощью инструмента MiSeq (Illumina; США) с использованием набора реагентов для секвенирования MiSeq Reagent Nano Kit v2 (500cycle) (Illumina; США) согласно рекомендациям производителя. Сборку геномов проводили с помощью программы SPAdes (v.3.14.0). Для идентификации

открытых рамок считывания (ОРС) в геноме использовали веб-сервис GeneMarkS (версия 4.32). Поиск генов тРНК проводили с помощью ARAGORN.

Аннотацию предсказанных генов проводили вручную с использованием BLASTp, HHPred и InterPro. Отсутствие генов токсинов и детерминант устойчивости к антибиотикам подтверждали сравнением с базами данных факторов вирулентности патогенных бактерий [20] и генов устойчивости к антибиотикам [21]. Аннотированные последовательности геномов бактериофагов vB_KpnM_NDO71, vB_KpnS_MAG26fr, vB_KpnS_MDA2066 и vB_KpnS_PMM-G3 были депонированы в базу GenBank под номерами OP558001, OP558002, OP558003 и OP558005 соответственно.

Филогенетический анализ выполняли с использованием 62 референсных геномов бактериофагов, рекомендованных Международным комитетом по таксономии вирусов (ICTV, от англ. International Committee on Taxonomy of Viruses). Филогенетические деревья на основе попарных расстояний между геномами фагов были построены с использованием автономной версии ViPTree v.1.1.2. [22]. Ближайшие гомологи бактериофагов определяли с помощью алгоритма BLASTn. Для сравнительного анализа последовательностей отдельных белков использовали сервисы BLASTp.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение, морфология и спектр литической активности бактериофагов *K. pneumoniae*

Из образца воды реки Лихоборка (Москва) методом накопительных культур были выделены четыре бактериофага *K. pneumoniae*: vB_KpnM_NDO71, vB_KpnS_MAG26fr, vB_KpnS_MDA2066 и vB_KpnS_PMM-G3. В качестве штаммов хозяев были использованы выделенные в 2020 г. клинические штаммы с определенными капсульными типами: *K. pneumoniae* Kp71 (капсульный тип KL45), Kp26f (KL19), Kp2066 (KL107) и KpG3 (KL28).

Бактериофаг vB_KpnM_NDO71 формировал мелкие (0,5 мм) негативные колонии, окруженные широким (2–4 мм) ореолом. Негативные колонии бактериофага vB_KpnS_PMM-G3 были значительно крупнее (1–2 мм) и окружены широким (4–5 мм) ореолом. Бактериофаги vB_KpnS_MAG26fr и vB_KpnS_MDA2066 формировали мелкие (0,5 мм) негативные колонии, окруженные небольшим (1–2 мм) ореолом (рис. 1).

Спектр литической активности бактериофагов был оценен на коллекции из 180 штаммов *K. pneumoniae* с известным капсульным типом на основании типирования по последовательности гена *izi*. Штаммы относились к 31 уникальному капсульному типу, среди которых самыми распространенными были KL2 (19,4%), KL23 (9,4%), KL39 (8,9%), KL64 (8,9%) и KL20 (6,1%).

Бактериофаги vB_KpnM_NDO71, vB_KpnS_MAG26fr и vB_KpnS_PMM-G3 обладали узким спектром литической активности и лизировали все штаммы с капсульным типом

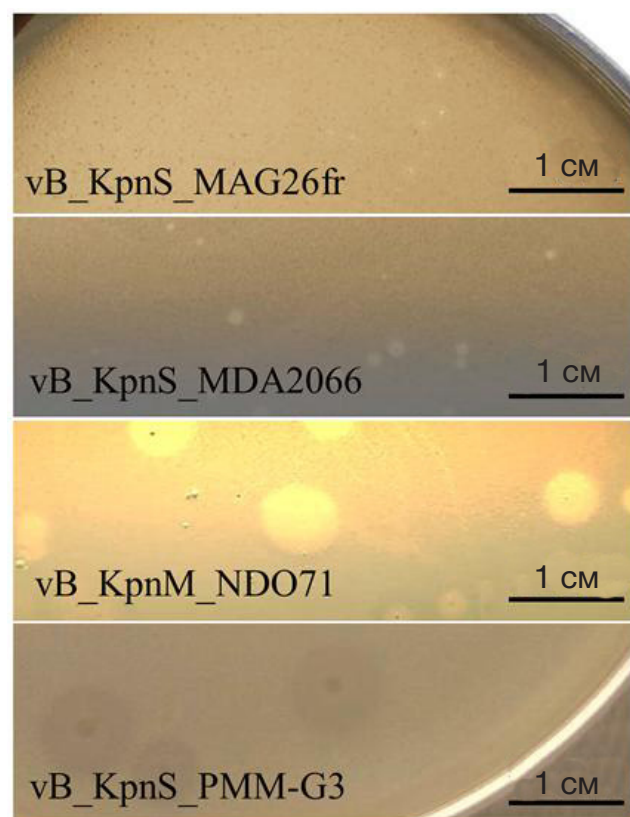


Рис. 1. Морфология негативных колоний бактериофагов vB_KpnM_NDO71, vB_KpnS_MAG26fr, vB_KpnS_MDA2066 и vB_KpnS_PMM-G3

штамма хозяина: KL45 ($n = 4$; 2,2%), KL19 ($n = 6$; 3,3%) и KL28 ($n = 4$; 2,2%) соответственно. Бактериофаг vB_KpnS_MDA2066 проявлял литическую активность в отношении штаммов двух различных капсульных типов: KL19 и KL107 ($n = 7$; 3,9%).

Полногеномное секвенирование и филогенетический анализ бактериофагов

Геномы исследуемых бактериофагов были представлены двухцепочечными молекулами ДНК длиной от 49 477 до 158 414 п.н. и содержанием Г+Ц пар 44,4–56,1% (табл. 1). Число предсказанных открытых рамок считывания (ОРС) варьировало от 76 до 236, для бактериофагов vB_KpnM_NDO71 и vB_KpnS_MDA2066 были выявлены гены тРНК (21 и 7 соответственно).

Для установления таксономического положения бактериофагов было построено филогенетическое древо с использованием полногеномных последовательностей фагов, рекомендованных ICTV (рис. 2). Бактериофаги vB_KpnM_NDO71, vB_KpnS_MAG26fr, vB_KpnS_MDA2066 и vB_KpnS_PMM-G3 принадлежали к разным таксономическим группам и на филогенетическом древе относились к кластерам, образованным представителями родов *Mydovirus*, *Yonsevivirus*, *Taipeivirus* и *Webervirus* соответственно.

Таблица 1. Общая характеристика геномов фагов vB_KpnM_NDO71, vB_KpnS_MAG26fr, vB_KpnS_MDA2066 и vB_KpnS_PMM-G3

Бактериофаг	Длина генома, п.н.	Г+Ц	ОРС	тРНК
vB_KpnM_NDO71	136 566	44,40%	236	21
vB_KpnS_MAG26fr	59 701	56,10%	79	0
vB_KpnS_MDA2066	158 414	46,40%	208	7
vB_KpnS_PMM-G3	49 477	50,10%	76	0

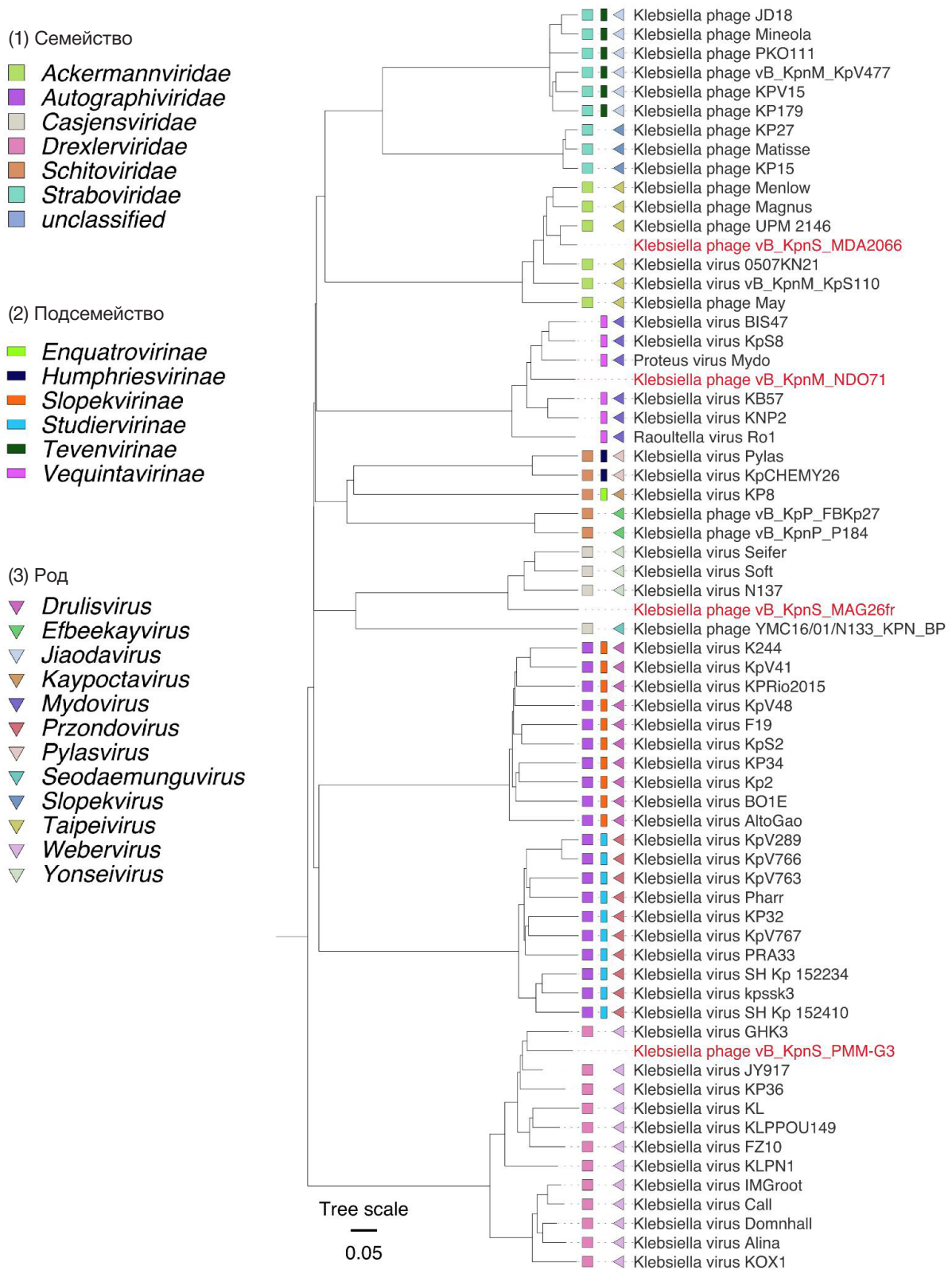


Рис. 2. Филогенетическое древо бактериофагов *K. pneumoniae*. Исследуемые бактериофаги отмечены красным цветом

На основании анализа BLASTn ближайшим гомологом фага vB_KpnM_NDO71 оказался *Klebsiella* phage vB_KpnM_KB57 (GenBank KT934943.1; 84% покрытия и 96,49% идентичности), фага vB_KpnS_MAG26fr — *Klebsiella* phage S9a (GenBank ON623732.1; 71% покрытия и 93,88% идентичности), фага vB_KpnS_MDA2066 — *Klebsiella* virus UPM 2146 (GenBank NC_049472.1; 95% покрытия и 98,98% идентичности), а фага vB_KpnS_PMM-G3 — *Klebsiella* virus

UPM 2146 (GenBank NC_049472.1; 95% покрытия и 98,98% идентичности).

Функциональный анализ фагов *K. pneumoniae*

В ходе функциональной аннотации генома vB_KpnM_NDO71 удалось предсказать функцию для 61 белка. Бактериофаг имел стандартное строение для rV5-подобных

Таблица 2. Предсказанные деполимеразные домены фагов vB_KpnM_NDO71, vB_KpnS_MAG26fr, vB_KpnS_MDA2066 и vB_KpnS_PMM-G3

ОПС	Деполимеразный домен	Размер белка, а/к	Идентичность с ближайшим гомологом, %		
			N-концевой домен	Деполимеразный домен	C-концевой домен
vB_KpnM_NDO71					
orf047	Пектатлиаза 4	597	0	90,8	57,8
vB_KpnS_MAG26fr					
orf055	Гликозилгидролаза семейства 48	941	29,4	41,8	50,8
vB_KpnS_PMM-G3					
orf046	Пектатлиаза 3	742	98,5	83,5	99,7
vB_KpnS_MDA2066					
orf130	Пектатлиаза 3	960	0	38,2	33,5
orf131	Гликозилгидролаза семейства 28	766	6,8	73,4	64,7
orf133	Гликозилгидролаза семейства 28	660	100	100	100
orf135	Гликозилгидролаза семейства 28	721	31,8	67,2	59,6

фагов: не кодировал РНК-полимеразу, а в качестве белка лизиса имел о-спанин. В отличие от фагов-гомологов Seu621 и VIK251 [23, 24] в геноме фага vB_KpnM_NDO71 ген ДНК-полимеразы был разбит на две рамки считывания геном хомингэндонуклеазы.

Для фага vB_KpnS_MAG26fr предполагаемая функция (структурные белки; ферменты, участвующие в репликации, регуляции, транскрипции и трансляции ДНК; лизис хозяина) была присвоена продуктам 42 ОПС. Из них 19 относились к структурным белкам фага, а за лизис хозяина отвечала кассета из пяти белков (о-спанин, компонент спанина внутренней мембраны, эндолизин и два белка системы холин-антихолин).

Бактериофаг vB_KpnS_MDA2066 кодировал 80 белков с предполагаемой функцией. Среди них 27 относились к структурным белкам; 52 — к генам, участвующим в репликации, регуляции, транскрипции и трансляции ДНК; кроме того, фаг кодировал один белок эндолизина, отвечающий за лизис бактерии хозяина.

Из 76 ОПС фага vB_KpnS_PMM-G3 43 кодировали белки с предсказанной функцией, большинство из которых относились к структурным белкам. Бактериофаг имел структуру генома, характерную для T1-подобных бактериофагов, и не кодировал гены ДНК- и РНК-полимеразы.

Рецептор-связывающие белки бактериофагов

Согласно функциональному анализу пять ОПС бактериофага vB_KpnM_NDO71 были аннотированы как белки фаговых фибрилл. В дальнейшем было обнаружено, что NDO71_orf047 несет деполимеразный домен, представленный пектатлиазой 4 (табл. 2). Анализ, проведенный с помощью BLASTp, показал, что данный белок обладал высокой гомологией с гипотетическими белками профагов *K. pneumoniae* (GenBank WP_180812430.1; 89% покрытия и 68,97% идентичности).

В геноме vB_KpnS_MDA2066 также было закодировано пять белков, аннотированных как белки фаговых фибрилл. Однако в отличие от vB_KpnM_NDO71, четыре из пяти предсказанных белков фибрилл фага несли домены полисахарид-деполимераз: MDA2066_orf130 — пектатлиазу 3, а MDA2066_orf131, MDA2066_orf133 и MDA2066_orf135 — гликозилгидролазы семейства 28.

Два белка фибрилл бактериофага vB_KpnS_MDA2066 (orf131 и orf135) имели уровень гомологии выше 50% с ранее описанными фибриллами бактериофага *Klebsiella phage K64-1*, специфичными в отношении капсульных типов K30/K69 и KN4 соответственно. Белок фибриллы MDA2066_orf130 имел гомологию (53% покрытия, 34,87% идентичности согласно BLASTp) с белком фибриллы ранее описанного фага P929, проявляющего литическую активность в отношении штаммов с капсульным типом KL19 (табл. 2). Четвертый белок фибрилл MDA2066_orf133 был идентичен белку фибриллы фага *Klebsiella virus UPM 2146* и обладал высокой гомологией с аналогичными белками фагов рода *Taipaivirus* (покрытие 100% и идентичность 99%).

Геном фага vB_KpnS_MAG26fr кодировал два белка, аннотированных как белки фибрилл. Один из них (MAG26fr_orf055) кодировал деполимеразный домен, представленный гликозилгидролазой семейства 48 (табл. 2). Ближайшим гомологом данного белка фибрилл являлся дистальный хвостовой белок бактериофага Soft (GenBank YP_009851405.1; 100% покрытия и 46,36% идентичности).

Аналогично фагу vB_KpnS_MAG26fr в геноме vB_KpnS_PMM-G3 было закодировано два белка фибрилл. При более детальном анализе для одного из этих белков (PMMG3_orf046) был предсказан домен полисахарид-деполимеразы, представленный пектатлиазой 3. Данный белок обладал высокой гомологией с белком фибрилл не описанного фага *Klebsiella phage VLCriD7c* (GenBank UXX29830.1; 100% покрытия и 95,15% идентичности).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе исследования из природных источников было выделено четыре бактериофага, способных лизировать штаммы *K. pneumoniae* с капсульными типами KL19, KL28, KL45 и KL107. Следует отметить, что бактериофаги против трех типов описаны впервые, тогда как фаги vB_KpnS_MDA2066 и vB_KpnS_MAG26fr обладали активностью против штаммов с капсульным типом KL19, так же как и ранее описанный *Klebsiella phage P929* [25].

Для описания генетических особенностей фагов был использован метод полногеномного секвенирования, в последние годы широко применяемый для определения

таксономического положения фагов и исследования их организации [26]. Филогенетический анализ данных позволил обнаружить, что исследуемые бактериофаги относятся к разным родам и семействам. Более того, выравнивание геномов с использованием алгоритма BLASTn выявило значимые различия (> 5%) с геномами ближайших фагов, позволяя сделать вывод, что исследованные бактериофаги являются представителями новых видов [26].

Функциональный анализ кодируемых генов продемонстрировал, что фаги имели типичную для представителей своих родов организацию генома. Бактериофаги обладали строго вирулентной природой и не несли в своем составе гены интеграз, а также потенциально опасные гены токсинов и детерминант устойчивости к антибиотикам, что позволяет применять их в терапевтической практике.

В геномах всех четырех бактериофагов были предсказаны рецептор-связывающие белки, представленные полисахарид-деполимеразы. Для деполимераз бактериофагов vB_KpnM_NDO71, vB_KpnS_MAG26fr и vB_KpnS_PMM-G3 не было выявлено гомологии с ранее описанными в литературе бактериофагами, что расширяет теоретическое знание и возможности для создания в будущем терапевтических препаратов полисахарид-деполимераз широкого спектра действия. Три фибриллы бактериофага vB_KpnS_MDA2066 (orf130, orf131 и orf135) показали гомологию с белками фибрилл известной специфичности: KL19, K30/K69 и KN4 соответственно. При этом основные различия находились на N-конце, который кодирует сайты прикрепления фибриллы к другим фаговым белкам, и напротив, высокая степень гомологии наблюдалась в области предсказанного ферментативного домена и C-конца, который отвечает за распознавание субстрата [27] (табл. 2). Стоит отметить также, что в тестируемой коллекции клинических изолятов *K. pneumoniae* не было образцов с капсульным типом K30/K69, а для определения типа KN4 необходимо использовать другую схему типирования.

Спектр литической активности исследуемых фагов был ограничен четырьмя капсульными типами. Несмотря на то что представленность штаммов с KL19, KL28, KL45 и KL107 в тестируемой коллекции невелика (11,7%),

изоляты с данными капсульными типами ассоциированы с нозокомиальными инфекциями, устойчивыми к широкому спектру антибиотиков, в том числе колистину [28]. Кроме того, два фага продемонстрировавшие активность против штаммов с KL19 (vB_KpnS_MAG26fr и vB_KpnS_MDA2066) несли различные по типу домены полисахарид-деполимераз, что потенциально способно уменьшить частоту образования мутантов при их совместном использовании.

Для увеличения эффективности терапии при создании терапевтических препаратов, как правило, несколько бактериофагов, имеющих различный литический профиль, объединяют в фаговый коктейль. На сегодняшний день к подобным коктейлям предъявляют следующие требования: титр входящих в них бактериофагов не должен быть ниже 10^8 БОЕ/мл, бактериофаги должны иметь строго вирулентную природу и не содержать потенциально опасных генов, бактериофаги должны эффективно лизировать возбудителей инфекционного процесса [29, 30]. Таким образом, объединение описанных фагов с другими капсулоспецифичными бактериофагами потенциально способно увеличить эффективность терапевтических коктейлей до 100%.

ВЫВОДЫ

Исследованные бактериофаги vB_KpnM_NDO71, vB_KpnS_MAG26fr, vB_KpnS_MDA2066 и vB_KpnS_PMM-G3 относятся к новым видам внутри охарактеризованных семейств и подсемейств и являются перспективными кандидатами для получения эффективных фаговых коктейлей. В свою очередь предсказанные деполимеразы, активные в отношении редких капсульных типов KL19, KL28, KL45 и KL107, могут быть предметом дальнейшего изучения в качестве потенциальных терапевтических агентов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Коллектив авторов благодарит заведующего лабораторией молекулярной диагностики и гено-инженерных препаратов ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии к.б.н. Н. В. Воложанцева за предоставленные штаммы.

Литература

1. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016; 80 (3): 629–61.
2. Touati A, Mairi A, Baloul Y, Lalaoui R, Bakour S, Thighilt L et al. First detection of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 in fresh vegetables from Béjaïa city, Algeria *J Glob Antimicrob Resist.* 2017; 9: 17–18.
3. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11(4): 589–603.
4. Сухорукова, М. В., Эйдельштейн, М. В., Иванчик, Н. В., Склеенова, Е. Ю., Шайдуллина, Э. Р., Азизов, И. С., и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacterales* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН 2015–2016». *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2019; 21(2): 147–59.
5. Кузьменков, А. Ю., Виноградова, А. Г., Трушин, И. В., Эйдельштейн, М. В., Авраменко, А. А., Дехнич А.В. и др. AMRmap — система мониторинга антибиотикорезистентности в России. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2021; 23(2): 198–204.
6. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Aguilar GR, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet.* 2022; 399(10325): 629–55.
7. Górski A, Międzybrodzki R, Węgrzyn G, Jończyk-Matysiak E, Borysowski J, Weber-Dąbrowska B. Phage therapy: Current status and perspectives. *Med Res Rev.* 2020; 40(1): 459–463.
8. Clokie MR, Millard AD, Letarov AV, Heaphy S. Phages in nature. *Bacteriophage.* 2011; 1 (1): 31.
9. D'Herelle MF. On an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli. *Comptes Rendus Acad des Sci Paris.* 1917; 165: 373–5.
10. Khatami A, Lin RC, Petrovic-Fabijan A, Alkalay-Oren S, Almuzam S, Britton PN et al. Bacterial lysis, autophagy and innate immune responses during adjunctive phage therapy in a child. *EMBO Mol Med.* 2021; 13 (9): e13936.
11. Leitner L, Ujmajuridze A, Chanishvili N, Goderdzishvili M, Chkonia I,

- Rigvava S et al. Intravesical bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Lancet Infect Dis.* 2021; 21 (3): 427–36.
12. Petrovic Fabijan A, Lin RC, Ho J, Maddocks S, Ben Zakour NL, Iredell JR. Safety of bacteriophage therapy in severe *Staphylococcus aureus* infection. *Nat Microbiol.* 2020; 5 (3): 465–72.
 13. Verbeken G, Pirnay JP. European regulatory aspects of phage therapy: magistral phage preparations. *Curr Opin Virol.* 2022; 52 (November): 24–29.
 14. Pires DP, Oliveira H, Melo LD, Sillankorva S, Azeredo J. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 2016; 100 (5): 2141–51.
 15. Danis-Wlodarczyk KM, Wozniak DJ, Abedon ST. Treating bacterial infections with bacteriophage-based enzybiotics: In vitro, in vivo and clinical application. *Antibiotics.* 2021; 10 (12): 1–36.
 16. Kornienko M, Ilna E, Lubasovskaya L, Pripitnevich T, Falova O, Sukhikh G et al. Analysis of nosocomial *Staphylococcus haemolyticus* by MLST and MALDI-TOF mass spectrometry. *Infect. Genet Evol.* 2016; 39: 99–105.
 17. Brisse S, Passet V, Haugaard AB, Babosan A, Kassis-Chikhani N, Struve C et al. Wzi gene sequencing, a rapid method for determination of capsulartype for klebsiella strains. *J Clin Microbiol.* 2013; 51 (12): 4073–8.
 18. Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of Bacteriophages by the Direct Plating Plaque Assay. *Methods Mol. Biol. Humana Press.* 2009; 501: 77–80.
 19. Green MR, Sambrook J. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012; 1890 p.
 20. Liu B, Zheng D, Jin Q, Chen L, Yang J. VFDB 2019: A comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47 (D1): D687–D692.
 21. Liu B, Pop M. ARDB — Antibiotic resistance genes database. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37 (SUPPL. 1): 443–7.
 22. Nishimura Y, Yoshida T, Kuronishi M, Uehara H, Ogata H, Goto S. ViPTree: the viral proteomic tree server. *Bioinformatics.* 2017; 33 (15): 2379–80.
 23. Gorodnichev RB, Volozhantsev NV, Krasilnikova VM, Bodoev IN, Kornienko MA, Kuptsov NS et al. Novel *Klebsiella pneumoniae* K23-Specific Bacteriophages From Different Families: Similarity of Depolymerases and Their Therapeutic Potential. *Front Microbiol.* 2021; 12: 669618.
 24. Городничев Р. Б., Корниенко М. А., Купцов Н. С., Малахова М. В., Беспярых Д. А., Веселовский В. А. и др. Молекулярно-генетическая характеристика трех новых бактериофагов *Klebsiella pneumoniae*, перспективных для применения в фаговой терапии. *Медицина экстремальных ситуаций.* 2021; 23 (3): 90–97.
 25. Chen X, Tang Q, Li X, Zheng X, Li P, Li M et al. Isolation, characterization, and genome analysis of bacteriophage P929 that could specifically lyse the KL19 capsular type of *Klebsiella pneumoniae*. *Virus Res.* 2022; 314: 198750.
 26. Turner D, Kropinski AM, Adriaenssens EM. A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy. *Viruses.* 2021; 13 (3): 506.
 27. Squeglia F, Maciejewska B, Łątka A, Ruggiero A, Briers Y, Drulis-Kawa Z et al. Structural and Functional Studies of a *Klebsiella* Phage Capsule Depolymerase Tailspike: Mechanistic Insights into Capsular Degradation. *Structure.* 2020; 28 (6): 613–24.e4.
 28. Zhao J, Liu C, Liu Y, Zhang Y, Xiong Z, Fan Y et al. Genomic characteristics of clinically important ST11 *Klebsiella pneumoniae* strains worldwide. *J Glob Antimicrob Resist.* 2020; 22: 519–6.
 29. Petrovic Fabijan A, Khalid A, Maddocks S, Ho J, Gilbey T, Sandaradura I et al. Phage therapy for severe bacterial infections: a narrative review. *Med J Aust.* 2020; 212 (6): 279–85.
 30. Асланов Б. И., Зуева Л. П., Кафтырева Л. А., Бойцов А. Г., Акимкин В. Г., Долгий А. А. и др. Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противозидемической практике. Изд-во «Ремедиум Приволжье», 2014; 54 с.

References

1. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016; 80 (3): 629–61.
2. Touati A, Mairi A, Baloul Y, Lalaoui R, Bakour S, Thighilt L et al. First detection of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 in fresh vegetables from Béjaïa city, Algeria *J Glob Antimicrob. Resist.* 2017; 9: 17–18.
3. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11 (4): 589–603.
4. Sukhorukova MV, Edelstein MV, Skleenova EY, Ivanchik NV, Shajdullina ER, Azyzov IS et al. Antimicrobial resistance of nosocomial Enterobacterales isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study “MARATHON 2015–2016”. *2019; 21 (2): 147–59.*
5. Kuzmenkov AY, Vinogradova AG, Trushin IV, Eidelstein MV, Avramenko AA, Dehnic AV et al. AMRmap — ANTIBIOTIC RESISTANCE SURVEILLANCE SYSTEM IN RUSSIA. *Klinicheskaa Mikrobiologija i Antimikrobnaa Himioterapia,* 2021; 23 (2): 198–204.
6. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Aguilar GR, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet.* 2022; 399 (10325): 629–55.
7. Górski A, Międzybrodzki R, Węgrzyn G, Jończyk-Matysiak E, Borysowski J, Weber-Dąbrowska B. Phage therapy: Current status and perspectives. *Med Res Rev.* 2020; 40 (1): 459–63.
8. Clokie MR, Millard AD, Letarov AV, Heaphy S. Phages in nature. *Bacteriophage.* 2011; 1 (1): 31.
9. D’Herelle MF. On an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli. *Comptes Rendus Acad des Sci Paris.* 1917; 165: 373–5.
10. Khatami A, Lin RC, Petrovic-Fabijan A, Alkalay-Oren S, Almuzam S, Britton PN et al. Bacterial lysis, autophagy and innate immune responses during adjunctive phage therapy in a child. *EMBO Mol. Med.* 2021; 13 (9): e13936.
11. Leitner L, Ujmajuridze A, Chanishvili N, Goderdzishvili M, Chkonია I, Rigvava S et al. Intravesical bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Lancet Infect Dis.* 2021; 21 (3): 427–36.
12. Petrovic Fabijan A, Lin RC, Ho J, Maddocks S, Ben Zakour NL, Iredell JR. Safety of bacteriophage therapy in severe *Staphylococcus aureus* infection. *Nat Microbiol.* 2020; 5 (3): 465–72.
13. Verbeken G, Pirnay JP. European regulatory aspects of phage therapy: magistral phage preparations. *Curr Opin Virol.* 2022; 52 (November): 24–29.
14. Pires DP, Oliveira H, Melo LD, Sillankorva S, Azeredo J. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 2016; 100 (5): 2141–51.
15. Danis-Wlodarczyk KM, Wozniak DJ, Abedon ST. Treating bacterial infections with bacteriophage-based enzybiotics: In vitro, in vivo and clinical application. *Antibiotics.* 2021; 10 (12): 1–36.
16. Kornienko M, Ilna E, Lubasovskaya L, Pripitnevich T, Falova O, Sukhikh G et al. Analysis of nosocomial *Staphylococcus haemolyticus* by MLST and MALDI-TOF mass spectrometry. *Infect. Genet Evol.* 2016; 39: 99–105.
17. Brisse S, Passet V, Haugaard AB, Babosan A, Kassis-Chikhani N, Struve C et al. Wzi gene sequencing, a rapid method for determination of capsulartype for klebsiella strains. *J Clin Microbiol.* 2013; 51 (12): 4073–8.
18. Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of Bacteriophages by the Direct Plating Plaque Assay. *Methods Mol. Biol. Humana Press.* 2009; 501: 77–80.
19. Green MR, Sambrook J. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012; 1890 p.
20. Liu B, Zheng D, Jin Q, Chen L, Yang J. VFDB 2019: A comparative

- pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47 (D1): D687–D692.
21. Liu B, Pop M. ARDB — Antibiotic resistance genes database. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37 (SUPPL. 1): 443–447.
 22. Nishimura Y, Yoshida T, Kuronishi M, Uehara H, Ogata H, Goto S. ViPTree: the viral proteomic tree server. *Bioinformatics.* 2017; 33 (15): 2379–80.
 23. Gorodnichev RB, Volozhantsev NV, Krasilnikova VM, Bodoev IN, Kornienko MA, Kuptsov NS et al. Novel *Klebsiella pneumoniae* K23-Specific Bacteriophages From Different Families: Similarity of Depolymerases and Their Therapeutic Potential. *Front Microbiol.* 2021; 12: 669618.
 24. Gorodnichev RB, Kornienko MA, Kuptsov NS, Malakhova MV, Bespiatykh DA, Veselovsky VA et al. Molecular Genetic Characterization Of Three New *Klebsiella pneumoniae* Bacteriophages Suitable For Phage Therapy. *Extreme medicine.* 2021; 23 (3): 90-97.
 25. Chen X, Tang Q, Li X, Zheng X, Li P, Li M et al. Isolation, characterization, and genome analysis of bacteriophage P929 that could specifically lyse the KL19 capsular type of *Klebsiella pneumoniae*. *Virus Res.* 2022; 314: 198750.
 26. Turner D, Kropinski AM, Adriaenssens EM. A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy. *Viruses.* 2021; 13 (3): 506.
 27. Squeglia F, Maciejewska B, Łątka A, Ruggiero A, Briers Y, Drulis-Kawa Z et al. Structural and Functional Studies of a *Klebsiella* Phage Capsule Depolymerase Tailspike: Mechanistic Insights into Capsular Degradation. *Structure.* 2020; 28 (6): 613–624.e4.
 28. Zhao J, Liu C, Liu Y, Zhang Y, Xiong Z, Fan Y et al. Genomic characteristics of clinically important ST11 *Klebsiella pneumoniae* strains worldwide. *J Glob Antimicrob Resist.* 2020; 22: 519–6.
 29. Petrovic Fabijan A, Khalid A, Maddocks S, Ho J, Gilbey T, Sandaradura I et al. Phage therapy for severe bacterial infections: a narrative review. *Med J Aust.* 2020; 212 (6): 279–5.
 30. Aslanov BI, Zueva LP, Kaftyreva LA, Bojcov AG, Akimkin VG, Dolgij AA, et al. Racional'noe primenenie bakteriofagov v lechebnoj i protivojepidemicheskoj praktike. *Izd-vo «Remedium Privolzh'e»;* 2014; 54 c.

ОЦЕНКА МЕТОДОВ ИНАКТИВИРОВАНИЯ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА ПТИЦ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН

Н. Н. Савина¹, А. А. Екимов¹✉, М. А. Шуклина², В. П. Трухин¹, А. Э. Евтушенко¹, Е. Н. Жиренкина¹, Л. А. Степанова²

¹ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

² Научно-исследовательский институт гриппа имени А. А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

При производстве инактивированных гриппозных вакцин на стадии инактивации должен быть инактивирован как вирус гриппа, так и возможные вирусные контаминанты, которые могут попасть в вакцину из сырья (куриных эмбрионов). Одним из возможных контаминантов является вирус лейкоза птиц. Инактиваторы должны обеспечивать гарантированное снижение вирусной нагрузки контаминанта не менее чем на 4 lg/мл, что обеспечит его отсутствие в готовой вакцине. Целью работы было осуществить наработку вируса лейкоза для достижения минимального титра 5 lg/мл, оценить снижение титра вируса лейкоза птиц в полупродуктах гриппозных вакцин при воздействии инактиваторов. В исследовании использовали штаммы вируса лейкоза RAV-1 и RAV-2 и полупродукты гриппозных вакцин, такие как вирусосодержащая аллантоисная жидкость и вирусные концентраты. Титры вируса лейкоза птиц определяли методом иммуноферментного анализа. Были подобраны условия наработки вируса лейкоза птиц штаммов RAV-1 и RAV-2 в первичной культуре фибробластов эмбрионов кур (ФЭК); рассмотрены основные используемые инактиваторы — β-пропиолактон и УФ-излучение. Выявлено, что спустя 12 ч инактивации β-пропиолактоном вирус лейкоза птиц штамма RAV-1 показал снижение вирусной нагрузки на $4,61 \pm 0,46$ lg, а вирус лейкоза птиц штамма RAV-2 — на $4,33 \pm 0,33$ lg, что указывает на эффективное действие β-пропиолактона при инактивации. Проведение инактивации УФ-излучением позволяет снизить вирусную нагрузку штамма RAV-1 на $4,22 \pm 0,31$ lg, а штамма RAV-2 на $4,44 \pm 0,48$ lg за 5 мин.

Ключевые слова: гриппозные вакцины, инактивация, вирус лейкоза птиц, RAV-1, RAV-2, пропиолактон, УФ-излучение

Вклад авторов: все авторы внесли равнозначный вклад в разработку методики исследования, получение, анализ и интерпретацию данных, в написание и редактирование статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование проведено с соблюдением этических принципов Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации 1964 г. и последующих ее пересмотров.

✉ **Для корреспонденции:** Алексей Александрович Екимов
ул. Свободы, д. 52, Красное Село, г. Санкт-Петербург, 198320, Россия; a.a.ekimov@niivs.ru

Статья получена: 31.10.2022 **Статья принята к печати:** 19.11.2022 **Опубликована онлайн:** 29.12.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.047

EVALUATION OF METHODS OF AVIAN LEUCOSIS VIRUS INACTIVATION IN PRODUCTION OF INFLUENZA VACCINES

Savina NN¹, Ekimov AA¹✉, Shuklina MA², Trukhin VP¹, Evtushenko AE¹, Zhirenkina EN¹, Stepanova LA²

¹ St. Petersburg Research Institute of Vaccines and Serums and Bacterial Preparations Production Company of the FMBA of Russia, St. Petersburg, Russia

² Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia

The process of production of inactivated influenza vaccines involves a stage of inactivation of both the influenza virus and the possible viral contaminants that can come from the raw materials (chicken embryos). One of such contaminants is the avian leucosis virus. The minimum viral contaminant load reduction that the inactivating agents should guarantee is by 4 lg/ml; this or higher level of the deactivating ability ensures the finished vaccine is free from viral contaminants. The purpose of this work was to cultivate the leucosis virus to the titer of 5 lg/ml (minimum) and to measure the reduction of the avian leucosis virus titer in influenza vaccine intermediates upon exposure to the inactivating agents. The RAV-1 and RAV-2 leucosis virus strains and influenza vaccine intermediates such as virus-containing allantoic fluid and virus concentrates were used in the study. Avian leucosis virus titers were determined by enzyme immunoassay. We created conditions for cultivation of the RAV-1 and RAV-2 avian leucosis virus strains in the primary culture of chicken embryo fibroblasts (CEF); the inactivating agents considered were the most commonly used β-propiolactone and UV radiation. It was found that after 12 hours of exposure to β-propiolactone, the RAV-1 avian leucosis virus load decreased by 4.61 ± 0.46 lg, and that of RAV-2 strain — by 4.33 ± 0.33 lg, which indicates that β-propiolactone is an effective inactivating agent. Five minutes of exposure to UV radiation reduces the RAV-1 strain viral load by 4.22 ± 0.31 lg and RAV-2 strain viral load by 4.44 ± 0.48 lg.

Keywords: influenza vaccines, inactivation, avian leucosis virus, RAV-1, RAV-2, propiolactone, UV radiation

Author contribution: all authors contributed equally to the research methodology design, data collection, analysis and interpretation, article authoring and editing.

Compliance with the ethical standards: the study was conducted in accordance with the ethical principles of the Declaration of Helsinki of 1964 and its subsequent revisions.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexey Alexandrovich Ekimov
Svobody, 52, Krasnoe Selo, St. Petersburg, 198320, Russia; aekimov@niivs.ru

Received: 31.10.2022 **Accepted:** 19.11.2022 **Published online:** 29.12.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.047

При производстве инактивированных гриппозных вакцин необходимо обеспечивать полную инактивацию вируса гриппа для достижения безопасности готового препарата. Указанное положение рекомендовано как Всемирной организацией здравоохранения, так и Европейским медицинским агентством [1, 2], и требуется при производстве вакцин международного качества.

В свою очередь куриные эмбрионы, используемые в процессе производства гриппозных вакцин, потенциально могут быть заражены зоонозными инфекциями, такими как вирус лейкоза птиц, аденовирус птиц, микоплазма. Согласно указанным выше рекомендациям, разработанный технологический процесс должен обеспечивать инактивацию и перечисленных контаминантов.

Известны различные способы инактивации вирусов при производстве вакцин, в том числе при помощи УФ-излучения, воздействия формальдегида или β -пропиолактона [3]. Указанные методы обладают различной эффективностью в отношении вирусов.

Ранее было рассмотрено влияние инактивирующих агентов на аденовирус птиц штаммов CELO и Fontes [4], показана эффективность β -пропиолактона и УФ-излучения при инактивации в отношении указанных штаммов. Выявлено, что спустя 10 ч инактивации β -пропиолактоном аденовирус штамма CELO показал снижение вирусной нагрузки на $4,12 \pm 0,06$ lg (БОЕ)/мл, а аденовирус штамма Fontes — на $4,20 \pm 0,19$ lg (БОЕ)/мл, что указывает на эффективное действие β -пропиолактона при инактивации. Проведение инактивации УФ-излучением позволяет снизить вирусную нагрузку штамма CELO на $4,69 \pm 0,89$ lg (БОЕ)/мл, а штамма Fontes на $4,44 \pm 1,06$ lg (БОЕ)/мл за 5 мин. Отмечено, что добавление детергента на стадии расщепления также снижает вирусную нагрузку на $0,93 \pm 0,15$ lg (БОЕ)/мл и $1,04 \pm 0,12$ lg (БОЕ)/мл для штаммов CELO и Fontes соответственно при использовании н-октил- β -D-глюкопиранозидом и на $1,18 \pm 0,17$ lg (БОЕ)/мл и $1,12 \pm 0,38$ lg (БОЕ)/мл — при использовании тетрадецилтриметиламмоний бромида.

В связи с этим возникла необходимость подробного изучения влияния указанных выше агентов на еще один возможный контаминант — вирус лейкоза птиц. Известно, что вирус лейкоза птиц относится к РНК-содержащим онкорнавирусам семейства *Retroviridae*, которые вызывают лейкоз и саркомы у птиц и включают шесть антигенных подгрупп А, В, С, D, E, J. Вирусы этой группы обнаруживают в опухолевой ткани, крови, в паренхиматозных органах, а также в яйцах кур. Согласно проведенному ранее исследованию, на территории Российской Федерации в 90% исследованных птицеводческих хозяйств были выявлены антитела к вирусу лейкоза птиц [5]. Таким образом, существует серьезный риск контаминирования яйца для вакцинного производства вирусом лейкоза птиц. Следует также отметить, что в Российской Федерации возникает острая необходимость регламентирования отсутствия вируса лейкоза птиц в яйце курином инкубационном для вакцинного производства.

В литературе описаны методы инактивации при помощи УФ-излучения, однако изучение инактивации проведено только на штамме RAV-1 [6]. Еще одним возможным инактиватором является формальдегид, но формальдегид может оказывать влияние на стабильность готовой гриппозной вакцины и на ее иммуногенность в связи с высокой реакционной способностью формальдегида и возможностью химической модификации гемагглютинаина вируса гриппа с затрагиванием антигенных детерминант [7, 8]. В свою очередь другой химический инактиватор — β -пропиолактон не приводит к указанным недостаткам, эффективно инактивирует вирус гриппа, а также гидролизует до 3-гидроксипропионовой кислоты, которая является промежуточным метаболитом липидного обмена человека [9], что влияет и на безопасность вакцины.

Целью настоящего исследования было выбрать оптимальный агент для инактивирования контаминанта гриппозных вакцин — вируса лейкоза птиц, в частности наиболее распространенных групп RAV-1 (подгруппа А) и RAV-2 (подгруппа В) и минимальную длительность стадии инактивации для гарантированного снижения вирусной нагрузки не менее чем на 4 lg инфекционных единиц (ИЕ)/мл [10].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

При работе использовали:

- вирус лейкоза птиц RAV-1 (ATCC-VR-335), полученный из коллекции ATCC (США);
- вирус лейкоза птиц RAV-2 (ATCC-VR-1828), полученный из коллекции ATCC (США);
- куриные эмбрионы 10-дневные («Птицефабрика Синявинская»; Россия);
- тест-систему IDEXX ALV Ag: Avian Leukosis Virus Antigen Test Kit (IDEXX Laboratories, Inc., США).

Получение вирусосодержащей аллантоисной жидкости

Для культивирования вируса гриппа использовали 9–11-дневные куриные эмбрионы. Заражение куриных эмбрионов проводили дозой 0,2 мл с инфекционной активностью 102,0–104,5 и эмбриональной инфекционной дозой, равной 50 (ЭИД₅₀). Инкубацию куриных эмбрионов осуществляли при 35 °С в течение 48 ч для вируса гриппа типа А и в течение 72 ч — для вируса гриппа типа В. После инкубации эмбрионы охлаждали и собирали вирусосодержащую аллантоисную жидкость (ВАЖ).

Получение вирусных концентратов (ВК)

ВАЖ подвергали фильтрации через каскад фильтров с диаметром пор 10, 6 и 1 мкм с последующим концентрированием и использованием ультрафильтрационной установки с пределом отсека 300 кДа. Сконцентрированную вирусосодержащую аллантоисную жидкость подвергали ультрацентрифугированию в градиенте плотности сахарозы (60–20%). Собирали фракции сахарозного градиента в диапазоне 40–25% сахарозы. Отобранные фракции сахарозного градиента объединяли и хранили при температуре –20 °С до проведения исследования.

Культивирование вируса лейкоза птиц штаммов RAV-1 и RAV-2

Культивирование вируса лейкоза птиц штаммов RAV-1 и RAV-2 проводили на первичной культуре клеток фибробластов (ФЭК), приготовленной из 10-суточных эмбрионов кур. Клеточную культуру ФЭК получали в соответствии с методом, описанным в литературе [11] в культуральных флаконах объемом 75 см³.

После формирования монослоя культуры клеток готовили рабочее разведение вируса на поддерживающей среде (питательная среда 199, с добавлением ТРСК-трипсина до конечной концентрации 2 мкг/мл и БСА (V фракция) до конечной концентрации 0,2%). Подготовленное разведение вируса вносили в первичную культуру клеток фибробластов КЭ (85–95% монослой), предварительно дважды отмытую ФБР, в объеме 2–3% от объема матраса (необходимом для полного покрытия монослоя вирусосодержащей жидкостью). Разведение вируса вносили на культуру клеток фибробластов в объеме 3 мл, оставляли на контакт в течение 1 ч при температуре +37 °С. Затем добавляли поддерживающую среду (6 мл) и инкубировали в CO₂-инкубаторе при +37 °С. Смену среды проводили на 5-е сутки инкубации.

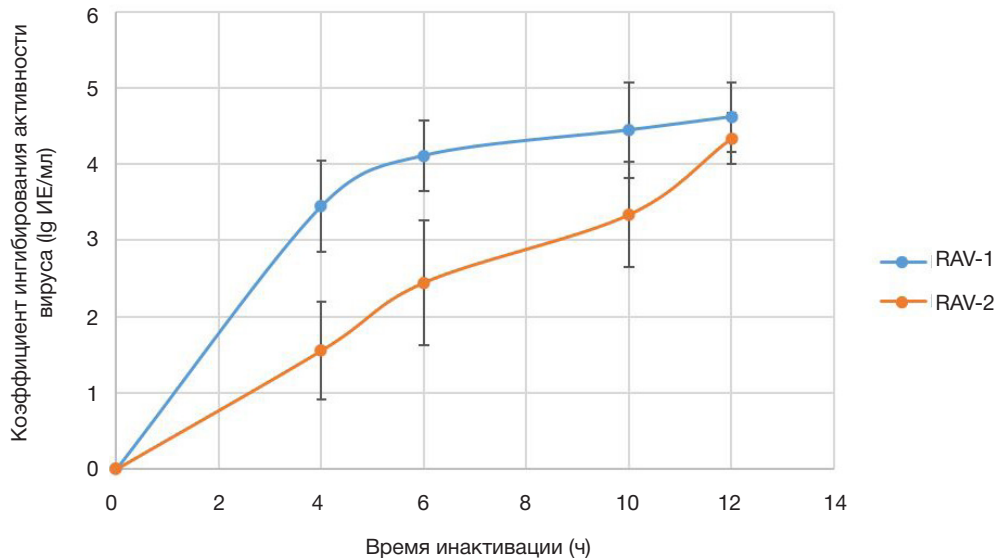


Рис. 1. Динамика инактивации вируса лейкоза птиц штаммов RAV-1 и RAV-2 при действии β -пропиолактона

Забор образцов (вирусодержащую культуральную жидкость) производили на 13-й (RAV-1) или на 7-й (RAV-2) день. По окончании инкубации флаконы с вирусодержащей жидкостью замораживали при -20°C и оставляли оттаивать при комнатной температуре (процедуру замораживания-размораживания повторяли 2–3 раза). Проводили сбор вирусодержащей жидкости из флаконов, центрифугировали при 1159 g 10 мин для осаждения клеток.

Определение титра вируса лейкоза птиц штаммов RAV-1 и RAV-2 в первичной клеточной культуре фибробластов куриного эмбриона

Определение титра вируса RAV-1 и RAV-2 в ВАЖ и ВК при моделировании инактивации вируса β -пропиолактоном (β -ПЛ) и УФ-облучением проводили путем титрования образцов на разных сроках инактивации на первичной культуре клеток ФЭК с последующим определением наличия антигена p27 в ИФА в каждом разведении. Каждый образец исследовали в трипликатах. Готовили 10-кратные разведения образцов (от 10^{-1} до 10^{-6}), полученных на поддерживающей среде. Подготовленные разведения образцов, полученных в процессе моделирования инактивации RAV-1 β -ПЛ или УФ-облучением, и отрицательный контроль (не контаминированные серии ВК и ВАЖ) вносили на культуру клеток ФЭК в объеме 0,5 мл на лунку (каждое разведение исследовали в трех повторностях), оставляли на контакт в течение 5 ч при температуре $+37^{\circ}\text{C}$. Затем удаляли вирусодержащую культуральную жидкость и вносили поддерживающую среду по 1 мл в лунку. Планшеты инкубировали в CO_2 -инкубаторе при $+37^{\circ}\text{C}$ и 5% CO_2 в течение 7 дней.

По окончании инкубации планшеты с первичной клеточной культурой фибробластов замораживали при -20°C и оставляли оттаивать при комнатной температуре, процедуру замораживания-размораживания повторяли 2 раза. Проводили сбор культуральной жидкости из лунок планшетов, центрифугировали при 3000 об./мин для осаждения собранных вместе с жидкостью клеток.

Надосадочную жидкость далее исследовали на наличие антигена p27 в ИФА с помощью тест-системы IDEXX ALV Ag: Avian Leukosis Virus Antigen Test Kit (IDEXX Laboratoties, Inc.; США) в соответствии с инструкцией к тест-системе. За титр принимали наибольшее разведение образца

вирусодержащей жидкости, которое дает значение соотношения оптических плотностей исследуемой пробы к положительному контролю больше 0,2. Предел чувствительности метода — 1lg ИЕ/мл. Титр меньше 1lg ИЕ/мл принимали за 0,5.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов осуществляли при помощи программного пакета Microsoft Excel 365 (Microsoft corp.; США), а также Minitab 19 (Minitab Inc.; США). Доверительные интервалы среднего значения рассчитывали с доверительной вероятностью 95%.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение динамики инактивации вируса лейкоза птиц в вирусодержащей аллантоисной жидкости β -пропиолактоном

Для моделирования инфицирования вирусодержащей аллантоисной жидкости (ВАЖ) вирусом лейкоза птиц и их инактивации эксперимент проводили аналогично изучению инактивации аденовируса птиц [4]. К образцам ВАЖ добавляли предварительно оттитрованный инфекционный материал, содержащий вирус лейкоза птиц, в объеме, равном 10% от исходного объема пробы, так чтобы конечное его содержание составляло не менее 5 lg ИЕ/мл. К полученным контаминированным образцам добавляли β -пропиолактоном до конечной концентрации 0,09% и определяли значение титра вируса лейкоза птиц в образцах в соответствии с описанной методикой. Динамика инактивации представлена на рис. 1.

Согласно полученным данным, снижение вирусной нагрузки не менее чем на 4 lg ИЕ/мл происходило не менее чем через 12 ч после добавления β -пропиолактона при температуре от $+4$ до $+8^{\circ}\text{C}$ (табл.).

Изучение динамики инактивации вируса лейкоза птиц в вирусных концентратах с помощью ультрафиолетового облучения

Для моделирования инфицирования ВК вирусом лейкоза птиц и их инактивации эксперимент проводили

Таблица. Снижение вирусной нагрузки вируса лейкоза птиц при действии различными инактиваторами

Инактиватор	Наименование штамма	
	RAV-1	RAV-2
β-Пропиолактон (время инаktivации 12 ч)	4,61 ± 0,46 lg	4,33 ± 0,33 lg
УФ-излучение (время инаktivации 5 мин)	4,22 ± 0,31 lg	4,33 ± 0,48 lg

аналогично изучению инаktivации аденовируса птиц [4]. К образцам ВК добавляли предварительно оттитрованный инфекционный материал, содержащий вирус лейкоза птиц, в объеме, равном 10% от исходного объема пробы, так чтобы конечное его содержание составляло не менее 5 lg ИЕ/мл. В чашки Петри диаметром 90 мм помещали по 7 мл контаминированного ВК. Чашки Петри облучали УФ-излучением, мощностью 60 Вт на расстоянии 20 см в течение 0; 0,5; 1; 2 и 5 мин. Инаktivацию проводили при температуре +18 °С.

Через указанные промежутки времени чашки удаляли из установки и проводили отбор проб объемом 1 мл для дальнейшего определения инфекционного титра в соответствии с описанной методикой. Динамика инаktivации представлена на рис. 2.

Снижение вирусной нагрузки не менее чем на 4 lg ИЕ/мл происходит не менее чем через 5 мин действия УФ-излучения (табл.).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно многолетним данным ФГУП СПбНИИВС ФМБА России, для полной инаktivации вируса гриппа штаммов, рекомендованных Всемирной организацией здравоохранения для включения в состав инаktivированной гриппозной вакцины, под действием β-пропиолактона достаточно 4–6 ч, а для УФ-излучения — 3–4 мин. Однако этой продолжительности недостаточно для инаktivации возможных контаминантов и вызывает риски получения небезопасной вакцины. По результатам более раннего исследования [4], нами было доказано, что инаktivация как β-пропиолактоном так и УФ-излучением эффективна в отношении контаминанта — аденовируса штаммов Fontes и CELO. При этом снижение вирусной нагрузки более чем на 4 lg БОЕ/мл достигается не менее чем за 10 ч при инаktivации ВАЖ β-пропиолактоном

(4,12 ± 0,06 lg и 4,20 ± 0,19 lg для CELO и Fontes соответственно) и не менее чем через 5 мин инаktivации УФ-излучением (4,69 ± 0,89 lg и 4,44 ± 1,06 для CELO и Fontes соответственно).

Согласно литературным данным, для инаktivации вируса лейкоза птиц используют термический метод и инаktivацию формалином в течение 24 ч [12, 13], но указанные способы малоприменимы при производстве гриппозных вакцин в связи со снижением иммуногенности готового продукта, а также токсичности формальдегида. Инаktivация вируса лейкоза птиц УФ-излучением описана только для RAV-1 [6], снижение вирусной нагрузки на 2 lg за 10 мин при облучении вирусосодержащих материалов с расстояния 40 см лампами суммарной мощностью 30 Вт.

Проведенное исследование показало, что β-пропиолактон и УФ-излучение эффективны и в отношении штаммов RAV-1 и RAV-2 вируса лейкоза птиц. Однако время для достижения полноты инаktivации вируса лейкоза птиц β-пропиолактоном составляет 12 ч, что больше на 2 ч по сравнению с аденовирусом, поэтому, для гарантированного инаktivирования обоих контаминантов, длительность стадии инаktivации β-пропиолактоном в технологическом процессе получения противогриппозных инаktivированных вакцин должна составлять не менее 12 ч при температуре +4–+8 °С. При инаktivации с помощью УФ-излучения нижняя граница доверительного интервала ($p = 0,95$) коэффициента снижения вирусной нагрузки составляет менее 4 lg, что свидетельствует о необходимости увеличения продолжительности инаktivации более чем 5 мин.

Таким образом, инаktivация β-пропиолактоном позволяет получать более воспроизводимые результаты и гарантированно снижать вирусную нагрузку более чем на 4 lg в отношении и вируса лейкоза птиц и аденовируса птиц в процессе получения гриппозных вакцин. Указанный факт минимизирует риски, и β-пропиолактон используют в качестве инаktivатора в технологических процессах

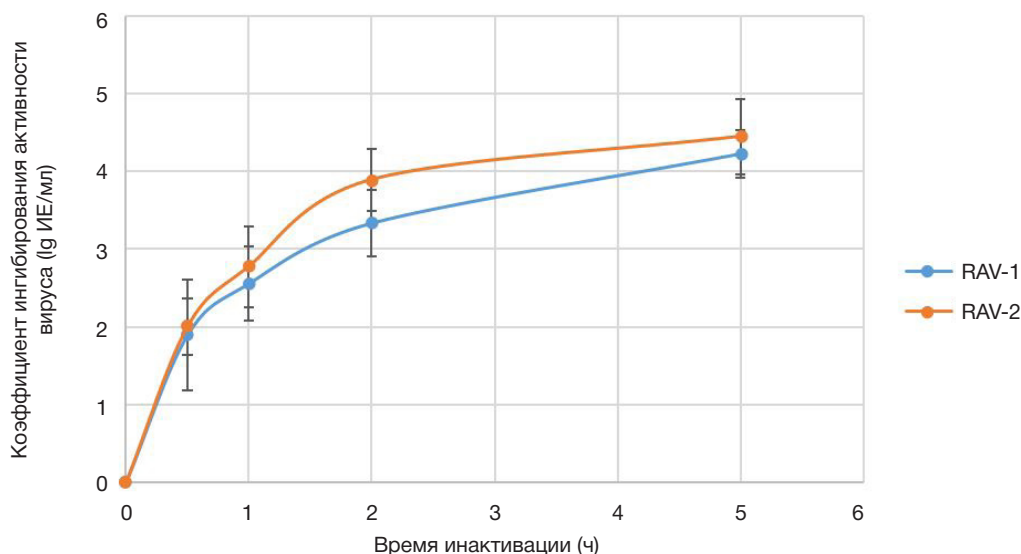


Рис. 2. Динамика инаktivации вируса лейкоза птиц штаммов RAV-1 и RAV-2 при действии УФ-излучения

производства инактивированных гриппозных вакцин различных компаний, например ФГУП СПбНИИВС ФМБА России, Novartis, GSK, ID Biomedical Corp of Quebec [14–16].

ВЫВОДЫ

В результате исследования выявлено, что минимальное время инактивирования аллантоисной жидкости, содержащей вирус лейкоза птиц, с использованием β -пропиолактона при получении гриппозных вакцин составляет 12 ч, что гарантированно снижает нагрузку

вируса лейкоза птиц на 4 Ig ИЕ/мл. В случае использования УФ-излучения для инактивации вирусных концентратов время инактивации должно составлять не менее 5 мин экспозиции, что снижает нагрузку вируса лейкоза птиц на 4 Ig ИЕ /мл. Такие схемы инактивации позволяют гарантированно обеспечить полноту инактивации аденовируса и вируса лейкоза птиц добиться должного уровня безопасности при производстве гриппозных вакцин в отношении указанных контаминантов. Следующим этапом работы будет изучение кинетики инактивации микоплазм различными инактиваторами в процессе получения гриппозных вакцин.

Литература

- EMA/CHMP/BWP/310834/2012 Rev.1 Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP) Guideline on Influenza vaccines — Quality module, 2017.
- Рекомендации по производству и контролю вакцины против гриппа инактивированной, Приложение 3 серии технических докладов ВОЗ № 927, 2005.
- Sabbaghi A, Miri SM, Keshavarz M, Zargar M, Ghaemi A. Inactivation methods for whole influenza vaccine production. *Rev Med Virol.* 2019; 29 (6): e2074.
- Савина Н. Н., Екимов А. А., Трухин В. П., Евтушенко А. Э., Жиренкина Е. Н., Синегубова Е. О. и др. Оценка методов инактивирования аденовируса птиц при производстве гриппозных вакцин. *Медицина экстремальных ситуаций.* 2021; (3): 84–9.
- Плотников В. А., Гребенникова Т. В., Дудникова Е. К., Шульпин М. И., Лазарева С. П., Никонова З. Б., и др. О распространении вируса лейкоза птиц в птицеводческих хозяйствах на территории России. *Сельскохозяйственная биология.* 2013; 6: 36–42.
- Bister K, Varmus HE, Stavnezer E, Hunters E, Vogt PK. Biological and biochemical studies on the inactivation of avian oncoviruses by ultraviolet irradiation. *Virology.* 1977; 77 (2): 689–704.
- Herrera-Rodriguez J, Signorazzi A, Holtrop M, de Vries-Idema J, Huckriede A. Inactivated or damaged? Comparing the effect of inactivation methods on influenza virions to optimize vaccine production. *Vaccine.* 2019; 37 (12): 1630–7.
- Kap M, Arron GI, Loibner M, Hausleitner A, Siaulyte G, Zatloukal K, Riegman P. Inactivation of Influenza A virus, Adenovirus, and Cytomegalovirus with PAXgene Tissue Fixative and Formalin. *Biopreservation and Biobanking.* 2013; 11 (4): 229–34.
- Shuo Lei, Xun Gao, Yang Sun, Xiangyong Yu, Longshan Zhao, Gas chromatography-mass spectrometry method for determination of β -propiolactone in human inactivated rabies vaccine and its hydrolysis analysis, *Journal of Pharmaceutical Analysis.* 2018; 8 (6): 373–7.
- Руководство по исследованию валидации вирусной очистки: проектирование, вклад и интерпретация исследований, использующих инактивацию и удаление вирусов, ЕМА СРМР/ ВРР/268/95, 1996.
- Фреши Р. Я. Культура животных клеток: практическое руководство. Пер. 5-го англ. изд. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2018; 691 с.
- Li Xue, Dong Xuan, Sun Xiaolong, Li Weihua, Zhao Peng, Cui Zhizhong, Wang Xin. Preparation and immunoprotection of subgroup B avian leukosis virus inactivated vaccine. *Vaccine.* 2013; 31 (46): 5479–85.
- Zavala, Guillermo, Sunny Cheng. Detection and Characterization of Avian Leukosis Virus in Marek's Disease Vaccines. *Avian Diseases.* 2006; 50 (2): 209–15.
- Hausmann C, Hauschild F, Jobst B, Novartis AG. Improvements in preparation of influenza virus vaccine antigens. Патент США № US6986808P. 18.03.2008.
- Burt DS, Jones DH, Lowell GH, White GL, Torossian K, Fries LF. ID Biomedical Corp of Quebec. Proteosome influenza vaccine. Патент США № US18247600P. 15.02.2000.
- Трухин В. П., Евтушенко А. Э., Красильников И. В., Савина Н. Н., Быков Д. Г., Уйба С. В., Васильев А. Н., Рыськова Е. В., Начарова Е. П., Араkelов С. А., авторы. Федеральное государственное унитарное предприятие «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» Федерального медико-биологического агентства (ФГУП СПбНИИВС ФМБА России). Способ получения антигена или антигенов для производства противогриппозной вакцины и вакцина на его основе. Патент РФ № RU2019118695A. 14.06.2019.

References

- EMA/CHMP/BWP/310834/2012 Rev.1 Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP) Guideline on Influenza vaccines — Quality module, 2017.
- Rekomendacii po proizvodstvu i kontrolyu vakciny protiv grippa inaktivirovannoj, Prilozhenie 3 serii texnicheskix dokladov VOZ # 927, 2005. Russian.
- Sabbaghi A, Miri SM, Keshavarz M, Zargar M, Ghaemi A. Inactivation methods for whole influenza vaccine production. *Rev Med Virol.* 2019; 29 (6): e2074.
- Savina NN, Ekimov AA, Trukhin VP, Evtushenko AE, Zhirenkina EN, Sinegubova EO. Evaluation of avian adenovirus inactivation methods used in the production of influenza vaccines. *Extreme Medicine.* 2021; (3): 84–9.
- Plotnikov VA, Grebennikova TV, Dudnikova EK, Shulpin MI, Lazareva SP, Nikonova ZB, i dr. O rasprostraneni virusa lejkoza ptic v pticevodcheskix xozyajstvax na territorii Rossii. *Sel'skoxozjaystvennaya biologiya.* 2013; 6: 36–42. Russian.
- Bister K, Varmus HE, Stavnezer E, Hunters E, Vogt PK. Biological and biochemical studies on the inactivation of avian oncoviruses by ultraviolet irradiation. *Virology.* 1977; 77 (2): 689–704.
- Herrera-Rodriguez J, Signorazzi A, Holtrop M, de Vries-Idema J, Huckriede A. Inactivated or damaged? Comparing the effect of inactivation methods on influenza virions to optimize vaccine production. *Vaccine.* 2019; 37 (12): 1630–7.
- Kap M, Arron GI, Loibner M, Hausleitner A, Siaulyte G, Zatloukal K, Riegman P. Inactivation of Influenza A virus, Adenovirus, and Cytomegalovirus with PAXgene Tissue Fixative and Formalin. *Biopreservation and Biobanking.* 2013; 11 (4): 229–34.
- Shuo Lei, Xun Gao, Yang Sun, Xiangyong Yu, Longshan Zhao, Gas chromatography-mass spectrometry method for determination of β -propiolactone in human inactivated rabies vaccine and its hydrolysis analysis, *Journal of Pharmaceutical Analysis.* 2018; 8 (6): 373–7.
- Rukovodstvo po issledovaniyu validacii virusnoj ochistki:

- proektirovanie, vklad i interpretaciya issledovanij, ispol'zuyushix inaktivaciyu i udalenie virusov, EMA CPMP/BWP/268/95, 1996. Russian.
11. Freshni RYa. Kul'tura zhivotnyx kletok: prakticheskoe rukovodstvo. Per. 5-go angl. izd. M.: BINOM. Laboratoriya znaniy, 2018; 691 s. Russian.
 12. Li Xue, Dong Xuan, Sun Xiaolong, Li Weihua, Zhao Peng, Cui Zhizhong, Wang Xin. Preparation and immunoprotection of subgroup B avian leukosis virus inactivated vaccine. *Vaccine*. 2013; 31 (46): 5479–85.
 13. Zavala, Guillermo, Sunny Cheng. Detection and Characterization of Avian Leukosis Virus in Marek's Disease Vaccines. *Avian Diseases*. 2006; 50 (2): 209–15.
 14. Haussmann C, Hauschild F, Jobst B, Novartis AG. Improvements in preparation of influenza virus vaccine antigens. Патент США № US6986808P. 18.03.2008.
 15. Burt DS, Jones DH, Lowell GH, White GL, Torossian K, Fries LF. ID Biomedical Corp of Quebec. Proteosome influenza vaccine. Патент США № US18247600P. 15.02.2000.
 16. Truhin VP, Evtushenko AJe, Krasilnikov IV, Savina NN, Bykov DG, Ujba SV, Vasilev AN, Ryskova EV, Nacharova EP, Arakelov SA, avtory. Federal'noe gosudarstvennoe unitarnoe predpriyatie «Sankt-Peterburgskij nauchno-issledovatel'skij institut vakcin i syvorotok i predpriyatie po proizvodstvu bakterijnyx preparatov» Federal'nogo mediko-biologicheskogo agentstva (FGUP SPbNIIVS FMBA Rossii). Sposob polucheniya antigena ili antigenov dlya proizvodstva protivogrippoznoj vakciny i vakcina na ego osnove. Patent RF # RU2019118695A. 14.06.2019. Russian.

РЕШЕНИЕ ЗАДАЧИ ФОРМИРОВАНИЯ БЕЗОПАСНОЙ КОНФИГУРАЦИИ РОБОТИЧЕСКОГО ПРОТЕЗА ВЕРХНЕЙ КОНЕЧНОСТИ ЧЕЛОВЕКА

А. Ш. Буреев^{1,2}, Е. В. Голобокова^{1,2}, Д. С. Жданов^{1,2} ✉, Я. В. Костелей^{1,2}, Р. В. Кошелев², Е. А. Фоменко²¹ Центр развития науки, технологий и образования в области обороны и обеспечения безопасности государства, Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия² Федеральный научно-клинический центр медицинской реабилитации и курортологии Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

На сегодняшний день остается актуальной разработка методов контроля позиционирования роботических манипуляторов с помощью систем технического зрения (СТЗ) с целью обеспечения безопасности пациентов и медицинского персонала при работе с медицинскими роботизированными реабилитационными устройствами. Целью исследования было разработать метод повышения безопасности применения роботизированных медицинских реабилитационных устройств путем разработки и апробации алгоритма расчета угловых положений роботизированных манипуляторов или роботических протезов, применяемых в восстановительном лечении и позволяющих воспроизвести естественную траекторию перемещения руки человека под контролем СТЗ. Дано описание роботизированного манипулятора, использованного при проведении исследований, представлены существующие подходы к расчету угловых положений приводов, а также описание предлагаемого алгоритма. Приведены сравнительные результаты работы предлагаемого алгоритма и существующих методов расчета угловых положений приводов роботизированных манипуляторов (роботических протезов) и предполагаемые направления для его доработки.

Ключевые слова: безопасность человека, управление манипулятором, роботический протез, роботизированная реабилитация, координата в трехмерном пространстве, системы технического зрения, кинематика

Финансирование: результаты были получены в рамках выполнения государственного задания Минобрнауки России, проект № FSWM-2022-0008.

Благодарности: заместителю генерального директора ФГБУ ФНКЦ МРИК ФМБА России Н. Абдулкиной за поддержку научного коллектива; проректору по научной и инновационной деятельности НИ ТГУ А. Ворожцову за помощь в развитии исследований в области медицинской робототехники.

Вклад авторов: Д. С. Жданов — разработка алгоритмов расчета безопасного перемещения роботизированных протезов; Я. В. Костелей — программная реализация алгоритмов; А. Ш. Буреев — анализ рисков применения медицинских роботов и роботизированных протезов; Е. В. Голобокова, Р. В. Кошелев — обзор литературы; Е. А. Фоменко — анализ, направленный на выявление траекторий перемещения, неисполнимых с точки зрения мехатроники.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Федерального научно-клинического центра медицинской реабилитации и курортологии Федерального медико-биологического агентства (протокол № 1 от 06 июля 2022 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Дмитрий Сергеевич Жданов
ул. Красноармейская, д. 14, г. Томск, 634029, Россия; d_s_zhdanov@mail.ru

Статья получена: 06.12.2022 **Статья принята к печати:** 20.12.2022 **Опубликована онлайн:** 30.12.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.050

SOLUTION TO THE PROBLEM OF DESIGNING A SAFE CONFIGURATION OF A HUMAN UPPER LIMB ROBOTIC PROSTHESIS

Bureev AS^{1,2}, Golobokova EV^{1,2}, Zhdanov DS^{1,2} ✉, Kosteley YaV^{1,2}, Koshelev RV², Seleznev AI^{1,2}, Fomenko EA²¹ Center for Development of Science, Technology and Education in the Field of Defense and State Security, National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia² Federal Research and Clinical Center of Medical Rehabilitation and Balneology of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

This study aimed to develop a method allowing to improve safety of use of robotic medical rehabilitation devices by designing and testing an algorithm for calculation of the angular positions of rehabilitation robotic manipulators or robotic prostheses and allowing to reproduce the natural arc of a human arm under control of a CVS. The Introduction section supports the urgency of development of the methods granting control over positioning of robotic manipulators with the help of a computer vision system (CVS) and thus guarantee safety of patients and medical personnel in the context of work with medical robotic rehabilitation devices. The Materials and Methods section contains a brief description of the robotic arm used in this study, a description of the existing approaches to calculation of angular positions of drives, and a description of the proposed algorithm. The final sections compare application of the proposed algorithm and existing methods of calculation of angular positions of drives of robotic manipulators (robotic prostheses) and outline the possible directions for further improvement.

Keywords: human safety, manipulator control, robotic prosthesis, robotic rehabilitation, three-dimensional coordinate, vision systems, kinematics

Funding: The study was conducted in the context of execution of the State Task by the Ministry of Education and Science of Russia, project #FSWM-2022-0008.

Acknowledgments: N. Abdulkina, deputy general director of the Federal Scientific and Clinical Center for Medical Rehabilitation and Balneology of the Federal Medical Biological Agency, for comprehensive support of the researchers; A. Vorozhtsov, vice-rector for research and innovation activities of the National Research Tomsk State University, for his contribution to the scientific progress in the field of medical robotics.

Author contribution: Luzgina NG, Rusanov AL — study concept; Romashin DD, Kozhin PM, Luzgina NG, Rusanov AL — study design and literature review; Romashin DD, Kozhin PM — study planning and execution; Kozhin PM, Romashin DD, Luzgina NG, Rusanov AL — data analysis and interpretation; Kozhin PM, Romashin DD — manuscript writing; Kozhin PM, Romashin DD, Luzgina NG, Rusanov AL — manuscript editing.

Compliance with the ethical standards: Conclusion of the local ethical committee at the Federal Scientific and Clinical Center for Medical Rehabilitation and Balneology of the Federal Medical Biological Agency #1 of July 06, 2022. At this stage, the study involved no patients, therefore, no signed voluntary informed consents forms were required.

✉ **Correspondence should be addressed:** Dmitry S. Zhdanov
Krasnoarmeyskaya, 14, Tomsk, 634029, Russia; D_S_Zhdanov@mail.ru

Received: 06.12.2022 **Accepted:** 20.12.2022 **Published online:** 30.12.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.050

В настоящее время общий тренд научно-технологического развития во всем мире — активное внедрение роботизированного оборудования во всех сферах экономики. В исследовании консалтинговой компании The Boston Consulting Group (BCG) заявлено, что к 2030 г. общий объем мирового рынка профессиональной сервисной робототехники достигнет объема в \$260 млрд [1].

Медицинская робототехника — один из лидирующих по уровню технологий и востребованности сегментов профессиональной сервисной робототехники. Как говорил отец коммерческой робототехники Джозеф Энгельбергер, «...больницы — это идеальное место и идеальная окружающая среда для использования роботов» [2].

Тем не менее, несмотря на широту внедрения роботических медицинских систем, до сих пор недостаточно внимания уделено вопросам обеспечения безопасности их применения как для пациента, так и для медицинского персонала. В имеющихся отдельных исследованиях указывается, что по результатам изучения документов, касающихся итогов операций с использованием роботов, было обнаружено более 1,5 тыс. случаев различных неблагоприятных последствий [3]. Роботизированные операции повлекли гибель 144 человек в 2000–2013 гг. В период с 2000 по 2013 г. было выявлено более 190 случаев возгорания или поломки оборудования в процессе подобных операций. Системные ошибки, такие как потеря видеосигнала, способствовали почти 800 другим неблагоприятным исходам роботизированных операций [3].

По мнению авторов статьи, роботизированная реабилитация несет несколько иные риски для пациентов, заключающиеся в возможном некорректном перемещении (по недопустимой траектории или на недопустимый угол) манипуляторов робота, влекущем за собой травмы пациента или медицинского персонала. Учитывая это, авторами была поставлена перед собой задача разработки метода повышения безопасности человека при эксплуатации медицинских реабилитационных роботов путем введения дополнительного контура контроля перемещения манипулятора робота в виде системы технического зрения (СТЗ). Под контролем перемещения манипулятора в контексте проведенного исследования понимается определение факта его перемещения в заданную точку внутри локальной системы координат. Таким образом, в рамках работы СТЗ использовались только для подтверждения успешности выполнения перемещений манипулятора без оценки его итоговой конфигурации. Для этой цели проводили анализ координат в трехмерном пространстве для каждого из узлов манипулятора.

В статье метод позиционирования узлов роботизированных манипуляторов рассмотрен на примере антропоморфного робота AR-600E (НПО «Андроидная техника»; Россия), использованного в качестве модели для отработки возможного способа повышения безопасности и точности позиционирования антропоморфных роботических протезов верхних конечностей человека. Особое внимание уделено решению задачи поиска координат отдельных узлов манипулятора для формирования его конфигурации, наиболее близкой к движениям руки человека. Это необходимо для создания медицинских реабилитационных устройств, замещающих отсутствующую или дисфункциональную руку пациента и максимально приближенных по своей кинематике к руке человека, что повышает безопасность их применения.

Следует учитывать, что в отличие от манипуляторов промышленных роботов, антропоморфный реабилитационный

роботический манипулятор не зафиксирован на жестком основании. Это, наряду со сложной структурой механизма и большим количеством взаимосвязанных узлов, приводит к получению большой ошибки позиционирования, что в ряде случаев может оказаться опасным для владельца роботического протеза или окружающих. В таких условиях задача точного и безопасного позиционирования является нетривиальной и во многом зависит от способа построения самого механизма.

Для решения этой задачи предлагается в контур управления роботическим реабилитационным антропоморфным манипулятором дополнительно ввести модуль СТЗ, отслеживающий положение манипулятора в поле зрения системы технического зрения и формирующий команды на прерывание или корректировку потенциально опасного движения. При этом будет вестись распознавание как схвата манипулятора, так и специальных маркеров, фиксируемых на его узлах [4, 5]. Но даже использование СТЗ при применении традиционных методов оценки положения манипулятора (относительно элементов системы технического зрения) дает абсолютную среднюю ошибку калибровки между системой технического зрения [6, 7] и схвата манипулятора более ± 5 см [4].

Традиционно, текущее положение узлов манипулятора определяется путем запроса их координат в трехмерном пространстве из схемы прямой кинематики. Она формируется на основании показаний датчиков углового положения соответствующих приводов. В той же схеме присутствуют и текущие координаты СТЗ. Программное обеспечение на начальных стадиях должно осуществить поиск целевого объекта и расчет его пространственного положения относительно элементов системы либо абсолютного нуля кинематической схемы. Операцию можно осуществлять путем использования position-based (PBVS), image-based (IBVS) visual servoing или гибридных методов. В общем виде перечисленные методы осуществляют расчет желаемых координат при анализе изображений и могут быть использованы как для работы промышленных манипуляторов и антропоморфных роботов, так и роботических протезов руки человека.

Согласно методу IBVS, проводят сравнение рассчитанного желаемого и текущего положения манипулятора или объекта на плоскости. Полученную ошибку в виде разности желаемого и текущего положения используют в виде обратной связи. Связь между полученной информацией и изменениями в положении узлов обеспечивается путем использования матрицы Якоби и прямой кинематической схемы робота [8]. Существует большое количество методов, позволяющих определить эту связь [9–11]. При этом необходимо учитывать, что использование одной маркерной точки на объекте (объект манипуляции либо сам манипулятор) дает возможность управления только двумя степенями свободы. Для управления шестью степенями свободы потребуется использовать как минимум четыре маркера. При этом повышается вероятность получения однозначного решения при формировании управляющей команды [11, 12]. Метод IBVS не обеспечивает линейного управления узлами робота и не использует трехмерную информацию о положении объекта манипуляции. Это приводит к формированию неоптимальных или нереализуемых траекторий, что может быть решено подбором визуальных параметров [13–15].

При использовании метода PBVS координаты объектов внутри рабочего пространства определяют по отношению к системе координат камеры, входящей в состав системы

технического зрения. Для этого учитывается совокупность параметров геометрической модели отслеживаемого объекта и параметров камеры. Параметры отслеживаемого манипулятора, находящегося в рабочей зоне, известны. Их изменения можно отслеживать при получении ответа от кинематической схемы робота. Геометрические параметры объекта манипуляции, напротив, сильно зависят от параметров системы технического зрения и способов трехмерной локализации, реализованных в ней [16–22].

При гибридном визуальном сервоуправлении совместно используют методы IBVS и PBVS с целью повышения точности формирования управляющих команд путем использования, например, отдельного контроля над степенями свободы управляемого манипулятора [23–27]. Такие системы менее зависимы от точности калибровки камер робота и дают более точное представление о геометрических характеристиках объектов. Однако они сложны в реализации и потребляют больше вычислительных ресурсов. Риск формирования неоптимальных или нереализуемых траекторий остается. Это может быть связано как с ошибками позиционирования, так и с неверной оценкой трехмерного положения отслеживаемых объектов системой технического зрения робота.

При расчете оптимальных позиций схвата манипулятора должны быть учтены механические ограничения узлов, как при первоначальном позиционировании, так и при последующей манипуляции с предметом. Кроме того, ввиду использования антропоморфных протезов для повышения безопасности применения в «человеческой» среде позиционирование манипулятора может включать в себя остановку перед препятствиями при решении задачи достижения целевого положения.

При разработке модуля управляющего программного обеспечения, ответственного за формирование траектории перемещения манипуляторов робота AR-600E, при использовании существующих методов обработки информации, поступающей от СТЗ, возникает высокая вероятность формирования небезопасной либо нереализуемой траектории перемещения манипулятора к целевому объекту. Кроме этого, была поставлена задача

построения траектории перемещения манипуляторов, схожей с естественными движениями руки человека. При проведении работ были оценены различные варианты решения задачи обратной кинематики манипулятора и предложен метод, обеспечивающий построение ожидаемой траектории перемещения.

Целью исследования была разработка метода повышения безопасности применения роботизированных медицинских реабилитационных устройств путем разработки и апробации алгоритма расчета угловых положений роботизированных манипуляторов или роботических протезов, применяемых в восстановительном лечении и позволяющих воспроизвести естественную траекторию перемещения руки человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В процессе проведения работ был создан ряд алгоритмических решений, позволяющих сформировать траекторию перемещения антропоморфного манипулятора, приближенную к естественной траектории руки человека. Решения были реализованы в виде программного обеспечения, управляющего манипулятором антропоморфного робота AR-600E в симуляционной среде с использованием алгебры кватернионов. Манипулятор включает следующие узлы (рис. 1):

1) группа узлов Shoulder осуществляет перемещение узла Elbow и нижестоящих узлов манипулятора по фронтальной (ShoulderS), сагиттальной (ShoulderF) и вертикальной осям (ElbowR);

2) узел Elbow осуществляет перемещение дочерних узлов по сагиттальной оси;

3) узел WristR осуществляет перемещение дочерних узлов по вертикальной оси;

4) узлы WristF и WristS обеспечивают перемещение кисти по фронтальной и сагиттальной осям соответственно.

Управление пальцами реализовано при помощи приводов, располагаемых на узле WristS.

Пространственное положение узлов манипулятора рассчитывали при помощи метода Forward and Backward Reaching Inverse Kinematics (FABRIK) [28], учитывающего

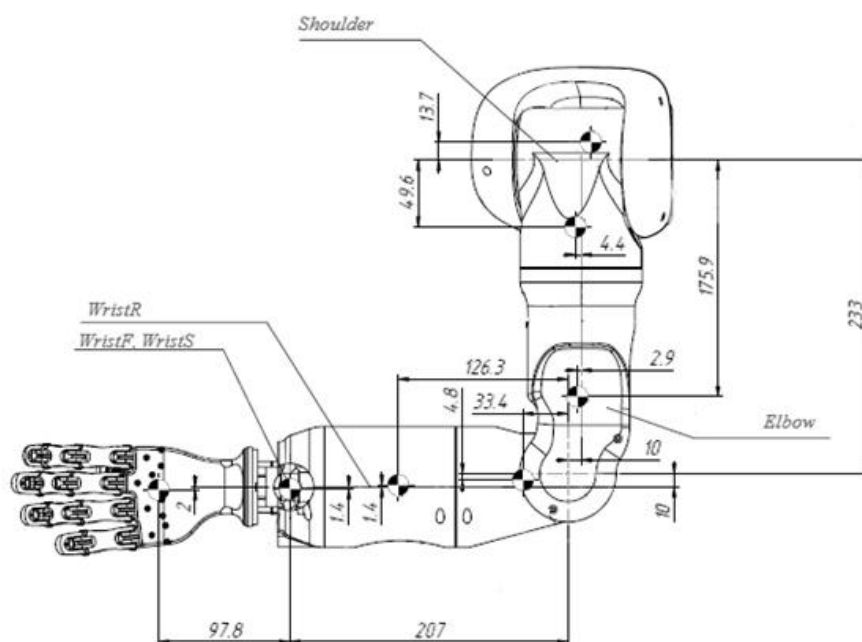


Рис. 1. Структура манипулятора AR-600E

ограничения и представляющего их координаты, совокупность которых позволяет кисти достичь заданной позиции в трехмерном пространстве.

Захват изображений рабочей области производится при помощи двух видеокамер, расположенных на голове антропоморфного механизма и регистрирующих цветные изображения. Контроль перемещения схвата манипулятора и оценка достижения им заданной координаты внутри рабочей области происходит с использованием методов машинного обучения, основной задачей которых является детектирование схвата и оценка выполнения им заданного действия внутри рабочей области.

Корректность позиционирования схвата оценивали двумя способами: путем запроса ответа от приводов манипулятора с последующим воспроизведением на его основе текущей конфигурации схвата манипулятора и с использованием СТЗ антропоморфного механизма. Контроль всей конфигурации манипулятора при этом не производится ввиду невозможности нахождения всех его узлов внутри рабочей области СТЗ. Для решения этой задачи после формирования конфигурации пространственного положения происходит расчет угловых положений приводов, приводящих узлы манипулятора в заданные координаты в трехмерном пространстве. Рассмотрим возможные пути их расчета на примере группы Shoulder (рис. 1), перемещения которой влияют на пространственное положение всех остальных узлов манипулятора. Было произведено сравнение работы следующих методов расчета угловых положений:

1) с использованием ортогональных проекций точек узлов манипулятора. Угол между двумя точками (например, оси узла Elbow и группы Shoulder) рассчитывали согласно формуле:

$$angle = 90^\circ - asin\left(\frac{a}{c}\right), \quad (1)$$

где a — модуль координаты y для соответствующей оси узла; c — расстояние между узлами в соответствующей ортогональной плоскости;

2) как угол поворота ортогональной плоскости между проекцией узла Elbow при инициализации кинематической схемы и проекцией в анализируемой плоскости его перемещения. Расчет происходил согласно формуле:

$$\cos(\bar{a}; \bar{b}) = \frac{(\bar{a}; \bar{b})}{|\bar{a}| \cdot |\bar{b}|} = \frac{a_1 \cdot b_1 + a_2 \cdot b_2 + a_3 \cdot b_3}{\sqrt{a_1^2 + a_2^2 + a_3^2} \cdot \sqrt{b_1^2 + b_2^2 + b_3^2}}, \quad (2)$$

где \bar{a} и \bar{b} — трехмерные векторы, между которыми рассчитывается угол; a_n , b_n — соответствующие координаты трехмерных векторов после формирования ортогональных проекций;

3) через проекцию координаты узла Elbow в трехмерном пространстве на соответствующие плоскости перемещения группы Shoulder:

$$\begin{aligned} YZ &= \left[0; \frac{Elbow.y \cdot dist}{Elbow.x + dist}; \frac{Elbow.z \cdot dist}{Elbow.x + dist} \right], \\ XZ &= \left[\frac{Elbow.x \cdot dist}{Elbow.y + dist}; 0; \frac{Elbow.z \cdot dist}{Elbow.y + dist} \right], \\ XY &= \left[\frac{Elbow.x \cdot dist}{Elbow.z + dist}; \frac{Elbow.y \cdot dist}{Elbow.z + dist}; 0 \right], \end{aligned} \quad (3)$$

$$dist = \sqrt{(Elbow.x - null.x)^2 + (Elbow.y - null.y)^2 + (Elbow.z - null.z)^2}$$

где $dist$ — расстояние между текущей координатой оси узла Elbow и общей осью ($null$) узлов ShoulderF, ShoulderS (группа Shoulder). Расчет угловых положений осуществляли как по (1), так и по (2);

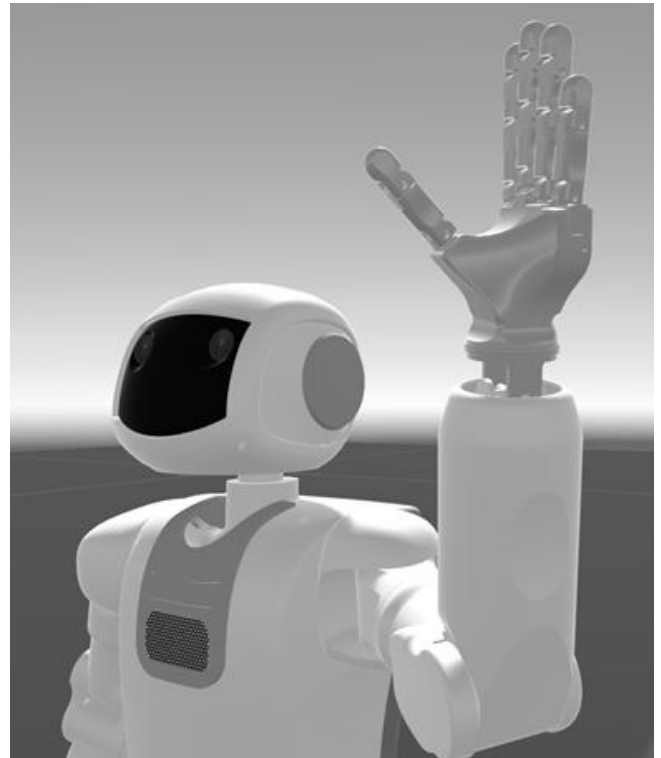


Рис. 2. Пример конфигурации манипулятора антропоморфного механизма AR-600E

4) путем использования метода «Shortest arch», применяемого разработчиками игр для расчета кратчайшей дуги перемещения связанных узлов виртуальных объектов из начальной в заданную точки трехмерного пространства. Практическая реализация метода сводится к формированию кватерниона поворота из кватернионов двойного поворота и нулевого вращения. Результирующий кватернион получается в результате сложения кватерниона двойного поворота и кватерниона идентичности;

5) алгоритм, предложенный авторами статьи.

Способ вычисления угловых положений, предложенный и апробированный коллективом авторов, использует матрицу взаимных положений узлов манипулятора, представляющую собой набор координат, соответствующих определенным углам. Шаг между ними устанавливается при инициализации алгоритма, что позволяет избежать повторного формирования матрицы. В качестве входных данных для предложенного алгоритма используется координата точки схвата в трехмерном пространстве, которая представляет собой центр кисти манипулятора (рис. 1). Далее применяется метод FABRIK, дающий набор координат точек осей основных узлов, совокупность которых формирует конфигурацию манипулятора в трехмерном пространстве. После этого внутри сформированной матрицы взаимных положений по принципу минимума расстояний ($dist$; формула (3)) между координатами предполагаемого положения узла Elbow и координатами, хранимыми в матрице, происходит выбор наиболее подходящего углового положения привода. В случае необходимости происходит дополнительная корректировка углового положения за счет формирования локальной матрицы взаимных положений с более точным шагом внутри небольшого диапазона углов поворота. Затем происходит расчет углового положения привода узла Elbow согласно формуле (1). При этом в качестве значения a выступает значение по оси y ортогональной проекции

Таблица 1. Сравнительный анализ результатов работы алгоритмов расчета угловых положений приводов узлов антропоморфного манипулятора

Положение I										
Метод	Угловые положения узлов				Координаты узлов					
	Elbow		WristS		Elbow			WristS		
	ShF, °	ShS, °	EIR, °	EI, °	x, мм	y, мм	z, мм	x, мм	y, мм	z, мм
0	0	0	0	0	191,92	229	3,58	201,85	-14,5	-49,5
1	-26,72	39,16	-3,16	-52,48	321,34	304,77	109,56	394,25	239,27	338,9
2	-27,42	43,16	58,51	-53,52	340,21	318,79	105,39	526	320,28	271,84
3	-27,42	47,72	52,23	-53,52	353,67	330,78	101,59	544,74	347,27	261,05
4	-27,42	43,16	58,51	-53,52	340,25	318,85	105,42	525,96	320,33	271,87
5	-27,42	60,97	52,23	-53,52	586,38	432,61	223,53	387,28	370,68	86,67
6	-26,73	39,15	-2,90	-52,53	321,31	304,78	109,6	394,77	239,73	338,92
Положение II										
Метод	Elbow		WristS		Elbow			WristS		
	ShF, °	ShS, °	EIR, °	EI, °	x, мм	y, мм	z, мм	x, мм	y, мм	z, мм
	0	0	0	0	191,92	229	3,58	201,85	-14,50	-49,50
1	10,45	2,54	11,73	-84,81	211,85	231,44	-35,88	222,95	116,65	185,26
2	10,52	3,07	20,71	-85,86	215,97	231,91	-36,70	264,48	124,16	182,92
3	10,52	8,61	20,71	-85,86	238,42	234,61	-31,99	292,75	135,74	190,43
4	10,52	3,07	20,71	-85,86	215,97	231,91	-36,70	264,48	124,16	182,92
5	10,52	8,61	20,71	-85,86	238,42	234,61	-31,99	292,75	135,74	190,43
6	10,51	3,04	11,15	-84,89	213,77	231,59	-35,70	223,09	117,25	185,78
Положение III										
Метод	Elbow		WristS		Elbow			WristS		
	ShF, °	ShS, °	EIR, °	EI, °	x, мм	y, мм	z, мм	x, мм	y, мм	z, мм
	0	0	0	0	191,92	229	3,58	201,85	-14,50	-49,50
1	-70,09	69,21	9,7	-31,31	393,83	443,58	112,32	598,23	493,83	246,09
2	-74,57	85,2	69,97	-32,36	419,98	465,41	50,68	658,75	533,46	72,92
3	-76,68	85,49	68,62	-32,36	421,26	467,23	45,12	660,52	535,69	59,34
4	-74,57	85,2	69,97	-32,36	419,98	465,41	50,68	58,75	533,46	72,92
5	-76,68	86,64	68,62	-32,36	421,5	467,5	44,02	660,75	536,27	57,02
6	-70,00	69,64	8,2	-31,41	394,33	444,03	111,57	598,59	494,73	245,3

искомого положения, а в качестве стороны с — длина узла. Расчет углового положения привода ElbowR производится относительно оси узла WristR (рис. 1). Здесь применяется итеративный подход — при помощи последовательного формируемых кватернионов осуществляется поворот WristR с заданным шагом. Процедура останавливается по условию минимума расстояний между координатами, рассчитанными методом FABRIK, и координатами, извлеченными из матрицы взаимных положений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При проведении экспериментальных исследований предложенные методы были применены для расчета угловых положений приводов манипулятора антропоморфного механизма AR-600E в симуляционной среде. Для этого оператором вручную задавались желаемые положения узлов, фиксировались результирующие угловые положения их приводов, а также координаты осей приводов Elbow и WristS в трехмерном пространстве. Далее происходило сравнение полученных результатов и выбор наилучшего метода по критерию близости результирующих координат с координатами осей узлов, выведенными оператором.

Пример конфигурации манипулятора при проведении исследований представлен на рис. 2.

В табл. 1 представлены угловые положения узлов группы Shoulder и узла Elbow:

- 1) 0 — начальное положение для антропоморфного механизма;
- 2) 1 — угловые положения, выставленные оператором;
- 3) 2 — угловые положения для конфигурации, рассчитанные согласно формуле (1);
- 4) 3 — угловые положения для конфигурации, рассчитанные согласно формуле (2);
- 5) 4 — угловые положения для конфигурации, рассчитанные через проекцию координаты на соответствующую ось с использованием формулы (1);
- 6) 5 — угловые положения для конфигурации, рассчитанные через проекцию координаты на соответствующую ось с использованием формулы (2);
- 7) 6 — угловые положения, рассчитанные предлагаемым методом.

Ячейки табл. 1 Elbow и WristS содержат координаты осей этих узлов в трехмерном пространстве, полученные при применении к ним сформированных угловых положений приводов. Ячейки Elbow и WristR — информацию об

Таблица 2. Абсолютная разница координат осей узлов Elbow и WristR, полученных при расчете угловых положений их приводов рассматриваемыми методами

Положение I										
Метод	Угловые положения узлов				Координаты узлов					
	Elbow		WristS		Elbow			WristS		
	ShF, °	ShS, °	EIR, °	El, °	x, мм	y, мм	z, мм	x, мм	y, мм	z, мм
2	0,7	4	61,67	1,04	18,87	14,01	4,17	131,75	81,01	67,06
3	0,7	8,56	55,39	1,04	32,33	26	7,97	150,49	108	77,85
4	0,7	4	61,67	1,04	18,91	14,08	4,14	131,71	81,06	67,03
5	0,7	21,81	55,39	1,04	265,04	127,84	113,97	6,98	131,41	252,23
6	0,01	0,01	0,26	0,05	0,03	0,01	0,04	0,52	0,46	0,02
Положение II										
Метод	Elbow		WristS		Elbow			WristS		
	ShF, °	ShS, °	EIR, °	El, °	x, мм	y, мм	z, мм	x, мм	y, мм	z, мм
2	0,07	0,53	8,98	1,05	4,12	0,47	0,82	41,53	7,51	2,34
3	0,07	6,07	8,98	1,05	26,57	3,17	3,89	69,8	19,09	5,17
4	0,07	0,53	8,98	1,05	4,12	0,47	0,82	41,53	7,51	2,34
5	0,07	6,07	8,98	1,05	26,57	3,17	3,89	69,8	19,09	5,17
6	0,06	0,5	0,58	0,08	1,92	0,15	0,18	0,14	0,6	0,52
Положение III										
Метод	Elbow		WristS		Elbow			WristS		
	ShF, °	ShS, °	EIR, °	El, °	x, мм	y, мм	z, мм	x, мм	y, мм	z, мм
2	4,48	15,99	60,27	1,05	26,15	21,83	61,64	60,52	39,63	173,17
3	6,59	16,28	58,92	1,05	27,43	23,65	67,2	62,29	41,86	186,75
4	4,48	15,99	60,27	1,05	26,15	21,83	61,64	539,48	39,63	173,17
5	6,59	17,43	58,92	1,05	27,67	23,92	68,3	62,52	42,44	189,07
6	0,09	0,43	1,5	0,1	0,5	0,45	0,75	0,36	0,9	0,79

угловых положениях (градусы) приводов, перемещающих соответствующие узлы в заданные точки трехмерного пространства.

Представленная таблица 2 иллюстрирует абсолютную разницу координат осей Elbow и WristR, между координатами, полученными в результате перемещения этих узлов оператором, и координатами, полученными при переводе их приводов в рассчитанные каждым из методов угловые положения. В табл. 2 не включена информация о положениях 0 и 1.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов, приведенных в табл. 1 и 2, дает возможность говорить о том, что предлагаемый метод расчета угловых положений приводов узлов позволяет сформировать именно заданную конфигурацию манипулятора и вывести его узлы в необходимые точки. Можно заметить, что и координаты положений узлов манипулятора, полученные при работе предлагаемого алгоритма, также отличаются от координат, которые были выведены оператором. Наибольшее расхождение полученных результатов от эталонных было получено для координаты оси узла WristS. Для компенсации этой ошибки был применен алгоритм, который так же, как и рассмотренный выше, использует матрицу взаимных положений. Для этого узел WristS необходимо перевести в его начальное положение. Затем в матрице взаимных положений, согласно условию минимума расстояний, происходит поиск значения углового положения привода. Для повышения быстродействия алгоритма было решено произвести первоначальный расчет значения углового положения привода узла WristF:

$$angle = - \left(nullWristF - \left(\pi - \arccos \left(\frac{a^2 + b^2 - c^2}{2 * a * b} \right) \right) \right), \quad (4)$$

где *angle* — предварительно рассчитываемый угол поворота привода WristS по сагиттальной оси; *nullWristF* — статичный угол поворота узла WristS относительно узла WristF, рассчитываемый при инициализации программного обеспечения антропоморфного механизма; *a* — длина предплечья антропоморфного механизма; *b* — расстояние от оси узла WristF до оси WristS; *c* — расстояние от оси узла WristS до оси узла WristR.

Расчет углового положения привода WristR осуществляется способом, аналогичным для ElbowR. Результаты корректировки для конфигураций манипулятора, сформированных в табл. 1, представлены в табл. 3.

Строка «Разница отклонений» в табл. 3 характеризует величину и направление изменений расстояний (миллиметры) между целевыми координатами узлов манипулятора в трехмерном пространстве и их расчетными значениями, полученными до и после проведения корректировки значений для угловых положений привода WristS. Анализ представленных данных позволяет говорить о том, что использование дополнительного этапа корректировки координат позволяет переместить узлы манипулятора с большей точностью. Погрешность перемещения при этом не превышает 0,5 мм. Этот механизм можно использовать при задании большого шага поиска при формировании матриц взаимных положений. Более точная подстройка конфигурации будет происходить на дополнительном этапе корректировки. Это позволит повысить быстродействие предлагаемого алгоритма.

Таблица 3. Результаты корректировки значений угловых положений для привода WristS

Положение	Положение I			Положение II			Положение III		
	WristF	WristS	WristR	WristF	WristS	WristR	WristF	WristS	WristR
Угловые положения, °	0	0,25	-0,04	0,25	-0,25	0,21	0,25	-1,5	-0,01
Ось координат, мм	x	y	z	x	y	z	x	y	z
Заданная координата	394,25	239,27	338,9	222,95	116,65	185,25	598,23	493,83	246,09
До корректировки	394,77	239,73	338,92	223,09	117,25	185,78	598,59	494,73	245,3
После корректировки	394,93	239,8	338,88	222,08	117,03	185,45	598	494,15	246,13
Отклонение по оси координат, мм	x	y	z	x	y	z	x	y	z
До корректировки	0,52	0,46	0,02	0,14	0,6	0,53	0,36	0,9	0,79
После корректировки	0,68	0,53	0,02	0,15	0,38	0,2	0,23	0,32	0,04
Разница отклонений	-0,16	-0,07	0	-0,01	0,22	0,33	0,13	0,58	0,75

ВЫВОДЫ

Создан алгоритм расчета угловых положений приводов узлов манипулятора, получающий наиболее точный и предсказуемый результат (табл. 2, 3), который в итоге позволяет получить конфигурацию, заданную оператором. При этом минимизирована вероятность получения непредсказуемого результата и перемещения манипулятора робота по небезопасной для человека траектории. Отдельно отметим, что точность расчета координат при использовании предложенного алгоритма напрямую зависит от величины шага поиска (градусы), использованного при формировании матриц взаимных положений. Созданный алгоритм был программно реализован и оптимизирован на языке C++. Время его исполнения на персональном компьютере (Intel Core i7-4770 3.40 GHz, RAM – 16 Gb) колебалось от 5 до 8 мс, что достаточно для управления манипулятором антропоморфного робота и при управлении роботическим протезом. Точность расчета угловых положений приводов можно повысить за счет уменьшения шага при формировании матриц взаимных положений. При этом повысится объем оперативной памяти, используемой

управляющим программным обеспечением, и понизится быстродействие алгоритма. Этого можно избежать путем применения в составе управляющего программного обеспечения модификации предложенного алгоритма, которая будет осуществлять расчет угловых положений приводов манипулятора с учетом его предыдущей конфигурации. В этом случае будет существенно сужена область поиска внутри матриц взаимных положений, что приведет к более быстрому формированию команды на изменение положения от программного обеспечения, управляющего манипулятором или роботическим протезом, и повысит точность его позиционирования. Использование СТЗ в процессе работы описанного алгоритма будет сведено к контролю факта корректного выполнения действия, осуществляемого манипулятором. Это значительно упростит алгоритмическое обеспечение, снизит вычислительную нагрузку и позволит уменьшить время формирования управляющей команды. Такой подход повысит безопасность эксплуатации роботизированных устройств в процессе решения задач медицинской реабилитации, критериями выполнения которых являются быстрота реакции и точность исполнения действий.

Литература

- Lässig R, Lorenz M, Sissimators E, Wicker I, Buchner T. Robotics Outlook 2030: How intelligence and mobility will shape the future. 2021. The Boston Consulting Group.
- Joseph F. Robotics in Service. Engelberger, 1989; 248 p.
- Alemzadeh H, Raman J, Leveson N, Kalbarczyk Z, Iyer RK. Adverse Events in Robotic Surgery: A Retrospective Study of 14 Years of FDA Data. PLOS ONE. 2016; 11 (4): e0151470. DOI: 10.1371/journal.pone.0151470.
- Taylor GR, Kleeman L. Grasping unknown objects with a humanoid robot. 2002.
- Kragic D, Christensen HA. Survey on Visual Servoing for Manipulation. Comput Vis Act Percept Lab. 2002; 15 p.
- Dong G, Zhu ZH. Position-based visual servo control of autonomous robotic manipulators. Acta Astronautica. 2015; 115: 291–302. DOI: 10.1016/j.actaastro.2015.05.036.
- Vahrenkamp N, Wieland S, Azad P, Gonzalez D, Asfour T, Dillmann R. Visual servoing for humanoid grasping and manipulation tasks. Humanoids 2008 — 8th IEEE-RAS International Conference on Humanoid Robots. 2008. DOI: 10.1109/ichr.2008.4755985.
- Chaumette F, Hutchinson S. Visual servo control, Part I: Basic approaches. IEEE Robotics and Automation Magazine. 2006; 13 (4): 82–90.
- Espiau B, Chaumette F, Rives P. A new approach to visual servoing in robotics. IEEE Transactions on Robotics and Automation. 1992; 8 (3): 313–26. DOI: 10.1109/70.143350.
- Chaumette F. Potential problems of stability and convergence in image-based and position-based visual servoing. Lecture Notes in Control and Information Sciences. 66–78. DOI: 10.1007/bfb0109663.
- Michel H, Rives P. Singularities in the determination of the situation of a robot effector from the perspective view of 3 points. Technical Report 1850, INRIA Research, 1993.
- Chaumette F. 2004. Image Moments: A General and Useful Set of Features for Visual Servoing. IEEE Transactions on Robotics. 20 (4): 713–23. DOI: 10.1109/tro.2004.829463.
- Tahri O, Chaumette F. Point-based and region-based image moments for visual servoing of planar objects. IEEE Transactions on Robotics. 2005; 21 (6): 1116–27. DOI: 10.1109/TRO.2005.853500.
- Tahri O, Mezouar Y, Chaumette F, Corke P. Decoupled Image-Based Visual Servoing for Cameras Obeying the Unified Projection Model. Robotics, IEEE Transactions on. 2010; 26: 684–97. DOI: 10.1109/TRO.2010.2051593.
- Dementhon DF, Davis LS. Model-based object pose in 25 lines of code. International Journal of Computer Vision. 1995; 15 (1–2): 123–41. DOI: 10.1007/bf01450852.
- Lowe DG. Three-dimensional object recognition from single two-dimensional images. Artif Intell. 1987; 31: 355–95.
- Malis E, Chaumette F, Boudet S. 2-1/2D visual servoing. IEEE

- Transactions on Robotics and Automation. 1999; 15 (2): 238–50.
18. Wilson WJ, Hulls CCW, Bell GS. Relative end-effector control using Cartesian position based visual servoing. *IEEE Transactions on Robotics and Automation*. 1996; 12 (5): 684–96. DOI: 10.1109/70.538974.
 19. Corke PI. Visual control of robot manipulators — a review. *Visual Servoing: Real-Time Control of Robot Manipulators Based on Visual Sensory Feedback*. 1993; pp. 1–31.
 20. Corke PI, Hutchinson SA. A new partitioned approach to image-based visual servo control. *IEEE Transactions on Robotics and Automation*. 2001; 17 (4): 507–15. DOI: 10.1109/70.954764.
 21. Deguchi K. Optimal motion control for image-based visual servoing by decoupling translation and rotation. *Proceedings. 1998 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems. Innovations in Theory, Practice and Applications (Cat. #. 98CH36190)*. DOI: 10.1109/iros.1998.727274.
 22. Gans NR, Hutchinson SA. Stable Visual Servoing Through Hybrid Switched-System Control. *IEEE Transactions on Robotics*. 2007; 23 (3): 530–40. DOI: 10.1109/tro.2007.895067.
 23. Kermorgant O, Chaumette F. Combining IBVS and PBVS to ensure the visibility constraint. *2011 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems*. 2011. DOI: 10.1109/iros.2011.6048254.
 24. Pang Y, Huang Q, Jia D, Tian Y, Gao J, Zhang W. Object manipulation of a humanoid robot based on visual Servoing. *2007 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems*. 2007. DOI: 10.1109/iros.2007.4399445.
 25. Moughlby AA, Cervera E, Martinet P. Real-time model based visual servoing tasks on a humanoid robot. *Intelligent Autonomous Systems 12*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013; c. 321–333.
 26. Agravante DJ, Cherubini A, Bussy A, Kheddar A. Human-humanoid joint haptic table carrying task with height stabilization using vision. *2013 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems*. 2013. DOI: 10.1109/iros.2013.6697019.
 27. Hogan N. Impedance Control: An Approach to Manipulation. *American Control Conference*. 1984; pp. 304–313. DOI: 10.23919/ACC.1984.4788393.
 28. Aristidou A, Lasenby J. FABRIK: A fast, iterative solver for the Inverse Kinematics problem. *Graphical Models*. 2011; 73 (5): 243–60. DOI: 10.1016/j.gmod.2011.05.003.

References

1. Lässig R, Lorenz M, Sissimators E, Wicker I, Buchner T. *Robotics Outlook 2030: How intelligence and mobility will shape the future*. 2021. The Boston Consulting Group.
2. Joseph F. *Robotics in Service*. Engelberger, 1989; 248 p.
3. Alemzadeh H, Raman J, Leveson N, Kalbarczyk Z, Iyer RK. Adverse Events in Robotic Surgery: A Retrospective Study of 14 Years of FDA Data. *PLOS ONE*. 2016; 11 (4): e0151470. DOI: 10.1371/journal.pone.0151470.
4. Taylor GR, Kleeman L. Grasping unknown objects with a humanoid robot. 2002.
5. Kragic D, Christensen HA. Survey on Visual Servoing for Manipulation. *Comput Vis Act Percept Lab*. 2002; 15 p.
6. Dong G, Zhu ZH. Position-based visual servo control of autonomous robotic manipulators. *Acta Astronautica*. 2015; 115: 291–302. DOI: 10.1016/j.actaastro.2015.05.036.
7. Vahrenkamp N, Wieland S, Azad P, Gonzalez D, Asfour T, Dillmann R. Visual servoing for humanoid grasping and manipulation tasks. *Humanoids 2008 — 8th IEEE-RAS International Conference on Humanoid Robots*. 2000. DOI: 10.1109/ichr.2008.4755985.
8. Chaumette F, Hutchinson S. Visual servo control, Part I: Basic approaches. *IEEE Robotics and Automation Magazine*. 2006; 13 (4): 82–90.
9. Espiau B, Chaumette F, Rives P. A new approach to visual servoing in robotics. *IEEE Transactions on Robotics and Automation*. 1992; 8 (3): 313–26. DOI: 10.1109/70.143350.
10. Chaumette F. Potential problems of stability and convergence in image-based and position-based visual servoing. *Lecture Notes in Control and Information Sciences*. 66–78. DOI: 10.1007/bfb0109663.
11. Michel H, Rives P. Singularities in the determination of the situation of a robot effector from the perspective view of 3 points. *Technical Report 1850, INRIA Research*, 1993.
12. Chaumette F. 2004. Image Moments: A General and Useful Set of Features for Visual Servoing. *IEEE Transactions on Robotics*. 20 (4): 713–23. DOI: 10.1109/tro.2004.829463.
13. Tahri O, Chaumette F. Point-based and region-based image moments for visual servoing of planar objects. *IEEE Transactions on Robotics*. 2005; 21 (6): 1116–27. DOI: 10.1109/TRO.2005.853500.
14. Tahri O, Mezouar Y, Chaumette F, Corke P. Decoupled Image-Based Visual Servoing for Cameras Obeying the Unified Projection Model. *Robotics, IEEE Transactions on*. 2010; 26: 684–97. DOI: 10.1109/TRO.2010.2051593.
15. Dementhon DF, Davis LS. Model-based object pose in 25 lines of code. *International Journal of Computer Vision*. 1995; 15 (1–2): 123–41. DOI: 10.1007/bf01450852.
16. Lowe DG. Three-dimensional object recognition from single two-dimensional images. *Artif Intell*. 1987; 31: 355–95.
17. Malis E, Chaumette F, Boudet S. 2-1/2D visual servoing. *IEEE Transactions on Robotics and Automation*. 1999; 15 (2): 238–50.
18. Wilson WJ, Hulls CCW, Bell GS. Relative end-effector control using Cartesian position based visual servoing. *IEEE Transactions on Robotics and Automation*. 1996; 12 (5): 684–96. DOI: 10.1109/70.538974.
19. Corke PI. Visual control of robot manipulators — a review. *Visual Servoing: Real-Time Control of Robot Manipulators Based on Visual Sensory Feedback*. 1993; pp. 1–31.
20. Corke PI, Hutchinson SA. A new partitioned approach to image-based visual servo control. *IEEE Transactions on Robotics and Automation*. 2001; 17 (4): 507–15. DOI: 10.1109/70.954764.
21. Deguchi K. Optimal motion control for image-based visual servoing by decoupling translation and rotation. *Proceedings. 1998 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems. Innovations in Theory, Practice and Applications (Cat. #. 98CH36190)*. DOI: 10.1109/iros.1998.727274.
22. Gans NR, Hutchinson SA. Stable Visual Servoing Through Hybrid Switched-System Control. *IEEE Transactions on Robotics*. 2007; 23 (3): 530–40. DOI: 10.1109/tro.2007.895067.
23. Kermorgant O, Chaumette F. Combining IBVS and PBVS to ensure the visibility constraint. *2011 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems*. 2011. DOI: 10.1109/iros.2011.6048254.
24. Pang Y, Huang Q, Jia D, Tian Y, Gao J, Zhang W. Object manipulation of a humanoid robot based on visual Servoing. *2007 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems*. 2007. DOI: 10.1109/iros.2007.4399445.
25. Moughlby AA, Cervera E, Martinet P. Real-time model based visual servoing tasks on a humanoid robot. *Intelligent Autonomous Systems 12*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013; c. 321–333.
26. Agravante DJ, Cherubini A, Bussy A, Kheddar A. Human-humanoid joint haptic table carrying task with height stabilization using vision. *2013 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems*. 2013. DOI: 10.1109/iros.2013.6697019.
27. Hogan N. Impedance Control: An Approach to Manipulation. *American Control Conference*. 1984; pp. 304–313. DOI: 10.23919/ACC.1984.4788393.
28. Aristidou A, Lasenby J. FABRIK: A fast, iterative solver for the Inverse Kinematics problem. *Graphical Models*. 2011; 73 (5): 243–60. DOI: 10.1016/j.gmod.2011.05.003.

ВЫЧИСЛИТЕЛЬНЫЙ ФАНТОМ ДЛЯ ДОЗИМЕТРИИ КРАСНОГО КОСТНОГО МОЗГА НОВОРОЖДЕННОГО РЕБЕНКА ОТ ИНКОРПОРИРОВАННЫХ БЕТА-ИЗЛУЧАТЕЛЕЙ

П. А. Шарагин¹✉, Е. А. Шишкина^{1,2}, Е. И. Толстых¹

¹ Уральский научно-практический центр радиационной медицины Федерального медико-биологического агентства России, Челябинск, Россия

² Челябинский государственный университет, Челябинск, Россия

Внутреннее облучение красного костного мозга (ККМ), обусловленное техногенными остеотропными радионуклидами, может приводить к серьезным медицинским последствиям. Так, радиоактивное загрязнение реки Течи в 1950-е годы стало причиной облучения ККМ у жителей прибрежных территорий, что привело к возникновению хронического лучевого синдрома у некоторых из них, а также повысило риск развития лейкозов в когорте этих жителей. Основными источниками внутреннего облучения ККМ были остеотропные бета-излучатели ^{89,90}Sr. Усовершенствование дозиметрии внутреннего облучения ККМ является важным этапом уточнения рисков хронического радиационного воздействия для жителей прибрежных территорий. Для оценки поглощенной энергии в ККМ от инкорпорированного ⁹⁰Sr используют вычислительные фантомы, в которых можно имитировать транспорт излучений. Фантом — это репрезентативное цифровое представление геометрии костей скелета и ККМ. Целью работы было разработать вычислительный фантом скелета новорожденного ребенка для дозиметрии ККМ от инкорпорированного ⁹⁰Sr. Для моделирования скелета использовали оригинальную методику SPSPD (Stochastic parametric skeletal dosimetry): участки скелета с активным гемопоэзом моделировали как набор фантомов простой геометрической формы, описывающих отдельные участки костей скелета. Содержание ККМ в скелете, а также параметры фантомов оценивали на основе опубликованных результатов измерений реальных костей. В результате был сгенерирован вычислительный фантом основных участков скелета с активным гемопоэзом для новорожденного ребенка, включающий 34 фантома участков костей. Смоделированный фантом имитирует структуру костной ткани, а также вариабельность параметров скелета внутри популяции и хорошо соответствует измерениям реальных костей.

Ключевые слова: красный костный мозг, трабекулярная кость, кортикальная кость, дозиметрия костного мозга, вычислительные фантомы, ⁹⁰Sr

Финансирование: работа выполнена в рамках реализации федеральной целевой программы «Обеспечение ядерной и радиационной безопасности» и при финансовой поддержке Федерального медико-биологического агентства России. Методологические подходы были разработаны при финансовой поддержке Федерального медико-биологического агентства России и Управления международных программ здравоохранения Министерства энергетики США в рамках совместного американо-российского проекта JCCRER 1.1.

Вклад авторов: все авторы внесли равнозначный вклад в разработку методики исследования, получение, анализ и интерпретацию данных, в написание и редактирование статьи.

✉ **Для корреспонденции:** Павел Алексеевич Шарагин
ул. Воровского, д. 68-а, г. Челябинск, 454141, Россия; sharagin@urcm.ru

Статья получена: 10.11.2022 **Статья принята к печати:** 19.12.2022 **Опубликована онлайн:** 27.12.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.045

COMPUTATIONAL PHANTOM FOR RED BONE MARROW DOSIMETRY FROM INCORPORATED BETA EMITTERS IN A NEWBORN BABY

Sharagin PA¹✉, Shishkina EA^{1,2}, Tolstykh EI¹

¹ Urals Research Center for Radiation Medicine of the Federal Medical-Biological Agency, Chelyabinsk, Russia

² Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

Active (red) bone marrow (AM) exposure due to ingested bone-seeking radionuclides can lead to grave medical consequences. For example, a radioactive contamination of the Techa River in the 1950s caused exposure to AM for riverside residents and led to chronic radioactive exposure syndrome in some of them, with higher risk of leukemia. The main sources of the marrow exposure were the bone-seeking beta emitters ^{89,90}Sr. Improving the dosimetry of AM internal exposure is an important step in clarifying the risks of chronic radiation exposure for riverside residents. To evaluate the energy absorbed by AM from incorporated ⁹⁰Sr it is customary to use computational phantoms where radiation transport can be emulated. A phantom is a representative digital representation of skeletal bone geometry and AM. The goal of this work was to develop a computational phantom of a newborn skeleton for dosimetry of AM from incorporated ⁹⁰Sr. The researchers have used the Stochastic Parametric Skeletal Dosimetry method (SPSPD), where hematopoietic sites were modeled as a set of phantoms of simple geometric shape describing individual skeletal bone areas. The AM content in the skeleton as well as the phantom parameters were evaluated on the basis of published measurements of real bones. As a result, a computational phantom of the main skeletal hematopoietic sites was generated for a newborn baby, including 34 phantoms of bone areas. The simulated phantom simulates the bone structure as well as the variability of skeletal parameters within the population and corresponds well to measurements of real bones.

Keywords: active bone marrow, trabecular bone, cortical bone, bone marrow dosimetry, computational phantoms, ⁹⁰Sr

Funding: The work was performed within the framework of the Federal Targeted Program "Nuclear and Radiation Safety" and was financially supported by the Federal Medical — Biological Agency of Russia. The methodological approaches were developed with financial support from the Federal Medical — Biological Agency of Russia and the Office of International Health Programs of the U.S. Department of Energy as part of the joint U.S.-Russian JCCRER 1.1 project.

Author contribution: all authors contributed equally to the development of research methodology, data acquisition, analysis, and interpretation, and to the writing and editing of the article.

✉ **Correspondence should be addressed:** Pavel Alekseevich Sharagin
Vorovskogo, 68-a, Chelyabinsk, 454141, Russia; sharagin@urcm.ru

Received: 10.11.2022 **Accepted:** 19.12.2022 **Published online:** 27.12.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.045

Внутреннее облучение красного костного мозга (ККМ), обусловленное техногенными остеотропными радионуклидами, может приводить к серьезным медицинским последствиям. Такое облучение может происходить как в рамках радионуклидной терапии, так и после попадания радионуклидов в окружающую среду вследствие испытаний ядерного оружия или радиационных аварий. Радиоактивное загрязнение реки Течи в 1950-е годы привело к облучению ККМ у жителей прибрежных территорий при средних дозах около 0,35 Гр, что стало причиной возникновения хронического лучевого синдрома [1–4] и повышенного риска развития лейкозов в когорте жителей прибрежных сел. Основными источниками внутреннего облучения ККМ для них были остеотропные бета-излучатели $^{89,90}\text{Sr}$ [2]. В этом контексте совершенствование дозиметрии ККМ от ^{90}Sr является актуальной задачей радиобиологии и радиационной защиты. Дозиметрия ^{90}Sr включает в себя биокинетическое моделирование, в рамках которого оценивается его распределение по тканям организма и расчет удельной активности ^{90}Sr в тканях-источниках, а также дозиметрическое моделирование переноса энергии от ткани — источника излучения (кости) к ткани-мишени (ККМ). Результатом дозиметрического моделирования являются коэффициенты перехода (DF) от удельной активности источника излучения к мощности поглощенной дозы в мишени. Важный этап дозиметрического моделирования — разработка вычислительных фантомов, т. е. репрезентативного цифрового представления геометрии тканей источников и мишеней, в котором моделируют транспорт излучения. При построении фантомов для дозиметрии ККМ объектом моделирования является кость. Дозиметрическая модель кости представляет собой упрощенное представление реальной кости и состоит из слоя сплошной кортикальной кости, который покрывает фантом снаружи, и спонгиозы, заполняющей модель изнутри. Спонгиоза — это совокупность трабекулярной кости, которую моделируют как сеть стержневидных трабекул, и расположенного между ними ККМ. В настоящее время существует несколько подходов для моделирования формы и структуры кости на основе анализа изображений компьютерной томографии (КТ) [5–9]. Эти методы требуют патологоанатомического материала и не позволяют учесть индивидуальную вариабельность размеров костей человека. В качестве альтернативы в ФГБУН УНПЦ РМ был разработан оригинальный параметрический метод стохастического моделирования костных структур, SPSPD-моделирование (от англ. stochastic parametric skeletal dosimetry) [10]. Данный метод основан на использовании опубликованных усредненных результатов измерений костных структур в качестве параметров фантомов, что позволяет обойтись без аутопсийного материала, а также оценить неопределенности, связанные с вариабельностью скелетов у разных людей.

Цель настоящего исследования — разработка вычислительного фантома скелета новорожденного ребенка для дозиметрии ККМ от инкорпорированного ^{90}Sr .

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для моделирования скелета использовали оригинальную методику SPSPD. В рамках данного подхода можно моделировать только участки скелета с активным гемопоэзом, т. е. содержащие ККМ (гемопоэтические сайты). SPSPD-фантом гемопоэтических сайтов скелета (ФГСС) состоит из набора меньших фантомов — базовых фантомов сегментов кости (БФСК) простой геометрической формы, описывающих отдельные участки костей скелета. Каждый фантом включает в себя описание моделируемых сред и описание геометрии тканей источников и мишеней.

Моделируемые участки скелета с активным гемопоэзом (гемопоэтические сайты) были определены согласно опубликованным данным о распределении ККМ.

Каждый БФСК состоит из минерализованной костной ткани и ККМ. Для имитации транспорта энергии в этих двух средах, согласно опубликованным данным, были определены их химический состав и плотность. Эти характеристики применяют в качестве параметров для всех фантомов.

Для каждого БФСК оценивали параметры, характеризующие геометрию облучения: линейные размеры кости, толщину кортикального слоя (*Ct.Th*), толщину трабекул (*Tb.Th*), размер межтрабекулярного пространства (*Tb.Sp.*), долю костной ткани в объеме спонгиозы (*BV/TV*). Перечисленные параметры оценивали по опубликованным данным. Для оценки характеристик геометрии кости рассматривали статьи в рецензируемых изданиях, атласы, руководства, монографии и диссертации. Кроме того, анализировали электронные ресурсы, содержащие коллекции рентгеновских снимков. Для анализа принимали результаты измерений людей/образцов, которые авторы определили как здоровые и не имеющие заболеваний, приводящих к деформации кости. Этническая принадлежность — европеоиды и монголоиды. Выбор этнических групп связан с тем, что эти группы характерны для населения Уральского региона. В рассмотрение принимали данные измерений костей скелета с помощью различных техник: микрометров, анатомических боксов, ультразвуковых и рентгенологических исследований, КТ (для линейных размеров и *Ct.Th*), гистоморфометрии и микро-КТ — для параметров микроархитектуры (*Tb.Th*, *Tb.Sp.*, *BV/TV*). В качестве параметров цифровых фантомов принимали усредненные оценки характеристик костей. Если были доступны опубликованные данные по индивидуальным измерениям, мы объединяли их и рассчитывали арифметические средние и стандартные отклонения (SD). В случае усреднения результатов исследований групп людей вводили взвешивающий коэффициент (*Wn*), который учитывал число (*n*) исследуемых субъектов: $Wn = 1$, если $n \geq 25$; $Wn = n/25$, если $n < 25$. Методы отбора и анализа литературных данных подробно описаны [11–14].

На основе средних значений выбранных параметров для каждого сегмента кости в программе Trabecula [15] был сгенерирован вычислительный фантом в воксельной

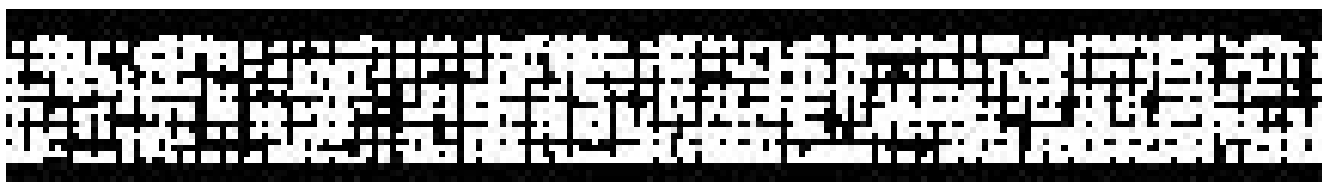


Рис. 1. Срез фантома подвздошной кости новорожденного (черным цветом показаны трабекулы и кортикальная кость, белым — ККМ)

Таблица 1. Массовая доля ККМ (% от общей массы ККМ в скелете) в основных гемопоэтических сайтах скелета новорожденного [17]

№	Гемопоэтический сайт	Массовая доля ККМ, %
1	Бедро	6,7
2	Плечо	4,5
3	Крестец	4,4
4	Берцовые кости	7,1
5	Тазовые кости	11,4
6	Череп	28,2
7	Ключица	0,7
8	Лопатка	2,3
9	Ребра	7,1
10	Лучевая и локтевая кость	2,4
11	Кости кисти и стопы	10,8
12	Шейные позвонки	1,7
13	Грудные позвонки	7,2
14	Поясничные позвонки	5,5

форме — базовый фантом сегмента кости (БФСК). БФСК представляет собой модель простой геометрической формы (прямоугольный параллелепипед, цилиндр, призма и др.), внутри заполненный спонгиозой и снаружи покрытый кортикальным слоем, как показано на примере фантома подвздошной кости новорожденного (рис. 1).

Каждый элемент фантома (ККМ, трабекула, кортикальный слой) имитировался набором трехмерных элементов — вокселей, из которых «складывались» моделируемые структуры. Каждый воксель имитировал либо минерализованную кость, либо костный мозг (КМ), в зависимости от положения центра вокселя в фантоме. В качестве тканей-источников дозиметрическая модель рассматривает отдельно трабекулярную кость (ТК) и кортикальную кость (КК), КМ рассматривается как ткань-мишень в предположении, что ККМ равномерно распределен внутри БФСК. Размер вокселя различался у разных фантомов, не превышал 70% от толщины трабекулы [15, 16], и в смоделированных фантомах варьировал от 50 до 200 мкм. Объемы тканей-источников и ткани-детектора автоматически рассчитывались в программе Tabecula для каждого воксельного фантома.

Для имитации популяционной вариативности размеров и характеристик микроструктуры для каждого БФСК, сгенерированного со средними значениями параметров, было создано 12 дополнительных фантомов сегментов кости (ДФСК) с параметрами, случайно разыгранными в пределах их индивидуальной вариативности (в границах минимальных и максимальных измеренных значений).

Таблица 2. Химический состав моделируемых сред, принятый для всех БФСК

Химический состав, отн. ед.		
Химический элемент	Кость	Костный мозг
H	0,035	0,105
C	0,16	0,414
N	0,042	0,034
O	0,445	0,439
Na	0,003	0,001
Mg	0,002	0,002
P	0,095	0,002
S	0,003	0,002
Ca	0,215	—

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основные гемопоэтические сайты скелета новорожденного и массовая доля ККМ в них были определены согласно данным МРТ-исследований [17] и представлены в табл. 1.

ФГСС скелета новорожденного включает в себя 14 гемопоэтических сайтов. Содержание ККМ в них варьирует от 1,7 до 28,2%.

Гемопоэтические сайты включают участки, которые не моделировали в рамках SPSPD-подхода. Так, не были смоделированы эпифизы трубчатых костей, так как они по большей части состоят из хрящевой ткани [18–22]. Не моделировали кости лицевого черепа, так как его доля по сравнению с мозговым составляет около 13%, а значительная часть тела нижней и верхней челюсти занята развивающимися зубами [33–35]. Кроме того, не моделировали отростки позвонков, так как у новорожденных в них наблюдаются только небольшие очаги окостенения [23].

Химический состав моделируемых сред был выбран на основе данных МКРЗ для взрослых [19]. Химический состав костной ткани и ККМ, используемый для всех БФСК, представлен в табл. 2.

Плотность минерализованной костной ткани оценена на основе результатов измерений плотности кортикальной кости новорожденных [24] и равна 1,65 г/см³. Плотность ККМ принимали равной плотности воды (1 г/см³) [25].

Параметры микроархитектуры спонгиозы были оценены на основе опубликованных данных и подробно

Таблица 3. Линейные размеры и кортикальная толщина, принятые для БФСК новорожденного

Гемопозитический сайт	Сегмент	Форма ¹	Параметры фантома, мм (в скобках дан CV, %) ²						Ссылки на источники данных
			<i>h</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>Ct.Th.</i>	
Бедро	Трубка диафиза ⁴	ц	30	7,2 (11)	7,2 (11)	–	–	1,7 (24)	26–32
	Проксимальный конец	дц	19 (5)	26 (9)	12 (12)	7,2 (11)	7,2 (11)	0,5 (24)	
	Дистальный конец	дц	19 (5)	26 (9)	12 (12)	7,2 (11)	7,2 (11)	0,4 (24)	
Плечо	Трубка диафиза ⁴	ц	30	6 (12)	6 (12)	–	–	1,3 (15)	26–31, 33
	Проксимальный конец	дц	13 (10)	13 (12)	13 (12)	6 (12)	6 (11)	0,4 (15)	
	Дистальный конец	дц	13 (10)	17 (13)	6 (12)	6 (12)	6 (11)	0,3 (19)	
Ребра	Ребра ⁴	п	5,7 (38)	30	3,2 (12)	–	–	0,4 (37)	34, 35
Крестец	Тело 1-го позвонка	п	6,3 (21)	15 (10)	7,5 (10)	–	–	–	36–39
	Тело 2-го позвонка	п	6,3 (21)	12 (10)	6 (10)	–	–	–	
	Тело 3-го позвонка	п	5,7 (19)	8,9 (10)	5,3 (9)	–	–	–	
	Тело 4-го позвонка	п	3,8 (21)	8,9 (10)	5,3 (9)	–	–	–	
	Тело 5-го позвонка	п	3,8 (21)	7,5 (10)	3,8 (11)	–	–	–	
Берцовые	Малая берцовая кость ⁴	ц	30	2,9 (7)	2,9 (7)	–	–	0,7 (14)	26, 30, 40
	Трубка диафиза б.б. ⁴	ц	30	6,9 (28)	6,9 (28)	–	–	1,4 (14)	26–29, 32, 41, 42
	Проксимальный конец б.б.	дц	19 (9)	21 (9)	13 (18)	6,9 (28)	6,9 (28)	0,3 (17)	
	Дистальный конец б.б.	дц	15 (9)	15 (23)	15 (23)	6,9 (28)	6,9 (28)	0,3 (17)	
Тазовые кости	Подвздошная кость часть 1	п	4 (23)	24 (3)	24 (3)	–	–	1,2 (33) 0,5 (47)3	23, 43–47
	Подвздошная кость часть 2	п	4 (23)	20 (3)	20 (3)	–	–	0,2 (25)	
	Лобковая кость	ц	16 (13)	7,5 (16)	7,5 (16)	–	–	0,4 (9)	
	Седалищная кость	ц	7,5 (16)	18 (11)	12 (8)	–	–	0,4 (9)	
Череп	Плоские кости свода ⁴	п	2 (25)	30	30	–	–	–	49–52
Ключица	Тело	ц	33 (15)	4,3 (23)	5,9 (25)	–	–	0,8 (25)	53–58
	Грудинный конец	дц	5,9 (15)	12 (24)	10 (24)	5,9 (25)	4,3 (23)	0,3 (24)	
	Акромиальный конец	дц	5,9 (15)	10 (24)	5,9 (49)	5,9 (25)	4,3 (23)	0,3 (24)	
Локтевая и лучевая	Трубка диафиза ⁴	ц	30	3,9 (8)	3,9 (8)	–	–	0,9 (13)	26, 27, 29, 30, 41
	Конец	дц	12 (6)	5,8 (7)	5,8 (7)	3,9 (8)	3,9 (8)	0,3 (29)	
Кости кистей и стоп	Трубчатые кости	ц	8,9 (43)	3,8 (42)	3,8 (42)	–	–	0,2 (25)	23, 53, 59,
	Таранная и пяточная кости	э	–	7,8 (14)	12 (11)	7,8 (14)	–	0,2 (25)	
Лопатка	Гленоид	ц	5,4 (4)	10 (21)	7,6 (18)	–	–	0,5 (29)	53, 60–63
	Акромион	п	7 (19)	16 (14)	13 (25)	–	–	0,4 (13)	
	Тело ⁴	п	2,7 (13)	30	30	–	–	0,4 (17)	
Шейные позвонки	Тело позвонка	ц	4,1 (1)	6,9 (1)	6,5 (1)	–	–	–	64–66
Грудные позвонки	Тело позвонка	ц	5,1 (2)	7,6 (2)	11 (2)	–	–	–	66, 67
Поясничные позвонки	Тело позвонка	ц	7,1 (1)	7,7 (1)	15 (1)	–	–	–	37, 66, 67

Примечания: ¹ — форму фантома обозначали следующим образом: ц — цилиндр, дц — деформированный цилиндр, п — прямоугольный параллелепипед, э — эллипсоид; ² — размеры БФСК обозначали следующим образом: *h* — высота; *a* — большая ось (ц), большая ось для большего основания (дц), или сторона *a* (п); *b* — малая ось (ц), малая ось для большего основания (дц), или сторона *b* (п); *c* — большая ось для меньшего основания (дц); *d* — малая ось для меньшего основания (дц); для эллипсоида (э) *a*, *b*, *c* обозначают оси эллипсоида; ³ — толщину кортикального слоя принимали разной для внутренней (медиальной) и внешней (ягодичной) поверхностей данного сегмента подвздошной кости (рис. 1); ⁴ — БФСК имитировал лишь часть моделируемого сегмента кости, в случае если размеры сегмента кости значительно превышали 30 мм, так как в таких случаях, с точки зрения дозиметрии не имеет смысла моделировать весь участок кости полностью [11, 12].

описаны ранее [14]. Линейные размеры и толщина кортикального слоя, принятые в качестве параметров БФСК, представлены в табл. 3.

Таким образом, ФГСС новорожденного состоит из 34-х БФСК. В зависимости от формы моделируемого гемопозитического сайта он может включать в себя от 1 (ребра) до 5 (крестец) БФСК. Большая часть БФСК представляет собой цилиндры и прямоугольные параллелепипеды. Размеры фантомов варьируют в широких пределах: от 2 до 33 мм. Как показано в табл. 3, не все фантомы покрыты

кортикальным слоем, что связано с незавершенным процессом окостенения позвоночника и костей свода черепа. Наибольшее значение *Ct.Th* для новорожденного характерно для тела бедренной кости (1,7 мм).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Чтобы проверить адекватность SPSPD-подхода, мы провели сравнение смоделированных фантомов и реальных костей. Имеются уникальные данные о массе

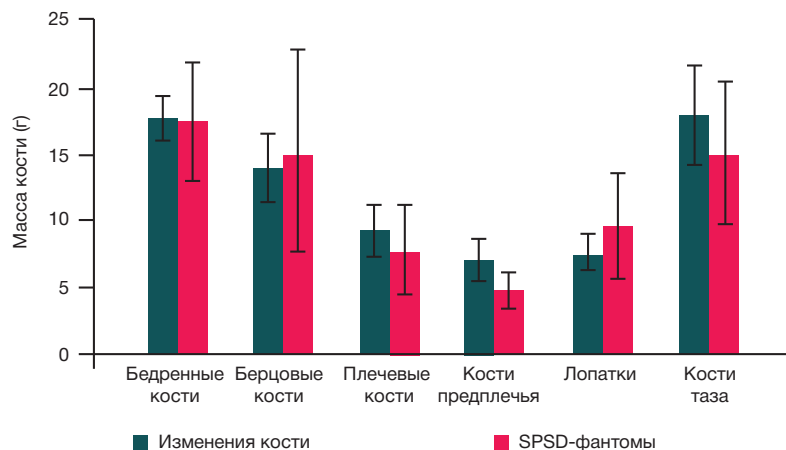


Рис. 2. Сравнение измеренных масс костей [68] и масс, соответствующих размерам SPSPD-фантомов, оцененных как сумма масс всех сегментов, описывающих конкретные кости (левая + правая) новорожденных с учетом повторяющихся и парных сегментов. Стандартные отклонения показаны «усами»

влажных минерализованных костей, полученные при исследовании 40 доношенных новорожденных [68]. Массы, соответствующие размерам фантомов, рассчитывали как сумму произведений объемов моделируемых сред (КМ, КК, ТК) на их плотности.

Сравнение измеренных масс костей и масс SPSPD-фантомов костей (рассчитанных как сумма масс сегментов, описывающих кость) представлено на рис. 2.

По результатам сравнения, массы, соответствующие размерам SPSPD-фантомов, в большинстве случаев попадают в диапазон стандартного отклонения значений, полученных автором сравниваемой работы [68], т. е. хорошо соответствуют массам реальных костей.

Особенностью SPSPD-фантома является генерация БФСК простой геометрической формы, т. е. упрощенное представление реальной формы участка кости. Упрощенное представление может привести к смещенным оценкам результатов моделирования. Как упоминалось ранее, БФСК моделируется со средними популяционными значениями параметров, а параметры ДФСК выбирали случайным образом в пределах диапазона их популяционной вариативности. В результате смоделированный сегмент

кости оказывается «внутри» набора геометрических фигур ДФСК. Дисперсия набора DF, рассчитанных для ДФСК, отражает влияние изменчивости размеров, формы и микроструктуры костей.

ВЫВОДЫ

В результате работы были сгенерированы вычислительные фантомы основных участков скелета с активным гемопоэзом для новорожденного ребенка. Смоделированный фантом имитирует структуру костной ткани, а также вариативность параметров скелета внутри популяции. Фантом хорошо соответствует измерениям реальных костей новорожденного. Представленный фантом используется для усовершенствования дозиметрической системы реки Теча. В дальнейшем будут созданы SPSPD-фантомы скелета для других возрастных групп: 1 год, 5 лет, 10 лет, 15 лет, взрослые и для плода человека на 24-й неделе беременности. SPSPD-фантомы могут быть использованы для дозиметрии других остеотропных бета-излучателей, в том числе применяемых в радионуклидной терапии, таких как ^{89}Sr , ^{32}P , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{117}mSm .

Литература

- Degteva MO, Shagina NB, Vorobiova MI, Shishkina EA, Tolstykh EI, Akleyev AV. Contemporary Understanding of Radioactive Contamination of the Techa River in 1949–1956. *Radiat Biol Radioecol.* 2016; 56 (5): 523–34. English, Russian. PMID: 30703313.
- Krestinina LY, Epifanova S, Silkin S, Mikryukova L, Degteva M, Shagina N, Akleyev A. Chronic low-dose exposure in the Techa River Cohort: risk of mortality from circulatory diseases. *Radiat Environ Biophys.* 2013; 52 (1): 47–57. DOI: 10.1007/s00411-012-0438-5. Epub 2012 Nov 4.
- Аклеев А. В. Хронический лучевой синдром у жителей прибрежных сел реки Теча. Челябинск: Книга, 2012; 464 с.
- Preston DL, Sokolnikov ME, Krestinina LY, Stram DO. Estimates of Radiation Effects on Cancer Risks in the Mayak Worker, Techa River and Atomic Bomb Survivor Studies. *Radiat Prot Dosimetry.* 2017; 173 (1–3): 26–31. DOI: 10.1093/rpd/ncw316.
- O'Reilly SE, DeWeese LS, Maynard MR, Rajon DA, Wayson MB, Marshall EL, et al. An 13 image-based skeletal dosimetry model for the ICRP reference adult female-internal electron 14 sources. *Phys Med Biol.* 2016; 61 (24): 8794–8824. Epub 2016 Nov 29.
- Xu XG, Chao TC, Bozkurt A. VIP-Man: an image-based whole-body adult male model constructed from color photographs of the Visible Human Project for multi-particle Monte Carlo calculations. *Health Phys.* 2000; 78 (5): 476–86. DOI: 10.1097/00004032-200005000-00003. PMID: 10772019.
- Shah AP, Bolch WE, Rajon DA, Patton PW, Jokisch DW. A paired-image radiation transport model for skeletal dosimetry. *J Nucl Med.* 2005; 46 (2): 344–53. PMID: 15695796.
- Pafundi D. Image-based skeletal tissues and electron dosimetry models for the ICRP reference pediatric age series. A dissertation presented to the graduate schools of the University of Florida in partial fulfillment of the requirements for the degree of doctor of the philosophy. University of Florida, 2009.
- Hough M, Johnson P, Rajon D, Jokisch D, Lee C, Bolch W. An image-based skeletal dosimetry model for the ICRP reference adult male-internal electron sources. *Phys Med Biol.* 2011; 56 (8): 2309–46. DOI: 10.1088/0031-9155/56/8/001. Epub 2011 Mar 22.
- Degteva MO, Tolstykh EI, Shishkina EA, Sharagin PA, Zalyapin VI, Volchkova AYU, et al. Stochastic Parametric Skeletal Dosimetry model for humans: General description. *PlosOne*; 2021 (submitted).
- Sharagin PA, Shishkina EA, Tolstykh EI, Volchkova AYU, Smith MA, Degteva MO. Segmentation of hematopoietic sites of human skeleton for calculations of dose to active marrow exposed to

- bone-seeking radionuclides. In: RAD Conference Proceedings, 2018; (3): 154–8. DOI: 10.21175/RadProc.2018.33.
12. Шарагин П. А., Толстых Е. И., Шишкина Е. А., Дегтева М. О. Дозиметрическое моделирование кости для остеотропных бета-излучающих радионуклидов: размерные параметры и сегментация. В сборнике: Материалы международной научной конференции «Современные проблемы радиобиологии». Беларусь, Гомель, 23–24 сентября 2021. 2021; с. 200–204.
 13. Толстых Е. И., Шарагин П. А., Шишкина Е. А., Дегтева М. О. Формирование доз облучения красного костного мозга человека от ^{89}Sr , оценка параметров трабекулярной кости от дозиметрического моделирования. В сборнике: Материалы международной научной конференции «Современные проблемы радиобиологии». Беларусь, Гомель, 23–24 сентября 2021. 2021; с. 176–179.
 14. Толстых Е. И., Шарагин П. А., Шишкина Е. А., Волчкова А. Ю., Дегтева М. О. Анатомо-морфологический базис для дозиметрического моделирования трабекулярной кости человека с использованием стохастического параметрического подхода. Клинический вестник ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна. 2022; 3: 25–40.
 15. Shishkina EA, Timofeev YS, Volchkova AY, Sharagin PA, Zalyapin VI, Degteva MO, et al. Trabecula: A Random Generator of Computational Phantoms for Bone Marrow Dosimetry. *Health Phys.* 2020; 118 (1): 53–59. DOI: 10.1097/HP.0000000000001127.
 16. Zalyapin VI, Timofeev YuS, Shishkina EA. A parametric stochastic model of bone geometry. *Bulletin of Southern Urals State University, Issue «Mathematical Modelling. Programming & Computer Software» (SUSU MMCS).* 2018; 11 (2): 44–57. DOI: 10.14529/mmp180204.
 17. Cristy M. Active bone marrow distribution as a function of age in humans. *Phys Med Biol.* 1981; 26 (3): 389–400.
 18. Vogler JB 3rd, Murphy WA. Bone marrow imaging. *Radiology.* 1988; 168 (3): 679–93.
 19. Vande Berg BC, Malghem J, Lecouvet FE, Maldague B. Magnetic resonance imaging of the normal bone marrow. *Skeletal Radiology.* 1998; 27: 471–83.
 20. Vande Berg BC, Malghem J, Lecouvet FE, Maldague B. Magnetic resonance imaging of normal bone marrow. *Eur Radiol.* 1998; 8 (8): 1327–34.
 21. Taccone A, Oddone M, Dell'Acqua AD, Occhi M, Ciccone MA. MRI "road-map" of normal age-related bone marrow. II. Thorax, pelvis and extremities. *Pediatr Radiol.* 1995; 25 (8): 596–606; PubMed PMID: 8570312.
 22. Taccone A, Oddone M, Occhi M, Dell'Acqua AD, Ciccone MA. MRI "road-map" of normal age-related bone marrow. I. Cranial bone and spine. *Pediatr Radiol.* 1995; 25 (8): 588–95; PubMed PMID: 8570311.
 23. Cunningham C, Scheuer L, Black S. *Developmental Juvenile Osteology.* Elsevier Academic Press, 2016.
 24. Robinson RA. Chemical analysis and electron microscopy of bone. In: *Bone as a tissue*, ed. by Rodahl K, Nicholson JT, Brown EM. New York: McGraw-Hill, 1960; p. 186–250.
 25. Valentin J. Basic anatomical and physiological data for use in radiological protection: reference values. *Annals of the ICRP.* *Annals of the ICRP.* 32 (3–4): 1–277. 2002.
 26. Медведев М. В. Ультразвуковая фетометрия: справочные таблицы и номограммы. М.: Реальное время, 2009; 19–24.
 27. Florence JL. Linear and cortical bone dimensions as indicators of health status in subadults from the Milwaukee County Poor Farm Cemetery. M.A., University of Colorado at Denver, 2007.
 28. Miles AEW. Growth Curves of Immature Bones from a Scottish Island Population of Sixteenth to mid-Nineteenth Century: Limb-bone Diaphyses and Some Bones of the Hand and Foot. *International Journal of Osteoarchaeology.* 1994; 4: 121–36.
 29. Maresh MM. Measurements from roentgenograms. In: *Human Growth and Development* (R.W. McCammon, Ed.). Springfield, IL: Charles C. Thomas, 1970; p. 157–200.
 30. Jeanty P. Fetal limb biometry. *Radiology.* 1983; 147 (2): 601–2. DOI: 10.1148/radiology.147.2.6836145. PMID: 6836145.
 31. Svadovsky VS. Age-related bone remodeling. Moscow, 1961.
 32. Dhavale N, Halcrow SE, Buckley HR, Tayles N, Dornett KM, Gray AR. Linear and appositional growth in infants and children from the prehistoric settlement of Ban Non Wat, Northeast Thailand: Evaluating biological responses to agricultural intensification in Southeast Asia. *Journal of Archaeological Science: Reports.* 2017; V11: 435–46.
 33. Danforth ME, Wrobel GD, Armstrong CW, Swanson D. Juvenile age estimation using diaphyseal long bone lengths among ancient Maya populations. *Latin American Antiquity.* 2017; 20 (1): 3–13.
 34. Beresheim AC, Pfeiffer S, Grynpsas M. Ontogenetic changes to bone microstructure in an archaeologically derived sample of human ribs. *J Anat.* 2019. DOI: 10.1111/joa.13116.
 35. Pfeiffer S. Cortical Bone Histology in Juveniles. Available from: https://www.researchgate.net/publication/303179375_Cortical_bone_histology_in_Juveniles
 36. Hresko AM, Hinchcliff EM, Deckey DG, Hresko MT. Developmental sacral morphology: MR study from infancy to skeletal maturity. *Eur Spine J.* 2020. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00586-020-06350-6>.
 37. Mavrych V, Bolgova O, Ganguly P and Kashchenko S. Age-Related Changes of Lumbar Vertebral Body Morphometry. *Austin J Anat.* 2014; 1 (3): 7.
 38. Dimeglio A, Bonnel F, Canavese F. *The Growing Spine.* In: *Spinal Anatomy. Modern Concepts.* Springer. 2020; 25–52.
 39. Андронеску А. Анатомия ребенка. Бухарест: Меридиан, 1970.
 40. Bernert Zs, Évinger S, Hajdu T. New data on the biological age estimation of children using bone measurements based on historical populations from the Carpathian Basin. *Annales Historico-Naturales Musei Nationalis Hungarici.* 2007; 99: 199–206.
 41. Gindhart PS. Growth Standards for the Tibia and Radius in Children Aged One Month through Eighteen Years. *Am J Phys Anthropol.* 1973; 39: 41–48.
 42. Suominen PK, Nurmi E, Lauerma K. Intraosseous access in neonates and infants: risk of severe complications - a case report. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2015; 59 (10): 1389–93. DOI: 10.1111/aas.12602. Epub 2015 Aug 24. PubMed PMID: 26300243.
 43. Blake KAS. An investigation of sex determination from the subadult pelvis: A morphometric analysis. Doctoral Dissertation, University of Pittsburgh. 2011.
 44. Cunningham CA, Black SM. Iliac cortical thickness in the neonate — the gradient effect. *J Anat.* 2009; 215 (3): 364–70. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2009.01112.x.
 45. Cunningham CA, Black SM. Anticipating bipedalism: trabecular organization in the newborn ilium. *J Anat.* 2009; 214 (6): 817–29. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2009.01073.x.
 46. Corron L, Marchal F, Condemi S, Chaumoitre K, Adalian P. A New Approach of Juvenile Age Estimation using Measurements of the Ilium and Multivariate Adaptive Regression Splines (MARS) Models for Better Age Prediction. *Forensic Sci.* 2017; 62 (1): 18–29. DOI: 10.1111/1556-4029.13224.
 47. Yusof NA, Soames RW, Cunningham CA, Black SM. *Anat Rec (Hoboken).* Growth of the human ilium: the anomalous sacroiliac junction 2013; 296 (11): 1688–94. DOI: 10.1002/ar.22785.
 48. Schnitzler CM, Mesquita JM, Pettifor JM. Cortical bone development in black and white South African children: iliac crest histomorphometry. *Bone.* 2009; 44 (4): 603–11. DOI: 10.1016/j.bone.2008.12.009.
 49. De Boer HH, Van der Merwe AE, Soerdjbalie-Maikoe VV. Human cranial vault thickness in a contemporary sample of 1097 autopsy cases: relation to body weight, stature, age, sex and ancestry. *Int J Legal Med.* 2016; 130 (5): 1371–7. DOI: 10.1007/s00414-016-1324-5.
 50. Margulies S, Coats B. Experimental Injury Biomechanics of the Pediatric Head and Brain. In: *Pediatric Injury Biomechanics.* New York: Springer Science + Business Media, 2013; 157–190.
 51. Li Z, Park BK, Liu W, Zhang J, Reed MP, Rupp JD, et al. A statistical skull geometry model for children 0–3 years old. *PLoS One.* 2015; 10 (5): e0127322. DOI: 10.1371/journal.pone.0127322. eCollection 2015.
 52. Rodriguez-Florez N, Ibrahim A, Hutchinson JC, Borghi A, James G, Arthurs OJ, et al. Cranial bone structure in children with sagittal craniosynostosis: Relationship with surgical outcomes. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2017; 70 (11): 1589–97. DOI: 10.1016/j.bjps.2017.06.017.
 53. Fazekas IGy. and Kósa F. *Forensic Fetal Osteology.* Budapest:

- Akadémiai Kiadó, 1978.
54. Sherer D, Sokolovski M, Dalloul M, Khoury-Collado F, Osho J, Lamarque M, et al. Fetal clavicle length throughout gestation: a nomogram. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2006; 27: 306–10.
 55. McGraw MA, Mehlman CT, Lindsell CJ, Kirby CL. Postnatal growth of the clavicle: birth to eighteen years of age. *Journal of Pediatric Orthopedics*. 2009; 29: 937.
 56. Black SM, and Scheuer JL. Age changes in the clavicle: from the early neonatal period to skeletal maturity. *International Journal of Osteoarchaeology*. 1996; 6: 425–34.
 57. Bernat A, Huysmans T, Van Glabbeek F, Sijbers J, Gielen J, Van Tongel A. The anatomy of the clavicle: a three-dimensional cadaveric study. *Clin Anat*. 2014; 27 (5): 712–23.
 58. Fujita T, Orimo H, Ohata M, Yoshikawa M. Changes in the cortical thickness of the clavicle according to age. *J Am Geriatr Soc*. 1968; 16 (4): 458–62.
 59. Raziye D, Ceren U, Kadir D, Osman S, Mehmed Ali M. A Radiological Investigation on the Hand Development in Human Fetuses Throughout the Fetal Period and an Evaluation Performed in Terms of its Clinical Importance Hand Development. *International Journal of Morphology*. *International Journal of Morphology*. 2016; 34: 1539–52. DOI: 10.4067/s0717-95022016000400057.
 60. Corrigan GE. The neonatal scapula. *Biol Neonat*. 1960; 2: 159–67. PubMed PMID: 13695677.
 61. Hrdlicka A. The scapula: visual observations. *Am J Phys Anthropol*. 1942; 29: 73–94.
 62. Vallois HV. L'omoplate humaine. *Bulletin de la Société d'Anthropologie de Paris*. 1946; 7: 16–99.
 63. Saunders S, Hoppa R, Southern R. Diaphyseal growth in a nineteenth-century skeletal sample of subadults from St Thomas' Church, Belleville, Ontario. *International Journal of Osteoarchaeology*. 1993; 3: 265–81.
 64. Хомутова Е. Ю. Анатомия шейного отдела позвоночника новорожденных при лучевых методах исследования [диссертация]. Санкт-Петербург, 2005.
 65. Sharma N, Jain SK, Singh PK, Rohin Garg. A morphometric study of predictors for sexual dimorphism of cervical part of vertebral column in human fetuses. *Journal of the Anatomical Society of India*. 2017; 66: 135–39.
 66. Kneissel M, Roschger P, Steiner W, Schamall D, Kalchauer G, Boyde A, et al. Cancellous Bone Structure in the Growing and Aging Lumbar Spine in a Historic Nubian Population. *Calcif Tissue Int*. 1997; 61: 95–100.
 67. Ponrartana S, Aggabao PC, Dharmavaram NL, Fisher CL, Friedlich P, Devaskar SU, et al. Sexual Dimorphism in Newborn Vertebrae and its Potential Implications. *J Pediatr*. 2015; 167: 416–21.
 68. Борисов Б. К. Весовые показатели развития скелета плода человека и содержание в нем стронция и кальция. М.: Государственный комитет по использованию атомной энергии СССР, 1973; 14 с.

References

1. Degteva MO, Shagina NB, Vorobiova MI, Shishkina EA, Tolstykh EI, Akleyev AV. Contemporary Understanding of Radioactive Contamination of the Techa River in 1949–1956. *Radiats Biol Radioecol*. 2016; 56 (5): 523–34. English, Russian. PMID: 30703313.
2. Krestinina LY, Epifanova S, Silkin S, Mikryukova L, Degteva M, Shagina N, Akleyev A. Chronic low-dose exposure in the Techa River Cohort: risk of mortality from circulatory diseases. *Radiat Environ Biophys*. 2013; 52 (1): 47–57. DOI: 10.1007/s00411-012-0438-5. Epub 2012 Nov 4.
3. Akleev AV. Xronicheskij luchevoj sindrom u zhitelej pribrezhnyx sel reki Techa. Chelyabinsk: Kniga, 2012; 464 s. Russian.
4. Preston DL, Sokolnikov ME, Krestinina LY, Stram DO. Estimates of Radiation Effects on Cancer Risks in the Mayak Worker, Techa River and Atomic Bomb Survivor Studies. *Radiat Prot Dosimetry*. 2017; 173 (1–3): 26–31. DOI: 10.1093/rpd/ncw316.
5. O'Reilly SE, DeWeese LS, Maynard MR, Rajon DA, Wayson MB, Marshall EL, et al. An 13 image-based skeletal dosimetry model for the ICRP reference adult female-internal electron 14 sources. *Phys Med Biol*. 2016; 61 (24): 8794–8824. Epub 2016 Nov 29.
6. Xu XG, Chao TC, Bozkurt A. VIP-Man: an image-based whole-body adult male model constructed from color photographs of the Visible Human Project for multi-particle Monte Carlo calculations. *Health Phys*. 2000; 78 (5): 476–86. DOI: 10.1097/00004032-200005000-00003. PMID: 10772019.
7. Shah AP, Bolch WE, Rajon DA, Patton PW, Jokisch DW. A paired-image radiation transport model for skeletal dosimetry. *J Nucl Med*. 2005; 46 (2): 344–53. PMID: 15695796.
8. Pafundi D. Image-based skeletal tissues and electron dosimetry models for the ICRP reference pediatric age series. A dissertation presented to the graduate schools of the University of Florida in partial fulfillment of the requirements for the degree of doctor of the philosophy. University of Florida, 2009.
9. Hough M, Johnson P, Rajon D, Jokisch D, Lee C, Bolch W. An image-based skeletal dosimetry model for the ICRP reference adult male-internal electron sources. *Phys Med Biol*. 2011; 56 (8): 2309–46. DOI: 10.1088/0031-9155/56/8/001. Epub 2011 Mar 22.
10. Degteva MO, Tolstykh EI, Shishkina EA, Sharagin PA, Zalyapin VI, Volchkova AYU, et al. Stochastic Parametric Skeletal Dosimetry model for humans: General description. *PlosOne*; 2021 (submitted).
11. Sharagin PA, Shishkina EA, Tolstykh EI, Volchkova AYU, Smith MA, Degteva MO. Segmentation of hematopoietic sites of human skeleton for calculations of dose to active marrow exposed to bone-seeking radionuclides. In: *RAD Conference Proceedings*, 2018; (3): 154–8. DOI: 10.21175/RadProc.2018.33.
12. Sharagin PA, Tolstykh EI, Shishkina EA, Degteva MO. Dozimetriceskoe modelirovanie kosti dlya osteotropnyx beta-izluchayushix radionuklidov: razmernye parametry i segmentaciya. V sbornike: *Materialy mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii «Sovremennye problemy radiobiologii»*. Belarus', Gomel', 23–24 sentyabrya 2021. 2021; s. 200–204. Russian.
13. Tolstykh EI, Sharagin PA, Shishkina EA, Degteva MO. Formirovanie doz oblucheniya krasnogo kostnogo mozga cheloveka ot 89,90Sr, ocenka parametrov trabekulyarnoj kosti dlya dozimetriceskogo modelirovaniya. V sbornike: *Materialy mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii «Sovremennye problemy radiobiologii»*. Belarus', Gomel', 23–24 sentyabrya 2021. 2021; s. 176–179. Russian.
14. Tolstykh EI, Sharagin PA, Shishkina EA, Volchkova AYU, Degteva MO. Anatomico-morfologicheskij bazis dlya dozimetriceskogo modelirovaniya trabekulyarnoj kosti cheloveka s ispol'zovaniem stoxasticheskogo parametriceskogo podxoda. *Klinicheskij vestnik GNC FMBC im.A. I. Burnazyana*. 2022; 3: 25–40. Russian.
15. Shishkina EA, Timofeev YS, Volchkova AY, Sharagin PA, Zalyapin VI, Degteva MO, et al. Trabecula: A Random Generator of Computational Phantoms for Bone Marrow Dosimetry. *Health Phys*. 2020; 118 (1): 53–59. DOI: 10.1097/HP.0000000000001127.
16. Zalyapin VI, Timofeev YuS, Shishkina EA. A parametric stochastic model of bone geometry. *Bulletin of Southern Urals State University, Issue «Mathematical Modelling. Programming & Computer Software» (SUSU MMCS)*. 2018; 11 (2): 44–57. DOI: 10.14529/mmp180204.
17. Cristy M. Active bone marrow distribution as a function of age in humans. *Phys Med Biol*. 1981; 26 (3): 389–400.
18. Vogler JB 3rd, Murphy WA. Bone marrow imaging. *Radiology*. 1988; 168 (3): 679–93.
19. Vande Berg BC, Malghem J, Lecouvet FE, Maldague B. Magnetic resonance imaging of the normal bone marrow. *Skeletal Radiology*. 1998; 27: 471–83.
20. Vande Berg BC, Malghem J, Lecouvet FE, Maldague B. Magnetic resonance imaging of normal bone marrow. *Eur Radiol*. 1998; 8 (8): 1327–34.
21. Taccone A, Oddone M, Dell'Acqua AD, Occhi M, Ciccone MA. MRI "road-map" of normal age-related bone marrow. II. Thorax,

- pelvis and extremities. *Pediatr Radiol.* 1995; 25 (8): 596–606; PubMed PMID: 8570312.
22. Taccone A, Oddone M, Occhi M, Dell'Acqua AD, Ciccone MA. MRI "road-map" of normal age-related bone marrow. I. Cranial bone and spine. *Pediatr Radiol.* 1995; 25 (8): 588–95; PubMed PMID: 8570311.
 23. Cunningham C, Scheuer L, Black S. *Developmental Juvenile Osteology.* Elsevier Academic Press, 2016.
 24. Robinson RA. Chemical analysis and electron microscopy of bone. In: *Bone as a tissue*, ed. by Rodahl K, Nicholson JT, Brown EM. New York: McGraw-Hill, 1960; p. 186–250.
 25. Valentin J. Basic anatomical and physiological data for use in radiological protection: reference values. *Annals of the ICRP.* *Annals of the ICRP.* 32 (3–4): 1–277. 2002.
 26. Medvedev MV. *Ul'trazvukovaya fetometriya: spravochnye tablicy i nomogrammy.* M.: Real'noe vremya, 2009; 19–24. Russian.
 27. Florence JL. Linear and cortical bone dimensions as indicators of health status in subadults from the Milwaukee County Poor Farm Cemetery. M.A., University of Colorado at Denver, 2007.
 28. Miles AEW. Growth Curves of Immature Bones from a Scottish Island Population of Sixteenth to mid-Nineteenth Century: Limb-bone Diaphyses and Some Bones of the Hand and Foot. *International Journal of Osteoarcheology.* 1994; 4: 121–36.
 29. Maresh MM. Measurements from roentgenograms. In: *Human Growth and Development* (R.W. McCammon, Ed.). Springfield, IL: Charles C. Thomas, 1970; p. 157–200.
 30. Jeanty P. Fetal limb biometry. *Radiology.* 1983; 147 (2): 601–2. DOI: 10.1148/radiology.147.2.6836145. PMID: 6836145.
 31. Svadovsky VS. Age-related bone remodeling. Moscow, 1961.
 32. Dhavale N, Halcrow SE, Buckley HR, Tayles N, Domett KM, Gray AR. Linear and appositional growth in infants and children from the prehistoric settlement of Ban Non Wat, Northeast Thailand: Evaluating biological responses to agricultural intensification in Southeast Asia. *Journal of Archaeological Science: Reports.* 2017; V11: 435–46.
 33. Danforth ME, Wrobel GD, Armstrong CW, Swanson D. Juvenile age estimation using diaphyseal long bone lengths among ancient Maya populations. *Latin American Antiquity.* 2017; 20 (1): 3–13.
 34. Beresheim AC, Pfeiffer S, Grynpas M. Ontogenetic changes to bone microstructure in an archaeologically derived sample of human ribs. *J Anat.* 2019. DOI: 10.1111/joa.13116.
 35. Pfeiffer S. *Cortical Bone Histology in Juveniles.* Available from: https://www.researchgate.net/publication/303179375_Cortical_bone_histology_in_Juveniles
 36. Hresko AM, Hinchcliff EM, Deckey DG, Hresko MT. Developmental sacral morphology: MR study from infancy to skeletal maturity. *Eur Spine J.* 2020. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00586-020-06350-6>.
 37. Mavrych V, Bolgova O, Ganguly P and Kashchenko S. Age-Related Changes of Lumbar Vertebral Body Morphometry. *Austin J Anat.* 2014; 1 (3): 7.
 38. Dimeglio A, Bonnel F, Canavese F. *The Growing Spine.* In: *Spinal Anatomy. Modern Concepts.* Springer. 2020; 25–52.
 39. Andronesky A. *Anatomiya rebenka.* Buxarest: Meridian, 1970. Russian.
 40. Bernert Zs, Évinger S, Hajdu T. New data on the biological age estimation of children using bone measurements based on historical populations from the Carpathian Basin. *Annales Historico-Naturales Musei Nationalis Hungarici.* 2007; 99: 199–206.
 41. Gindhart PS. Growth Standards for the Tibia and Radius in Children Aged One Month through Eighteen Years. *Am J Phys Anthropol.* 1973; 39: 41–48.
 42. Suominen PK, Nurmi E, Lauerma K. Intraosseous access in neonates and infants: risk of severe complications - a case report. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2015; 59 (10): 1389–93. DOI: 10.1111/aas.12602. Epub 2015 Aug 24. PubMed PMID: 26300243.
 43. Blake KAS. An investigation of sex determination from the subadult pelvis: A morphometric analysis. Doctoral Dissertation, University of Pittsburgh. 2011.
 44. Cunningham CA, Black SM. Iliac cortical thickness in the neonate — the gradient effect. *J Anat.* 2009; 215 (3): 364–70. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2009.01112.x.
 45. Cunningham CA, Black SM. Anticipating bipedalism: trabecular organization in the newborn ilium. *J Anat.* 2009; 214 (6): 817–29. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2009.01073.x.
 46. Corron L, Marchal F, Condemi S, Chamoûtère K, Adalian P. A New Approach of Juvenile Age Estimation using Measurements of the Ilium and Multivariate Adaptive Regression Splines (MARS) Models for Better Age Prediction. *Forensic Sci.* 2017; 62 (1): 18–29. DOI: 10.1111/1556-4029.13224.
 47. Yusof NA, Soames RW, Cunningham CA, Black SM. *Anat Rec (Hoboken).* Growth of the human ilium: the anomalous sacroiliac junction 2013; 296 (11): 1688–94. DOI: 10.1002/ar.22785.
 48. Schnitzler CM, Mesquita JM, Pettifor JM. Cortical bone development in black and white South African children: iliac crest histomorphometry. *Bone.* 2009; 44 (4): 603–11. DOI: 10.1016/j.bone.2008.12.009.
 49. De Boer HH, Van der Merwe AE, Soerdjbalie-Maikoe VV. Human cranial vault thickness in a contemporary sample of 1097 autopsy cases: relation to body weight, stature, age, sex and ancestry. *Int J Legal Med.* 2016; 130 (5): 1371–7. DOI: 10.1007/s00414-016-1324-5.
 50. Margulies S, Coats B. *Experimental Injury Biomechanics of the Pediatric Head and Brain.* In: *Pediatric Injury Biomechanics.* New York: Springer Science + Business Media, 2013; 157–190.
 51. Li Z, Park BK, Liu W, Zhang J, Reed MP, Rupp JD, et al. A statistical skull geometry model for children 0–3 years old. *PLoS One.* 2015; 10 (5): e0127322. DOI: 10.1371/journal.pone.0127322. eCollection 2015.
 52. Rodriguez-Florez N, Ibrahim A, Hutchinson JC, Borghi A, James G, Arthurs OJ, et al. Cranial bone structure in children with sagittal craniosynostosis: Relationship with surgical outcomes. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2017; 70 (11): 1589–97. DOI: 10.1016/j.bjps.2017.06.017.
 53. Fazekas IGy. and Kósa F. *Forensic Fetal Osteology.* Budapest: Akadémiai Kiadó, 1978.
 54. Sherer D, Sokolovski M, Dalloul M, Khoury-Collado F, Osho J, Lamarque M, et al. Fetal clavicle length throughout gestation: a nomogram. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology.* 2006; 27: 306–10.
 55. McGraw MA, Mehlman CT, Lindsell CJ, Kirby CL. Postnatal growth of the clavicle: birth to eighteen years of age. *Journal of Pediatric Orthopedics.* 2009; 29: 937.
 56. Black SM. and Scheuer JL. Age changes in the clavicle: from the early neonatal period to skeletal maturity. *International Journal of Osteoarcheology.* 1996; 6: 425–34.
 57. Bernat A, Huysmans T, Van Glabbeek F, Sijbers J, Gielen J, Van Tongel A. The anatomy of the clavicle: a three-dimensional cadaveric study. *Clin Anat.* 2014; 27 (5): 712–23.
 58. Fujita T, Orimo H, Ohata M, Yoshikawa M. Changes in the cortical thickness of the clavicle according to age. *J Am Geriatr Soc.* 1968; 16 (4): 458–62.
 59. Raziye D, Ceren U, Kadir D, Osman S, Mehmed Ali M. A Radiological Investigation on the Hand Development in Human Fetuses Throughout the Fetal Period and an Evaluation Performed in Terms of its Clinical Importance Hand Development. *International Journal of Morphology. International Journal of Morphology.* 2016; 34: 1539–52. DOI: 10.4067/s0717-95022016000400057.
 60. Corrigan GE. The neonatal scapula. *Biol Neonat.* 1960; 2: 159–67. PubMed PMID: 13695677.
 61. Hrdlicka A. The scapula: visual observations. *Am J Phys Anthropol.* 1942; 29: 73–94.
 62. Vallois HV. L'omoplate humaine. *Bulletin de la Société d'Anthropologie de Paris.* 1946; 7: 16–99.
 63. Saunders S, Hoppa R, Southern R. Diaphyseal growth in a nineteenth-century skeletal sample of subadults from St Thomas' Church, Belleville, Ontario. *International Journal of Osteoarcheology.* 1993; 3: 265–81.
 64. Xomutova E. Yu. *Anatomiya shejnogo otdela pozvonochnika novorozhdennyx pri luchevox metodax issledovaniya [dissertaciya].* Sankt-Peterburg, 2005. Russian.
 65. Sharma N, Jain SK, Singh PK, Rohin Garg. A morphometric study of predictors for sexual dimorphism of cervical part of vertebral column in human fetuses. *Journal of the Anatomical Society of India.* 2017; 66: 135–39.
 66. Kneissel M, Roschger P, Steiner W, Schamall D, Kalchauer G,

- Boyde A, et al. Cancellous Bone Structure in the Growing and Aging Lumbar Spine in a Historic Nubian Population. *Calcif Tissue Int.* 1997; 61: 95–100.
67. Ponrartana S, Aggabao PC, Dharmavaram NL, Fisher CL, Friedlich P, Devaskar SU, et al. Sexual Dimorphism in Newborn Vertebrae and its Potential Implications. *J Pediatr.* 2015; 167: 416–21.
68. Borisov BK. Vesovye pokazateli razvitiya skeleta ploda cheloveka i sodержanie v nem stronciya i kal'ciya. M.: Gosudarstvennyj komitet po ispol'zovaniyu atomnoj ehnergii SSSR, 1973; 14 s. Russian.

МЕТОДИЧЕСКОЕ СОПРОВОЖДЕНИЕ РАБОТ ПО ВЫВОДУ ИЗ ЭКСПЛУАТАЦИИ ОБЪЕКТОВ АТОМНОЙ ОТРАСЛИ

Д. Е. Калинин^{1,2} ✉, А. Р. Тахауов¹, Л. Р. Тахауова^{1,2}, И. В. Мильто^{1,2}, Р. М. Тахауов^{1,2}

¹ Северский биофизический научный центр Федерального медико-биологического агентства, Северск, Россия

² Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

Безопасность персонала является приоритетом при выводе из эксплуатации устаревших объектов атомной отрасли. Целью исследования было разработать методические основы медико-санитарного обеспечения радиационной безопасности персонала предприятия атомной отрасли при ликвидации ядерного наследия на примере Сибирского химического комбината (СХК) г. Северск. Исследование проведено на основании сведений медико-дозиметрического регистра персонала СХК, содержащего информацию обо всех случаях смерти (с указанием причины) бывших и действующих работников предприятия. В результате работы обоснован выбор территории для разработки научно-методического сопровождения работ в области медико-санитарного обеспечения радиационной безопасности при ликвидации объектов ядерного наследия. Проанализированы показатели смертности населения выбранной территории и риски смертности персонала предприятия атомной индустрии вследствие злокачественных новообразований некоторых локализаций (трахея, бронхи, легкое, кожа, желудок, толстая кишка, лимфоидной, кроветворной и родственных им тканей, молочная и предстательная железы). Определены направления совершенствования медицинского обеспечения персонала предприятия атомной индустрии и населения зон наблюдения при ликвидации ядерного наследия. Полученные данные позволят скорректировать медицинское сопровождение персонала предприятия атомной отрасли с целью продления трудового долголетия работников, а также снизить негативные радиационно обусловленные последствия на здоровье людей, задействованных в ликвидации объектов ядерного наследия.

Ключевые слова: ядерное наследие, радиационная безопасность, предприятие атомной индустрии, персонал

Финансирование: исследование выполнено в рамках Федеральной целевой программы «Обеспечение ядерной и радиационной безопасности на 2016–2020 годы и на период до 2030 года», государственный контракт от 02.06.2020 № 56.002.20.2.

Вклад авторов: Д. Е. Калинин — планирование исследования, сбор, анализ и интерпретация данных, анализ литературы, подготовка черновика рукописи; А. Р. Тахауов — сбор данных, подготовка черновика рукописи; Л. Р. Тахауова — сбор данных, анализ литературы; И. В. Мильто — концепция и дизайн исследования, подготовка черновика рукописи; Р. М. Тахауов — концепция и дизайн исследования.

✉ **Для корреспонденции:** Дмитрий Евгеньевич Калинин
а/я № 130, г. Северск-13, ЗАТО Северск, Томская область, Россия, 636013; kalinkin750@gmail.com

Статья получена: 02.11.2022 **Статья принята к печати:** 14.12.2022 **Опубликована онлайн:** 24.12.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.044

METHODOLOGICAL SUPPORT OF ACTIVITIES ON DECOMMISSIONING THE NUCLEAR FACILITIES

Kalinkin DE^{1,2} ✉, Takhauov AR¹, Takhauova LR^{1,2}, Milto IV^{1,2}, Takhauov RM^{1,2}

¹ Seversk Biophysical Research Center of the Federal Medical Biological Agency, Seversk, Russia

² Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

Personnel safety is a priority when decommissioning obsolete nuclear facilities. The study was aimed to develop the methodological basis for the medical and sanitary support of the nuclear industry enterprise personnel radiation safety during the nuclear legacy elimination on the example of Siberian Chemical Plant (SCP, Seversk). The study involved the data of the SCP employees' medical and dosimetric register containing information about all cases of death (with an indication of the cause) of former and current employees of the enterprise. The study results were used to justify selection of the area for development of scientific and methodological support of activities in the field of medical and sanitary support of radiation safety during the nuclear legacy elimination. Death rates and the risk of dying from cancer of certain localizations (trachea, bronchi, lung, skin, stomach, colon, lymphoid, hematopoietic and related tissues, breast and prostate glands) in the nuclear industry enterprise employees were assessed. The directions for improving the medical support of the nuclear enterprise employees and the population of the surveillance zones during the nuclear legacy elimination were defined. The findings will make it possible to adjust the medical support of the nuclear industry enterprise employees in order to extend their working longevity, as well as to reduce the adverse radiation-induced health effects in people engaged in the nuclear legacy elimination.

Keywords: nuclear legacy, radiation safety, nuclear industry enterprise, personnel

Funding: the study was carried out within the framework of the Federal Target Program "Ensuring Nuclear and Radiation Safety in 2016–2020 and During the Period of up to 2030", state contract № 56.002.20.2 of 02.06.2020.

Author contribution: Kalinkin DE — study planning, data acquisition, analysis, and interpretation, literature analysis, draft manuscript writing; Takhauov AR — data acquisition, draft manuscript writing; Takhauova LR — data acquisition, literature analysis; Milto IV — study concept and design, study concept and design; Takhauov RM — study concept and design.

✉ **Correspondence should be addressed:** Dmitry E. Kalinkin
P.O. box 130, Seversk-13, Closed Administrative-Territorial Unit Seversk, Tomsk Region, Russia, 636013; kalinkin750@gmail.com

Received: 02.11.2022 **Accepted:** 14.12.2022 **Published online:** 24.12.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.044

В связи с интенсивным развитием атомной отрасли в России в последние десятилетия все актуальнее становится проблема вывода из эксплуатации устаревших производств и объектов использования атомной энергии, выработавших свой проектный ресурс. При проведении данных работ одним из основных приоритетов,

декларируемых Госкорпорацией «Росатом», является обеспечение безопасности персонала указанных предприятий, а также населения и окружающей среды в районе их расположения [1].

Некоторые предприятия атомной отрасли России функционируют более 60 лет и неизбежно приближаются

к срокам планового выведения из эксплуатации. За более чем 75-летнюю историю развития отечественной атомной энергетики технологии, оборудование и виды топлива существенно изменились, что в ряде случаев делает невозможным модернизацию существующих предприятий атомной отрасли. В связи с этим возникает задача плановой ликвидации объектов ядерного наследия различных этапов развития атомной отрасли, в том числе с возможностью повторного использования этих территорий для создания новых инфраструктурных объектов атомной промышленности. Эта сложная задача может быть решена только в результате совместной работы специалистов из различных областей (инженеров, экологов, биологов и др.) и предварительной разработки научно обоснованного методического сопровождения, учитывающего особенности ликвидируемого объекта ядерного наследия [1, 2].

Одним из важнейших направлений работ, предшествующих безопасному выведению из эксплуатации объектов использования атомной энергии, является медико-санитарное обеспечение радиационной безопасности персонала ликвидируемого предприятия атомной индустрии и населения зон наблюдения [1].

Научно-методическое сопровождение работ в области обеспечения радиационной безопасности при выведении из эксплуатации объектов использования атомной энергии требует оценки медико-биологических эффектов воздействия ионизирующего излучения (ИИ) на персонал предприятий атомной отрасли, а также установления радиогенных рисков у работников этих предприятий и должно разрабатываться с учетом особенностей производства (вида технологии, радионуклидного спектра, типа излучения и др.) [2, 3].

Источником специфичной информации для проведения подобных исследований в каждом конкретном случае должен быть медико-дозиметрический регистр (МДР) персонала предприятия атомной отрасли и населения прилегающей территории, а также данные организаций, осуществляющих наблюдение за условиями производственных процессов на основных объектах предприятия и состоянием здоровья его персонала [4].

Научно-методическое сопровождение работ при ликвидации объектов ядерного наследия позволит определить основные медико-биологические последствия для здоровья персонала, задействованного в работах по выводу из эксплуатации объектов использования атомной энергии, и определить комплекс мероприятий, направленных на продление их трудового долголетия [3].

На современном этапе развития атомной отрасли России, учитывая существенный прогресс, достигнутый в последние годы в области радиационной безопасности, следует акцентировать внимание на оценке эффектов ИИ (например, канцерогенном риске), предполагающих накопление суммарной дозы внешнего облучения (СДВО) не более 100 мЗв [1].

Результаты многочисленных эпидемиологических исследований не позволяют сделать однозначный вывод о наличии повышенного риска заболевания и смерти вследствие злокачественных новообразований (ЗНО) у лиц, работающих в условиях воздействия техногенного ИИ. Одним исследователям удалось выявить повышенный относительный риск смерти вследствие ЗНО среди персонала объектов использования атомной энергии [2–4], в то время как другие указывают на отсутствие повышения относительных рисков заболевания или смерти вследствие ЗНО у персонала этих производств [5–7].

Методическое сопровождение работ для обеспечения работ при ликвидации ядерного наследия требует внедрения высокотехнологичных методов перманентного медико-санитарного наблюдения, направленного на выявление медицинских последствий радиационного воздействия на персонал, задействованный в выведении из эксплуатации объекта ядерного наследия, например внедрение автоматизированной системы медицинского мониторинга здоровья прикрепленного контингента, а также создание и ведение МДР работников выводимого из эксплуатации предприятия атомной отрасли.

Целью исследования была разработка методических основ медико-санитарного обеспечения радиационной безопасности персонала предприятия атомной отрасли при ликвидации ядерного наследия на примере Сибирского химического комбината (СХК) г. Северск.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение научно обоснованных результатов работы невозможно без применения адекватной методики исследования, т. е. правильного выбора объекта и методов исследования. Если методы исследования и обеспечительный математический аппарат, как правило, хорошо известны и их выбор не представляет трудности (в большинстве случаев это методы эпидемиологической оценки рисков возникновения стохастических эффектов воздействия ИИ на персонал радиационно опасных производств — в первую очередь, ЗНО), то выбор объекта и, соответственно, территории исследования представляет собой трудную практическую задачу. Объект исследования и территория его расположения должны отвечать ряду требований.

1. Объект исследования (предприятие атомной индустрии) должен иметь как можно более длительный период безаварийной работы, вывод подобных объектов из эксплуатации имеет плановый характер и требует соответствующего научно-методического сопровождения. Наличие в истории объекта аварий, сопровождавшихся выбросом в окружающую среду радионуклидов, «аварийным» облучением персонала и населения прилегающей территории, требует разработки качественно иного научно-методического сопровождения.

2. Разработка названного научно-методического сопровождения невозможна без наличия МДР персонала предприятия и населения зоны наблюдения, в котором учтены дозы профессионального облучения и все случаи ЗНО. В свою очередь, полноценное ведение МДР возможно лишь на закрытой в административном отношении территории, где медицинское обеспечение персонала радиационно опасного предприятия и населения зон наблюдения централизованно осуществляет одна медицинская организация.

Исходя из вышеизложенного, закрытое административно-территориальное образование (ЗАТО) Северск является оптимальной площадкой для разработки методического сопровождения работ по плановому выведению из эксплуатации объектов ядерного наследия. ЗАТО Северск сформировано вокруг г. Северска, градообразующим предприятием по отношению к которому является СХК, чьи первые предприятия (например, сублиматное и разделительное производства) введены в эксплуатацию в 1953 г. На протяжении более 60 лет функционирования СХК не было зарегистрировано крупных аварий с выбросом радионуклидов в окружающую

среду. Самый крупный радиационный инцидент произошел в 1993 г. на радиохимическом заводе СХК, который был отнесен к третьему уровню по международной семибальной шкале ядерных событий.

Медицинское сопровождение населения ЗАТО Северск (105 238 человек, по данным на 2022 г.), включая работников СХК, обеспечивает одна крупная медицинская организация — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Сибирский федеральный научно-клинический центр» ФМБА России (СибФНКЦ).

На базе Северского биофизического научного центра ФМБА России (СБН Центр) создан МДР персонала СХК, база данных которого содержит актуальную информацию обо всех работниках предприятия за все годы деятельности СХК, данные обо всех случаях смерти (с указанием причины) бывших и действующих работников СХК в ЗАТО Северск, данные о важнейших неинфекционных социально значимых заболеваниях работников СХК.

В когорту персонала СХК включены все работники (независимо от вида производства), поступившие на СХК в период с 1 января 1950 г. по 31 декабря 2020 г. и проработавшие не менее одного года.

В структуру СХК входят предприятия основного и вспомогательного производств (ОП и ВП соответственно).

К предприятиям ОП СХК относятся реакторное (РП), радиохимическое (РХП), плутониевое (ПП), разделительное (РдП) и сублиматное (СП).

Персонал четырех производств (РХП, ПП, РдП и СП) подвергается в основном сочетанному облучению, персонал РП — исключительно внешнему облучению и может служить группой контроля при оценке вклада внутреннего облучения в формирование радиационных эффектов.

В отношении работников СХК на сегодняшний день база данных МДР содержит информацию:

- об общей численности работников СХК, нанятых в период с 1950 г. в зависимости от вида производства (следует подчеркнуть, что с момента формирования базы данных МДР вносится информация относительно всех работников СХК, зарегистрированных в отделе кадров предприятия, за весь период деятельности комбината; такой подход дает возможность формировать разнообразные контрольные группы в зависимости от широкого круга научных задач);

- об индивидуальных дозах облучения и динамике накопления доз;
- о количестве умерших работников СХК;
- о работниках СХК, заболевших ЗНО.

Все имеющиеся данные хранятся в электронном виде, а также на бумажных носителях в архиве.

Таблица 1. Характеристика когорты работников СХК, нанятых в период с 01 января 1950 г. по 31 декабря 2019 г.

Показатель	Пол	РП	РХП	ПП	РдП	СП	ВП
Общее число работников	М	6651	5272	7569	4935	3581	21 373
	Ж	1323	1115	2267	1492	1101	8766
Число работников с установленным жизненным статусом	М	5493	4454	6561	3389	2477	13 343
	Ж	1165	1019	2120	1143	865	6643
Число работников, умерших вследствие ЗНО	М	418	286	456	300	226	1312
	Ж	101	80	171	103	79	579
Число работников, находившихся на индивидуальном дозиметрическом контроле по внешнему облучению	М	5171	4632	3254	1113	1935	2043
	Ж	710	802	832	309	487	847
Число работников, находившихся на индивидуальном дозиметрическом контроле по внутреннему облучению	М	86	1990	3491	534	1039	163
	Ж	14	441	1100	270	322	121

В табл. 1 содержатся сведения о работниках, нанятых на предприятия ОП СХК в период с 1950 по 2019 г.

В табл. 2 и 3 представлена демографическая характеристика населения ЗАТО Северск в 1970–2019 гг.

В период 1970–2019 гг. общая численность населения (всех возрастных групп) ЗАТО Северск увеличилась, равно как и численность взрослого населения. Наиболее заметно возросло число лиц в возрасте 60 лет и старше. В то же время доля детского населения существенно уменьшилась: с 29,5% в период 1970–1974 гг. до 15,8% в период 2015–2019 гг. Доля мужчин в структуре населения снизилась с 48,6% в период 1970–1974 гг. до 46,3% в период 2015–2019 гг.

В период наблюдения существенно снизилась рождаемость и увеличилась смертность населения, что стало причиной его естественной убыли. Причиной указанных процессов послужило изменение демографической структуры населения, а именно его старение. В то же время значительно увеличилась ожидаемая продолжительность жизни населения.

Показатели, используемые в работе, и источники информации для их расчета представлены в табл. 4.

Риски смертности персонала СХК вследствие ЗНО оценивали на основании расчета стандартизованного относительного риска (COP).

COP рассчитывали по формуле:

$$COP = \frac{\Phi}{O}$$

где Φ — фактическое число случаев заболевания или смерти; O — ожидаемое число случаев заболевания или смерти.

Верхнюю и нижнюю границы 95%-го доверительного интервала COP вычисляли по формулам:

$$НГ = COP \times \left(1 - \frac{1,96}{2 \times \sqrt{\Phi}}\right)^2$$

$$ВГ = COP \times \left(1 + \frac{1,96}{2 \times \sqrt{\Phi + 1}}\right)^2 \times \frac{\Phi + 1}{\Phi}$$

где ВГ — верхняя граница и НГ — нижняя граница.

Считалось, что заболеваемость в исследуемой группе статистически значимо превышает таковую в группе сравнения, если нижняя граница доверительного интервала COP была больше 1.

Для оценки зависимости COP от увеличения СДВО использовали разделение персонала на подгруппы с различной СДВО. В качестве группы сравнения

Таблица 2. Демографическая характеристика взрослого населения ЗАТО Северск в 1970–2019 гг.

Категория населения	Интервал изучаемого периода, годы							
	1970–1974	1980–1984	1990–1994	1995–1999	2000–2004	2005–2009	2010–2014	2015–2019
Все население	87 121 ± 2302,0	97 763,2 ± 1310,1	109 230,0 ± 1580,6	111 701,4 ± 344,2	110 816,4 ± 1732,9	109 949,7 ± 3500,7	115 511,1 ± 750,0	113 728,8 ± 861,5
Взрослые	57 019,3 ± 1792,0	68 548,4 ± 965,9	78 609,4 ± 2048,1	84 024,0 ± 1667,0	88 255,6 ± 695,8	91 036,6 ± 3313,3	95 679,0 ± 674,1	92 716,8 ± 909,1
Лица 60 лет и старше	4 140,1 ± 268,9	5 724,3 ± 254,9	11 402,4 ± 1117,8	15 462,8 ± 1592,5	19 223,0 ± 486,3	20 021,3 ± 1236,4	21 335,7 ± 5821,3	26 783,8 ± 1207,7
Мужчины трудоспособного возраста	27 252,9 ± 775,9	30 946,1 ± 882,1	33 790,4 ± 661,9	35 095,2 ± 320,0	35 282,6 ± 208,0	35 919,0 ± 996,5	36 210,6 ± 512,1	33 599,9 ± 754,1
Женщины трудоспособного возраста	27 480,3 ± 551,9	29 670,0 ± 877,1	32 743,2 ± 224,3	33 029,4 ± 697,1	34 487,2 ± 557,2	33 709,9 ± 816,6	33 207,0 ± 1006,2	29 699,6 ± 862,9

(стандарта) использовали показатели заболеваемости (или смертности) среди работников СХК без зарегистрированных доз облучения, или работников, профессиональная деятельность которых осуществлялась вне контакта с источниками техногенного облучения. Применяли прямой метод стандартизации, стратификацию по возрасту не проводили. При этом расчеты выполняли дважды: вначале для дозовых интервалов с четко определенными нижней и верхней границами СДВО (0–20 мЗв, 20–50 мЗв, 50–100 мЗв, 100–150 мЗв, 150–200 мЗв, 200–300 мЗв, 300–500 мЗв и 500–1000 мЗв), а затем для более широких интервалов, для которых было установлено только нижнее пороговое значение (> 0 мЗв, > 100 мЗв, > 200 мЗв, > 300 мЗв, > 500 мЗв), поскольку расширение интервала (и, соответственно, увеличение количества человеко-лет наблюдения) повышает статистическую значимость результатов исследования.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сведения относительно смертности мужского и женского населения ЗАТО Северск вследствие ЗНО бронхов, трахеи, легкого, желудка, толстой кишки, лимфоидной, кроветворной и родственных им тканей, молочной и предстательной желез, кожи в период 1970–2019 гг. представлены в табл. 5 и 6.

На протяжении изучаемого периода отмечен рост смертности мужского населения ЗАТО Северск вследствие ЗНО желудка, толстой кишки, бронхов, легкого и предстательной железы (табл. 5).

Среди женщин тенденция (в том числе смертность вследствие ЗНО молочной железы) аналогична; исключение составила смертность вследствие ЗНО желудка, которая, преодолев свой максимум в период 2005–2009 гг., к периоду 2015–2019 гг. снизилась до 25,4 случаев на 100 000 человек (табл. 6).

Таблица 3. Основные демографические показатели в ЗАТО Северск в период 1970–2019 гг. (на 1000 человек)

Показатель	Интервал изучаемого периода, годы							
	1970–1974	1980–1984	1990–1994	1995–1999	2000–2004	2005–2009	2010–2014	2015–2019
Рождаемость	18,7 ± 1,7	16,9 ± 0,9	10,6 ± 2,1	8,1 ± 0,4	8,5 ± 0,2	9,6 ± 1,0	10,9 ± 0,3	9,4 ± 1,5
Смертность	3,8 ± 0,1	5,7 ± 0,3	8,9 ± 2,1	10,2 ± 0,4	12,1 ± 0,9	12,2 ± 0,6	11,9 ± 0,4	12,5 ± 0,2
Естественный прирост	14,9 ± 1,8	11,2 ± 0,7	1,8 ± 4,2	-2,1 ± 0,5	-3,6 ± 0,8	-2,6 ± 1,1	-1,1 ± 0,4	-3,1 ± 0,2
Ожидаемая продолжительность жизни, годы	72,46 ± 0,48	71,18 ± 0,55	68,67 ± 2,89	68,60 ± 1,36	68,44 ± 0,88	70,89 ± 0,38	73,25 ± 0,60	74,25 ± 0,63

В табл. 7 и 8 представлен СОР смерти в зависимости от СДВО персонала СХК вследствие ЗНО трахеи, бронхов, легкого, кожи, желудка, толстой кишки, лимфоидной, кроветворной и родственных им тканей, а также молочной и предстательной желез в период с 01 января 1970 г. до 31 декабря 2019 г. Под СДВО следует понимать эффективную дозу внешнего облучения, накопленную работником за весь период работы на предприятии атомной отрасли.

Ввиду относительно небольшого объема выборки анализ проводили без учета возраста работников и календарных периодов наблюдения.

Среди мужского персонала СХК анализировали ЗНО органов пищеварительной системы (желудок и толстая кишка), органов дыхательной системы (трахея, бронхи, легкое), кожи, органов мужской половой системы (предстательная железа), лимфоидной, кроветворной и родственных им тканей. Выбор для анализа ЗНО данных органов и тканей обусловлен тем, что эти локализации наиболее распространены в ЗАТО Северск среди мужчин, не подвергавшихся воздействию техногенного ИИ.

Анализируемый диапазон охватывает «малые» дозы ИИ (до 100 мЗв), типичные для штатных условий труда на современных предприятиях атомной отрасли, и «средние» дозы ИИ (до 1 Зв), возможные при внештатных радиационных ситуациях на предприятиях атомной отрасли.

Среди мужчин — работников СХК, подвергавшихся облучению ИИ при осуществлении своей профессиональной деятельности, повышен СОР смерти вследствие ЗНО предстательной железы у работников, СДВО которых составляла 200–1000 мЗв (табл. 4).

Среди женского персонала СХК также анализировали ЗНО молочной железы, органов пищеварительной системы (желудок и толстая кишка), органов дыхательной системы (трахея, бронхи, легкое), кожи, лимфоидной, кроветворной и родственных им тканей. Выбор для анализа ЗНО данных

Таблица 4. Показатели и источники информации, использованные при проведении исследования

Изучаемый показатель	Источник информации
Показатели смертности населения ЗАТО Северск вследствие ЗНО в период 1970–2019 гг.	Сведения, полученные из: – Территориального органа Федеральной службы государственной статистики по Томской области (Томскстат); – ФГБУ СибФНКЦ ФМБА России; – базы данных регионального МДР населения ЗАТО Северск и персонала СХК, содержащей уточненную информацию обо всех случаях смерти населения ЗАТО Северск вследствие ЗНО ведущих локализаций (трахея, бронхи, легкое, кожа, желудок, толстая кишка, лимфоидная, кроветворная и родственные им ткани, молочная и предстательная железы) в период 1970–2019 гг.
Риск смертности персонала предприятия атомной промышленности вследствие ЗНО в период с 01 января 1970 г. до 31 декабря 2019 г.	Сведения, полученные из базы данных регионального МДР населения ЗАТО Северск и персонала СХК, содержащей уточненную информацию обо всех случаях смерти персонала СХК вследствие ЗНО ведущих локализаций (трахея, бронхи, легкое, кожа, желудок, толстая кишка, лимфоидная, кроветворная и родственные им ткани, молочная и предстательная железы) в период 1970–2019 гг.

органов и тканей обусловлен тем, что они наиболее распространены в ЗАТО Северск среди женщин, не подвергавшихся воздействию техногенного ИИ.

Статистическая точность данных по женскому персоналу уступает аналогичным показателям у мужского персонала из-за небольшого объема выборки в связи с существенно меньшим количеством женщин, задействованных в работе с источниками ИИ.

Отсутствие данных по ЗНО некоторых локализаций у женского персонала в «средних» дозах ИИ (например, трахея, бронхи, легкое, кожа, лимфоидная, кроветворная и родственные им ткани) обусловлено крайне малым объемом выборки, недостаточным для проведения статистического анализа.

Среди женского персонала СХК повышен СОР смерти вследствие ЗНО трахеи, бронхов и легкого, желудка, толстой кишки, кожи, молочной железы, а также лимфоидной, кроветворной и родственных им тканей у работниц, СДВО которых достигала 100–150 мЗв.

Особо стоит отметить, что СОР смерти вследствие ЗНО трахеи, бронхов и легкого, а также молочной железы был повышен среди женского персонала, СДВО которых составляла 0–20 мЗв (табл. 8).

Совершенствование медицинского обеспечения персонала при ликвидации объектов ядерного наследия следует осуществлять в три этапа.

Первый этап — определение факторов риска нарушения здоровья названного контингента граждан.

Формирование комплекса факторов риска включает:

– оценку демографических показателей (рождаемость, смертность, естественный прирост), ожидаемой продолжительности жизни и показателей инвалидизации в изучаемой популяции;

– исследование структуры заболеваемости в изучаемой популяции и выявление наиболее распространенных заболеваний;

– выявление факторов риска с установлением потенциально управляемых (модифицируемых) факторов риска, таких как социально-экономические, поведенческие, медико-организационные и техногенные.

Второй этап — формулировка предложений по коррекции в данной популяции наиболее распространенных заболеваний и выявленных факторов риска. Так, из проведенной работы следует, что основной акцент при разработке стратегии медицинского обеспечения персонала, задействованного в работе по выводу из эксплуатации объектов ядерного наследия, следует сделать на профилактике и диагностике ЗНО.

Третий этап — разработка стратегии медицинского обеспечения персонала, задействованного в работе по выводу из эксплуатации объектов ядерного наследия, путем коррекции действующей стратегии с учетом новых данных о состоянии здоровья изучаемого контингента граждан (демографические данные, сведения о заболеваемости и инвалидности) и о факторах риска для данной популяции.

Согласно результатам исследования среди мужского персонала СХК повышен СОР смерти вследствие ЗНО предстательной железы, среди женского персонала — СОР смерти вследствие ЗНО трахеи, бронхов и легкого, желудка, толстой кишки, кожи, молочной железы, а также лимфоидной, кроветворной и родственных им тканей.

Исходя из вышеприведенных данных, а также в соответствии с целями и мероприятиями национального проекта «Здравоохранение» и федерального проекта «Борьба с онкологическими заболеваниями», следует разработать стратегию медицинского сопровождения персонала, задействованного в работе по выводу из эксплуатации объектов ядерного наследия. В частности, определить для работников, участвующих в ликвидации объектов ядерного наследия, дополнительные инструментальные и лабораторные исследования, направленные на диагностику онкологических заболеваний

Таблица 5. Смертность взрослого мужского населения ЗАТО Северск вследствие ЗНО в период 1970–2019 гг. (на 100 000 человек; групповая средняя)

Локализация ЗНО (код МКБ-10)	Интервал изучаемого периода, годы									
	1970–1974	1975–1979	1980–1984	1985–1989	1990–1994	1995–1999	2000–2004	2005–2009	2010–2014	2015–2019
Желудок (С16)	19	22,4	20,5	19	18,4	25,9	38,3	44	43,1	24,6
Толстая кишка (С18)	0	0	2,2	10,2	14,9	12,2	14,3	22,4	26	26,3
Трахея (С33)	0	0	0	0	0,7	1,5	0,8	1,9	1,9	0,8
Бронхи и легкое (С34)	11,2	10,2	36,1	50,8	65,7	80	75,6	80,1	70	99
Кожа (С43–44)	0	0	1	2	0,8	2,6	2,8	2,9	3,7	2,8
Предстательная железа (С61)	2,3	1,7	0,5	0,7	6	8,7	14,3	19,8	24,6	29,3
Лимфоидная, кроветворная и родственные им ткани (С81–96)	5,3	6	9,2	8,4	11	13,2	20,8	9,5	18,3	25,2

Таблица 6. Смертность взрослого женского населения ЗАТО Северск вследствие ЗНО в период 1970–2019 гг. (на 100 000 человек; групповая средняя)

Локализация ЗНО (код МКБ-10)	Интервал изучаемого периода, годы									
	1970–1974	1975–1979	1980–1984	1985–1989	1990–1994	1995–1999	2000–2004	2005–2009	2010–2014	2015–2019
Желудок (С16)	31,3	15,9	24,7	27,2	18,9	21,7	19,6	38,8	15,9	25,4
Толстая кишка (С18)	4,5	4,3	7,7	7,4	16,3	6,8	23,5	18	19,5	22,5
Трахея (С33)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Бронхи и легкое (С34)	6,8	2,3	9,7	7,6	12,4	3,5	15,5	9,8	11,4	24,5
Кожа (С43–44)	0,3	2,2	0,4	0,6	1,9	3,6	13,8	8,4	3,4	4,5
Молочная железа (С50)	4,8	12,9	15	18,9	19,1	25,9	30,2	36,5	38,4	30,6
Лимфоидная, кроветворная и родственные им ткани (С81–96)	4,9	12,9	9,5	5,3	17,4	22,3	19,9	8,1	9,1	15,9

во время прохождения периодических медицинских осмотров (в первую очередь, по выявленным локализациям ЗНО).

В соответствии с федеральным проектом «Борьба с онкологическими заболеваниями» к 2024 г. смертность населения вследствие ЗНО должна составлять не более 185 случаев на 100 000 человек. Целесообразно принять данные индикаторы в качестве целевых при разработке стратегии охраны здоровья персонала, задействованного в работе по выводу из эксплуатации объектов ядерного наследия.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Одним из направлений обеспечения ядерной безопасности является организация выведения из эксплуатации объектов атомной промышленности, выработавших свой технологический ресурс. Безопасное выведение из эксплуатации объекта атомной промышленности, в свою очередь, невозможно без медико-санитарного сопровождения [1].

В связи с этим целью настоящего исследования была разработка методических основ медико-санитарного обеспечения радиационной безопасности персонала предприятия атомной отрасли при ликвидации объекта ядерного наследия, на примере СХК (ЗАТО Северск). Для ее достижения были решены следующие задачи: обоснован выбор территории для разработки методического сопровождения работ по обеспечению радиационной безопасности при ликвидации объектов ядерного наследия; определены показатели смертности населения выбранной территории вследствие ЗНО наиболее распространенных локализаций; проведен анализ рисков смертности вследствие ЗНО наиболее распространенных локализаций персонала, который задействован в выведении из эксплуатации предприятия атомной отрасли, являющегося объектом ядерного

наследия; определены направления совершенствования медицинского обеспечения персонала, задействованного в работах по ликвидации объекта ядерного наследия.

В рамках исследования удалось обосновать возможность использования ЗАТО Северск в качестве площадки для разработки методического сопровождения работ по плановому выведению из эксплуатации объектов ядерного наследия. Анализ смертности мужского и женского персонала СХК вследствие ЗНО бронхов, трахеи, легкого, желудка, толстой кишки, лимфоидной, кроветворной и родственных им тканей, молочной и предстательной желез, кожи в период 1970–2019 гг. позволил выявить рост изучаемого показателя, за исключением ЗНО желудка среди женщин. Очевидно, что рост онкологической смертности среди представителей изучаемой популяции обусловлен, в первую очередь, старением последней, о чем наглядно говорит представленная выше динамика численности основных возрастных групп. Анализ СОР смерти работников СХК вследствие ЗНО ключевых локализаций позволил выявить статистически значимое повышение (в сравнении с «необлученными» работниками) изучаемого показателя в отношении ЗНО предстательной железы у мужчин, а также вследствие ЗНО трахеи, бронхов и легкого, желудка, толстой кишки, кожи, молочной железы, лимфоидной, кроветворной и родственных им тканей у женщин. Полученные данные совпадают (в самом общем виде) с результатами, полученными другими исследователями [2–4]. Однако, по мнению авторов настоящего исследования, его результаты не могут служить основанием для окончательных выводов относительно влияния ИИ на возникновение ЗНО у работников предприятий атомной индустрии. Вследствие этого, необходимо продолжение исследований на более обширной выборке персонала.

В рамках настоящего исследования сформулированы основные этапы совершенствования медицинского обеспечения персонала при ликвидации объектов

Таблица 7. СОР смерти вследствие ЗНО мужского персонала предприятия атомной индустрии в зависимости от СДВО (95%-й доверительный интервал)

Локализация ЗНО	СДВО, мЗв							
	0–20	> 20–50	> 50–100	> 100–150	> 150–200	> 200–300	> 300–500	> 500–1000
Желудок и толстая кишка	0,68 (–0,11–5,18)	0,70 (–0,10–0,94)	1,06 (0,04–1,34)	0,49 (–0,16–0,69)	0,73 (–0,09–0,97)	0,74 (–0,09–0,98)	0,98 (0,01–1,25)	1,25 (0,14–1,56)
Трахея, бронхи и легкое	0,52 (–0,15–4,90)	0,48 (–0,16–0,70)	0,66 (–0,11–0,92)	0,54 (–0,15–0,77)	1,24 (0,13–1,58)	1,09 (0,06–1,41)	0,49 (–0,16–0,72)	2,29 (0,73–2,73)
Кожа	–	1,59 (0,15–4,99)	2,08 (0,32–5,72)	–	–	–	2,21 (0,37–5,91)	–
Предстательная железа	0,69 (–0,06–5,20)	0,24 (–0,04–1,13)	1,26 (0,10–2,61)	0,57 (–0,08–1,65)	0,85 (–0,03–2,05)	3,08 (1,03–4,93)	3,96 (2,18–6,61)	3,16 (1,60–5,60)
Лимфоидная, кроветворная и родственные им ткани	0,77 (–0,06–5,34)	0,73 (–0,07–1,45)	0,96 (0,00–1,75)	0,58 (–0,10–1,25)	0,86 (–0,06–1,62)	1,25 (0,11–2,12)	1,36 (0,16–2,25)	0,53 (–0,11–1,18)

Таблица 8. COP смерти вследствие ЗНО женского персонала предприятия атомной индустрии в зависимости от СДВО (95%-й доверительный интервал)

Локализация ЗНО	СДВО, мЗв					
	0–20	> 20–50	> 50–100	> 100–150	> 150–200	> 200–300
Желудок и толстая кишка	0,6 (0,45–5,13)	1,07 (0,82–5,86)	0,48 (0,32–4,83)	1,78 (1,42–6,97)	0,56 (0,38–4,97)	1,07 (0,82–5,86)
Трахея, бронхи и легкое	1,93 (1,20–7,25)	0,49 (0,16–4,83)	0,80 (0,36–5,39)	1,75 (1,05–6,96)	–	–
Кожа	–	1,65 (0,55–6,80)	–	5,94 (3,59–13,06)	–	–
Молочная железа	1,66 (1,18–6,81)	0,66 (0,38–5,15)	0,36 (0,16–4,61)	1,58 (1,12–6,69)	1,27 (0,86–6,18)	–
Лимфоидная, кроветворная и родственные им ткани	0,18 (0,02–4,27)	0,83 (0,41–5,43)	0,69 (0,30–5,18)	2,97 (2,11–8,83)	–	–

ядерного наследия (формирование комплекса факторов риска, формулировка предложений по коррекции наиболее значимых из них, разработка стратегии медицинского обеспечения персонала, задействованного в работе по выводу из эксплуатации объектов ядерного наследия).

ВЫВОДЫ

В ходе исследования получены сведения о COP смерти и динамике смертности персонала предприятия атомной отрасли вследствие наиболее распространенных ЗНО. Эти данные позволяют скорректировать медицинское

сопровождение персонала предприятия атомной отрасли с целью продления трудового долголетия работников, а также снизить негативные радиационно обусловленные последствия на здоровье людей, задействованных в ликвидации объектов ядерного наследия. Результаты исследования будут основой для формирования информационных и инструктивно-методических документов, предназначенных для использования в практике научных и медицинских организаций, осуществляющих медицинское сопровождение работ на объектах атомной индустрии и мониторинг здоровья персонала данных предприятий и населения, проживающего в зоне их действия.

Литература

- Ильин Л. А., редактор. Техногенное облучение и безопасность человека. М.: ИздАТ, 2006; 304 с.
- Shilnikova NS, Preston DL, Ron E, Gilbert ES, Vassilenko EK, Romanov SA, et al. Cancer mortality risk among workers at the Mayak nuclear complex. *Radiat Res.* 2003; 159 (6): 787–98. DOI: 10.1667/0033-7587(2003)159[0787:cmrawa]2.0.co;2.
- Zablotska LB, Ashmore JP, Howe GR. Analysis of mortality among Canadian nuclear power industry workers after chronic low-dose exposure to ionizing radiation. *Radiat Res.* 2004; 161 (6): 633–41. DOI: 10.1667/rr3170.
- Gilbert ES, Koshurnikova NA, Sokolnikov ME, Shilnikova NS, Preston DL, Ron E, et al. Lung cancer in Mayak workers. *Radiat Res.* 2004; 162 (5): 505–16. DOI: 10.1667/rr3259.
- Auvinen A, Pukkala E, Hyvönen H, Hakama M, Rytömaa T. Cancer incidence among Finnish nuclear reactor workers. *J Occup Environ Med.* 2002; 44 (7): 634–8. DOI: 10.1097/00043764-200207000-00008.
- Cardis E, Vrijheid M, Blettner M, Gilbert E, Hakama M, Hill C, et al. Risk of cancer after low doses of ionising radiation: retrospective cohort study in 15 countries. *BMJ.* 2005; 331 (7508): 77. DOI: 10.1136/bmj.38499.599861.E0.
- Jeong M, Jin YW, Yang KH, Ahn Y-O, Chaet C-Y. Radiation exposure and cancer incidence in a cohort of nuclear power industry workers in the Republic of Korea, 1992–2005. *Radiat Environ Biophys.* 2010; 49 (1): 47–55. DOI: 10.1007/s00411-009-0247-7.

References

- Ilyin LA, redaktor. *Tekhnogennoe obluchenie i bezopasnost' cheloveka.* M.: IzdAT, 2006; 304 s. Russian.
- Shilnikova NS, Preston DL, Ron E, Gilbert ES, Vassilenko EK, Romanov SA, et al. Cancer mortality risk among workers at the Mayak nuclear complex. *Radiat Res.* 2003; 159 (6): 787–98. DOI: 10.1667/0033-7587(2003)159[0787:cmrawa]2.0.co;2.
- Zablotska LB, Ashmore JP, Howe GR. Analysis of mortality among Canadian nuclear power industry workers after chronic low-dose exposure to ionizing radiation. *Radiat Res.* 2004; 161 (6): 633–41. DOI: 10.1667/rr3170.
- Gilbert ES, Koshurnikova NA, Sokolnikov ME, Shilnikova NS, Preston DL, Ron E, et al. Lung cancer in Mayak workers. *Radiat Res.* 2004; 162 (5): 505–16. DOI: 10.1667/rr3259.
- Auvinen A, Pukkala E, Hyvönen H, Hakama M, Rytömaa T. Cancer incidence among Finnish nuclear reactor workers. *J Occup Environ Med.* 2002; 44 (7): 634–8. DOI: 10.1097/00043764-200207000-00008.
- Cardis E, Vrijheid M, Blettner M, Gilbert E, Hakama M, Hill C, et al. Risk of cancer after low doses of ionising radiation: retrospective cohort study in 15 countries. *BMJ.* 2005; 331 (7508): 77. DOI: 10.1136/bmj.38499.599861.E0.
- Jeong M, Jin YW, Yang KH, Ahn Y-O, Chaet C-Y. Radiation exposure and cancer incidence in a cohort of nuclear power industry workers in the Republic of Korea, 1992–2005. *Radiat Environ Biophys.* 2010; 49 (1): 47–55. DOI: 10.1007/s00411-009-0247-7.

ПРОБЛЕМЫ АНАЛИЗА СМЕРТНОСТИ В ГОРОДАХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

М. М. Салтыкова ✉, У. И. Антипина, А. В. Балакаева

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

Уровень смертности является одним из основных индикаторов здоровья населения, поэтому планирование и проведение мероприятий, направленных на снижение заболеваемости и увеличение продолжительности жизни населения, невозможны без адекватного анализа и интерпретации данных о смертности. Вместе с тем, как отмечают многие исследователи, существуют внешние для организма человека факторы, которые могут существенно влиять на показатели смертности населения. Целью работы было оценить значимость влияния одного из таких факторов — размера коечного фонда больничных организаций (на 10 тыс. населения) — в городах с населением более 100 тыс. человек на показатели смертности населения в этих городах. В анализ были включены данные Росстата за 2017–2019 гг. о количестве населения, смертности, количестве больничных коек, среднемесячной заработной плате в 12 городах. Из этих городов была сформирована более однородная по социально-экономическим условиям подгруппа, включающая 5 городов. Выявлено, что показатель смертности населения на 1000 жителей положительно коррелировал ($R > 0,7$; $p < 0,009$) с числом больничных коек на 10 тыс. населения в группе из 12 городов и корреляция была выше ($R \geq 0,9$; $p < 0,037$) в более однородной подгруппе. Указанная закономерность может быть обусловлена тем, что при оценке показателей смертности населения значимым оказывается вклад количества умерших в городских стационарах жителей других регионов. Полученные результаты указывают на необходимость при изучении смертности населения в городах анализировать число смертей, не только зарегистрированных в городе, но и постоянно проживающих в нем жителей.

Ключевые слова: смертность, доступность медицинской помощи**Финансирование:** работа выполнена в рамках государственного задания Рег. № НИОКТР АААА-А19-119020890029-1.**Вклад авторов:** М. М. Салтыкова — концепция и дизайн исследования; М. М. Салтыкова, У. И. Антипина, А. В. Балакаева — анализ и интерпретация данных, написание, редактирование и окончательное утверждение текста.✉ **Для корреспонденции:** Марина Михайловна Салтыкова
ул. Погодинская, д. 10, стр. 1, г. Москва, 119121, Россия; saltykova@cspmz.ru**Статья получена:** 21.09.2022 **Статья принята к печати:** 13.10.2022 **Опубликована онлайн:** 07.11.2022**DOI:** 10.47183/mes.2022.035

PROBLEMS OF MORTALITY ANALYSIS IN TOWNS OF THE RUSSIAN FEDERATION

Saltykova MM ✉, Antipina UI, Balakayeva AV

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

Mortality rate is one of the main indicators of how healthy a population is, and planning and implementing measures aimed at reducing morbidity and increasing life expectancy in the population is impossible without an adequate analysis and interpretation of mortality data. At the same time, as pointed out by many researchers, there are factors external to a human body being that can have a significant effect on the mortality rate in a population. This study aimed to assess the impact of one of these factors, the number of beds in hospitals (per 10,000 people) of cities with population exceeding 100,000 people. The analysis included data from Rosstat (Russian statistics service) on the population size, mortality, number of hospital beds, average monthly wages in 12 cities within the period from 2017 through 2019. Five cities from these 12 were selected as a more homogeneous subgroup in terms of socio-economic conditions. We found a positive correlation between mortality rate per 1000 inhabitants ($R > 0.7$; $p < 0.009$) and the number of hospital beds per 10,000 people in the sample of 12 cities. This correlation was higher ($R \geq 0.9$; $p < 0.037$) in the more homogeneous subgroup. A factor that may condition this correlation may be that of deaths of people from other regions in hospitals of the cities in question, which are counted when estimating the mortality rate and have a significant effect on that estimation. The results of the study point to the need to differentiate between people registered in a city and those living there permanently when assessing mortality rate therein.

Keywords: mortality, access to medical care**Funding:** the study was part of the effort under State Assignment #NIOKTR АААА-А19-119020890029-1.**Author contribution:** Saltykova MM — concept and design of the study; Saltykova MM, Antipina UI, Balakayeva AV — data analysis and interpretation, article authoring, editing and final approval.✉ **Correspondence should be addressed:** Marina M. Saltykova
Pogodinskaya st., 10, building 1, Moscow, 119121, Russia; saltykova@cspmz.ru**Received:** 21.09.2022 **Accepted:** 13.10.2022 **Published online:** 07.11.2022**DOI:** 10.47183/mes.2022.035

Поскольку уровень смертности является одним из основных индикаторов здоровья населения, без адекватного анализа и интерпретации данных о смертности невозможны планирование и проведение мероприятий, направленных на снижение заболеваемости и увеличение продолжительности жизни населения.

По состоянию на 2019 г. в России насчитывалось более 1100 городов. При этом основная их часть (около 1000 городов) — это города с населением менее 100 тыс. человек, т. е. средние и малые города [1]. Большинство закрытых административно-территориальных образований (ЗАТО) и территорий, подлежащих обслуживанию ФМБА России,

тоже попадают в эту категорию [2]. Статистический анализ данных о смертности населения со стратификацией по полу, возрасту и причинам смерти в таких населенных пунктах существенно затруднен вследствие относительно небольшого объема выборки [3].

Кроме того, необходимо отметить, что на данные о смертности населения влияют такие по сути внешние для организма человека факторы, как правила регистрации смерти и указания причин смерти [4, 5]. Учет заболеваемости и причин смерти в мире ведут согласно Международной статистической классификации болезней десятого пересмотра (МКБ 10). Вместе с тем

многие исследователи отмечают, что в Российской Федерации относительно высок процент смертности от неточно обозначенных состояний: «повреждения с неопределенными намерениями», «неточно обозначенные и неуточненные причины смерти», «кардиомиопатия неуточненная», «старость» [6–10]. Эти причины смерти могут быть использованы для занижения вклада так называемых «социально значимых причин смерти» (алкогольные и наркотические отравления, убийства и самоубийства), а также причин, имеющих плановые показатели по снижению (болезни системы кровообращения) [7]. Отмечено, что перенос причин случаев смерти, которые до 2013 г. кодировали по классу болезней системы кровообращения, в другие классы причин смерти существенно искажает реальную структуру смертности населения [6]. Высокие уровни потерь от неточно обозначенных состояний не позволяют адекватно оценивать резервы снижения смертности и разрабатывать эффективные меры профилактики.

Другим фактором, существенно искажающим статистику смертности, является следующий. В настоящее время при формировании показателей смертности населения в том или ином городе помимо смертей жителей города часто учитывают и смертность лиц, постоянно проживавших в другом месте, но умерших и зарегистрированных в органах ЗАГС в данном городе [7, 11]. Наиболее детально эта проблема проанализирована для Москвы [11, 12]. Большая численность населения мегаполиса позволяет получить наиболее достоверные и воспроизводимые результаты, которые наглядно показывают значимость этой проблемы. Кроме того, в Москве постоянно находится значительная популяция мигрантов, включающая в себя как граждан других государств, так и россиян из других регионов страны. В Москве в 2003 г. смертность мигрантов от новообразований составила 5,3% (для мужчин) и 6,3% (для женщин) от соответствующих показателей смертности всего населения Москвы, а показатели смертности болезней системы кровообращения составили 8,4% (для мужчин) и 6,0% (для женщин) [11]. При этом вклад указанной группы населения в смертность от инфекций, травм и отравлений, а также неточно обозначенных состояний составлял более 33% для мужчин и более 25% для женщин. Вместе с тем на эту же группу приходилось от четверти до трети случаев смерти от всех основных причин в молодом трудоспособном возрасте. Выявленные закономерности сохранились и в 2013 г. Авторы этого исследования делают вывод, что если учитывать только население, имеющее место жительства в Москве, то уровень его смертности окажется ниже, чем регистрирует статистика, а структура причин смерти — ближе к структуре европейских стран за счет более низкой смертности от внешних причин. Схожие закономерности зарегистрированы и в других регионах РФ [13].

Кроме того, в РФ организуются региональные сосудистые центры и первичные сосудистые отделения в городских больницах, которые аккумулируют больных с самыми тяжелыми формами сердечно-сосудистой патологии, среди которых не только жители города, но и пациенты, приехавшие из других населенных пунктов. Это, с одной стороны, улучшает доступность для населения квалифицированной медицинской помощи, а с другой — увеличивает показатели смертности населения городов, в которых расположены сосудистые центры или первичные сосудистые отделения, вследствие учета количества смертей иногородних пациентов при вычислении этих

показателей. Указанный фактор в наибольшей степени влияет на показатели смертности в городах с относительно небольшим населением. Еще одним фактором, существенно влияющим на показатели смертности населения в небольшом городе, но не имеющим отношения к состоянию здоровья населения, является наличие пенитенциарных учреждений на его территории, в которых регистрируется высокая смертность от социально значимых заболеваний [14].

Необходимо отметить, что для реализации адресных мер, разработанных с учетом специфики того или иного города, необходим полный и детальный анализ смертности жителей именно этого города с учетом всех возможных статистических артефактов. Наиболее сложно провести такой анализ в небольших городах из-за малого объема выборки. Для выявления возможных статистических артефактов представляется целесообразным проведение исследований с включением в анализ более крупных городов. В исследование следует включать города, расположенные в схожих природно-климатических и социально-экономических условиях, что позволяет исключить влияние таких значимых для здоровья населения факторов, как степень благоприятности природных условий для жизнедеятельности человека и уровень жизни. Как отмечалось выше, одним из возможных статистических артефактов, способных влиять на показатели смертности населения в городе, является наличие в нем крупных больничных организаций, в том числе региональных сосудистых центров. При этом число умерших иногородних жителей из других регионов будет учтено в показателях смертности в городах расположения этих больничных организаций [7, 11]. Это позволяет выдвинуть гипотезу о том, что размер коечного фонда больничных организаций (на 10 тыс. населения) может влиять на показатели смертности населения (число умерших на 100 тыс. жителей) в городах с населением до 500 тыс. жителей. Очевидно, что в крупнейших городах и городах-миллионерах вклад этого фактора будет менее значимым.

Целью данного исследования была оценка значимости влияния размера коечного фонда больничных организаций (на 10 тыс. населения) в городах Московской области с населением 100–500 тыс. человек на показатели смертности населения в этих городах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены данные Росстата [15] за 2017–2019 гг. о числе умерших на 1000 человек населения, среднемесячной номинальной начисленной заработной плате работников организаций, числе больничных коек круглосуточных стационаров (на 10 тыс. человек населения), а также численности населения в 12 городах Московской области с населением 100–500 тыс. человек. В исследование были включены: 1) только те города, для которых в открытой печати имеются все показатели, включенные в данное исследование; 2) только города Московской области, для того чтобы исключить влияние различий в природно-климатических условиях на показатели смертности (вся Московская область находится в одной климатической зоне) и уменьшить влияние социально-экономических условий. Для более точной оценки возможного влияния уровня жизни на смертность населения в анализ были включены данные о среднемесячной номинальной начисленной заработной плате работников организаций.

Таблица 1. Численность населения в изучаемых городах в 2017 г.

	Численность населения на конец 2017 г., тыс. человек	Доля жителей в возрасте старше трудоспособного, %
Домодедово	127,9	20
Балашиха	468,2	20
Реутов	103,8	23
Химки	250,7	23
Мытищи	211,6	22
Электросталь	158,2	28
Королев	223	27
Серпухов	125,8	27
Жуковский	108,2	29
Подольск	302,8	24
Коломна	142,7	29
Орехово-Зуево	118,8	27

Таблица 2. Статистические характеристики (медиана, нижний и верхний квартили) изучаемых показателей в группе Г_12

	Med (Q ₁ ; Q ₃)		
	2017 г.	2018 г.	2019 г.
Смертность (на 1000 населения)	12,25 (10,8; 13,7)	12,1 (10,6; 14,1)	11,65 (10,2; 13,7)
Число больничных коек (на 10 тыс. населения)	48,2 (35,0; 58,7)	47,4 (33,0; 55,8)	47,45 (32,6; 54,3)
Средняя заработная плата	52 133 (44 795; 58 443)	57 551 (48 286; 65 401)	62 727 (51 390; 69 294)

Данные о населении в основной группе из 12 городов (Г_12) в 2017 г. с указанием доли населения старше трудоспособного возраста представлены в табл. 1.

Для оценки статистической зависимости между изучаемыми показателями использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена (R). Данные описательной статистики представлены в таблицах в виде медианы (Med) и межквартильного размаха (Q₁; Q₃). Для оценки воспроизводимости выявленных закономерностей анализ статистической связи проводили отдельно для каждого года (2017, 2018, 2019). В ходе исследования была проанализирована статистическая связь между показателем смертности населения (число умерших от всех причин на 1000 населения) и среднемесячной номинальной начисленной заработной платой работников организаций, а также числом больничных коек круглосуточных стационаров (на 10 тыс. человек населения). Дополнительно были проанализированы такие показатели, как доля жителей в возрасте старше трудоспособного, по данным Росстата [15], и расстояние от города до центра Москвы. Указанные показатели были включены в анализ для формирования более однородной подгруппы и исключения влияния следующих факторов: степени транспортной доступности медицинских учреждений, расположенных в областном центре, и доли населения старших возрастных групп.

Поскольку относительно небольшой объем выборки не позволяет проводить многомерный анализ, дополнительно была сформирована относительно однородная группа городов (Г_5), расположенных в 30-километровой зоне от центра Москвы (Балашиха, Химки, Реутов, Мытищи,

Королев), среднемесячная номинальная начисленная заработная плата работников организаций в которых превышала в 2017 г. 50 000 рублей.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В табл. 2 представлены статистические характеристики таких изучаемых показателей, как смертность населения (на 1000 населения), число больничных коек круглосуточных стационаров (на 10 тыс. человек населения) и среднемесячная заработная плата работников организаций в 12 городах (Г_12) в 2017–2019 гг.

На первом этапе проанализирована зависимость смертности населения от числа больничных коек и уровня заработной платы, а также от таких факторов, как доля населения старше трудоспособного возраста в 2017 г. и расстояние до центра Москвы.

В табл. 3 представлены коэффициенты корреляции Спирмена между показателями смертности населения, числом больничных коек и уровнем заработной платой в группе Г_12.

Показатель смертности населения на 1000 жителей коррелировал ($R > 0,7$) с числом больничных коек на 10 тыс. населения. Эта зависимость высоко достоверна и воспроизводилась ежегодно. С величиной заработной платы показатель смертности коррелировал с отрицательным, меньшим по абсолютной величине, коэффициентом, который тоже ежегодно достоверно отличается от 0.

Проанализированы значения коэффициентов корреляции Спирмена между показателем смертности и

Таблица 3. Коэффициенты корреляции по Спирмену (R) между показателем смертности населения, заработной платой и числом больничных коек в 2017, 2018 и 2019 гг. в группе Г_12

	2017 г.		2018 г.		2019 г.	
	R	p	R	p	R	p
Число больничных коек (на 10 тыс. населения)	0,828	0,001	0,727	0,007	0,709	0,009
Средняя заработная плата	-0,585	0,046	-0,594	0,042	-0,628	0,029

Таблица 4. Статистические характеристики (медиана, нижний и верхний квартили) изучаемых показателей в группе Г_5

	Med (Q ₁ ;Q ₃)		
	2017 г.	2018 г.	2019 г.
Смертность (на 1000 населения)	9,5 (8,7; 11,2)	9,4 (8,4; 11)	9,3 (8,0; 10,5)
Число больничных коек (на 10 тыс. населения)	35,8 (32,4; 42,0)	34,3 (29,2; 39,8)	33,3 (30,5; 37,7)
Средняя заработная плата	52 602 (51 664; 60 621)	60 349 (58 106; 66 172)	65 233 (63 066; 69 031)

долей населения старше трудоспособного возраста в 2017 г., а также между показателем смертности и расстоянием до центра Москвы. Первое составило 0,675 ($p < 0,016$), а второе — 0,904 ($p < 0,0001$).

Таким образом, показатель смертности населения статистически тесно связан с числом больничных коек и расстоянием от города до центра Москвы (положительная связь), а также менее тесно связан с заработной платой (отрицательная связь) и долей населения старше трудоспособного возраста (положительная связь).

В связи с выявлением указанных закономерностей дополнительно были проанализированы значения коэффициентов ранговой корреляции Спирмена между расстоянием до центра Москвы и заработной платой, а также расстоянием до центра Москвы и долей населения старше трудоспособного возраста. Все эти значения коэффициентов корреляции достоверно отличались от 0 ($p < 0,04$) и составляли $-0,601$, $-0,629$, $-0,625$ для заработной платы в 2017, 2018 и 2019 г. соответственно и 0,615 — для доли населения старше трудоспособного возраста в 2017 г. В значительной степени выявленные зависимости от расстояния до центра Москвы обусловлены особенностями городов Орехово-Зуево, Коломна, Серпухов, Электросталь, расположенных на расстоянии 60–115 км от Москвы, в которых наиболее низкая заработная плата (в 2017 г. она составила 42–45 тыс. рублей), доля жителей в возрасте старше трудоспособного — 27–29%, в стационарах имелось наибольшее число коек на 10 тыс. населения (от 13 до 16,7).

Выявленные достоверные закономерности, с одной стороны, и небольшой объем выборки городов, с другой стороны, обусловили необходимость формирования более однородной группы городов. Такую группу составили пять городов (Г_5), расположенных в 30-километровой зоне от центра Москвы (Балашиха, Химки, Реутов, Мытищи, Королев); среднемесячная номинальная начисленная заработная плата работников организаций в них превышала 50 000 рублей в 2017 г. В табл. 4 представлены статистические особенности изучаемых показателей в этой группе, согласно которым в ней в среднем меньше и смертность, и число больничных коек.

В табл. 5 представлены значения коэффициентов ранговой корреляции Спирмена между показателем смертности населения, заработной платой и числом больничных коек в 2017, 2018 и 2019 г. в группе Г_5. В относительно однородной по социально-экономическим условиям подгруппе городов зарегистрирована еще более тесная положительная статистическая связь между показателем смертности населения и числом больничных

коек ($R \geq 0,9$) при отсутствии статистически значимой зависимости от заработной платы.

Достоверной зависимости смертности населения в группе Г_5 от расстояния до центра Москвы и доли населения старше трудоспособного возраста в 2017 г. выявлено не было. Соответствующие коэффициенты корреляции — 0,4 ($p = 0,505$) и 0,7 ($p = 0,188$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные в ходе исследования результаты на примере 12 городов Московской области подтвердили известную отрицательную корреляционную зависимость смертности населения от уровня жизни [8, 12, 16, 17] (в данном исследовании — от величины среднемесячной номинальной начисленной заработной платы работников организаций).

Вместе с тем, проведенное исследование выявило положительную корреляционную зависимость такого широко используемого в здравоохранении показателя, как число умерших на 1000 человек населения, от так же широко используемого показателя — числа больничных коек круглосуточных стационаров (на 10 тыс. человек населения). При этом последний (число коек) характеризует, в частности, доступность медицинской помощи [18]. Кажущееся противоречие (смертность выше при большей доступности медицинской помощи в стационаре) обусловлено следующим. В стационары, особенно в региональные центры, госпитализируют не только жителей города, в котором расположен стационар, но и жителей окрестных населенных пунктов и других регионов. При этом в случае смерти пациента регистрация ее может быть осуществлена в городе, в котором расположена больница [7, 11]. Прежде всего это относится к жителям других субъектов РФ и иностранных государств. Необходимо отметить, что на оценку общей смертности в крупнейших городах и городках-миллионерах наличие крупных медицинских учреждений не влияет, поскольку основной вклад в число умерших на 1000 населения дает смертность жителей этих городов. Напротив, в небольших городах смертность иногородних жителей в стационарах города оказывает наибольшее искажающее влияние на показатели смертности в этом городе. Особое значение это приобретает в городах, расположенных на территориях, обслуживаемых ФМБА России. Значительная часть работников предприятий атомной промышленности в течение длительного времени в процессе своей профессиональной деятельности подвержена воздействию ионизирующего излучения в

Таблица 5. Коэффициенты корреляции по Спирмену (R) между показателем смертности населения, заработной платой и числом больничных коек в 2017, 2018 и 2019 гг. в группе Г_5

	2017 г.		2018 г.		2019 г.	
	R	p	R	p	R	p
Число больничных коек (на 10 тыс. населения)	0,975	0,005	0,9	0,037	0,975	0,005
Средняя заработная плата	0,5	0,391	0,7	0,188	0,668	0,219

малых дозах, что потенциально способствует развитию злокачественных новообразований и болезней системы кровообращения — двух основных причин смерти населения [19–21]. Вместе с тем, как показало данное исследование, наличие регионального сосудистого центра, например, в городе Северодвинске (население 180 тыс. человек, в городе расположены предприятия по ремонту атомных подводных лодок), может в какой-то степени обуславливать выявленную в предыдущих исследованиях увеличенную смертность от болезней системы кровообращения в этом городе [22].

Полученные в данной статье результаты согласуются с результатами других исследователей, выявивших статистические артефакты при оценке смертности населения в городе, обусловленные наличием в нем значительного числа трудовых мигрантов, что обуславливает повышенные значения показателей

смертности от инфекционных заболеваний и внешних причин [11–13].

Результаты, полученные в данной статье, указывают на необходимость при изучении смертности населения в относительно небольших городах анализировать не только число смертей, зарегистрированных в городе, но и число смертей постоянных жителей города.

Выводы

Показатели доступности медицинской помощи неоднозначно связаны с индикаторами здоровья населения в городах. Для адекватной оценки смертности населения небольших городов необходимо учитывать возмозный вклад в число умерших на территории города жителей других регионов. Этот вклад связан с числом больничных коек круглосуточных стационаров прямой зависимостью.

Литература

1. Свод правил СП 42.13330.2016 Градостроительство. Планировка и застройка городских и сельских поселений Актуализированная редакция СНиП 2.07.01-89.
2. Об утверждении перечня организаций и перечня территорий, подлежащих обслуживанию ФМБА России: Распоряжение Правительства Российской Федерации от 21 августа 2006 г. N 1156-р (с изменениями на 2 октября 2021 г.).
3. Шапошников Д. А., Ревич Б. А. О некоторых подходах к вычислению рисков температурных волн для здоровья. Анализ риска здоровью. 2018; 1: 22–31.
4. Дралкина О. М., Самородская И. В., Семёнов В. Ю., Зайратьянц О. В. Сравнительный анализ вариабельности показателей смертности от различных причин в субъектах Российской Федерации. Архив патологии. 2020; 82 (3): 31–37.
5. Иванова А. Е., Сабгайда Т. П., Семенова В. Г., Запорожченко В. Г., Землянова Е. В., Никитина С. Ю. Факторы искажения структуры причин смерти трудоспособного населения России. Социальные аспекты здоровья населения. 2013; 14 (4).
6. Сабгайда Т. П., Семенова В. Г. Связь снижения сердечно-сосудистой смертности 2013–2015 годов с изменением смертности от других причин. Социальные аспекты здоровья населения. 2017; 57 (5).
7. Юмагузин В. В., Винник М. В. Проблемы качества статистики смертности в России. ЭКО. 2019; 10: 54–77.
8. Семенова В. Г., Головенкин С. Е., Евдокушкина Г. Н., Сабгайда Т. П. Потери от болезней системы кровообращения в контексте программы по снижению сердечно-сосудистой смертности в России. Здравоохранение Российской Федерации. 2016; 60 (1): 4–9.
9. Сабгайда Т. П., Семенова В. Г., Евдокушкина Г. Н., Секриеру Е. М., Никитина С. Ю. Модификация причины смерти при статистическом учете смертности. Социальные аспекты здоровья населения. 2017; 57 (5).
10. Сабгайда Т. П., Тарасов Н. А., Евдокушкина Г. Н. Смертность от сахарного диабета в ракурсе множественных причин смерти: проблемы кодирования. Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. 2019; 27 (6): 1043–8.
11. Иванова А. Е., Рязанцев С. В. Вклад мигрантов в смертность населения г. Москвы. Серия 1. Экономика и право. 2015; 3: 174–84.
12. Иванова А. Е., Рязанцев С. В., Семенова В. Г. Вклад миграции в смертность российского населения трудоспособного возраста. Научное обозрение. Серия 2. Гуманитарные науки. 2016; 6: 47–60.
13. Михайлова Ю. В., Нечаева О. Б., Шикина И. Б., Сорокин В. Н. Влияние миграционных факторов на эпидемическую ситуацию по туберкулезу и ВИЧ инфекции в России. Социальные аспекты здоровья населения. 2018; 62 (4).
14. Туленков А. М., Дюжева Е. В., Романов К. А. Медико-демографическая ситуация в пенитенциарных учреждениях Приволжского федерального округа в период реформирования уголовно-исполнительной системы. Казанский медицинский журнал. 2016; 97 (1): 124–30.
15. Регионы России. Основные социально-экономические показатели городов. 2020: Стат. сб. / Росстат. М., 2020; 456 с.
16. Самородская И. В., Барабаш О. Л., Кондраткова Н. В., Бойцов С. А. Взаимосвязь социально-экономических факторов и показателей смертности населения. Профилактическая медицина. 2017; 1: 10–14.
17. Коссова Т. Экономические факторы смертности от инфекционных болезней в регионах России. Экономическая политика. 2020; 15 (6): 90–109.
18. Руководство по анализу деятельности учреждений здравоохранения муниципального уровня. М.: ЦНИИОИЗ, 2008; 97 с.
19. Leuraud K, Richardson DB, Cardis E, Daniels RD, Gillies M, O'Hagan JA, et al. Ionising radiation and risk of death from leukaemia and lymphoma in radiation-monitored workers (INWORKS): an international cohort study. Lancet Haematol. 2015; 2 (7): 276–81.
20. Daniels RD, Bertke SJ, Richardson DB, Cardis E, Gillies M, O'Hagan JA, et al. Examining temporal effects on cancer risk in the international nuclear workers' study. Int J Cancer. 2017; 140 (6): 1260–9.
21. Kamiya K, Ozasa K, Akiba S, Niwa O, Kodama K, Takamura N, et al. Long-term effects of radiation exposure on health. Lancet. 2015; 386 (9992): 469–78.
22. Салтыкова М. М., Бобровницкий И. П., Балакаева А. В. Сравнительный анализ смертности населения в городах Северодвинске и Архангельске. Медицина экстремальных ситуаций. 2021; 4: 17–22.

References

1. Svod pravil SP 42.13330.2016 Gradostroitel'stvo. Planirovka i zastrojka gorodskix i sel'skix poselenij Aktualizirovannaya redakciya SNiP 2.07.01-89. Russian.
2. Ob utverzhdenii perechnya organizacij i perechnya territorij, podlezhashix obsluzhivaniyu FMBA Rossii: Rasporyazhenie Pravitel'stva Rossijskoj Federacii ot 21 avgusta 2006 g. N 1156-r

- (s izmeneniyami na 2 oktyabrya 2021 g.). Russian.
3. Shaposhnikov DA, Revich BA. O nekotoryx podxodax k vychisleniyu riskov temperaturnyx voln dlya zdorov'ya. Analiz riska zdorov'yu. 2018; 1: 22–31. Russian.
 4. Drapkina OM, Samorodskaya IV, Semyonov VYu, Zajratyanc OV. Sravnitel'nyj analiz variabel'nosti pokazatelej smernosti ot razlichnyx prichin v sub'ektax Rossijskoj Federacii. Arxiv patologii. 2020; 82 (3): 31–37. Russian.
 5. Ivanova AE, Sabgajda TP, Semenova VG, Zaporozhchenko VG, Zemlyanova EV, Nikitina SYu. Faktory iskazheniya struktury prichin smerti trudosposobnogo naseleniya Rossii. Social'nye aspekty zdorov'ya naseleniya. 2013; 14 (4). Russian.
 6. Sabgajda TP, Semenova VG. Svyaz' snizheniya serdechno-sosudistoj smernosti 2013–2015 godov s izmeneniem smernosti ot drugix prichin. Social'nye aspekty zdorov'ya naseleniya. 2017; 57 (5). Russian.
 7. Yumaguzin VV, Vinnik MV. Problemy kachestva statistiki smernosti v Rossii. EhKO. 2019; 10: 54–77. Russian.
 8. Semenova VG, Golovenkin SE, Evdokushkina GN, Sabgajda TP. Poteri ot boleznej sistemy krovoobrashheniya v kontekste programmy po snizheniyu serdechno-sosudistoj smernosti v Rossii. Zdravooxranenie Rossijskoj Federacii. 2016; 60 (1): 4–9. Russian.
 9. Sabgajda TP, Semenova VG, Evdokushkina GN, Sekrieru EM, Nikitina SYu. Modifikaciya prichiny smerti pri statisticheskom uchte smernosti. Social'nye aspekty zdorov'ya naseleniya. 2017; 57 (5). Russian.
 10. Sabgajda TP, Tarasov NA, Evdokushkina GN. Smernost' ot saxarnogo diabeta v rakurse mnozhestvennyx prichin smerti: problemy kodirovaniya. Problemy social'noj gigieny, zdravooxraneniya i istorii mediciny. 2019; 27 (6): 1043–8. Russian.
 11. Ivanova AE, Ryazancev SV. Vklad migrantov v smernost' naseleniya g. Moskvy. Seriya 1. Ehkonomika i pravo, 2015; 3: 174–84. Russian.
 12. Ivanova AE, Ryazancev SV, Semenova VG. Vklad migracii v smernost' rossijskogo naseleniya trudosposobnogo vozrasta. Nauchnoe obozrenie. Seriya 2. Gumanitarnye nauki. 2016; 6: 47–60. Russian.
 13. Mixajlova YuV, Nechaeva OB, Shikina IB, Sorokin VN. Vliyanie migracionnyx faktorov na ehpidemicheskuyu situaciyu po tuberkulozu i VCh infekcii v Rossii. Social'nye aspekty zdorov'ya naseleniya. 2018; 62 (4). Russian.
 14. Tulenkov AM, Dyuzheva EV, Romanov KA. Mediko-demograficheskaya situaciya v penitenciarnyx uchrezhdeniyax Privolzhskogo federal'nogo okruga v period reformirovaniya ugolovno-ispolnitel'noj sistemy. Kazanskij medicinskij zhurnal. 2016; 97 (1): 124–30. Russian.
 15. Regiony Rossii. Osnovnye social'no-ehkonomicheskie pokazateli gorodov. 2020: Stat. sb. / Rosstat. M., 2020; 456 s. Russian.
 16. Samorodskaya IV, Barabash OL, Kondrtkova NV, Bojcov SA. Vzaimosvyaz' social'no-ehkonomicheskix faktorov i pokazatelej smernosti naseleniya. Profilakticheskaya medicina. 2017; 1: 10–14. Russian.
 17. Kossova T. Ehkonomicheskie faktory smernosti ot infekcionnyx boleznej v regionax Rossii. Ehkonomicheskaya politika. 2020; 15 (6): 90–109. Russian.
 18. Rukovodstvo po analizu deyatel'nosti uchrezhdenij zdravooxraneniya municipal'nogo urovnya. M.: CNII OIZ, 2008; 97 s. Russian.
 19. Leuraud K, Richardson DB, Cardis E, Daniels RD, Gillies M, O'Hagan JA, et al. Ionising radiation and risk of death from leukaemia and lymphoma in radiation-monitored workers (INWORKS): an international cohort study. Lancet Haematol. 2015; 2 (7): 276–81.
 20. Daniels RD, Bertke SJ, Richardson DB, Cardis E, Gillies M, O'Hagan JA, et al. Examining temporal effects on cancer risk in the international nuclear workers' study. Int J Cancer. 2017; 140 (6): 1260–9.
 21. Kamiya K, Ozasa K, Akiba S, Niwa O, Kodama K, Takamura N, et al. Long-term effects of radiation exposure on health. Lancet. 2015; 386 (9992): 469–78.
 22. Saltykova MM, Bobrovnickij IP, Balakaeva AV. Sravnitel'nyj analiz smernosti naseleniya v gorodax Severodvinske i Arxangel'ske. Medicina ehkstremaal'nyx situacij. 2021; 4: 17–22. Russian.

ПОКАЗАТЕЛИ ВНИМАНИЯ КАК ИНДИКАТОРЫ УТОМЛЕНИЯ МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ СКОРОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ

Т. А. Болобонкина [✉], А. А. Дементьев, Н. В. Минаева

Рязанский государственный медицинский университет имени И. П. Павлова, Рязань, Россия

Оказание медицинской помощи на догоспитальном этапе требует концентрации внимания и напряжения функциональных систем организма сотрудников скорой медицинской помощи. Распространение COVID-19 увеличило нагрузку на выездные бригады и привело к негативным изменениям функционального состояния центральной нервной системы работников. Целью исследования было изучить влияние профессиональной деятельности на изменение показателей объема, распределения и переключения внимания медицинских работников выездных бригад скорой медицинской помощи в условиях пандемии COVID-19. Для оценки объема, распределения и переключения внимания использовали методику «Числовой квадрат». Разделение обследуемых на группы проводили по индексам стенов путем стандартизации показателей количества цифровых символов, правильных ответов, допущенных ошибок и затраченного времени. Снижение объема внимания у 40,48% ($p < 0,0001$) обследованных и снижение его распределения у 64,29% ($p < 0,05$) свидетельствуют об утомлении к концу рабочей смены. Выявлены негативные тенденции динамики показателей с увеличением стажа работы и возраста. Отсутствие отрицательной динамики показателей между соседними сменами свидетельствует о достаточном восстановлении за период отдыха. Уменьшение объема и распределения внимания к концу смены как объективные признаки утомления имеют зависимость от возраста и стажа. Отсутствие негативной динамики у работников между сменами является признаком восстановления функциональных ресурсов за период регламентированного отдыха в условиях напряженной работы выездных бригад скорой медицинской помощи в период пандемии COVID-19.

Ключевые слова: медицинские работники, скорая помощь, утомление, функциональное состояние, коронавирусная инфекция

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-313-90005.

Благодарности: главному врачу ГБУ РО «Городская клиническая станция скорой медицинской помощи» И. П. Задою за помощь в организации исследования.

Вклад авторов: Т. А. Болобонкина — получение и анализ полученных данных; А. А. Дементьев — разработка дизайна исследования, анализ полученных данных; Н. В. Минаева — написание текста.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Минздрава России (протокол № 2 от 08 октября 2019 г.); все участники подписали информированное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Татьяна Александровна Болобонкина
ул. 8-го Марта, д. 8, г. Рязань, 390027, Россия; bolobonkina@bk.ru

Статья получена: 10.11.2022 **Статья принята к печати:** 14.11.2022 **Опубликована онлайн:** 20.12.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.040

ATTENTION INDICATORS AS MARKERS OF FATIGUE IN AMBULANCE WORKERS

Bolobonkina TA [✉], Dementiev AA, Minaeva NV

Pavlov Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia

Medical care at the pre-hospital stage requires concentration of attention from ambulance workers and induces stress on the functional systems of their bodies. The spread of COVID-19 has increased the workload on mobile ambulance teams and worsened functional state of the team members' central nervous systems. This study aimed to investigate the impact of professional activity on changes in the indicators reflecting attention capacity, allocation and switching in mobile ambulance healthcare workers in the context of the COVID-19 pandemic. We used the Number Square method to assess these indicators. The participants were divided into groups with the help of standard tests, through standardization of the number of digital symbols, correct answers, mistakes made and time spent. The clear signs of fatigue by the end of the work shift are the decreased attention capacity, registered in 40.48% ($p < 0.0001$) of participants, and deteriorating attention allocation, registered in 64.29% ($p < 0.05$). The dynamics of the indicators were revealed to be associated (negative trends) with length of service and age. The registered values did not decrease at each subsequent shift, which proves the rest period between the shifts ensures a sufficient recovery. Decreased attention capacity and allocation by the end of the shift, as objective signs of fatigue, depend on age and length of service. Lack of negative dynamics shift-to-shift shows that the functional resources of the body are restored during the prescribed rest period even in the intense conditions of mobile ambulance teams' work during the COVID-19 pandemic.

Keywords: medical worker, ambulance, fatigue, functional state, COVID-19

Funding: the study was supported by the Russian Foundation for Basic Research under research project #20-313-90005.

Acknowledgments: the authors thank I.P. Zadoy, Chief Physician of the City Clinical Emergency Medical Station, for assistance in organizing the study.

Author contribution: Bolobonkina TA — data acquisition and analysis; Dementiev AA — study design development, data analysis; Minaeva NV — article authoring.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Ryazan State Medical University named after Academician I.P. Pavlov of the Ministry of Health of Russia (Minutes #2 of October 08, 2019); all participants signed an informed consent.

✉ **Correspondence should be addressed:** Tatyana Alexandrovna Bolobonkina
8 Marta, 8, Ryazan, 390027, Russia; bolobonkina@bk.ru

Received: 10.11.2022 **Accepted:** 14.11.2022 **Published online:** 20.12.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.040

Работа медицинских сотрудников характеризуется использованием больших объемов памяти, концентрацией внимания, необходимостью принятия сложных решений в нестандартных ситуациях, зачастую в условиях дефицита информации и времени при высокой личной

ответственности за результат [1, 2]. Это объясняет высокую напряженность труда медицинских работников, особенно оказывающих urgentную помощь [3]. Профессиональная деятельность в таких условиях приводит к развитию профессионального выгорания, которое по данным

исследований развивается чаще у медицинских работников при оказании помощи в экстренной и неотложной форме, когда возникают сложные тактические задачи по диагностике и лечению патологий, иногда выходящие за рамки компетенции указанных специалистов [4, 5]. На перенапряжение функциональных систем организма работников экстренных служб значимое влияние оказывает режим трудовой деятельности. Медицинский персонал, трудящийся в сменном или ночном режиме, особенно подвержен негативным воздействиям факторов на функциональное состояние центральной нервной системы (ЦНС), что напрямую влияет на возникновение опасных последствий для здоровья [6]. Сменная работа связана с ухудшением бдительности и работоспособности из-за отсутствия сна и нарушения биологических ритмов [7].

Внимание — динамическая характеристика психики и представляет собой направленность и сосредоточенность сознания. Благодаря способности человека к активизации внимания обеспечиваются четкость и ясность понимания ситуации [8, 9].

Уровни распределения и переключения внимания свидетельствуют о степени подвижности нервных процессов в корковых отделах ЦНС, а также обуславливают способность быстро ориентироваться в сложной изменяющейся ситуации. Последнее качество является одним из важнейших составляющих успешного осуществления профессиональной деятельности медицинских работников выездных бригад скорой медицинской помощи (СМП). Высокая напряженность трудового процесса этой группы работников неблагоприятно влияет на функционирование различных систем организма, приводит к преобладанию процессов торможения в ЦНС и развитию утомления, выраженность которого во многом зависит от пола, возраста, стажа работы и ее графика (смены) [10].

Пандемия COVID-19 привела к существенному увеличению нагрузки на первичное звено и еще большему развитию стойких процессов утомления среди медицинских работников, в том числе среди сотрудников СМП [11]. Интенсификация работы медицинских служб, оказывающих помощь на догоспитальном этапе, усугубила негативную динамику по распространенности синдрома профессионального выгорания среди работников. Основными причинами этого являлись ограниченные ресурсы здравоохранения, угроза вирусной контаминации как дополнительного профессионального риска, увеличение длительности работы с одним пациентом из-за необходимости выполнения противоэпидемических мероприятий до и после контакта с больным, нарушение режима сна, баланс между работой и личной жизнью, пренебрежение личными и семейными потребностями при повышенной рабочей нагрузке и недостаточность информации о способах лечения и профилактики COVID-19 [12].

Перечисленные выше факторы определили актуальность настоящего исследования, целью которого стало изучение влияния профессиональной деятельности на изменение показателей объема, распределения и переключения внимания медицинских работников выездных бригад скорой медицинской помощи в условиях пандемии COVID-19.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Базой исследования была городская клиническая станция СМП города Рязани. Достаточность объема выборки

рассчитывали по стандартной формуле повторной выборки с использованием приема коррекции малого объема генеральной совокупности. Критерии включения участников исследования: работа в составе выездных бригад СМП городской клинической станции СМП г. Рязани по графику: 24-часовая рабочая смена и период отдыха — 72 ч; возраст до 65 лет включительно; трудовой стаж в качестве медицинского работника выездной бригады СМП более одного года; отсутствие медицинских противопоказаний к суточному режиму работы и к работе во вредных условиях труда.

Напряженная эпидемическая обстановка и выраженный кадровый дефицит специалистов СМП, сложившийся в регионе, привели к фактическому отсутствию перерывов между вызовами у бригад всех специализаций и выравниванию их по структуре обслуживаемых вызовов. По данным автоматизированной информационной системы «Скорая помощь», число выездов одной бригады за смену колебалось от 15 до 26 (в среднем $19,45 \pm 3,37$), суммарное время одного вызова составляло в среднем $45,46 \pm 15,98$. Обследованные работники подвергались схожему воздействию профессиональных факторов и характеристик трудового процесса.

Выборку формировали с мая по октябрь 2021 г. В нее вошли 42 медицинских работника (11 мужчин и 31 женщина). Среди работников 10 обследованных занимали должности врачей и 32 — должности фельдшеров. Средний возраст участников составил $35,77 \pm 3,39$. Исследование проводили при помощи аппаратно-программного комплекса «НС-ПсихоТест» («Нейрософт»; Россия). Для оценки объема внимания (ОВ), распределения внимания (РВ) и переключения внимания применяли методику «Числовой квадрат» [13]. Обследования проводились трехкратно, во временной период с 7.00 до 8.00 утра в соответствии с суточным графиком рабочих смен через следующие промежутки времени: первое обследование — в начале суточной рабочей смены, второе — спустя 24 ч в конце этой же смены, третье — после 72 ч периода регламентированного отдыха, в начале следующей смены. Время прохождения теста было ограничено периодом 90 с. Общее время, затраченное на одно обследование, не превышало 3 мин, включая объяснение методики и подготовку оборудования.

Разделение обследуемых на группы в зависимости от уровней объема и распределения внимания проводили по индексам стенов — нормированных и центрированных оценок, полученных путем стандартизации показателей количества цифровых символов, правильных ответов, допущенных ошибок и затраченного времени.

Проверку нормальности распределения переменных осуществляли при помощи критерия Колмогорова–Смирнова. Для формирования границ доверительных интервалов при распределении обследуемых на группы в зависимости от динамики показателей использовали критерий Уилсона (Wilson, 1927), для оценки статистической значимости различий долей обследуемых с разнонаправленной динамикой показателей использовали критерий χ^2 Пирсона; средние значения количественных переменных с нормальным распределением представлены в виде $M \pm tm$ (M — среднее арифметическое значение показателя, выраженное в абсолютных цифрах; m — ошибка среднего, t — критерий достоверности при заданном размере выборки).

Анализировали статистически значимые индивидуальные сдвиги функциональных показателей в динамике рабочей

Таблица 1. Структура работников с различной индивидуальной сменной динамикой объема внимания

Группы работников	Группы работников с ростом ОВ		Группы работников со снижением ОВ		Группы работников без динамики ОВ
	Доля, % ДИ, $p < 0,05$	Средний рост ОВ t -критерий	Доля, % ДИ, $p < 0,05$	Среднее снижение ОВ t -критерий	Доля, % ДИ, $p < 0,05$
Всего $n = 42$	11,9 [5,19; 25,0]	$3,57 \pm 1,04^*$ 3,42	40,48 [27,04; 55,51]	$3,61 \pm 0,98^{***}$ 7,33	47,62 [33,36; 62,28]
Распределение по полу					
Женщины $n = 31$	12,9 [5,13; 28,85]	$3,16 \pm 3,20$ –	41,94 [26,42; 59,23]	$3,07 \pm 1,04^{***}$ 5,87	45,16 [29,16; 62,23]
	9,09 [1,62; 37,74]	$4,66 \pm 4,04$ –	36,36 [15,17; 64,62]	$5,0 \pm 1,90^{***}$ 5,27	54,55 [28,01; 78,83]
Распределение по возрасту					
До 30 лет $n = 16$	18,75 [6,59; 43,01]	$2,5 \pm 1,73$ –	50 [28,0; 72,0]	$3,00 \pm 1,51^*$ 3,97	31,25 [14,16; 55,6]
	14,29 [4,01; 39,94]	$4,25 \pm 3,3$ –	14,29 [4,01; 39,94]	$6,00 \pm 0,00$ –	71,43 [45,35; 88,28]
40 лет и старше $n = 12$	0	–	58,33 [31,95; 80,67]	$3,62 \pm 1,41^{***}$ 5,14	41,67 [19,33; 68,05]
	Распределение по стажу				
0–5 лет $n = 13$	23,08 [8,18; 50,26]	$2,50 \pm 1,73$ –	30,77 [12,68; 57,63]	$2,0 \pm 1,15$ –	46,15 [23,21; 70,76]
	8,33 [1,49; 35,39]	$1,00 \pm 0,00$	41,67 [19,33; 68,05]	$3,6 \pm 2,15^*$ 3,34	50 [25,38–74,62]
11 лет и более $n = 17$	5,88 [1,05; 26,98]	$7,00 \pm 0,00$ –	47,06 [26,17; 69,04]	$4,33 \pm 1,33^{***}$ 7,33	47,06 [26,17; 69,04]

Примечание: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ — степень значимости с использованием парного t -критерия Стьюдента; ДИ, $p < 0,05$ — 95%-й доверительный интервал.

смены и между соседними сменами. Испытуемые в зависимости от динамики индивидуальных показателей были разделены на три группы: группа 1 — показатель вырос, группа 2 — показатель снизился, группа 3 — показатель не изменился. Затем проводили расчет процента работников с разной динамикой изучаемых функциональных сдвигов. В дальнейшем сравнивали группы работников (профессия, возраст, стаж работы) по проценту испытуемых с разной динамикой рассматриваемых показателей и проводили сравнительную оценку групповых средних. Для оценки статистической достоверности средней динамики (средней разницы роста или снижения) индивидуальных показателей в динамике рабочих смен использовали парный t -критерий Стьюдента (полученные данные имели нормальное распределение). Статистическая достоверность гипотезы принималась при $p < 0,05$.

Статистическую обработку проводили при помощи пакетов программ Microsoft Excel 2007 (Microsoft; США) с надстройкой «Анализ данных».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Распределение работников на группы с разнонаправленным изменением ОВ за рабочую смену представлено в табл. 1.

При физиологическом исследовании к концу смены у 40,48% работников снижение ОВ происходило в среднем на 3,61 единицы ($p < 0,0001$). Доля испытуемых с увеличением объема внимания была в 3,4 раза меньше, тогда как у остальных сотрудников вышеназванный показатель не

претерпел изменений в динамике рабочей смены. Следует отметить, что среднее снижение ОВ в соответствующей группе мужчин составило 5,00 единиц ($p < 0,0001$) и превышало аналогичный показатель среди женщин в 1,6 раза ($p > 0,05$). У 58,33% испытуемых в возрасте 40 лет и старше было зарегистрировано статистически значимое среднее снижение ОВ на 3,62 единицы ($p < 0,001$), тогда как у остальных работников указанной возрастной группе рассматриваемый показатель не изменился.

Выявлена тенденция увеличения доли лиц со снижением объема внимания с увеличением стажа работы от 0–5 лет до 11 лет и более, соответственно с 30,77 до 47,06%.

Распределение работников с различной динамикой РВ за рабочую смену представлено в табл. 2.

У большинства испытуемых (64,29%; $p < 0,05$) выявлено снижение РВ к концу смены в среднем на 3,0 единицы ($p < 0,0001$), выраженные гендерные различия в сменной динамике реакции выбора отсутствовали.

Выявлены статистически достоверные разнонаправленные тенденции динамики РВ в зависимости от возраста работников ($\chi^2 = 11,407$; $p = 0,023$). В частности, у половины работников в возрасте до 30 лет обнаружена положительная динамика РВ в среднем на 2,62 единицы ($p = 0,0013$) и только у 37,5% отмечено снижение данного показателя в среднем на 3,28 единицы ($p = 0,0001$). Напротив, в возрастных группах 30–39 лет и 40 лет и старше у большинства испытуемых (78,57 и 83,33% соответственно) зарегистрировано снижение РВ к концу рабочей смены в среднем на 3,60 и 3,45 единицы ($p < 0,0001$).

Таблица 2. Структура работников с различной индивидуальной сменной динамикой распределения внимания

Группы работников	Группы работников с ростом РВ		Группы работников со снижением РВ		Группы работников без динамики РВ
	Доля, % ДИ, $p < 0,05$	Средний рост РВ t -критерий	Доля, % ДИ, $p < 0,05$	Среднее снижение РВ t -критерий	
Всего $n = 42$	23,81*	3,98 ± 1,46***	64,29*	3,46 ± 0,78***	11,9
	[13,48; 38,53]	4,47	[49,17; 77,01]	8,81	[5,19; 25,0]
Распределение по полу					
Женщины $n = 31$	25,81*	2,89 ± 1,51**	61,29*	2,95 ± 1,13***	12,9
	[13,7; 43,25]	3,83	[43,82; 76,27]	7,7	[5,13; 28,85]
Мужчины $n = 11$	18,18*	5,5	72,73*	4,00 ± 3,05***	9,09
	[5,14; 42,70]	–	[43,44; 90,25]	8,1	[1,62; 37,74]
Распределение по возрасту					
До 30 лет $n = 16$	50	2,62 ± 1,41**	37,5	3,28 ± 0,84***	12,5
	[28,0; 72,0]	3,72	[18,48; 61,36]	7,81	[3,5; 36,02]
30–39 лет $n = 14$	14,29	5,33 ± 2,08	78,57	3,60 ± 1,37***	7,14
	[4,01; 39,94]	–	[52,41; 92,43]	5,24	[1,27; 31,47]
40 лет и старше $n = 12$	0	–	83,33	3,45 ± 1,56***	16,67
			[55,2; 95,3]	4,43	[4,7; 44,8]
Распределение по стажу					
0–5 лет $n = 13$	46,15	2,50 ± 1,61*	38,46	3,16 ± 0,95***	15,38
	[23,21; 70,76]	3,1	[17,71; 64,48]	6,63	[4,33; 42,23]
6–10 лет $n = 12$	25	4,00 ± 2,64	66,67	6,25 ± 1,29**	8,33
	[8,89; 53,23]	–	[39,06; 86,19]	4,08	[1,49; 35,39]
11 лет и более $n = 17$	5,88	5,00 ± 2,82	82,35	3,71 ± 1,26***	17,65
	[1,05; 26,98]		[58,97; 93,81]	5,87	[6,19; 41,03]

Примечание: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ — степень достоверности с использованием парного t -критерия Стьюдента; ДИ, $p < 0,05$ — 95%-й доверительный интервал.

Выявлена тенденция к увеличению доли испытуемых со снижением РВ с увеличением стажа трудовой деятельности. Так, у 82,35% работников со стажем 11 лет и более зарегистрировано снижение РВ в течение смены в среднем на 3,71 единицы ($p < 0,0001$ — степень достоверности с использованием парного t -критерия Стьюдента), тогда как среди персонала со стажем работы 0–5 лет и 6–10 лет процент таких испытуемых был в 2,1 и 1,2 раза меньше соответственно.

При физиологическом исследовании у 62,5% испытуемых к началу следующей смены была положительная динамика РВ в среднем на 2,2 единицы ($p < 0,0001$). Вышеназванная междусменная динамика РВ была одинаково характерна как для мужчин, так и для женщин, среди которых она была зафиксирована у 55,56% и 83,33% испытуемых соответственно, при этом показатель увеличился в среднем на 2,33 и 1,8 единицы ($p < 0,0001$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выявленное в ходе исследования достоверное снижение распределения внимания у большей части испытуемых свидетельствует о негативных изменениях функционального состояния ЦНС к концу рабочей смены вследствие утомления. Возможной причиной развития указанных процессов могли быть напряженная работа в условиях большой плотности вызовов и увеличения их продолжительности, а также необходимость проведения дополнительных противоэпидемических мер при контакте с инфекционными больными. Так, в период

пандемии COVID-19 описано влияние использования средств защиты на увеличение количества и степени выраженности симптомов, характеризующих процесс утомления. Указанные явления вызваны изменениями эргономики рабочего процесса, приводящими к нарушению функционального состояния и снижению работоспособности [14]. Также известно, что производительность труда в экстренных медицинских службах ниже во время ночных смен по сравнению с дневными [15]. Фактическое отсутствие перерывов на сон в условиях суточных дежурств со сплошным потоком вызовов к пациентам являлось одним из важных факторов развития усталости у обследованных. Установлена корреляционная связь между суточным режимом работы, распространенностью сонливости и более высоким риском травматизма на рабочем месте среди работников СМП [16, 17]. В этой связи мониторинг показателей внимания у специалистов экстренных медицинских служб может иметь важное прикладное значение по снижению уровней производственного травматизма.

Статистически достоверные разнонаправленные тенденции динамики РВ в зависимости от возраста работников и выраженная тенденция к увеличению удельного веса испытуемых со снижением РВ в старших возрастных группах свидетельствуют о возрастном снижении адаптационных резервов к трудовой деятельности и более быстром развитии утомления [18]. Причиной таких изменений являются естественные процессы: старение нарушает тонко настроенный баланс возбуждения и торможения в коре головного мозга, вызывая функциональные нарушения [8, 19].

Выявленные негативные тенденции к увеличению процента испытуемых со снижением функций объема и распределения внимания в динамике рабочей смены с увеличением стажа работы свидетельствуют о его неблагоприятном влиянии на развитие процессов утомления в высших отделах ЦНС [20]. Длительная напряженная работа в службе СМП приводит к нарушению процессов возбуждения и торможения в корковых отделах ЦНС, что проявляется нарушениями распределения и переключения внимания.

Статистически достоверное увеличение показателей РВ у большинства работников в начале следующей смены по сравнению с предыдущей свидетельствует о достаточно полном восстановлении функционального состояния ЦНС у работников в течение регламентированного периода отдыха, что является положительным фактором.

Длительная работа в условиях постоянного напряжения регуляторных систем способна привести к развитию различных патологических состояний у трудящегося, а также синдрома профессионального выгорания [4, 5, 21]. Возможно, что введение индивидуальных графиков труда, исключающих работу в ночное время у наиболее дезадаптированных групп работников, в совокупности с устранением дефицита бригад в периоды подъема заболеваемости путем привлечения кадровых резервов будут способствовать решению проблемы.

ВЫВОДЫ

Достоверное снижение показателей распределения внимания к концу рабочей смены у большинства медицинских работников выездных бригад станции скорой медицинской помощи можно рассматривать в качестве одного из объективных признаков утомления. С увеличением возраста работников наблюдается неблагоприятная тенденция к увеличению доли работников со снижением функциональных возможностей центральной нервной системы в сфере распределения внимания. Отсутствие негативных тенденций в динамике показателей внимания при сравнении значений начала соседних смен свидетельствует о достаточном уровне восстановления функционального состояния центральной нервной системы сотрудников после работы за период регламентированного отдыха. Введение индивидуальных графиков труда и устранение кадрового дефицита в периоды подъема заболеваемости населения могут способствовать решению обозначенной проблемы. В перспективе планируется повторное проведение исследований по схожему алгоритму для оценки эффективности рекомендованных профилактических мероприятий, а также для сравнения показателей внимания в периоды наибольшей и наименьшей загруженности бригад.

Литература

- Deng S, Yang N, Li S, et al. Doctors' job satisfaction and its relationships with doctor-patient relationship and work-family conflict in China: A Structural Equation Modeling. *Inquiry*. 2018; 55: 46958018790831. DOI: 10.1177/0046958018790831.
- Bi J, Yin X, Li H, et al. Effects of monitor alarm management training on nurses' alarm fatigue: A randomised controlled trial. *J Clin Nurs*. 2020; 29 (21–22): 4203–16. DOI:10.1111/jocn.15452.
- Болобонкина Т. А., Дементьев А. А., Шатрова Н. В. Тяжесть и напряженность трудового процесса медицинских работников выездных бригад скорой медицинской помощи в условиях модернизации здравоохранения. *Наука молодых (Eruditio Juvenium)*. 2019; 7 (4): 501–08. DOI: 10.23888/HMJ201974501-508.
- Milas GP, Issaris V, Zareifopoulos N. Burnout for medical professionals during the COVID-19 pandemic in Greece; the role of primary care. *Hosp Pract (1995)*. 2022; 50 (2): 102–3. DOI: 10.1080/21548331.2022.2045133.
- Moukarzel A, Michelet P, Durand AC, et al. Burnout syndrome among emergency department staff: prevalence and associated factors. *Biomed Res Int*. 2019; 2019: 6462472. Published 2019 Jan 21. DOI: 10.1155/2019/6462472.
- Knap M, Maciąg D, Trzeciak-Bereza E, et al. Sleep disturbances and health consequences induced by the specificity of nurses' work. *Int J Environ Res Public Health*. 2022; 19 (16): 9802. DOI: 10.3390/ijerph19169802.
- Ganesan S, Magee M, Stone JE, et al. The impact of shift work on sleep, alertness and performance in healthcare workers. *Sci Rep*. 2019; 9 (1): 4635. DOI: 10.1038/s41598-019-40914-x.
- Купцова С. В., Иванова М. В., Петрушевский А. Г., Федина О. Н., Жаворонкова Л. А. ФМРТ-исследование переключения зрительного внимания у здоровых людей. *Журнал высшей нервной деятельности*. 2015; 65 (1): 61–71.
- Poysophon P, Rao AL. Neurocognitive deficits associated with ADHD in athletes: a systematic review. *Sports Health*. 2018; 10 (4): 317–26.
- Ильцова С. Д., Куликов Р. Ф. Психоэмоциональное выгорание работников скорой медицинской помощи. *Colloquium-journal*. 2019; 10–3 (34): 35–37.
- Zhan YX, Zhao SY, Yuan J, et al. Prevalence and influencing factors on fatigue of first-line nurses combating with COVID-19 in China: A Descriptive Cross-Sectional Study. *Curr Med Sci*. 2020; 40 (4): 625–35. DOI: 10.1007/s11596-020-2226-9.
- Raudenská J, Steinerová V, Javůrková A, et al. Occupational burnout syndrome and post-traumatic stress among healthcare professionals during the novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2020; 34 (3): 553–60. DOI: 10.1016/j.bpa.2020.07.008.
- Шапарь В. Б., Тимченко А. В., Швыдченко В. Н. Практическая психология. Инструментарий. Ростов-на-Дону: Феникс, 2002; 688 с.
- Зеленко А. В., Толкач С. Н., Синякова О. К., и др. Субъективная оценка состояния организма как элемент профилактики нарушения профессионального здоровья медицинских работников. В сборнике: Анализ риска здоровью — 2021. Внешнесредовые, социальные, медицинские и поведенческие аспекты. Совместно с международной встречей по окружающей среде и здоровью RISE-2021. Материалы XI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием: в 2 т. Пермь, 2021; с. 153–61.
- Patterson PD, Weaver MD, Markosyan MA, et al. Impact of shift duration on alertness among air-medical emergency care clinician shift workers. *Am J Ind Med*. 2019; 62 (4): 325–36. DOI: 10.1002/ajim.22956.
- Lin MH, Huang YC, Chen WK, Wang JY. Sleepiness and injury risk in emergency medical service workers in Taiwan. *PLoS One*. 2020; 15 (2): e0229202. Published 2020 Feb 24. DOI: 10.1371/journal.pone.0229202.
- Mansukhani MP, Kolla BP, Surani S, et al. Sleep deprivation in resident physicians, work hour limitations, and related outcomes: a systematic review of the literature. *Postgrad Med*. 2012; 124 (4): 241–9. DOI: 10.3810/pgm.2012.07.2583.
- Violanti JM, Owens SL, Fekedulegn D, et al. An Exploration of Shift Work, Fatigue, and Gender Among Police Officers: The BCOPS Study. *Workplace Health Saf*. 2018; 66 (11): 530–7. DOI: 10.1177/2165079918754586.
- Petitot P, Spitz G, Emir UE, et al. Age-related decline in cortical inhibitory tone strengthens motor memory. *Neuroimage*. 2021;

- 245: 118681. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2021.118681.
20. Губарева Л. И., Пономарева Т. Ю., Ермолова Л. С. Особенности функционирования центральной нервной системы у работников газотранспортной системы с разной степенью адаптации к условиям профессиональной среды. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2016; 11 (4): 573–6.
21. Rabinerson D, Markovitch L, Gabbay-Ben-Ziv R. *Harefuah*. 2016; 155 (7): 394–7.

References

- Deng S, Yang N, Li S, et al. Doctors' job satisfaction and its relationships with doctor-patient relationship and work-family conflict in China: A Structural Equation Modeling. *Inquiry*. 2018; 55: 46958018790831. DOI: 10.1177/0046958018790831.
- Bi J, Yin X, Li H, et al. Effects of monitor alarm management training on nurses' alarm fatigue: A randomised controlled trial. *J Clin Nurs*. 2020; 29 (21–22): 4203–16. DOI:10.1111/jocn.15452.
- Bolobonkina TA, Dementev AA, Shatrova NV. Tyazhest' i napryazhennost' trudovogo processa medicinskix rabotnikov vyezdnyx brigad skoroj medicinskoj pomoshhi v usloviyax modernizacii zdruvooxraneniya. *Nauka molodyx (Eruditio Juvenium)*. 2019; 7 (4): 501–08. DOI: 10.23888/HMJ201974501-508. Russian.
- Milas GP, Issaris V, Zareifopoulos N. Burnout for medical professionals during the COVID-19 pandemic in Greece; the role of primary care. *Hosp Pract (1995)*. 2022; 50 (2): 102–3. DOI: 10.1080/21548331.2022.2045133.
- Moukarzel A, Michelet P, Durand AC, et al. Burnout syndrome among emergency department staff: prevalence and associated factors. *Biomed Res Int*. 2019; 2019: 6462472. Published 2019 Jan 21. DOI: 10.1155/2019/6462472.
- Knap M, Maciąg D, Trzeciak-Bereza E, et al. Sleep disturbances and health consequences induced by the specificity of nurses' work. *Int J Environ Res Public Health*. 2022; 19 (16): 9802. DOI: 10.3390/ijerph19169802.
- Ganesan S, Magee M, Stone JE, et al. The impact of shift work on sleep, alertness and performance in healthcare workers. *Sci Rep*. 2019; 9 (1): 4635. DOI: 10.1038/s41598-019-40914-x.
- Kupcova SV, Ivanova MV, Petrushevskij AG, Fedina ON, Zhavoronkova LA. FMRT-issledovanie pereklyucheniya zritel'nogo vnimaniya u zdorovyx lyudej. *Zhurnal vyshej nervnoj deyatel'nosti*. 2015; 65 (1): 61–71. Russian.
- Poysophon P, Rao AL. Neurocognitive deficits associated with ADHD in athletes: a systematic review. *Sports Health*. 2018; 10 (4): 317–26.
- Il'yasova SD, Kulikov RF. Psixoehmocional'noe vygoranie rabotnikov skoroj medicinskoj pomoshhi. *Colloquium-journal*. 2019; 10–3 (34): 35–37. Russian.
- Zhan YX, Zhao SY, Yuan J, et al. Prevalence and influencing factors on fatigue of first-line nurses combating with COVID-19 in China: A Descriptive Cross-Sectional Study. *Curr Med Sci*. 2020; 40 (4): 625–35. DOI: 10.1007/s11596-020-2226-9
- Raudenská J, Steinerová V, Javůrková A, et al. Occupational burnout syndrome and post-traumatic stress among healthcare professionals during the novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2020; 34 (3): 553–60. DOI: 10.1016/j.bpa.2020.07.008.
- Shapar VB, Timchenko AV, Shvydchenko VN. *Prakticheskaya psixologiya. Instrumentarij*. Rostov-na-Donu: Feniks, 2002; 688 s. Russian.
- Zelenko AV, Tolkach SN, Sinyakova OK, i dr. Sub"ektivnaya ocenka sostoyaniya organizma kak ehlement profilaktiki narusheniya professional'nogo zdorov'ya medicinskix rabotnikov. V sbornike: *Analiz riska zdorov'yu — 2021. Vneshnesredovye, social'nye, medicinskie i povedencheskie aspekty. Sovmestno s mezhdunarodnoj vstrechej po okruzhayushhej srede i zdorov'yu RISE-2021. Materialy XI Vserossijskoj nauchno-prakticheskoy konferencii s mezhdunarodnym uchastiem: v 2 t. Perm'*, 2021; c. 153–61. Russian.
- Patterson PD, Weaver MD, Markosyan MA, et al. Impact of shift duration on alertness among air-medical emergency care clinician shift workers. *Am J Ind Med*. 2019; 62 (4): 325–36. DOI: 10.1002/ajim.22956.
- Lin MH, Huang YC, Chen WK, Wang JY. Sleepiness and injury risk in emergency medical service workers in Taiwan. *PLoS One*. 2020; 15 (2): e0229202. Published 2020 Feb 24. DOI: 10.1371/journal.pone.0229202.
- Mansukhani MP, Kolla BP, Surani S, et al. Sleep deprivation in resident physicians, work hour limitations, and related outcomes: a systematic review of the literature. *Postgrad Med*. 2012; 124 (4): 241–9. DOI: 10.3810/pgm.2012.07.2583.
- Violanti JM, Owens SL, Fededulegn D, et al. An Exploration of Shift Work, Fatigue, and Gender Among Police Officers: The BCOPS Study. *Workplace Health Saf*. 2018; 66 (11): 530–7. DOI: 10.1177/2165079918754586.
- Petit P, Spitz G, Emir UE, et al. Age-related decline in cortical inhibitory tone strengthens motor memory. *Neuroimage*. 2021; 245: 118681. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2021.118681.
- Gubareva LI, Ponomareva TYu, Ermolova LS. Osobennosti funkcionirovaniya central'noj nervnoj sistemy u rabotnikov gazotransportnoj sistemy s raznoj stepen'yu adaptacii k usloviyam professional'noj sredy. *Medicinskij vestnik Severnogo Kavkaza*. 2016; 11 (4): 573–6. Russian.
- Rabinerson D, Markovitch L, Gabbay-Ben-Ziv R. *Harefuah*. 2016; 155 (7): 394–7.

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК В ОЦЕНКЕ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ХОЛОДОВОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

В. П. Патракеева , В. А. Штаборов

Институт физиологии природных адаптаций Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени Н. П. Лавёрова Уральского отделения Российской академии наук, Архангельск, Россия


Центральную роль в адаптации организма человека к холоду играет быстрое включение переходных краткосрочных реакций, которые участвуют в корректровке гомеостаза, необходимой для приспособления к низкотемпературной среде. Сеть сигнальных путей и регуляторы метаболизма обеспечивают достаточную пластичность работы клеток иммунной системы, нормальное функционирование которой крайне важно для успешной адаптации организма человека. Энергообеспеченность иммунокомпетентных клеток дает возможность формирования адекватного иммунного ответа на воздействие любого негативного фактора, обеспечения адаптационных функциональных перестроек. Целью работы было изучить варианты путей метаболической активности иммунокомпетентных клеток в формировании индивидуальной холодовой чувствительности. Проведено обследование 180 человек в возрасте 25–55 лет (130 женщин, 50 мужчин) до и после кратковременного общего охлаждения. В периферической крови и лизате клеток иммуноферментным анализом определяли уровни IL10, IL6, TNF α , иризина, трансферрина, sTfR, HIF-1 α , Sirt3. В лимфоцитах определяли содержание гликогена (цитохимически) и АТФ (люциферин-люциферазный метод). Снижение уровня лимфоцитов в периферической крови после охлаждения свидетельствует о формировании срочной адаптивной реакции и активации гликолитических процессов в клетке на фоне более низкого уровня воспалительной реакции. Повышение уровня лимфоцитов в циркуляции после воздействия холода происходит на фоне активации воспалительных реакций. Для обследованных волонтеров, у которых не было зарегистрировано изменений в уровне лимфоцитов, выявлено более низкое соотношение регуляторов метаболизма HIF-1 α /SIRT3, что свидетельствует о преобладании митохондриальной активности при адаптации к холоду.

Ключевые слова: холод, метаболическая активность, гликоген, иризин, АТФ, сатурация кислорода

Финансирование: работа выполнена в рамках программы фундаментальных научных исследований по теме лаборатории экологической иммунологии Института физиологии природных адаптаций ФГБУН ФИЦКИА УрО РАН № гос. регистрации 122011300377-5.

Вклад авторов: В. П. Патракеева — планирование исследования, анализ литературы, сбор, обработка и интерпретация данных, подготовка рукописи; В. А. Штаборов — анализ литературы, сбор и обработка данных, подготовка рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ИФПА ФГБУН ФИЦКИА УрО РАН (протоколы № 4 и 6 от 7 декабря 2016 г. и от 14 февраля 2022 г. соответственно), проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации 1975 г. (2013 г.).

 **Для корреспонденции:** Вероника Павловна Патракеева
наб. Северной Двины, д. 23, г. Архангельск, 163000, Россия; patrakeewa.veronika@yandex.ru

Статья получена: 14.10.2022 **Статья принята к печати:** 02.11.2022 **Опубликована онлайн:** 17.11.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.036

METABOLIC ACTIVITY OF IMMUNOCOMPETENT CELLS IN ASSESSMENT OF INDIVIDUAL COLD SENSITIVITY

Patrakeeva VP , Shtaborov VA

N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk, Russia


The rapid switch on of the transient short-term responses involved in adjustment of homeostasis plays a key role in human adaptation to low temperatures that is essential for adjustment to low-temperature environment. The network of signaling pathways together with metabolic regulators provide sufficient plasticity of the cells of immune system, the normal function of which is extremely important for successful human adaptation. Sufficient energy supply to immunocompetent cells makes it possible to form an adequate immune response to any negative factor and to ensure adaptive functional rearrangements. The study was aimed to assess the variants of the immunocompetent cell metabolic pathways involved in acquiring individual cold sensitivity. A total of 180 people aged 25–55 (130 females, 50 males) were assessed before and after the short-term whole body cooling. Enzyme immunoassay was used to define the levels of IL10, IL6, TNF α , irisin, transferrin, sTfR, HIF-1 α , Sirt3 in peripheral blood and cell lysate. The levels of glycogen (cytochemical methods) and ATP (luciferin-luciferase assay) in lymphocytes were defined. The decrease in peripheral blood lymphocyte levels after cooling was indicative of the formation of immediate adaptive response and activation of glycolysis amid less intense inflammatory response. The increase in the levels of circulating lymphocytes after the cold exposure was associated with activation of inflammatory responses. The lower ratio of HIF-1 α /SIRT3 metabolic regulators was found in the surveyed volunteers who showed no changes in the levels of lymphocytes. This indicated predominance of mitochondrial activity in adaptation to low temperatures.

Keywords: cold, metabolic activity, glycogen, irisin, ATP, oxygen saturation

Funding: the study was carried out as part of the fundamental research program on the topic of the Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Environmental Adaptation Physiology, N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, project № 122011300377-5.

Author contributions: Patrakeeva VP — study planning, literature analysis, data acquisition, processing and interpretation, manuscript writing; Shtaborov VA — literature analysis, data acquisition and processing, manuscript writing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (protocols № 4 and 6 of 7 December 2016 and 14 February 2022, respectively) and carried out in accordance with the principles of the 1975 Declaration of Helsinki (2013).

 **Correspondence should be addressed:** Veronika P. Patrakeeva
Naberezhnaya Severnoi Dviny, 23, Arkhangelsk, 163000, Russia; patrakeewa.veronika@yandex.ru

Received: 14.10.2022 **Accepted:** 02.11.2022 **Published online:** 17.11.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.036

Адаптация к условиям Севера связана со способностью организма приспосабливаться к воздействию низких температур, что приводит к необходимости метаболических перестроек. Наиболее быстрым способом получения энергии является гликолиз, используемый клеткой в процессе пролиферации, а также при воздействии экстремальных нагрузок [1]. Митохондрии медленнее, но эффективнее способствуют наработке АТФ в результате окислительного фосфорилирования, однако митохондриальный окислительный метаболизм сенситивизирует клетки к апоптозу [2]. Одним из ключевых регуляторов митохондриального метаболизма является Sirt3 [3–6]. Снижение его экспрессии можно наблюдать при сердечно-сосудистых заболеваниях, сахарном диабете, онкологических процессах и нарушениях метаболизма, а также в регуляции окислительного стресса через ось Sirt3-AMPK- α -PGC-1 α [7–11]. Другой фактор, регулирующий метаболизм клетки, — гипоксия-индуцируемый фактор HIF-1 α , который повышает гликолитическую активность и подавляет митохондриальную [12]. Оценка соотношения этих двух регуляторов позволит оценить направленность метаболической активности клетки. В ранее проведенных нами исследованиях было установлено, что люди, проживающие на Севере, по-разному реагируют на кратковременное общее охлаждение, что проявляется в изменении уровня циркулирующих в периферической крови лимфоцитов (снижение или повышение их уровня, либо отсутствие реакции) [13, 14]. В связи с такими различиями представляет интерес изучение вариантов путей метаболической активности иммунокомпетентных клеток в формировании индивидуальной холодовой чувствительности, что стало целью данной работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено обследование 180 человек (из них 130 женщин и 50 мужчин) в возрасте 25–55 лет до и после кратковременного общего охлаждения в холодной камере при -25°C в течение 5 мин. Забор крови проводили из локтевой вены до и сразу после охлаждения. Критерий включения: практически здоровые люди трудоспособного возраста, на момент обследования не имевшие хронических и/или рецидивирующих заболеваний. Лейкограмму определяли на гематологическом анализаторе XS-1000i (Systemx; Япония). Иммуноферментным методом определяли концентрацию цитокинов IL10, IL6, TNF α , иризина, трансферрина, sTfR, HIF-1 α , Sirt3 на АИФА Evolis (Bio-Rad; Франция) и Multiscan MS (Финляндия). Оценка содержания гликогена проводили цитохимически («Абрис+»; Россия). Количественное содержание аденозинтрифосфата (АТФ) определяли при помощи люциферин-люциферазного метода. Результаты реакции оценивали на люминометре ЛЮМ-1 («Люмтек»; Россия) с использованием стандартных

наборов реактивов «Люмтек». Сатурацию крови определяли при помощи пульсоксиметра («Armed» YX300; Китай). У всех обследованных определяли массу тела (кг), рост (см), рассчитывали индекс массы тела ($\text{кг}/\text{м}^2$). Оценка содержания подкожного и висцерального жира проводили с использованием портативного прибора фирмы Omron (Япония). В соответствии с рекомендациями производителя содержание висцерального жира, равное 1–9%, считали нормальным, 10–14% — высоким, 15–30% — очень высоким. Результаты исследования оценивали в трех группах, в зависимости от изменения уровня лимфоцитов в периферической крови после кратковременного общего охлаждения. В группе 1 содержание лимфоцитов снизилось в 1,5–2 раза с 2,1 (1,77–2,44) до 1,69 (0,95–2,16) $\times 10^9$ кл/л ($p < 0,001$); в группе 2 оно повысилось с 1,49 (1,26–1,74) до 2,22 (1,48–2,61) $\times 10^9$ кл/л ($p < 0,01$); в группе 3 не установлено достоверных изменений (1,88 (1,46–2,17) и 1,82 (1,46–2,56) $\times 10^9$ кл/л). Группы не различались по возрасту, средний возраст в группе 1 составил 33 года, в группе 2 — 31 год, в группе 3 — 32 года. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 10 (США). В связи с тем, что распределение признаков не подчинялось закону нормального распределения (Shapiro-Wilk's), данные представляли в виде медианы, 25- и 75-перцентилей Me (25–75). Множественные сравнения значений (по трем группам) — Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Парные сравнения — критерий Mann-Whitney ($p < 0,017$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Показатель индекса массы тела значимо не различался по группам: в группе 1 он составил 23,50 $\text{кг}/\text{м}^2$, в группе 2 — 24,16 $\text{кг}/\text{м}^2$, в группе 3 — 24,78 $\text{кг}/\text{м}^2$. Сравнение данных биоимпедансометрии показало, что для людей, реагирующих на общее кратковременное охлаждение повышением уровня лимфоцитов в периферической крови, характерно более высокое содержание висцерального жира 12,1% (группа 1 — 7,2%, группа 2 — 5,3%; $p^{1-2}, 1-3 < 0,01$) при этом доля подкожной жировой клетчатки значимо не различалась у всех обследованных и составила в группе 1 — 31,8%, в группе 2 — 30%, в группе 3 — 30,1%. Высокий уровень висцерального жира повышает риск сердечно-сосудистых патологий, нарушений обмена веществ, положительно коррелирует с повышением триглицеридов и уровнем сахара в крови натощак, снижением уровня липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) [15–17]. Известно, что дисфункция висцерального жира способствует формированию гипоксических состояний [18]. Это отражается в более низком уровне сатурации крови в группе 1 — 97% (min — 94%, max — 99%); в группе 2 данный показатель составил 98% (min — 97%, max — 99%), в третьей — 99% (min — 98%,

Таблица 1. Концентрация трансферрина и sTfR в периферической крови, Me (25–75)

		Трансферрин, мг/дл	sTfR, мкг/мл
Группа 1	До охлаждения	455,9 (306,5–846,7)	27,1 (1,5–53,4)
	После охлаждения	430,3 (333,1–480,0)	35,9 (17,4–344,6)*
Группа 2	До охлаждения	371,4 (341,4–543,4)	20,0 (18,46–22,60)
	После охлаждения	573,8 (434,20–640,2)**	22,6 (21,54–46,2)
Группа 3	До охлаждения	434,2 (363,8–517,0)	22,3 (20,0–126,2)
	После охлаждения	434,2 (324,2–663,2)	25,6 (18,72–130,8)

Примечание: * — $p_{г,1} < 0,01$; ** — $p_{г,2} < 0,01$.

Таблица 2. Содержание HIF-1 α и SIRT-3 в лимфоцитах периферической крови, Me (25–75)

Показатель	Группа 1	Группа 2	Группа 3
HIF-1 α , 106 кл/мл	1,3 (0,9–1,8)	1,8 (1,48–2,1)	1,3 (1,13–2,0)
SIRT-3, 106 кл/мл	0,2 (0,1–0,2)	0,3 (0,12–0,5)	0,3 (0,19–0,5)

max — 99%). После общего кратковременного охлаждения насыщение крови кислородом в группе 1 фактически сравнялось с двумя другими группами и повысилось до 98% (min — 97%, max — 99%). Сочетанное влияние гипоксии и низких температур приводит к активации гена трансферрина и накоплению его в плазме (табл. 1). Во всех группах регистрируется достаточно высокое содержание растворимого рецептора к трансферрину sTfR и самого трансферрина с превышением концентрации 340 мг/дл у 75% обследованных в группе 1; 77,8% — в группе 2 и 90,9% — в группе 3.

Такое повышение уровня трансферрина и sTfR свидетельствует о формировании дефицита железа в тканях, гипоксии; кроме того, высокие концентрации трансферрина являются фактором риска сердечно-сосудистой патологии, провоцируя активацию факторов свертывания крови и гиперкоагуляцию [19, 20]. Изменение метаболической активности клеток определяет возможность адаптации к изменяющимся условиям. Наиболее быстрым способом получения энергии для клетки является гликолиз, для синтеза АТФ в среднем необходимо 2–4 мин. Снижение уровня лимфоцитов в периферической крови после кратковременного охлаждения ассоциировано со снижением гликогена в них с 4 до 2,83% ($p = 0,0056$); в двух других группах уровень гликогена в лимфоцитах не изменялся и составил соответственно 5,8 и 6,2% в группе 2 и 3,6 и 4,8% — в группе 3. Снижение гликогена приводит к наработке АТФ в лимфоцитах (с 0,98 (0,42–2,87) до 3,16 (0,55–4,19) мкмоль/млн кл); так как клетка не имеет механизмов депонирования АТФ для продолжительного использования, такое повышение АТФ, свидетельствует об ее активации. Повышение соотношения HIF-1 α /SIRT3, регистрируемое при наработке клеткой АТФ свидетельствует в пользу повышения гликолитической активности, так как HIF-1 α оказывает преимущественно ингибирующее действие на процессы окислительного фосфорилирования и стимулирует гликолиз, индуцируя поглощение глюкозы и экспрессию гликолитических ферментов (табл. 2) [21–23].

В регуляции холодной адаптации принимает участие один из миокинов белок иризин, рецепторы к которому имеются на всех клетках организма [24, 25]. Иризин обеспечивает треморрегуляторные процессы за счет активации термогена (UCP1), повышает расход энергии. Кроме того, иризин за счет взаимодействия с тирозинкиназой Src и фосфорилирования AMPK оказывает противовоспалительное действие и обеспечивает защиту межклеточных соединений от повреждения [26–28]. Содержание данного миокина было наиболее высоким в группе 1 и составило 6,29 (3,04–7,98) мкг/мл; в двух других группах уровни были ниже: в группе 2 — 3,06 (1,59–6,70), в группе 3 — 4,32 (3,11–8,08) мкг/мл ($p^{1-2} = 0,005$). После холодного воздействия уровень иризина в группе 1 значительно снизился до 3,17 (1,349–6,64) мкг/мл ($p < 0,01$). Такое снижение уровня иризина после охлаждения может способствовать усилению проницаемости эндотелия, повышению адгезии клеток и миграции их, что ассоциировано со снижением уровня лимфоцитов в циркуляции в данной группе обследованных. Более высокий фоновый уровень иризина обеспечивает повышение в периферической крови содержания противовоспалительного цитокина IL10 на фоне более низких концентраций провоспалительных цитокинов IL6 и TNF α (см. рисунок).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что ранний период акклиматизации к холоду (до 7 дней) связан с повышением уровня белка HIF-1 α , способствующего активации гликолиза и β -окисления [29, 30]. В результате исследований нами установлено, что даже кратковременное холодное воздействие в течение 5 мин способствует формированию адаптивных реакций, что определяется фоновым уровнем иммунной защиты и регуляторных механизмов, обеспечивающих метаболическую активность клеток. Сочетанное влияние гипоксии и холода связано с повышением уровня трансферрина и растворимого рецептора к нему практически у всех обследованных волонтеров,

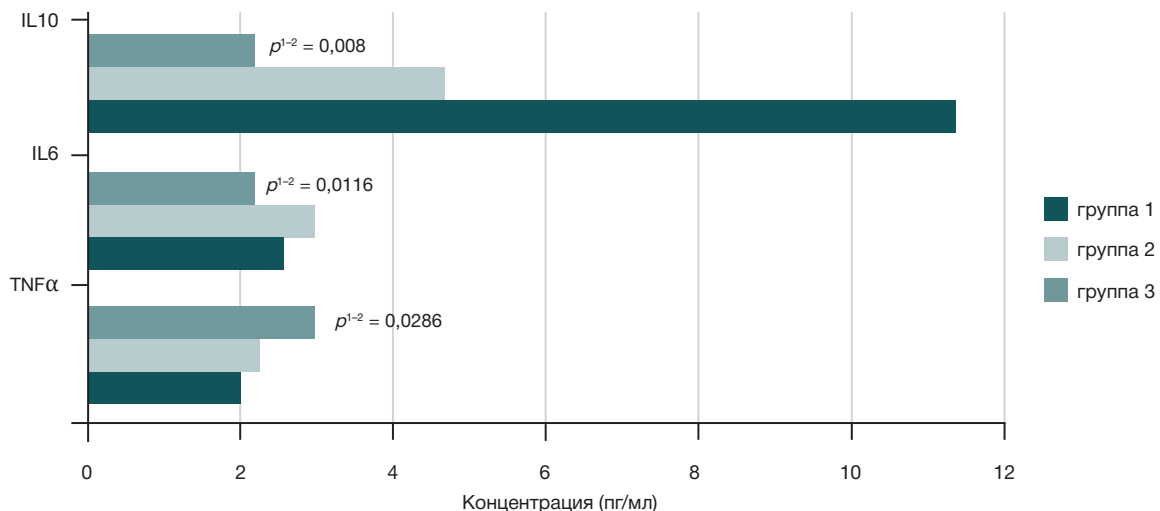


Рис. Содержание цитокинов в периферической крови

что является фактором риска формирования сердечно-сосудистых заболеваний, являющихся распространенной патологией в северных территориях. Трансферрин служит важным переносчиком ионов железа, вовлеченных в разнообразные метаболические процессы [31, 32], от которых непосредственно зависит вариант реагирования на холодовое воздействие за счет формирования срочных или долговременных адаптивных реакций. Так, установленное снижение уровня лимфоцитов в периферической крови в ответ на кратковременное общее охлаждение свидетельствует о формировании срочной адаптивной реакции с активацией гликолитических процессов в клетке, обеспечивающих быстрое повышение энергетических запасов, необходимых для активации лимфоцитов. Более высокий фоновый уровень иризина в первой группе обследованных обеспечивает регуляцию воспалительной реакции за счет стимуляции более высоких уровней противовоспалительного цитокина. Повышение в циркуляции лимфоцитов во второй группе обследованных связано с более высоким уровнем воспалительной реакции, что отражается в уровне содержания провоспалительных

цитокинов. Кроме того, для данной группы обследованных характерно наличие большего процента висцерального жира, что также может провоцировать более высокий уровень воспаления. Для обследованных волонтеров, у которых не было зарегистрировано изменений в уровне лимфоцитов (3 группа обследованных), не установлено активизации срочных адаптивных реакций. В данной группе ниже соотношение регуляторов метаболизма HIF-1 α /SIRT3, что свидетельствует о преобладании митохондриальной активности при адаптации к холоду.

ВЫВОДЫ

Фоновый уровень иммунной защиты, а также концентрация про- и противовоспалительных факторов связаны с формированием срочных и долговременных адаптивных реакций на холодовое воздействие. Оценка изменения уровня лимфоцитов в циркуляции является простым и доступным методом для прогнозирования адаптивных возможностей человека, обеспечиваемых регуляцией активации метаболических путей клетки.

Литература

- Zhu J, Thompson CB. Metabolic regulation of cell growth and proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019; 20 (7): 436–50.
- Ferranti CS, Cheng J, Thompson C, Zhang J, Rotolo JA, Buddaseth S, et al. Fusion of lysosomes to plasma membrane initiates radiation-induced apoptosis. *J Cell Biol.* 2020; 219 (4): e201903176.
- Newman JC, He W, Verdin E. Mitochondrial protein acylation and intermediary metabolism: regulation by sirtuins and implications for metabolic disease. *J Biol Chem.* 2012; 287 (51): 42436–43.
- Zhang J, Xiang H, Liu J, Chen Y, He R-R, Liu B. Mitochondrial sirtuin 3: new emerging biological function and therapeutic target. *Theranostics.* 2020; 10 (18): 8315–42.
- Reverdy C, Gitton G, Guan X, Adhya I, Krishna Dumpati R, Roy S, et al. Discovery of novel compounds as potent activators of Sirt3. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2022; 73: 116999.
- Anderson KA, Hirschev MD. Mitochondrial protein acetylation regulates metabolism. *Essays Biochem.* 2012; 52: 23–35.
- Bagul PK, Katare PB, Bugga P, Dinda AK, Banerjee SK. SIRT3 modulation by resveratrol improves mitochondrial oxidative phosphorylation in diabetic heart through deacetylation of TFAM. *Cells.* 2018; 7 (12): 235.
- Kincaid B, Bossy-Wetzel E. Forever young: SIRT3 a shield against mitochondrial meltdown, aging, and neurodegeneration. *Front Aging Neurosci.* 2013; 5: 48.
- Anderson KA, Hirschev MD. Mitochondrial protein acetylation regulates metabolism. *Essays Biochem.* 2012; 52: 23–35.
- Porter GA, Urciuoli WR, Brookes PS, Nadtochiy SM. SIRT3 deficiency exacerbates ischemia-reperfusion injury: implication for aged hearts. *Am J Phys Heart Circ Phys.* 2014; 306: H1602–H1609.
- Bugga P, Alam J, Kumar R, Pal S, Chattopadhyay N, Banerjee SK. Sirt3 ameliorates mitochondrial dysfunction and oxidative stress through regulating mitochondrial biogenesis and dynamics in cardiomyoblast. *Cellular Signalling.* 2022; 94: 110309.
- Denko NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nature Reviews Cancer.* 2008; 8: 705–13.
- Патракеева В. П., Самодова А. В. Влияние кратковременного общего охлаждения на миграцию, рециркуляцию и энергетический ресурс иммунокомпетентных клеток периферической крови человека. *Вестник Уральской медицинской академической науки.* 2017; 14 (4): 362–8.
- Патракеева В. П. Изменение уровня лимфоцитов периферической венозной крови как метод оценки индивидуальной холодовой чувствительности. В сборнике: Экологический мониторинг: методы и подходы. Материалы Международной сателлитной конференции «Экологический мониторинг: методы и подходы» и XX Международного симпозиума «Сложные системы в экстремальных условиях». 20–24 сентября 2021 г.; Красноярск, 2021: 170–3.
- Piché M-E, Tchernof A, Després J-P. Obesity phenotypes, diabetes, and cardiovascular diseases. *Circ Res.* 2020; 126 (11): 1477–500.
- Després J-P. Body fat distribution and risk of cardiovascular disease. *Circulation.* 2012; 126 (10): 1301–13.
- Sukkriang N, Chanprasertpinoy W, Wattanapit A, Punsawad C, Thamrongrat N, Sangpoom S. Correlation of body visceral fat rating with serum lipid profile and fasting blood sugar in obese adults using a noninvasive machine. *Heliyon.* 2021; 7 (2): e06264.
- Gugliucci A. Biomarkers of dysfunctional visceral fat. *Advances in Clinical Chemistry.* 2022; 109: 1–30.
- Addo OY, Mei Z, Hod EA, Jeffers ME, Sharma AJ, Flores-Ayala RS, et al. Physiologically based serum ferritin thresholds for iron deficiency in women of reproductive age who are blood donors. *Blood Advances.* 2022; 6 (12): 3661–5.
- Li M, Tang X, Liao Z, Shen C, Cheng R, Fanget M. Hypoxia and low temperature up-regulate transferrin to induce hypercoagulability at high altitude. *Blood.* 2022; 2022016410.
- Kierans SJ, Taylor CT. Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. *J Physiol.* 2021; 599 (1): 23–37.
- Singh D, Arora R, Kaur P, Singh B, Mannan R, Arora S. Overexpression of hypoxia-inducible factor and metabolic pathways: possible targets of cancer. *Cell Biosci.* 2017; 7: 62.
- Sautchuk Jr R, Eliseev RA. Cell energy metabolism and bone formation. *Bone Reports.* 2022; 16: 101594.
- Kim H, Wrann CD, Jedrychowski M, Vidoni S, Kitase Y, Nagano K. et al. Irisin mediates effects on bone and fat via α V integrin receptors. *Cell.* 2019; 178 (2): 507–8.
- Fu T, Li C, Sun Z, Yan B, Wu Y, Huang Z, et al. Integrin α V mediates the effects of irisin on human mature adipocytes. *Obes Facts.* 2022; 15 (3): 442–50.
- Bi J, Zhang J, Ren Y, Du Z, Li T, Wang T, et al. Irisin reverses intestinal epithelial barrier dysfunction during intestinal injury via binding to the integrin α V β 5 receptor. *J Cell Mol Med.* 2020; 24 (1): 996–1009.
- Drewlo S, Johnson E, Kilburn BA, Kadam L, Armistead B, Kohan-

- Ghadr H-R. Irisin induces trophoblast differentiation via AMPK activation in the human placenta. *J Cell Physiol.* 2020; 235 (10): 7146–58.
28. Slate-Romano JJ, Yano N, Zhao TC. Irisin reduces inflammatory signaling pathways in inflammation-mediated metabolic syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2022; 552: 111676.
29. Pescador N, Villar D, Cifuentes D, Garcia-Rocha M, Ortiz-Barahona A, Vazquez S, et al. Hypoxia promotes glycogen accumulation through hypoxia inducible factor (HIF)-mediated induction of glycogen synthase 1. *PLoS One.* 2010; 5: e9644.
30. Vucetic M, Otasevic V, Korac A, Stancic A, Jankovic A, Markelic M, et al. Interscapular brown adipose tissue metabolic reprogramming during cold acclimation: Interplay of HIF-1 α and AMPK α . *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — General Subjects.* 2011; 1810 (12): 1252–61.
31. Xu Y, Alfaro-Magallanes VM, Babitt JL. Physiological and pathophysiological mechanisms of hepcidin regulation: clinical implications for iron disorders. *Br J Haematol.* 2021; 193 (5): 882–93.
32. Kawabata H. Transferrin and transferrin receptors update. *Free Radic Biol Med.* 2019; 133: 46–54.

References

1. Zhu J, Thompson CB. Metabolic regulation of cell growth and proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019; 20 (7): 436–50.
2. Ferranti CS, Cheng J, Thompson C, Zhang J, Rotolo JA, Buddaseth S, et al. Fusion of lysosomes to plasma membrane initiates radiation-induced apoptosis. *J Cell Biol.* 2020; 219 (4): e201903176.
3. Newman JC, He W, Verdin E. Mitochondrial protein acylation and intermediary metabolism: regulation by sirtuins and implications for metabolic disease. *J Biol Chem.* 2012; 287 (51): 42436–43.
4. Zhang J, Xiang H, Liu J, Chen Y, He R-R, Liu B. Mitochondrial sirtuin 3: new emerging biological function and therapeutic target. *Theranostics.* 2020; 10 (18): 8315–42.
5. Reverdy C, Gitton G, Guan X, Adhya I, Krishna Dumpati R, Roy S, et al. Discovery of novel compounds as potent activators of Sirt3. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2022; 73: 116999.
6. Anderson KA, Hirschey MD. Mitochondrial protein acetylation regulates metabolism. *Essays Biochem.* 2012; 52: 23–35.
7. Bagul PK, Katara PB, Bugga P, Dinda AK, Banerjee SK. SIRT3 modulation by resveratrol improves mitochondrial oxidative phosphorylation in diabetic heart through deacetylation of TFAM. *Cells.* 2018; 7 (12): 235.
8. Kincaid B, Bossy-Wetzell E. Forever young: SIRT3 a shield against mitochondrial meltdown, aging, and neurodegeneration. *Front Aging Neurosci.* 2013; 5: 48.
9. Anderson KA, Hirschey MD. Mitochondrial protein acetylation regulates metabolism. *Essays Biochem.* 2012; 52: 23–35.
10. Porter GA, Urciuoli WR, Brookes PS, Nadtochiy SM. SIRT3 deficiency exacerbates ischemia-reperfusion injury: implication for aged hearts. *Am J Phys Heart Circ Phys.* 2014; 306: H1602–H1609.
11. Bugga P, Alam J, Kumar R, Pal S, Chattopadhyay N, Banerjee SK. Sirt3 ameliorates mitochondrial dysfunction and oxidative stress through regulating mitochondrial biogenesis and dynamics in cardiomyoblast. *Cellular Signalling.* 2022; 94: 110309.
12. Denko NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nature Reviews Cancer.* 2008; 8: 705–13.
13. Patrakeeva VP, Samodova AV. Vlijanie kratkovremennogo obshhego ohlazhdenija na migraciju, recirkuljaciju i jenergeticheskij resurs immunokompetentnyh kletok perifericheskoj krovi cheloveka. *Vestnik Ural'skoj medicinskoj akademicheskoy nauki.* 2017; 14 (4): 362–8. Russian.
14. Patrakeeva VP. Izmenenie urovnja limfocitov perifericheskoj venoznoj krovi kak metod ocenki individual'noj holodovoj chuvstvitel'nosti. V sbornike: *Jekologicheskij monitoring: metody i podhody. Materialy Mezhdunarodnoj satellitnoj konferencii «Jekologicheskij monitoring: metody i podhody» i HH Mezhdunarodnogo simpoziuma «Slozhnye sistemy v jekstremal'nyh uslovijah».* 20–24 sentjabrja 2021 g.; Krasnojarsk, 2021: 170–3. Russian.
15. Piché M-E, Tchernof A, Després J-P. Obesity phenotypes, diabetes, and cardiovascular diseases. *Circ Res.* 2020; 126 (11): 1477–500.
16. Després J-P. Body fat distribution and risk of cardiovascular disease. *Circulation.* 2012; 126 (10): 1301–13.
17. Sukkriang N, Chanprasertpinyo W, Wattanapit A, Punsawad C, Thamrongrat N, Sangpoom S. Correlation of body visceral fat rating with serum lipid profile and fasting blood sugar in obese adults using a noninvasive machine. *Heliyon.* 2021; 7 (2): e06264.
18. Gugliucci A. Biomarkers of dysfunctional visceral fat. *Advances in Clinical Chemistry.* 2022; 109: 1–30.
19. Addo OY, Mei Z, Hod EA, Jeffers ME, Sharma AJ, Flores-Ayala RS, et al. Physiologically based serum ferritin thresholds for iron deficiency in women of reproductive age who are blood donors. *Blood Advances.* 2022; 6 (12): 3661–5.
20. Li M, Tang X, Liao Z, Shen C, Cheng R, Fanget M. Hypoxia and low temperature up-regulate transferrin to induce hypercoagulability at high altitude. *Blood.* 2022; 2022016410.
21. Kierans SJ, Taylor CT. Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. *J Physiol.* 2021; 599 (1): 23–37.
22. Singh D, Arora R, Kaur P, Singh B, Mannan R, Arora S. Overexpression of hypoxia-inducible factor and metabolic pathways: possible targets of cancer. *Cell Biosci.* 2017; 7: 62.
23. Sautchuk Jr R, Eliseev RA. Cell energy metabolism and bone formation. *Bone Reports.* 2022; 16: 101594.
24. Kim H, Wrann CD, Jedrychowski M, Vidoni S, Kitase Y, Nagano K, et al. Irisin mediates effects on bone and fat via α V integrin receptors. *Cell.* 2019; 178 (2): 507–8.
25. Fu T, Li C, Sun Z, Yan B, Wu Y, Huang Z, et al. Integrin α V mediates the effects of irisin on human mature adipocytes. *Obes Facts.* 2022; 15 (3): 442–50.
26. Bi J, Zhang J, Ren Y, Du Z, Li T, Wang T, et al. Irisin reverses intestinal epithelial barrier dysfunction during intestinal injury via binding to the integrin α V β 5 receptor. *J Cell Mol Med.* 2020; 24 (1): 996–1009.
27. Drewlo S, Johnson E, Kilburn BA, Kadam L, Armistead B, Kohan-Ghadr H-R. Irisin induces trophoblast differentiation via AMPK activation in the human placenta. *J Cell Physiol.* 2020; 235 (10): 7146–58.
28. Slate-Romano JJ, Yano N, Zhao TC. Irisin reduces inflammatory signaling pathways in inflammation-mediated metabolic syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2022; 552: 111676.
29. Pescador N, Villar D, Cifuentes D, Garcia-Rocha M, Ortiz-Barahona A, Vazquez S, et al. Hypoxia promotes glycogen accumulation through hypoxia inducible factor (HIF)-mediated induction of glycogen synthase 1. *PLoS One.* 2010; 5: e9644.
30. Vucetic M, Otasevic V, Korac A, Stancic A, Jankovic A, Markelic M, et al. Interscapular brown adipose tissue metabolic reprogramming during cold acclimation: Interplay of HIF-1 α and AMPK α . *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — General Subjects.* 2011; 1810 (12): 1252–61.
31. Xu Y, Alfaro-Magallanes VM, Babitt JL. Physiological and pathophysiological mechanisms of hepcidin regulation: clinical implications for iron disorders. *Br J Haematol.* 2021; 193 (5): 882–93.
32. Kawabata H. Transferrin and transferrin receptors update. *Free Radic Biol Med.* 2019; 133: 46–54.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ПОГОДНО-КЛИМАТИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ В АРКТИКЕ ПО БИОКЛИМАТИЧЕСКИМ ИНДЕКСАМ

Р. С. Рахманов¹✉, Д. А. Нарутдинов², Е. С. Богомолова¹, С. А. Разгулин¹

¹ Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

² Медицинская служба войсковой части 73633, Красноярск, Россия

Влияние на здоровье погодных-климатических условий определяют по одно- или многопараметрическим биоклиматическим индексам. Целью работы было провести сравнительную оценку риска для здоровья на открытой территории в Арктике по биоклиматическим индексам. По данным метеорологического центра "Среднесибирское управление по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды" (г. Красноярск) за 2010–2022 гг. на мысе Челюскин оценили температуру, интегральный показатель условий охлаждения организма (ИПУОО), ветро-холодовой индекс (ВХИ), эффективную (ЭТ) и эквивалентно-эффективную температуры (ЭЭТ), интегральный индекс теплового комфорта (УТСИ). Определено, что температура ВХИ может характеризовать степень холодного риска, установленную по ИПУОО. Периоду критического холодного риска по ИПУОО (ноябрь–апрель) соответствует риск по ВХИ, оцениваемый как «дискомфорт» (прохлада) и «очень холодно», по УТСИ — «экстремальный стресс»; по ЭТ — «осторожно — обморожение открытых участков кожи» (более короткий); по ЭЭТ — «угроза обморожения» (более длительный). ИПУОО и УТСИ указывают на круглогодичный риск холодной травмы в условиях мыса Челюскин: по ИПУОО — умеренный (4–6 месяцев) и критический (4–6 месяцев), по УТСИ очень сильный (4 месяца), а также очень сильный и экстремальный (8 месяцев). Доказано преимущество использования УТСИ для оценки холодного риска для здоровья. Актуализируется вопрос нормирования гигиенических требований к режиму работ на открытой территории или в неотапливаемых помещениях в холодный период года.

Ключевые слова: мыс Челюскин, биоклиматические индексы, риск холодной травмы

Вклад авторов: Р. С. Рахманов — разработка дизайна и концепции исследования, написание статьи; Е. С. Богомолова — редактирование, утверждение окончательного варианта статьи; Д. А. Нарутдинов — сбор материала, участие в статистической обработке материала; С. А. Разгулин — подбор литературных данных, участие в статистической обработке материала.

✉ **Для корреспонденции:** Рофаиль Сальхович Рахманов
пл. Минина и Пожарского, д. 10/1, г. Нижний Новгород, Россия; raf53@mail.ru

Статья получена: 31.10.2022 **Статья принята к печати:** 08.12.2022 **Опубликована онлайн:** 22.12.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.041

COMPARATIVE ASSESSMENT OF THE IMPACT OF WEATHER AND CLIMATE CONDITIONS IN THE ARCTIC REGION BY BIOCLIMATIC INDICES

Rakhmanov RS¹✉, Narutdinov DA², Bogomolova ES¹, Razgulin SA¹

¹ Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia

² Medical service of military unit 73633, Krasnoyarsk, Russia

There are single and multi parameter bioclimatic indices that enable assessment of the impact of weather and climatic conditions on health of a human being. This study aimed to comparatively assess health risks in the Arctic's open area using the bioclimatic indices. Relying on the data from the Central Siberian Department for Hydrometeorology and Environmental Monitoring (Krasnoyarsk) that describe the weather on Cape Chelyuskin in 2010–2022, we assessed the temperature, the integral indicator of body cooling conditions (IIBCC), the wind chill factor (WCF), the effective (ET) and the net effective temperature (NET), and the universal thermal climate index (UTCI). It was found that the WCF temperature can characterize the degree of frost risk as established by the IIBCC: the indicator has the critical frost risk period lasting November through April, and the respective risk level by WCF is "discomfort" (coolness) and "very cold", that by UTCI — "extreme stress", by ET — "caution — frostbite of exposed skin" (shorter), by NET — "threat of frostbite" (longer). The IIBCC and the UTCI show that the risk of cold injury in the conditions of Cape Chelyuskin is year-round: according to the IIBCC, its level changes between moderate (4–6 months) and critical (4–6 months), and according to UTCI, it may be very strong (4 months), and very strong and extreme (8 months). We have proven the advantages of UTCI over other integral indicators in assessment of the cold-related health risk and updated the basis for the hygienic requirements regulating practice of work in the open or in unheated enclosed spaces during the cold season.

Keywords: Cape Chelyuskin, bioclimatic indices, cold injury risk

Author contribution: RS Rakhmanov — study design and concept, article authoring; ES Bogomolova — editing, approval of the final version of the article; DA Narutdinov — collection of the material, participation in its statistical processing; SA Razgulin — selection of the reference data sources, participation in the statistical processing of the material.

✉ **Correspondence should be addressed:** Rofail Salykhovich Rakhmanov
ploschad Minina i Pozharskogo, 10/1, Nizhny Novgorod, Russia; raf53@mail.ru

Received: 31.10.2022 **Accepted:** 08.12.2022 **Published online:** 22.12.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.041

Метеорологические факторы внешней среды могут оказывать на человека патологическое, саногенное, устойчивое и неустойчивое, непосредственное и косвенное воздействие [1–3]. Поэтому для определения их значимости на здоровье человека используют оценку одного фактора или многокомпонентных физических величин (выраженных в биоклиматических индексах), позволяющих установить риск для здоровья по заболеваемости, смертности населения, травматизму,

а также по метеорологическим ощущениям в зонах комфорта и дискомфорта и экстремальных условий [4–9].

Исследования ряда авторов доказывают, что факторами влияния на безопасность (или риск обморожения) при работе на открытой территории (ОТ) в жестких погодных условиях являются температура воздуха и скорость ветра [10–12].

Вместе с тем, роль влажности воздуха или радиационной температуры в обеспечении безопасности нахождения

на ОТ также существенна. Например, при экстремально низких температурах воздуха, высокой скорости ветра и высокой влажности происходит утрата теплозащитных свойств одежды, что резко повышает риск для здоровья человека [13, 14]. Радиационная температура (средняя температура излучения, включая потоки коротковолнового и длинноволнового излучения атмосферы) — одна из ведущих составляющих определения теплообмена человека с окружающей средой [15–16].

Цель работы — провести сравнительную оценку погодно-климатических условий в Арктике по биоклиматическим индексам при различных сочетаниях температуры, радиационной температуры, влажности воздуха и скорости его движения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на примере погодно-климатических условий на мысе Челюскин (77.717,104.300). Провели расчеты среднесуточных месячных показателей на ОТ по сведениям регистрации состояния ежедневных физических факторов (температуры, относительной влажности воздуха, скорости его движения (ветра)), которые получили из Среднесибирского управления по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды за 2010–2020 гг.:

- температуры;
- двухпараметрических (температура в сочетании со скоростью ветра): интегральный показатель условий охлаждения организма (ИПУОО), ветро-холодовой индекс (ВХИ);
- трехпараметрических (включая относительную влажность воздуха) — эквивалентно-эффективная температура по А. Миссенарду (ЭЭТ), эффективная температура (ЭТ) по Стедману (Robert Steadman);
- четырехпараметрических (включая радиационную температуру) — универсальный индекс теплового комфорта UTCI.

Расчет ИПУОО (баллы) проводили согласно нормативным документам (МР 2.2.7.2129-06). Критерии риска для здоровья: ≤ 34 — риск отсутствует; $34 - \leq 47$ — риск умеренный; $47 - \leq 57$ — риск критический; 57 — риск катастрофический. ИПУОО позволяет устанавливать время работы на открытой территории без ущерба здоровью, например, при умеренном риске продолжительность безопасного пребывания на холоде, не более 60 мин; при критическом — не более 1 мин; при катастрофическом — не более 0,5 мин.

ВХИ (°C) определяет время переохлаждения (без обморожения) обнаженных частей тела человека в холодных средах. Холодной считается среда при температуре $+10$ °C и ниже. Риск для здоровья по ВХИ определяется так: от -10 до -24 °C — дискомфорт, прохлада; от -25 до -34 °C — очень холодно, переохлаждение поверхности кожи; от -35 до $+59$ °C — чрезвычайно холодно, обнаженные части тела человека могут переохладиться за 10 мин и от -60 °C и холоднее — экстремально холодно, обнаженные части тела человека могут переохладиться за 2 мин.

ЭЭТ (°C) позволяет оценивать зоны термического комфорта/дискомфорта: от -24 °C и ниже (угроза обморожения); от -18 °C до -24 °C включительно (очень холодно); от -12 °C до -18 °C включительно (холодно); от -6 °C до -12 °C включительно (умеренно холодно); от -6 °C до 0 °C включительно (очень прохладно); от 0 °C до $+6$ °C (умеренно прохладно) [17, 18].

Эффективную температуру (ЭТ, °C) рассчитывали по Стедману (R. Steadman). Минусовые температуры свидетельствуют о вероятности обморожения (ниже -50 °C — возможно менее чем через 5 мин; от -38 °C до -50 °C — возможно через 10–15 мин; от -28 °C до -38 °C — возможно через 20–30 мин). В диапазоне температур от -28 °C до -27 °C опасности для одетого человека нет [19].

Холодовой риск для здоровья по UTCI оценивали по степеням стресса: слабый (от 0 до $+9,0$ °C), умеренный (от -13 до 0 °C), сильный (от -27 до -13 °C), очень сильный (от -40 до -27 °C), экстремальный (ниже -40 °C) [15, 20], нет теплового стресса (от $+9,0$ до $+18,0$ °C). Расчет UTCI проводили с помощью компьютерной программы BioKlima 2.6 [21].

Для расчетов показателей необходимо было определять среднесуточную месячную скорость ветра по шкале Бофорта (силу от 0 до 12 баллов) и среднесуточную месячную относительную влажность воздуха: сухой (55,0% и ниже), умеренно сухой (56,0–70,0%), умеренно влажный (71,0–85,0%) и сильно влажный (85,0% и более) [22, 23].

Статистическую оценку базы данных проводили на ПЭВМ с использованием программного пакета Statistica 6.1 (StatSoft; США). Определяли средние величины и ошибки средних ($M \pm m$), применяли параметрический *t*-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Воздух в декабре–апреле (5 месяцев) был умеренно влажным, в мае–октябре (6 месяцев) — сильно влажным. В ноябре влажность воздуха колебалась в пределах критериев оценки от «умеренная» до «сильно влажная» (табл. 1). Обращало на себя внимание превышение относительной влажности в мае относительно данных апреля ($p = 0,001$) и в октябре относительно ноября ($p = 0,001$). Максимальное увеличение относительной влажности было отмечено в июле, после чего она начинала уменьшаться.

Ветер имел силу 4 балла (как умеренный) во все месяцы года. Статистически достоверно значимых различий по месяцам года не было определено.

По среднемесячным температурам погодные условия в Арктике круглогодично оценивались как «холодная среда». Температура на открытой территории имела положительные значения только в июле и августе, в июне и сентябре колебалась в пределах положительных–отрицательных (табл. 2).

При расчетах температур, учитывающих комплексное влияние различных физических факторов, оказалось, что все они были ниже значений температуры на ОТ.

Характерным для всех биоклиматических индексов было уменьшение разницы между значением температур от января к августу, затем вновь рост к январю (табл. 3). Вторая особенность заключалась в динамике разниц значений ВХИ и ЭТ с температурой на ОТ. Если первые можно охарактеризовать как «уменьшение–рост», то динамика вторых относительно первых колеблется. Так, в январе–апреле значения температур были более высокими, чем первые, в мае и октябре — были равными, а в июне–сентябре — ниже.

По критериям риска для здоровья получены следующие данные: ИПУОО свидетельствовал о круглогодичном риске обморожения открытых областей тела человека; значения ИПУОО в апреле и в ноябре находились на

Таблица 1. Среднемесячные показатели скорости ветра и относительной влажности на мысе Челюскин

Месяц года	Оцениваемые показатели, М ± m	
	Относительная влажность воздуха, %	Скорость ветра, м/с
Январь	81,1 ± 0,5	6,4 ± 0,5
Февраль	81,6 ± 0,4	6,5 ± 0,4
Март	81,6 ± 0,4	5,9 ± 0,4
Апрель	81,5 ± 0,5	5,8 ± 0,3
Май	88,5 ± 0,7	5,7 ± 0,2
Июнь	89,2 ± 0,9	5,8 ± 0,2
Июль	90,5 ± 0,9	6,1 ± 0,2
Август	89,6 ± 1,0	5,9 ± 0,3
Сентябрь	88,5 ± 0,6	6,0 ± 0,3
Октябрь	85,1 ± 0,6	6,2 ± 0,3
Ноябрь	81,1 ± 0,3	6,4 ± 0,4
Декабрь	82,1 ± 0,3	5,8 ± 0,3

верхней границе значения «умеренный риск» (табл. 4); по ВХИ риск переохлаждения возможен в течение 8 месяцев в году; наиболее суровый период, оцениваемый как «чрезвычайно холодно», длился 2–4 месяца; ЭТ указывала на угрозу обморожения в зимние месяцы и в марте; на риск обморожения в течение 8 месяцев указывала и ЭЭТ; UTCI так же, как и ИПУОО, указывал на круглогодичный холодовой риск для здоровья.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно нормативным документам, температура на открытой территории определяет длительность теплового и холодного периодов года, режимы работ на открытой территории, условия менеджмента работ в холодной среде, влияет на энергетические затраты организма и потребности в белках, жирах и углеводах, заболеваемость [13]. Экстремальные погодные условия, в том числе волны температурного холода, оказывают влияние на заболеваемость, психическое здоровье и смертность населения [24–26].

Есть мнение, что для оценки биоклиматического влияния погоды на организм в условиях холода наиболее предпочтительно использовать ИПУОО и ВХИ [27]. При построении регрессионных моделей оценки риска обморожения по показателям температуры, скорости ветра и влажности воздуха при работах на ОТ определено,

что основными являются температура и скорость ветра [10]. Вероятно, поэтому для практического применения и рекомендованы ИПУОО и ВХИ.

Вместе с тем, «холодовые индексы» не дают возможность определять степень биоклиматической комфортности среды обитания. Для этого можно использовать такие биоклиматические индексы, как ЭТ и ЭЭТ [17, 18].

Наши данные показывают, что влажность воздуха все же имеет значение при оценке суровости погоды: на примере определения ЭТ установлена зависимость от нее результирующего показателя. К примеру, при умеренно влажном воздухе ЭТ была выше, чем температура по ВХИ, а при повышении влажности, наоборот — ниже. Показатель ЭЭТ, тоже учитывающий влажность воздуха, показывает температуры более низкие, чем температура по ВХИ: только в январе разница температур составляла 6,8 °С, в остальные месяцы разница колебалась от 10,4 °С до 11,7 °С.

Однако все три показателя (ВХИ, ЭТ и ЭЭТ) дали разнозначные оценки влияния на здоровье погодных условий на ОТ. Так, по ВХИ 8 месяцев в году создаются условия от дискомфорта до ощущения «чрезвычайно холодно», а 4 месяца в году риск отсутствует. Это показатель рекомендован для менеджмента условий труда, в том числе на ОТ в условиях холодной среды при температуре ниже +10 °С. Но эти условия уже сами

Таблица 2. Годовые показатели температуры на открытой территории и биоклиматических индексов

Месяц года	Критерии оценки					
	T, °С	ИПУОО, балл	ВХИ, °С	ЭТ, °С	ЭЭТ, °С	UTCI, °С
Январь	-26,0 ± 1,1	50,8 ± 0,8	-38,9 ± 1,7	-34,5 ± 0,4	-45,7 ± 1,3	-48,8 ± 1,4
Февраль	-24,5 ± 1,0	50,2 ± 0,7	-37,0 ± 2,1	-33,1 ± 0,3	-49,2 ± 1,1	-49,7 ± 1,3
Март	-22,9 ± 1,2	49,1 ± 0,8	-34,5 ± 2,3	-31,0 ± 0,3	-46,1 ± 1,2	-46,7 ± 0,9
Апрель	-16,3 ± 0,4	45,9 ± 0,4	-26,0 ± 2,0	-24,1 ± 0,4	-37,3 ± 0,9	-41,0 ± 1,1
Май	-8,0 ± 0,5	42,0 ± 0,4	-15,4 ± 2,8	-15,2 ± 0,4	-26,9 ± 0,6	-32,0 ± 0,6
Июнь	-0,3 ± 0,2	38,5 ± 0,2	-5,8 ± 2,5	-6,8 ± 0,4	-16,5 ± 0,5	-23,1 ± 0,8
Июль	1,4 ± 0,2	37,9 ± 0,2	-3,7 ± 2,5	-5,0 ± 0,4	-14,5 ± 0,3	-21,7 ± 0,6
Август	2,1 ± 0,4	37,4 ± 0,4	-2,8 ± 2,0	-4,1 ± 0,4	-13,2 ± 0,5	-20,2 ± 0,7
Сентябрь	-0,05 ± 0,4	38,5 ± 0,4	-5,5 ± 2,0	-6,6 ± 0,4	-16,1 ± 0,7	-23,1 ± 1,1
Октябрь	-6,8 ± 0,6	41,8 ± 0,5	-14,3 ± 2,2	-14,3 ± 0,4	-25,4 ± 0,9	-32,3 ± 1,2
Ноябрь	-17,0 ± 0,8	45,9 ± 0,6	-27,1 ± 1,9	-25,0 ± 0,4	-38,4 ± 1,1	-42,0 ± 1,3
Декабрь	-22,3 ± 0,7	48,7 ± 0,5	-33,6 ± 2,3	-30,3 ± 0,4	-45,3 ± 0,7	-45,8 ± 0,9

Таблица 3. Отклонения температур по биоклиматическим индексам относительно температуры на открытой территории

Месяц года	Абсолютные значения отклонений биоклиматических температур			
	ВХИ, °С	ЭТ, °С	ЭЭТ, °С	UTCI, °С
Январь	-12,9	-8,5	-19,7	-22,8
Февраль	-12,3	-8,4	-24,7	-25,0
Март	-11,6	-8,1	-23,2	-23,8
Апрель	-9,7	-7,8	-21,0	-24,7
Май	-7,4	-7,2	-18,9	-24,0
Июнь	-5,5	-6,5	-16,2	-22,8
Июль	-2,3	-3,6	-13,1	-20,3
Август	-0,7	-2,0	-11,1	-18,1
Сентябрь	-5,5	-6,6	-16,1	-23,1
Октябрь	-7,5	-7,5	-18,6	-25,5
Ноябрь	-10,1	-8,0	-21,4	-25,0
Декабрь	-11,3	-8,0	-23,0	-23,5

по себе дискомфортны, что определяет необходимость использования средств защиты от холода.

По критерию ЭТ по Стедману риск холодовой травмы определен только в течение 4 месяцев в году. Учитывая, что диапазон зоны комфорта по ЭТ составляет 17,2–21,7 °С [28], можно полагать, что остальной период года при температурах от -4,1 до -25,0 °С тоже не комфортен для человека: эти условия могут привести к охлаждению организма.

ЭЭТ по А. Миссенарду показывает как на более длительный период, так и более суровые условия на объекте наблюдения: они регистрируются в течение 8 месяцев, хотя в остальные 4 месяца также холодно.

Охлаждение лежит в основе патогенеза влияния холода, изменения могут иметь как функциональный, так и патологический характер. Компенсаторная реакция на локальное охлаждение вызывает рефлекторные сдвиги в работе сердечно-сосудистой, дыхательной, эндокринной систем разной силы (больше лица, чем рук). Влияние на лицо, органы дыхания приводит к сокращению артериальных сосудов (в циркуляторной системе конечностей, а также в коронарных сосудах), результатом чего является повышение кровяного давления. При хроническом действии холода нарушается двигательная активность, координация и способность выполнять точные

операции; усиливаются тормозные процессы в коре головного мозга, может развиваться «синдром полярной гипоксии», «хронический гипоксический синдром», или «холодовая гипоксия», основанные на недостаточности функции дыхания и образовании дефицита кислорода в организме [11, 12, 23, 29–31]. Холод провоцирует нарушение метаболизма нутриентов, что повышает риск возникновения заболеваний и расстройств [14].

Два биоклиматических индекса (ИПУОО и UTCI) указали на круглогодичный холодовой риск (возможность обморожения открытых областей тела). Но первый биоклиматический индекс, с одной стороны, не показывает значение эквивалентной температуры, определенной по температуре и скорости ветра. Для этого используют таблицу приложения 6 МР 2.2.7.2129-06, утвержденных Главным санитарным врачом Российской Федерации. Однако в ней достаточно широкий размах значений эквивалентных температур, что затрудняет установление конкретных величин. С другой стороны, он не учитывает влияние влажности воздуха и радиационной температуры. По нашим данным можно полагать, что она соответствует значениям эквивалентных температур, определенных по формуле ВХИ.

Интегральный показатель температурного комфорта показал наиболее низкие значения эквивалентных

Таблица 4. Отклонения температур по биоклиматическим индексам относительно температуры на открытой территории

№ п/п	Индекс	Вид риска	Месяцы года/число месяцев
1	ИПУОО	Умеренный	IV–XI (8–6)
		Критический	XII–III (4–6)
2	ВХИ	отсутствует	VI–IX (4)
		Дискомфорт, прохлада	V, X (2)
		Очень прохладно	III–IV, XI–XII (4–2)
		Чрезвычайно холодно	I–II (2–4)
3	ЭТ	Отсутствует	IV–XI (8)
		Осторожно — обморожение открытых участков кожи возможно через 20–30 мин	XII–III (4)
4	ЭЭТ	Холодно	VI–IX (4)
		Очень холодно	Нет
		Угроза обморожения	X–V (8)
5	UTCI	Сильный	VI–IX (4)
		Очень сильный	V, X (2)
		Экстремальный	XI–IV (6)

температур, а также наличие более длительного сурового периода обитания на мысе Челюскин. Относительно температуры по ВХИ разница достигала следующих величин: минимальная — 9,9 °С (январь), максимальная — 18,0 °С (июль и октябрь). В целом среднегодовая температура по ВХИ была ниже, чем по UTCI в 2,1 раза: $-20,4 \pm 4,0$ °С против $-42,8 \pm 3,3$ °С ($p = 0,008$).

Интересным выглядело то, что значения температур по UTCI и ЭЭТ по А. Миссенарду в декабре–марте были практически равными.

Таким образом, на примере мыса Челюскин показано преимущество использования UTCI для оценки холодового риска для здоровья человека, что может быть использовано для прогнозирования риска в различных по суровости погодно-климатических условиях. Кроме того, наши данные получены при оценке средних физических показателей на ОТ. При комбинированном влиянии максимальной/минимальной влажности воздуха и крайних значений (в данном случае — минимальной температуры, максимального ветра) и радиационной температуры эффект негативного влияния на организм будет значительно более выраженным. Вероятно, необходимо оценивать влияние погодных факторов по крайним

(неблагоприятным) показателям, на что указывают и другие авторы [32].

Исследование актуализирует решение вопроса о нормировании гигиенических требований к режиму работ на открытой территории или в неотопляемых помещениях в холодный период года.

ВЫВОДЫ

Температура, определенная по формуле ВХИ (в градусах Цельсия), может характеризовать степень холодового риска, установленную по ИПУОО в баллах. Периоду критического холодового риска по ИПУОО (ноябрь–апрель) соответствует риск по ВХИ, оцениваемый как «дискомфорт (прохлада)» и «очень холодно», по UTCI — «экстремальный стресс»; по ЭТ — «осторожно, обморожение открытых участков кожи» (более короткий); по ЭЭТ — «угроза обморожения» (более длительный). ИПУОО и UTCI указывают на круглогодичный риск холодовой травмы в условиях мыса Челюскин: по УПОО — умеренный (4–6 месяцев) и критический (4–6 месяцев), по UCI — очень сильный (4 месяца), а также очень сильный и экстремальный (8 месяцев).

Литература

1. Веремчук Л. В., Челнокова Б. И. Влияние природно-экологических условий на качество среды обитания человека в Приморском крае. Здоровье населения и среда обитания. 2013; 2 (239): 4–6.
2. Уянаева А. И., Тулицына Ю. Ю., Рассулова М. А., Турова Е. А., Львова Н. В., Айрапетова Н. С. Влияние климата и погоды на механизмы формирования повышенной метеочувствительности. Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. 2016; 93 (5): 52–57.
3. Григорьева Е. А., Христофорова Н. К. Биоклимат Дальнего Востока России и здоровье населения. Экология человека. 2019; 5: 4–10. DOI: 10.33396 / 1728-0869-2019-5-4-10.
4. Ревич Б. А., Шапошников Д. А. Особенности воздействия волн холода и жары на смертность в городах с резко-континентальным климатом. Сибирское медицинское обозрение. 2017; (2): 84–90. DOI: 10.20333/2500136-2017-2-84-90.
5. Шапошников Д. А., Ревич Б. А. О некоторых подходах к вычислению рисков температурных волн для здоровья. Анализ риска здоровью. 2018; 1: 22–31. DOI: 10.21668/health.risk/2018.1.03.
6. Шатрова Н. В., Шапошников Д. А., Константинов П. И., Ревич Б. А. Определение порогов температурно-зависимой смертности на основе универсального индекса теплового комфорта – UTCI. Анализ риска здоровью. 2019; 3: 83–93. DOI: 10.21668/health.risk/2019.3.10.
7. Кнауф Р. В., Игнатьева А. В. Оценка энергетических последствий заболеваемости и смертности людей от климатических изменений на территории Томской области России. Современные исследования социальных проблем. 2015; 4 (48): 466–87.
8. Синицын И. С., Георгица И. М., Иванова Т. Г. Биоклиматическая характеристика территории в медико-географических целях. Ярославский педагогический вестник. 2013; 3 (4): 279–83.
9. Черных Д. А., Тасейко О. В. Оценка риска от температурных волн, влияющих на повышение уровня смертности населения г. Красноярск. Экология человека. 2018; 2: 3–8.
10. Шипко Ю. В., Шувакин Е. В., Шуваев М. А. Регрессионные модели оценки безопасности работ персонала на открытой территории в жестких погодных условиях. Воздушно-космические силы. Теория и практика. 2017; 1: 131–40.
11. Wenz J. What Is Wind Chill, and How Does It Affect the Human Body? Smithsonian Magazine. 2019; 30. Available from: <https://www.smithsonianmag.com/science-nature/what-wind-chill-and-how-does-it-affect-human-body-180971376>.
12. Vankov A. Explainer: What is Wind Chill? What are Its Effects? Posted on January 31, 2019. Available from: <https://www.profolus.com/topics/explainer-what-is-wind-chill-what-are-its-effects>.
13. Чашин В. П., А. Б. Гудков А. Б., Чашин М. В. и др. Предиктивная оценка индивидуальной восприимчивости организма человека к опасному воздействию холода. Экология человека. 2017; 5: 3–13.
14. Полякова Е. М., Мельцер А. В. Сравнительный анализ состояния здоровья работников, выполняющих трудовые операции на открытой территории в холодный период года, по результатам анкетирования. Профилактическая медицина. 2019; 4 (73): 35–44.
15. Fiala D, Havenith G, Brode P, Kampmann B, Jendritzky G. UTCI-Fiala multi-node model of human heat transfer and temperature regulation. Int J Biometeorol. 2012; 56 (3): 429–41.
16. Potchter O, Cohen P, Lin T-P, Matzarakis A, Total S. Environ Outdoor human thermal perception in various climates: A comprehensive review of approaches, methods and quantification. 2018; 631–2: 390–406. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.02.276. Epub 2018 Mar 16.
17. Ткачук С. В. Обзор индексов степени комфортности погодных условий и их связь с показателями смертности. Труды гидрометеорологического научно-исследовательского центра РФ. 2012; 347: 223–45.
18. Латышева И. В., Лощенко К. А., Потемкин В. Л., Потемкина Т. Г., Астафьева Н. В. Интегральные биоклиматологические показатели в исследованиях климата Иркутской области за период 1970–2010 гг. Междисциплинарный научный и прикладной журнал «Биосфера». 2014; 6 (3): 265–74.
19. Карандеев Д. Ю. Эффективная температура как фактор, влияющий на электропотребление города. Современная техника и технологии. 2015; 2. Available from (дата обращения: 01.11.2022): <http://technology.snauka.ru/2015/02/5728>.
20. Di Napoli C, Pappenberger F, Hannah LC. Assessing heat-related health risk in Europe via the Universal Thermal Climate Index (UTCI). Int J Biometeorol. 2018; 62 (7): 1155–65.

21. BioKlima 2.6, software package. Available from: www.igipz.pan.pl/geoekoklimat/blaz/bioklima.htm.
22. Monmonier M. Defining the Wind: The Beaufort Scale, and How a 19th Century Admiral Turned Science into Poetry. Published online: 29 Feb 2008. Pages 474–5. DOI: https://doi.org/10.1111/j.0033-0124.2005.493_1.x.
23. Аленикова А. Э., Теписова Е. В. Анализ изменений гормонального профиля мужчин г. Архангельска в зависимости от факторов погоды. Вестник Северного (Арктического) федерального университета. Серия: Медико-биологические науки. 2014; 3: 5–15.
24. Pascal M. [Adaptation to extreme weather event is key to protection of human health]. *Rev Mal Respir.* 2022; 39 (8): 719–25. DOI: 10.1016/j.rmr.2022.08.003. Epub 2022 Sep 8.
25. Weilhhammer V, Schmid J, Mittermeier I, Schreiber F, Jiang L, Pastuhovic V, et al. Extreme weather events in Europe and their health consequences — A systematic review. *Jnt J Hyg Environ Health.* 2021; 233: 113688. DOI: 10.1016/j.ijheh.2021.113688. Epub 2021 Jan 30.
26. Ebi KL, Vanos J, Baldwin JW, Bell JE, Hondula DM, Errett NA, et al. Extreme Weather and Climate Change: Population Health and Health System Implications. *Annu Rev Public Health.* 2021; 42: 293–315. DOI: 10.1146/annurev-publhealth-012420-105026. Epub 2021 Jan 6.
27. Шипко Ю. В., Шувакин Е. В., Иванов А. В. Обобщенный биоклиматический показатель безопасности работ на открытом воздухе в суровых погодных условиях. Вестник КВГУ, Серия: география. Геоэкология. 2015; 3: 33–39.
28. Большая медицинская энциклопедия: Эффективная температура. Available from: http://bigmeden.ru/article/Эффективная_Температура.
29. Афанасьев Р. Ф., Бурмистрова О. В., Бобров А. Ф. Холод, критерии оценки и прогнозирование риска охлаждения человека. Бюллетень ВШЦ СО РАМН. 2006; 3 (49):13–18.
30. Бочаров М. И. Терморегуляция организма при холодных воздействиях (обзор). Сообщение 1. Вестник Северного (Арктического) федерального университета. Серия «Медико-биологические науки». 2015; 1: 5–15.
31. Бочаров М. И. Терморегуляция организма при холодных воздействиях (обзор). Сообщение II. Вестник Северного (Арктического) федерального университета. Серия «Медико-биологические науки». 2015; 2: 5–17.
32. Мاستрюков С. И., Червякова И. В. Обзор современных отечественных и зарубежных методов оценки ветрового охлаждения человека. Навигация и гидрография. 2014; 38: 83–90.

References

1. Veremchuk LV, Chelnokova BI. Vliyaniye prirodno-ehkologicheskix uslovij na kachestvo sredy obitaniya cheloveka v Primorskom krae. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya.* 2013; 2 (239): 4–6. Russian.
2. Uyanaeva AI, Tupicyna YuYu, Rassulova MA, Turova EA, Lvova NV, Ajrapetova NS. Vliyaniye klimata i pogody na mexanizmy formirovaniya povyshennoj meteochuvstvitel'nosti. *Voprosy kurtologii, fizioterapii i lechebnoj fizicheskoy kul'tury.* 2016; 93 (5): 52–57. Russian.
3. Grigoreva EA, Kristoforova NK. Bioklimat Dal'nego Vostoka Rossii i zdorov'e naseleniya. *Ehkologiya cheloveka.* 2019; 5: 4–10. DOI: 10.33396/1728-0869-2019-5-4-10. Russian.
4. Revich BA, Shaposhnikov DA. Osobennosti vozdeystviya voln xoloda i zhary na smertnost' v gorodax s rezko-kontinental'nym klimatom. *Sibirskoe medicinskoe obozrenie.* 2017; (2): 84–90. DOI: 10.20333/2500136-2017-2-84-90. Russian.
5. Shaposhnikov DA, Revich BA. O nekotoryx podkhodax k vychisleniyu riskov temperaturnyx voln dlya zdorov'ya. *Analiz riska zdorov'yu.* 2018; 1: 22–31. DOI: 10.21668/health.risk/2018.1.03. Russian.
6. Shatrova NV, Shaposhnikov DA, Konstantinov PI, Revich BA. Opredeleniye porogov temperaturno-zavisimoy smertnosti na osnove universal'nogo indeksa teplovogo komforta — UTCI. *Analiz riska zdorov'yu.* 2019; 3: 83–93. DOI: 10.21668/health.risk/2019.3.10. Russian.
7. Knaub RV, Ignateva AV. Ocenka ehnergeticheskix posledstvij zabelevaemosti i smertnosti lyudej ot klimaticheskix izmenenij na territorii Tomskoj oblasti Rossii. *Sovremennye issledovaniya social'nyx problem.* 2015; 4 (48): 466–87. Russian.
8. Sinicyan IS, Georgica IM, Ivanova TG. Bioklimaticheskaya xarakteristika territorii v mediko-geograficheskix celyax. *Yaroslavskij pedagogicheskij vestnik.* 2013; 3 (4): 279–83. Russian.
9. Chernyx DA, Tasejko OV. Ocenka riska ot temperaturnyx voln, vliyayushhix na povysheniye urovnya smertnosti naseleniya g. Krasnoyarska. *Ehkologiya cheloveka.* 2018; 2: 3–8. Russian.
10. Shipko YuV, Shuvakin EV, Shuvaev MA. Regressionnyye modeli ocenki bezopasnosti rabot personala na otkrytoj territorii v zhestkix pogodnyx usloviyax. *Vozdushno-kosmicheskie sily. Teoriya i praktika.* 2017; 1: 131–40. Russian.
11. Wenz J. What Is Wind Chill, and How Does It Affect the Human Body? *Smithsonian Magazine.* 2019; 30. Available from: <https://www.smithsonianmag.com/science-nature/what-wind-chill-and-how-does-it-affect-human-body-180971376>.
12. Vankov A. Explainer: What is Wind Chill? What are Its Effects? Posted on January 31, 2019. Available from: <https://www.profolus.com/topics/explainer-what-is-wind-chill-what-are-its-effects>.
13. Chashhin VP, Gudkov AB, Chashhin MV, i dr. Prediktivnaya ocenka individual'noj vospriimchivosti organizma cheloveka k opasnomu vozdeystviyu xoloda. *Ehkologiya cheloveka.* 2017; 5: 3–13. Russian.
14. Polyakova EM, Melcer AV. Sravnitel'nyj analiz sostoyaniya zdorov'ya rabotnikov, vypolnyayushhix trudovye operacii na otkrytoj territorii v xolodnyj period goda, po rezul'tatam anketirovaniya. *Profilakticheskaya medicina.* 2019; 4 (73): 35–44. Russian.
15. Fiala D, Havenith G, Brode P, Kampmann B, Jendritzky G. UTCI-Fiala multi-node model of human heat transfer and temperature regulation. *Int J Biometeorol.* 2012; 56 (3): 429–41.
16. Potchter O, Cohen P, Lin T-P, Matzarakis A, Total S. Environ Outdoor human thermal perception in various climates: A comprehensive review of approaches, methods and quantification. 2018; 631–2: 390–406. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.02.276. Epub 2018 Mar 16.
17. Tkachuk SV. Obzor indeksov stepeni komfortnosti pogodnyx uslovij i ix svyaz' s pokazatelyami smertnosti. *Trudy gidrometeorologicheskogo nauchno-issledovatel'skogo centra RF.* 2012; 347: 223–45. Russian.
18. Latysheva IV, Loshhenko KA, Potemkin VL, Potemkina TG, Astafeva NV. Integral'nye bioklimatologicheskije pokazateli v issledovaniyax klimata Irkutskoj oblasti za period 1970–2010 gg. *Mezhdisciplinarnyj nauchnyj i prikladnoj zhurnal «Biosfera».* 2014; 6 (3): 265–74. Russian.
19. Karandeev DYU. Ehffektivnaya temperatura kak faktor, vliyayushhij na ehlektropotrebleniye goroda. *Sovremennaya texnika i texnologii.* 2015; 2. Available from (data obrashheniya: 01.11.2022): <http://technology.snauka.ru/2015/02/5728>. Russian.
20. Di Napoli C, Pappenberger F, Hannah LC. Assessing heat-related health risk in Europe via the Universal Thermal Climate Index (UTCI). *Int J Biometeorol.* 2018; 62 (7): 1155–65.
21. BioKlima 2.6, software package. Available from: www.igipz.pan.pl/geoekoklimat/blaz/bioklima.htm.
22. Monmonier M. Defining the Wind: The Beaufort Scale, and How a 19th Century Admiral Turned Science into Poetry. Published online: 29 Feb 2008. Pages 474–5. DOI: https://doi.org/10.1111/j.0033-0124.2005.493_1.x.
23. Alenikova AEh, Tepisova EV. Analiz izmenenij hormonal'nogo profilya muzhchin g. Arxangel'ska v zavisimosti ot faktorov pogody. *Vestnik Severnogo (Arkticheskogo) federal'nogo universiteta. Seriya: Mediko-biologicheskije nauki.* 2014; 3: 5–15. Russian.
24. Pascal M. [Adaptation to extreme weather event is key to

- protection of human health]. *Rev Mal Respir.* 2022; 39 (8): 719–25. DOI: 10.1016/j.rmr.2022.08.003. Epub 2022 Sep 8.
25. Weinhammer V, Schmid J, Mittermeier I, Schreiber F, Jiang L, Pastuhovic V, et al. Extreme weather events in Europe and their health consequences — A systematic review. *Jnt J Hyg Environ Health.* 2021; 233: 113688. DOI: 10.1016/j.ijheh.2021.113688. Epub 2021 Jan 30.
 26. Ebi KL, Vanos J, Baldwin JW, Bell JE, Hondula DM, Errett NA, et al. Extreme Weather and Climate Change: Population Health and Health System Implications. *Annu Rev Public Health.* 2021; 42: 293–315. DOI: 10.1146/annurev-publhealth-012420-105026. Epub 2021 Jan 6.
 27. Shipko YuV, Shuvakin EV, Ivanov AV. Obobshhennyj bioklimaticheskij pokazatel' bezopasnosti rabot na otkrytom vozduxe v surovyyx pogodnyx usloviyax. *Vestnik KVGU, Seriya: geografiya. Geoekologiya.* 2015; 3: 33–39. Russian.
 28. Bol'shaya medicinskaya ehnciklopediya: Ehffektivnaya temperatura. Available from: http://bigmeden.ru/article/Ehffektivnaya_Temperaturatura. Russian.
 29. Afanasev RF, Burmistrova OV, Bobrov AF. Xolod, kriterii ocenki i prognozirovanie riska oxlazhdeniya cheloveka. *Byulleten' VSNC SO RAMN.* 2006; 3 (49):13–18. Russian.
 30. Bocharov MI. Termoregulyaciya organizma pri xolodovyx vozdeystviyax (obzor). Soobshhenie 1. *Vestnik Severnogo (Arkticheskogo) federal'nogo universiteta. Seriya «Mediko-biologicheskie nauki».* 2015; 1: 5–15. Russian.
 31. Bocharov MI. Termoregulyaciya organizma pri xolodovyx vozdeystviyax (obzor). Soobshhenie II. *Vestnik Severnogo (Arkticheskogo) Federal'nogo universiteta. Seriya «Mediko-biologicheskie nauki».* 2015; 2: 5–17. Russian.
 32. Mastryukov SI, Chervyakova IV. Obzor sovremennyx otechestvennyx i zarubezhnyx metodov ocenki vetrovogo oxlazhdeniya cheloveka. *Navigaciya i gidrografiya.* 2014; 38: 83–90. Russian.

SWOT-АНАЛИЗ ОРГАНИЗАЦИИ АНТИДОПИНГОВЫХ МЕРОПРИЯТИЙ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ СПОРТСМЕНОВ

А. А. Деревоедов¹, А. В. Жолинский¹, В. С. Фещенко^{1,2}, И. Т. Выходец², К. А. Стащук¹, А. А. Павлова¹✉

¹ Федеральный научно-клинический центр спортивной медицины и реабилитации Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

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

В связи с необходимостью совершенствования антидопинговой работы врачей требуется постоянный анализ и поиск путей повышения ее эффективности. Одним из таких направлений является SWOT-анализ (от англ. strengths, weaknesses, opportunities, threats), основанный на изучении внутренних проблем и ресурсов организации и влияния внешних факторов. Целью исследования было совершенствование антидопинговой работы на основе анализа сильных и слабых ее сторон с учетом внешних угроз и направлений развития. Проведен экспресс SWOT-анализ антидопинговой работы в медицинских организациях Федерального медико-биологического агентства России с составлением простой матрицы. Рассмотрены внутренние факторы, модификация которых возможна, а также внешние факторы, влияние на которые зачастую невозможно, но они должны быть приняты во внимание. Выделены наиболее значимые факторы, влияющие на организацию этого раздела работы, составлена матрица SWOT, позволяющая оценить возможные ресурсы активизации антидопинговой работы, ее сильные и слабые стороны, а также угрозы и возможности, выявленные в результате анализа среды, в которой осуществляется эта деятельность. Экспресс SWOT-анализ позволил оценить факторы, оказывающие наибольшее влияние на организацию антидопинговой работы. Основным направлением этой работы могут быть информационно-образовательные программы, включая проведение семинаров и контроль уровня знаний врачей.

Ключевые слова: противодействие допингу, спорт, SWOT-анализ, медико-биологическое обеспечение, подготовка спортсменов

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Государственного задания Федерального медико-биологического агентства России № 67.001.21.800.

Вклад авторов: А. А. Деревоедов — концепция работы, сбор, анализ литературы, написание текста; А. В. Жолинский — редактирование, утверждение окончательного варианта статьи; В. С. Фещенко, И. Т. Выходец — утверждение окончательного варианта статьи; К. А. Стащук — сбор, анализ литературы; А. А. Павлова — редактирование рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Анна Александровна Павлова
ул. Большая Дорогомиловская, д. 5, г. Москва, 121059, Россия; pavlovaaa@sportfmba.ru

Статья получена: 24.11.2022 **Статья принята к печати:** 18.12.2022 **Опубликована онлайн:**

DOI: 10.47183/mes.2022.048

SWOT ANALYSIS OF ORGANIZATION OF ANTI-DOPING MEASURES IN THE CONTEXT OF MEDICAL AND BIOLOGICAL SUPPORT OF ATHLETES

Derevoedov AA¹, Zholinsky AV¹, Feshchenko VS^{1,2}, Vykhodets IT², Stashchuk KA¹, Pavlova AA¹ ✉

¹ Federal Research and Clinical Center of Sports Medicine and Rehabilitation of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The anti-doping efforts on the part of medics should be constantly improved, which means the exploration and analysis of ways to increase the effectiveness of such efforts should be constant. SWOT analysis (Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats) is one of such ways. It investigates internal problems and resources of an organization and the influence of external factors. This study aimed to improve the anti-doping efforts based on the analysis of their strengths and weaknesses, taking into account external threats and directions of development. We have conducted an express SWOT analysis of anti-doping work in medical organizations of the Federal Medical Biological Agency of Russia and compiled a simple matrix. The factors under consideration are internal, which can be controlled, and external, which are often uncontrollable but should be accounted for. We identified the most significant factors influencing organization of this line of work, compiled the SWOT matrix that allows assessing the possible resources for intensifying the anti-doping work, determined its strengths and weaknesses, threats and opportunities imposed by the environment in this activity takes place in. The express SWOT analysis enabled evaluation of the factors that have the greatest impact on the organization of anti-doping work. Informational and educational programs, including workshops for medics and monitoring of their level of knowledge, can be the key line of activity in the context of such efforts.

Keywords: countering doping in sports, SWOT analysis, medical and biological support, training of athletes

Funding: the study received financial support under the State Assignment No. 67.001.21.800 issued by the Federal Medical Biological Agency of Russia

Author contribution: AA Derevoedov — study concept, selection and analysis of the published research reports, article authoring; AV Zholinsky — article editing, approval of the final version thereof; VS Feshchenko, IT Vykhodets — approval of the final version of the article; KA Stashchuk — selection and analysis of the published research reports; AA Pavlova — manuscript editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Anna A. Pavlova
B. Dorogomilovskaya, 5, Moscow, 121059, Russia; pavlovaaa@sportfmba.ru

Received: 24.11.2022 **Accepted:** 18.12.2022 **Published online:**

DOI: 10.47183/mes.2022.048

В медицинских организациях Федерального медико-биологического агентства (ФМБА России) мероприятия по противодействию допингу в спорте осуществляются на постоянной основе в соответствии с требованиями нормативных документов.

С 2017 г. эти мероприятия были структурированы для создания системы, целью которой было помочь врачам при

подготовке документов для запроса на терапевтическое использование (ТИ) как основного раздела антидопинговой работы. Был разработан ряд нормативных документов [1, 2], проведены организационные мероприятия, налажен регулярный выпуск справочно-информационных и образовательных материалов, а главное — у врача появилась возможность получить необходимую помощь

на любом этапе подготовки медицинских документов для запроса на ТИ.

В ходе работы проводился постоянный анализ ее эффективности, были выявлены и устранены слабые стороны, усовершенствованы отдельные разделы. Проводился также регулярный контроль качества документов для запроса на ТИ, подготавливаемых врачами медицинских организаций ФМБА России.

В тех случаях, когда было возможно, выявленные недостатки устраняли немедленно, в остальных — были разработаны предложения для их устранения; риски нарушений антидопинговых правил спортсменом или персоналом спортсмена невозможно избежать полностью и навсегда.

С целью дальнейшего совершенствования антидопинговой работы проведен анализ сильных и слабых ее сторон, а также внешних угроз и направлений развития — SWOT-анализ (от англ. strengths, weaknesses, opportunities, threats).

Возможны различные подходы к анализу эффективности противодействия допингу в спорте медицинскими работниками. SWOT-анализ как одна из универсальных матриц позволяет не просто перечислить основные ресурсы организации и угрозы, которые формируются во внешней среде, но и сгруппировать их понятным образом как основу непрерывного эффективного планирования.

Разделив внешние факторы на те, что могут быть предсказаны и нивелированы организационными мероприятиями, и непредсказуемые угрозы, можно определить основные риски и пути их преодоления или сглаживания.

В целом, SWOT-анализ является одним из разделов комплексного подхода к совершенствованию противодействия допингу в спорте медицинскими работниками и позволяет в дальнейшем оценить динамику и отдельные сдвиги в этой работе.

Целью исследования было оценить различные аспекты деятельности организации с точки зрения эффективности противодействия допингу в спорте при проведении мероприятий медико-биологического обеспечения (МБО) спортсменов сборных команд Российской Федерации с учетом внутренних ресурсов и внешних угроз для совершенствования этой работы, а также риски, требующие постоянного мониторинга и противодействия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

SWOT — это список сильных и слабых сторон организации, на которые указывает анализ ее ресурсов, а также список угроз и возможностей, выявленных в результате анализа среды, в которой она осуществляет свою деятельность [3]. Планирование на основе этого анализа должно опираться на сильные стороны и существующие возможности, отражая угрозы и преодолевая слабые стороны (рис.).

По мнению исследователей, SWOT-анализ является одним из наиболее широко используемых инструментов стратегии среди менеджеров [4].

При его проведении могут быть сформированы различные матрицы SWOT-анализа, основная цель которого — оценка текущего состояния компании или важных направлений ее деятельности и выработка на этой основе стратегии развития и плана мероприятий, направленных на повышение эффективности работы.

Применяемый в более широком смысле метод SWOT позволяет структурировать тему в четкую матрицу и с первого взгляда различать положительные и отрицательные стороны (вместо составления списка преимуществ и недостатков) [5]. Сильные и слабые стороны характеризуют наличие или отсутствие внутренних ресурсов организации, необходимых для достижения поставленных целей, в данном случае — повышения эффективности антидопинговых мероприятий.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В соответствии со структурой SWOT-анализа были выделены и проанализированы следующие стороны антидопинговой работы.

Сильные стороны организации и проведения антидопинговых мероприятий в процессе МБО (S, от англ. strengths)

За последние годы организация антидопинговой работы медицинских специалистов в ФМБА России претерпела существенные изменения.

К сильным сторонам можно, прежде всего, отнести наличие высокопрофессиональных кадров,



Рис. Основные разделы, изучаемые в процессе SWOT-анализа

организационной структуры и документального обеспечения организации противодействия допингу.

Профессиональный кадровый состав

Специалисты, участвующие в МБО, ежедневно сталкиваются с необходимостью принимать решение о назначении субстанций, методов, БАД с учетом их антидопингового статуса. Большинство из них имеют необходимый опыт и стимул для дальнейшего совершенствования.

Наличие разработанных программ последипломного образования и программ, рассчитанных на врачей сборных команд

За последнее время были обновлены разделы программ последипломного образования, касающиеся вопросов противодействия допингу. Разработана программа для врачей сборных команд страны, направленная на помощь врачам в организации основных разделов антидопинговой работы.

Наличие нормативных документов Минздрава России, ФМБА России и ФГБУ ФНКЦСМ ФМБА России по вопросам борьбы с допингом

С 2018 г. были обновлены основные нормативные документы Минздрава России, регламентирующие оказание медицинской помощи спортсменам различного уровня. Приказами ФМБА России и ФГБУ ФНКЦСМ ФМБА России структурирована вся система противодействия допингу в медицинских организациях ФМБА России [1, 2].

Наличие лиц, ответственных за противодействие допингу в медицинских организациях ФМБА России

В соответствии с приказом ФМБА России от 05 апреля 2016 г. № 49 во всех медицинских организациях определены лица, ответственные за противодействие допингу, а также их права и обязанности и порядок взаимодействия с другими участниками процесса [6].

Организация и развитие системы помощи врачам в вопросах противодействия допингу, активное взаимодействие в рамках системы: врач — лицо, ответственное за противодействие допингу в медицинской организации (врач спортивной сборной команды РФ) — специалист по антидопинговым мерам ФГБУ ФНКЦСМ ФМБА России.

Постоянное обновление актуальной информации по вопросам антидопинга для врачей (Комментарии к Запрещенному списку [7], Разрешенный список [8], переводы статей по вопросам борьбы с допингом).

С 2018 г. выходят два основных документа в помощь врачам: «Комментарий к Запрещенному списку» и «Разрешенный список». Кроме того, происходит регулярный перевод и передача врачам актуальных статей и материалов с сайтов антидопинговых организаций и медицинских журналов.

Слабые стороны (W, от англ. weaknesses)

Слабые стороны отражают, как правило, проблемы и недостатки в проведении работы в самой организации и

определяют в большой степени пути совершенствования работы. Можно условно выделить основные блоки этого раздела: устаревшую документацию, кадровые проблемы, поведенческие (психологические) проблемы. В настоящее время можно выделить ряд слабых сторон антидопинговой работы.

Устаревшая нормативная документация

Требует переработки ряд нормативных документов в связи с тем, что они были приняты более 5 лет назад, в то время как изменения антидопинговых документов происходят практически ежегодно [6]. Не все эти изменения требуют отражения в нормативных документах, но часть из них необходимо учитывать при организации работы.

Отсутствие раздела антидопинга во ФГИС МИАС

Медицинскую информационно-аналитическую систему по «Функционированию и ведению электронного регистра состояния здоровья спортсменов сборных команд Российской Федерации» (ФГИС МИАС) разрабатывали без учета антидопинговой работы. Систематизация этой информации в базе данных могла бы оказать существенную поддержку организации противодействия допингу. Были разработаны предложения по внесению дополнений и изменений в сервисы АРМ «Врач по спортивной медицине» во ФГИС МИАС.

Отсутствие информации о ТИ в амбулаторных картах

Стандартная медицинская документация не содержит разделов, отражающих противодействие допингу, и прежде всего — оформление медицинских документов для запроса на ТИ. Ее анализ не позволяет оценить качество этой работы.

Кадры

- 1) *текучесть кадров, обновляющийся состав врачей.* Вновь пришедшие специалисты с опытом работы в других разделах медицины, как правило, не сталкивались ранее с проблемами допинга, прежде всего — ТИ. Требуется проведение соответствующих образовательных мероприятий с последующим контролем знаний;
- 2) *приход врачей сразу после окончания вуза, без опыта работы и базовых знаний.* Ситуация, схожая с той, что изложена в предыдущем пункте, хотя у молодых врачей есть шанс получить знания в рамках разработанных циклов по антидопингу для врачей различных специальностей. В любом случае, опыта такой работы у молодых специалистов нет;
- 3) *длительные командировки врачей сборных команд страны, выпадающих из образовательных мероприятий.* Врачи сборных команд могут проводить на сборах большую часть года, не участвуя при этом в образовательных и тестовых мероприятиях. Повышается значение, с одной стороны, печатных и электронных материалов по антидопинговой тематике, а с другой — возможности получить необходимую консультацию в удаленном формате;
- 4) *врач не отслеживает судьбу запроса, в котором принимал участие.* Сопровождение запроса до момента принятия решения антидопинговой организацией является важным ресурсом для совершенствования антидопинговой работы врачей и образовательных мероприятий.

Психологические проблемы

Допинг и вопросы с ним связанные врачи зачастую воспринимают как нечто вторичное, необязательное, мешающее их основной работе. Среди проблем такого рода можно выделить следующие:

1) *незаинтересованность врачей в повышении уровня знаний о противодействии допингу, поверхностное отношение к теме антидопинга.* Только когда эта тема касается непосредственно врача, он начинает искать информацию и пополнять свои знания. Такой подход грозит принятием непрофессиональных решений и повышает риск возможных санкций со стороны антидопинговых организаций.

2) *непонимание медицинскими работниками рисков, связанных с возможными нарушениями антидопинговых правил.* В силу плохой осведомленности существует недооценка рисков (а иногда, наоборот, паническое избегание проблемы), что может быть также связано с неумением и нежеланием использовать справочные программы, с обращением за консультациями к коллегам и тренерам, а не к документам или лицам, ответственным за противодействие допингу в медицинской организации. Ситуация постоянно меняется, все больше врачей приходят к пониманию необходимости повышения знаний в вопросах антидопинга, однако риски остаются.

3) *устоявшееся мнение о том, что за все отвечает спортсмен.* Несмотря на то, что антидопинговые документы и российское законодательство существенно повысили за последнее время ответственность врача за нарушения антидопинговых правил, все еще преобладает точка зрения, что за все нарушения несет ответственность исключительно спортсмен.

4) *увлечение биологически активными добавками (БАД).* У ряда медицинских работников сложилась зависимость от модных, разрекламированных и широко применяемых, но далеко не всегда эффективных БАД. Не учитываются при этом риски, связанные со слабым контролем за их составом и возможными фальсификациями БАД.

5) *слабое знание английского языка врачами.* Это серьезная проблема, ограничивающая возможность работы с профессиональной литературой, наиболее часто издающейся на английском языке. Она является не только психологической, но и структурной, требующей решения на уровне образовательных учреждений.

Возможности, перспективы (О, от англ. opportunities)

Возможности отражают динамику внешних условий и их влияние на организацию работы. В ряде случаев возможности могут переходить в разряд угроз и наоборот в зависимости от ситуации и наличия необходимых ресурсов для их использования или противодействия им.

Внешние влияния, которые могли бы быть использованы в процессе совершенствования антидопинговых мероприятий, касаются двух основных составляющих: документов, принимаемых антидопинговыми организациями или федеральными органами исполнительной власти, и позиции врачей (тем набором знаний и умений, которые они приобрели в процессе обучения и работы).

Совершенствование образовательных программ для врачей

Эффективное регулярное антидопинговое образование является основным условием предупреждения

нарушения антидопинговых правил и главным ресурсом противодействия допингу в медицинских организациях. В ходе реализации этих программ врач получает актуальную информацию, необходимые рекомендации и материалы по основным направлениям антидопинговой работы. Это положение отнесено к внешним влияниям, поскольку нормативные документы, регламентирующие образовательную деятельность и содержание программ, утверждаются вне профессиональной среды и требуют быстрой и эффективной адаптации.

Внесение изменений в нормативные документы

Регулярный пересмотр основных документов антидопинговых организаций (Общероссийских антидопинговых правил, Кодекса Всемирного антидопингового агентства (ВАДА), Запрещенного списка и других международных стандартов ВАДА) требуют оперативного внесения изменений в действующие ведомственные документы.

Внесение изменений во ФГИС МИАС и карту амбулаторного больного, отражающих работу по противодействию допингу в спорте

С точки зрения обучения, разбора ошибок и преимущественности при оказании медицинской помощи внесение указанных изменений является одним из ключевых. Оно позволит также вести автоматизированный учет запросов на ТИ и их анализ по различным параметрам.

Введение системы проверки антидопинговых знаний врачей на постоянной основе

Такой подход является продолжением и обязательной неотъемлемой частью образовательного процесса.

Угрозы (Т, от англ. threats)

Понятие угроз в данном случае достаточно условно, поскольку в ряде случаев при правильном подходе они могут быть и ресурсом развития организации.

В этом разделе выделены те угрозы, повлиять на которые в ходе деятельности медицинских организаций невозможно и которые требуют учета при организации работы.

Регулярное изменение документов антидопинговых организаций, требующее отражения в текущих документах, регламентирующих работу медицинского персонала

Документы антидопинговых организаций изменяются с различной частотой: Кодекс ВАДА пересматривают каждые 5 лет, Запрещенный список не реже одного раза в год, в международные стандарты изменения вносят, как правило, раз в 5 лет, но возможно и чаще, руководства ВАДА и другие документы рекомендательного характера изменяются регулярно, часто без анонса изменений. Требуется регулярный скрининг антидопинговых документов с целью не пропустить значимых изменений.

Прогрессирующий обвинительный уклон антидопингового законодательства

Как показывает опыт, каждая последующая редакция Кодекса ВАДА расширяла список нарушений антидопинговых правил,

Таблица. Матрица SWOT-анализа

	Полезные факторы (S–O)	Угрожающие факторы (W–T)
Внутренние факторы (S–W)	<p>Сильные стороны</p> <ul style="list-style-type: none"> –Профессиональный кадровый состав –Программы последилового образования и программы, рассчитанные на врачей сборных команд –Наличие нормативных документов Минздрава России, ФМБА России и ФГБУ ФНКЦСМ ФМБА России по вопросам борьбы с допингом –Система помощи врачам в вопросах противодействия допингу –Актуальная информация по вопросам антидопинга для врачей 	<p>Слабые стороны</p> <ul style="list-style-type: none"> –Текучесть кадров, обновляющийся состав врачей –Незаинтересованность врачей в повышении уровня знаний о противодействии допингу, поверхностное отношение к теме антидопинга, устоявшееся мнение о том, что за все отвечает спортсмен –Устаревшие отдельные нормативные документы –Отсутствие информации о ТИ в медицинской документации и ФГИС МИАС –Широкое назначение БАД
Внешние факторы (O–T)	<p>Возможности</p> <ul style="list-style-type: none"> –Постоянное отслеживание обновлений документов антидопинговых организаций –Внесение изменений в действующие нормативные документы –Совершенствование образовательных программ для врачей –Внесение изменений во ФГИС МИАС и карту амбулаторного больного, отражающих работу по противодействию допингу в спорте –Введение системы проверки антидопинговых знаний врачей на постоянной основе 	<p>Угрозы</p> <ul style="list-style-type: none"> –Регулярное, не всегда анонсированное изменение документов антидопинговых организаций –Формирование антидопинговыми организациями материалов для врачей на основе европейских стандартов –Прогрессирующий обвинительный уклон антидопингового законодательства –Незаинтересованность в сотрудничестве антидопинговых организаций –Риски, связанные с фальсификацией БАД

ужесточая при этом санкции к персоналу спортсмена. Это касается и внутрироссийских нормативных документов. За последнее время соответствующими статьями пополнены Уголовный кодекс и Кодекс об административных правонарушениях, существует уже практика применения этих статей.

Если говорить об антидопинговых организациях, то стремление ужесточить наказание, в том числе персонала спортсмена, не коррелирует со стремлением повысить эффективность основного средства борьбы с допингом — выявления положительных допинг-проб при лабораторном исследовании как результата эффективного плана распределения тестов.

Формирование антидопинговыми организациями материалов для врачей на основе европейских стандартов, наличие заболеваний и состояний, диагностику и лечение которых в РФ не проводят или проводят крайне редко

Разработанные ВАДА «Руководства для врачей по ТИ» [9] приводят модели лучших практик, которые не всегда совпадают с требованиями Клинических рекомендаций Минздрава России. Зачастую субстанции и методы из Запрещенного списка используют для лечения заболеваний, для которых «Руководства для врачей по ТИ» не разработаны. В таких случаях врач обязан руководствоваться национальным документом и в обязательном порядке прилагать к запросам на ТИ выписки из них. Это одни из существенных рисков, что требует от врача внимательности и компетентности.

ВАДА разработаны «Руководства для врачей по ТИ» для 18 заболеваний и состояний, часть из которых практически не используют в российской практике. Это относится к таким руководствам, как СДВГ, врожденные нарушения сна, спортсмены-трансгендеры, нейропатическая боль. В терапии ряда из них используют субстанции, запрещенные к обороту в Российской Федерации, что надо учитывать при проведении терапии.

Расхождение между Клиническими рекомендациями Минздрава и «Руководствами для врачей по ТИ»

Так, диагностическим критерием сахарного диабета по данным Клинических рекомендаций Минздрава России

является содержание глюкозы в венозной крови, взятой натощак более 6,1 ммоль/л [10]. Согласно Европейским критериям, он составляет 7 ммоль/л [11]. Возможно, таких расхождений в критериях диагностики существенно больше, но для этого необходимо провести подробный анализ документов.

Келейность в работе антидопинговых организаций

В антидопинговых организациях, как правило, отсутствуют медицинские специалисты с опытом практической работы, что влияет на качество оказываемых консультативных услуг. К конференциям по вопросам ТИ, которые ежегодно проводит ВАДА и его структуры, врачей не допускают, а информация о рассмотренных вопросах малодоступна. Таким образом, возрастают риски и снижается эффективность внедрения результатов обсуждения и принятых решений.

Матрица SWOT

Существует несколько путей обобщения результатов SWOT-анализа. Наиболее распространен подход по созданию так называемой матрицы, позволяющей свести все разделы SWOT-анализа в таблицу, где сгруппированы основные признаки по выбранным критериям.

Для формирования матрицы был выбран один из подходов, который выделяет полезные и угрожающие факторы с учетом их подразделения на внешние и внутренние [4]. Для анализа были отобраны наиболее значимые факторы в каждой группе.

Согласно таблице, у организации есть все необходимые ресурсы для устранения недостатков (слабых сторон) и возможных угроз. К таким ресурсам относятся, прежде всего, активная информационно-образовательная работа, а также постоянный мониторинг изменений документов антидопинговых организаций.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основные направления SWOT-анализа в медицинских организациях включают анализ деятельности медицинских организаций в целом, анализ эффективности внедрения различных профилактических программ среди разных групп населения, внедрения различных методов

диагностики и лечения, использования лекарственных препаратов и т. д. [3]. В доступной литературе информация о применении SWOT-анализа оценки эффективности и планирования мероприятий по противодействию допингу в спорте отсутствует.

Антидопинговая работа медицинских работников как неотъемлемая часть МБО является небольшим его разделом. В то же время важность этой работы обусловлена ее актуальностью и возможными негативными последствиями, связанными с рисками нарушений антидопинговых правил.

Ключевым представляется приведение соответствующих разделов ФГИС МИАС и карт амбулаторного больного в соответствие с проводимыми антидопинговыми мероприятиями. Появление цифровой составляющей антидопинговой работы может вывести ее на новый уровень с возможностью анализа документов и разработки образовательных программ на этой основе.

Внесение изменений в действующие нормативные документы является по сути технической задачей и требует также отслеживания изменений соответствующих документов антидопинговых организаций [1, 2, 6].

Необходимо предоставление врачам информации в тех случаях, когда «Руководства для врачей по ТИ» отсутствуют и необходимо использовать Клинические рекомендации Минздрава России. Возможно, потребуется издание справочных материалов, хотя это затруднено

постоянными изменениями документов антидопинговых организаций.

Ряд угроз (рисков) невозможно компенсировать, устранить или предугадать. Сюда можно отнести стремление всех сторон процесса противодействия допингу ужесточать ответственность медицинского персонала. Понять цели, механизм, а также сами риски возможно только после появления регламентирующих документов.

Такой подход, по сути, «переводит стрелки» с неэффективного допинг-контроля на специалистов, оказывающих спортсмену профессиональную помощь. Врач, находящийся под постоянным давлением и контролем, старается избегать назначения запрещенных субстанций даже в показанных случаях, что может влиять на эффективность медицинской помощи. Это одна из возможных причин сравнительного небольшого количества запросов на ТИ, которые подает спортсмен, но инициирует, как правило, врач.

Выводы

Проведенный анализ подтверждает целесообразность выбора основных направлений совершенствования антидопинговой работы: прежде всего, это эффективная помощь врачам при подготовке ими документов для запроса на ТИ и разработка информационно-образовательных программ и материалов с учетом изменений документов ВАДА и российских нормативных актов.

Литература

1. Приказ ФМБА России от 25.09.2020 № 262 «Об утверждении Порядка оформления медицинских документов для запроса на терапевтическое использование запрещенной субстанции и (или) метода». Доступно по ссылке: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_428933/ (дата обращения 23.12.2022).
2. Приказ ФГБУ ФНКЦСМ ФМБА России № 157 от 28.10.2020 «Порядок оформления медицинских документов для запроса на терапевтическое использование запрещенной субстанции и (или) запрещенного метода» (дата обращения 23.12.2022).
3. Stacey R. Strategic Management and Organisational Dynamics. London: Pitman, 1993; 538 p.
4. Überall M, Werner-Felmayer G. Integrative Biology and Big-Data-Centrism: Mapping out a Bioscience Ethics Perspective with a S.W.O.T. Matrix. OMICS 2019; 23 (8): 371–9. DOI: 10.1089/omi.2019.0043.
5. Madsen DØ, SWOT Analysis: A Management Fashion Perspective (March 21, 2016). International Journal of Business Research. 2016; 16 (1): 39–56. DOI: 10.18374/ijbr-16-1.3.
6. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации и Федерального медико-биологического агентства от 05.04.2016 года № 49 «О противодействии применению допинга в спорте и борьбе с ним». Доступно по ссылке: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_255161/ (дата обращения 23.12.2022).
7. Деревоедов А. А., Высокотский И. Э., Выходец И. Т., Жолинский А. В., Пушкина Т. А., Фещенко В. С. Актуальные вопросы противодействия допингу в спорте в практике врача. Комментарии к запрещенному списку — 2023. Руководство для врачей по спортивной медицине. 2022; 28 с.
8. Деревоедов А. А., Высокотский И. Э., Выходец И. Т., Жолинский А. В., Овсянников И. В., Павлова А. А., и др. Актуальные вопросы противодействия допингу в спорте в практике врача. Брошюра Разрешенный список. Версия 5.0. Руководство для врачей по спортивной медицине. 2022; 38 с.
9. TUE Physician Guidelines. Available from: https://www.wada-ama.org/en/search?q=TUE%20Physician%20Guidelines&filters%5Bcontent_type%5D%5B%5D=%22resource%22 (дата обращения 23.12.2022).
10. Дедов И. И., Шестакова М. В., Майоров А. Ю., редакторы. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. М., 2021. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.14341/DM12802>.
11. Harreiter J, Roden M. Diabetes mellitus-Definition, classification, diagnosis, screening and prevention Wien Klin Wochenschr. 2019; 131 (Suppl 1): 6–15. DOI: 10.1007/s00508-019-1450-4.

References

1. Prikaz FMBA Rossii ot 25.09.2020 № 262 «Ob utverzhdenii Poryadka oformleniya medicinskih dokumentov dlya zaprosa na terapevticheskoe ispol'zovanie zapreshhennoj substancii i (iii) metoda». Dostupno po ssylke: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_428933/ (data obrashheniya 23.12.2022). Russian.
2. Prikaz FGBU FNKCSM FMBA Rossii # 157 ot 28.10.2020 «Poryadok oformleniya medicinskih dokumentov dlya zaprosa na terapevticheskoe ispol'zovanie zapreshhennoj substancii i (iii) zapreshhennogo metoda» (data obrashheniya 23.12.2022). Russian.
3. Stacey R. Strategic Management and Organisational Dynamics. London: Pitman, 1993; 538 p.
4. Überall M, Werner-Felmayer G. Integrative Biology and Big-Data-Centrism: Mapping out a Bioscience Ethics Perspective with a S.W.O.T. Matrix. OMICS 2019; 23 (8): 371–9. DOI: 10.1089/omi.2019.0043.
5. Madsen DØ, SWOT Analysis: A Management Fashion Perspective (March 21, 2016). International Journal of Business Research. 2016; 16 (1): 39–56. DOI: 10.18374/ijbr-16-1.3.

6. Prikaz Ministerstva zdravoohraneniya Rossijskoj Federacii i Federal'nogo mediko-biologicheskogo agentstva ot 05.04.2016 goda № 49 «O protivodejstvii primeneniyu dopinga v sporte i bor'be s nim». Dostupno po ssylke: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_255161/ (data obrashheniya 23.12.2022). Russian.
7. Derevoedov AA, Vykhodets IEh, Vykhodets IT, Zholinsky AV, Pushkina TA, Feshchenko VS. Aktual'nye voprosy protivodejstviya dopingu v sporte v praktike vracha. Kommentarii k zapreshhennomu spisku — 2023. Rukovodstvo dlya vrachej po sportivnoj medicine. 2022; 28 s. Russian.
8. Derevoedov AA, Vykhodets IEh, Vykhodets IT, Zholinsky AV, Ovsyannikov IV, Pavlova AA, i dr. Aktual'nye voprosy protivodejstviya dopingu v sporte v praktike vracha. Broshyura Razreshennyj spisok. Versiya 5.0. Rukovodstvo dlya vrachej po sportivnoj medicine. 2022; 38 s. Russian.
9. TUE Physician Guidelines. Available from: https://www.wada-ama.org/en/search?q=TUE%20Physician%20Guidelines&filters%5Bcontent_type%5D%5B%5D=%22resource%22 (data obrashcheniya 23.12.2022).
10. Dedov II, Shestakova MV, Majorov AYU, redaktory. Algoritmy specializirovannoj medicinskoj pomoshhi bol'nym sahnym diabetom. M., 2021. Dostupno po ssylke: <https://doi.org/10.14341/DM12802>. Russian.
11. Harreiter J, Roden M. Diabetes mellitus-Definition, classification, diagnosis, screening and prevention Wien Klin Wochenschr. 2019; 131 (Suppl 1): 6–15. DOI: 10.1007/s00508-019-1450-4.

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРА ИНТЕРФЕРЕНЦИИ СОЦИАЛЬНЫХ СЕТЕЙ НА ПРОЦЕССЫ КОНСОЛИДАЦИИ ПАМЯТИ У ПОДРОСТКОВ

Е. А. Петраш¹✉, В. Б. Никишина¹, Т. Н. Разуваева², М. В. Сокольская¹, А. А. Кузнецова³, И. В. Запесоцкая¹

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

² Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

³ Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

Актуальность настоящего исследования обусловлена необходимостью поиска ответа на вопрос о том, как факторы цифровой среды оказывают влияние на формирование психических функций подрастающего поколения. Целью работы было изучение влияния фактора интерференции социальных сетей на процессы консолидации памяти (слухоречевой и зрительно-образной) у подростков. Объем выборки составил 130 подростков в возрасте 11–17 лет. Формирование групп осуществляли по возрастным этапам (11–12, 13–14, 15–17 лет). Исследование осуществляли с использованием методик диагностики объема кратковременной слухоречевой и зрительно-образной памяти. В качестве интерферирующего воздействия выступали просмотр видеоконтента и прочтение фрагмента художественного произведения. Установлено значимое снижение объема кратковременной слухоречевой и зрительно-образной памяти у подростков. В условиях интерферирующего воздействия социальных сетей (длительного непрерывного просмотра визуально-акустического и визуально-речевого контента гетерогенного содержания) происходит снижение объема кратковременной памяти. Эмпирически доказан высокий риск потери долговременной памяти под влиянием фактора интерференции социальных сетей на процессы консолидации памяти у подростков. Чем больше длина максимального непрерывного видеопотока, а также общая длительность нахождения подростков в интернете (в том числе в социальных сетях), тем больше объем потери информации.

Ключевые слова: кратковременная память, слухоречевая память, зрительно-образная память, интерференция, визуально-акустический контент, визуально-речевой контент

Вклад авторов: все авторы внесли равнозначный вклад в планирование исследования, анализ литературы, сбор, анализ, интерпретация данных.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ им. Н. И. Пирогова (протокол № 217 от 18 апреля 2022 г.), проведено в соответствии с требованиями Основ законодательства «Об охране здоровья граждан»; все участники подписали информированное согласие на обследование.

✉ **Для корреспонденции:** Екатерина Анатольевна Петраш
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997, Россия; petrash@mail.ru

Статья получена: 13.10.2022 **Статья принята к печати:** 14.11.2022 **Опубликована онлайн:** 16.12.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.039

EFFECTS OF THE SOCIAL MEDIA INTERFERENCE FACTOR ON MEMORY CONSOLIDATION IN ADOLESCENTS

Petrash EA¹✉, Nikishina VB¹, Razuvaeva TN², Sokolyskaya MV¹, Kuznetsova AA³, Zapesotskaya IV¹

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Belgorod State University, Belgorod, Russia

³ Kursk State Medical University, Kursk, Russia

The relevance of this study is due to the need to answer the question of how the factors of digital medium affect the development of mental functions in the younger generation. The study was aimed to assess the effects of the social media interference factor on memory (auditory-speech and visual-figurative) consolidation in adolescents. The sample was 130 adolescents aged 11–17. The groups were formed based on the age stages (11–12, 13–14, 15–17 years). The study involved the use of the method for the diagnosis of the short-term auditory-speech and visual-figurative memory span. Viewing video content and reading the fragment of the fiction book were used as interference. A significant decrease in the short-term auditory-speech and visual-figurative memory span was observed in adolescents. The short-term memory span is reduced in the context of social media interference (prolonged continuous viewing the heterogenous visual-acoustic and visual-speech content). The high risk of the long-term memory loss due to the impact of the social media interference factor on memory consolidation in adolescents is empirically proven. The more the duration of the maximum continuous video stream and the total time the adolescents spend on Internet (including social media), the larger is the loss of information.

Keywords: short-term memory, auditory-speech memory, visual-figurative memory, interference, visual-acoustic content, visual-speech content

Author contribution: all authors contributed to study planning, literature analysis, data acquisition, analysis, and interpretation equally.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Pirogov Russian National Research Medical University (protocol № 217 of 18 April 2022) and conducted in accordance with the framework legislation "On Protection of Public Health"; the informed consent to examination was submitted by all participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina A. Petrash
Ostroviryanov, 1, Moscow, 117997, Russia; petrash@mail.ru

Received: 13.10.2022 **Accepted:** 14.11.2022 **Published online:** 16.12.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.039

В истории цивилизации актуальное поколение подростков впервые проживает в двух реальностях — опосредованной техническими средствами реальности (цифровой реальности) и неопосредованной техническими средствами

реальности. Каждая из этих реальностей своими микро- и макрохарактеристиками влияет на психическое развитие подрастающего поколения. Современные специалисты-психологи должны уже сейчас ставить конкретные вопросы

о том, как факторы цифровой среды оказывают влияние на формирование психических функций подрастающего поколения.

В современных теориях памяти одним из популярных тезисов является тезис о том, что мы есть наша память. Вопрос о влиянии факторов цифровой среды на процессы памяти у подрастающего поколения представляет собой конкретную проблему исследования [1–8].

Более четырех с половиной миллиардов человек во всем мире (57,6% мирового населения) активно пользуются социальными сетями. В среднем пользователи проводят в интернете 6 ч 54 мин в сутки и зарегистрированы в 6–7 различных социальных сетях (по данным Digital Global Statshot Report in partnership with We Are Social and Hootsuite, 2021).

Несмотря на нормативно-правовую регламентацию [9] (использование детьми интернета и социальных сетей регламентируется письмом Министерства образования и науки РФ), а также существование возрастных ограничений, устанавливаемых непосредственно социальными сетями и/или провайдерами (например, минимальный возраст пользователей TikTok — 13 лет), дети находят способы обойти установленные ограничения. Это приводит к существенному расширению их доступа к общему контенту без каких-либо возрастных содержательных ограничений.

Фундаментальный процесс формирования долговременной памяти, обозначаемый как консолидация, происходит во множестве различных типов воспоминаний, видов и систем памяти [2, 10, 11].

Первоначально память находится в неустойчивом состоянии и может быть нарушена несколькими типами помех, в том числе поведенческими, фармакологическими. Со временем память становится устойчивой к этим формам вмешательства благодаря процессу консолидации [2]. Формирование памяти осуществляется в две стадии. Первая стадия — это фаза кратковременной памяти, длящаяся до нескольких десятков минут. На данной стадии память подвержена воздействиям внешней среды: интерференции новым обучением или нарушении экспрессии генов. Вторую стадию формирования памяти составляет фаза долговременной (долгосрочной) памяти — более устойчивая структура, формирующаяся через сутки после возникновения энграммы. Ряд исследований показал [10, 11], что консолидированная память, прошедшая фазу долговременной памяти, тоже может принимать лабильную форму, если после ее формирования и стабилизации применить условный раздражитель, что отражает процесс реконсолидации памяти [3, 5, 13].

Экспериментальные исследования консолидации памяти были сосредоточены на изучении временного окна в несколько часов после обучения. Эмпирические данные о том, что консолидация памяти у людей может продолжаться в течение недель, месяцев и, возможно, лет, позволяют предположить, что существуют разные стадии консолидации памяти. Доказательства того, что разные стадии консолидации зависят от разных клеточных механизмов и систем мозга, представлены результатами исследований на людях и животных, в которых показано, что поражения гиппокампа, как правило, ухудшают память на недавно полученную информацию. При этом способность вспоминать ранее усвоенную информацию сохраняется.

Системная консолидация представляет изменения, связанные с хранением памяти. Консолидация и хранение памяти будут включать последовательную активность

гиппокампа, за которой следуют области коры, такие как энторинальная (CA1–CA3) и задняя теменная кора [11]. В результате кодирования поступающей от сенсорных систем разнотипности информации в гиппокампе формируется след памяти (энграмма). Поступающая информация преобразуется в объединенное внутреннее представление разрозненных элементов восприятия окружающей среды, которое интерпретируется и осмысливается через подключение элементов прошлого опыта, которые соотносятся с актуальными переживаниями. Таким образом, внутреннее представление преобразуется в энграмму, которая затем проходит этап консолидации.

Представленное исследование методологически выстраивалось на положениях концепции рабочей памяти Б. Б. Величковского [4, 13] и концепции К. В. Анохина [14]. Высшая психическая функция памяти характеризуется процессуальностью и осуществляется посредством запоминания. Запоминание обеспечивает сохранение информационного содержания, которое проходит два этапа (фазы). Кратковременный этап характеризуется фиксацией сохраняемой информации в полном объеме (без потери и искажения содержания) в течение короткого промежутка времени. Это лабильная фаза памяти, которой соответствует удержание информационного следа в форме реверберации нервных импульсов. Долговременный этап запоминания характеризуется сокращением объема информации при ее последующем длительном хранении без внесения изменений.

В процессе консолидации, обеспечивающем переход информационного содержания от кратковременного этапа к долговременному, также происходит дальнейшая трансформация сохраненной информации в соответствии с имеющимся опытом и ее присоединение к уже имеющейся информации («встраивание в систему долговременного хранения»). Долговременная память предполагает сохранение следа за счет процесса консолидации и последующих структурных изменений.

Рабочая память характеризует систему когнитивных процессов, которые обеспечивают оперативное хранение и переработку информации. Хранение информации в рабочей памяти осуществляется при помощи механизмов кратковременного и долговременного хранения. Извлечение информации (обозначаемое как процесс реконсолидации) осуществляется из долговременной памяти (включающей систему образов, систему символов и знаков, а также семантическую систему, организованные в целостный опыт). При этом первично реконсолидируется упроченная в предшествующем опыте информация. В процессе извлечения при реактивации памяти, обеспечивающей процесс извлечения информации, происходит ее активная реконструкция, которая, в свою очередь, сопровождается рекатегоризацией. После каждой рекатегоризации следует процесс реконсолидации (повторного сохранения информации). Каждое извлечение памяти сопровождается заменой старого следа памяти новым содержанием (оно может полностью или частично измениться).

Интерферирующая информация (в этом исследовании представленная в виде визуально-акустического и визуально-речевого контента) занимает объем кратковременной памяти, что, в свою очередь, приводит к консолидации изначально ограниченного объема информационного содержания.

Цель исследования — изучение влияния фактора интерференции социальных сетей на процессы консолидации памяти у подростков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Общий объем выборки составил 130 подростков-школьников 11–17 лет. По критерию возраста были сформированы три исследовательские группы. В первую вошли 44 подростка 11–12 лет (23 мальчика и 21 девочка); во вторую — 41 подросток 13–14 лет (20 мальчиков и 21 девочка); в третью — 45 подростков 15–17 лет (23 мальчика и 22 девочки). В контрольные группы тоже вошли подростки указанных возрастных диапазонов: 46 человек 11–12 лет (26 девочек и 20 мальчиков); 42 подростка 13–14 лет (20 девочек и 22 мальчика); 42 человека 15–17 лет (23 девочки и 19 мальчиков). Критерий включения: экранное время, т. е. время нахождения в сети интернет, в том числе в социальных сетях, должно составлять не менее 6 ч в сутки.

Исследование осуществляли в три этапа (рис. 1).

Первый этап

Оценивали объем кратковременной слухоречевой и кратковременной зрительно-образной памяти, долговременной памяти (отсроченное воспроизведение через 40 мин); экспериментально исследовали процессы консолидации-реконсолидации памяти при сохранении образно-символической информации. Оценка объема кратковременной слухоречевой и зрительно-образной памяти проводили с использованием методики «Десять слов» А. Р. Лурия, методики «Две группы слов по три слова» и «Пять трудновербализуемых фигур».

Оценка объема зрительно-пространственной рабочей памяти осуществляли с использованием методики Block Span [15].

Второй этап

Проводили экспериментальное исследование интерферирующего воздействия в форме просмотра видеоконтента социальной сети Tik-Tok (в экспериментальных группах), а также в форме прочтения фрагмента детской иллюстрированной книги (в контрольных группах). Испытуемым экспериментальных групп предлагали для

просмотра две серии видеороликов. В первую серию вошли 18 видеороликов длительностью до 10 с и более каждый (суммарная длительность данного видеоконтента составила 5 мин). Видеоролики для данной серии отбирали по критерию визуально-акустического признака. Ролики содержали видеоконтент с наличием музыкального либо иного ритмико-мелодического сопровождения без речевого сопровождения. Вторая серия представлена 22 видеороликами длительностью 10–20 с каждый (при общей суммарной длительности 5 мин). Критерием отбора видеороликов для данной серии являлся визуально-речевой признак. Ролики содержали видеоконтент с непосредственной речевой продукцией.

После просмотра обеих серий видеороликов (визуально-акустических и визуально-речевых) испытуемым предлагалось ответить на следующие вопросы по каждому видеоролику: номер видеоролика, его смысловое содержание, детали, впечатление (в границах понравился/не понравился).

Испытуемым контрольных групп предлагалось к прочтению «про себя» (не вслух) в течение 10 мин несколько страниц текста с иллюстрациями (фрагмент произведения Э. Рауда «Муфта, Полботинка и Моховая Борода»). После прочтения испытуемым необходимо пересказать прочитанный фрагмент текста максимально подробно. Оценка осуществлялась по следующим параметрам: количество действующих лиц; последовательность действий главных героев; количество семантических единиц в пересказе.

Третий этап

Осуществляли оценку процесса реконсолидации слухоречевой и зрительно-образной памяти в условиях интерферирующего воздействия: повторно оценивали показатели объема, темпа, точности и длительности сохранения следов памяти в рамках слуховой и зрительной модальности с использованием методик «Десять слов» А. Р. Лурия, «Две группы слов по три слова», «Пять трудновербализуемых фигур».

Для количественной обработки данных использовали методы описательной статистики (показатели средних



Рис. 1. Схема дизайна исследования влияния фактора интерференции социальных сетей на процессы консолидации памяти у подростков

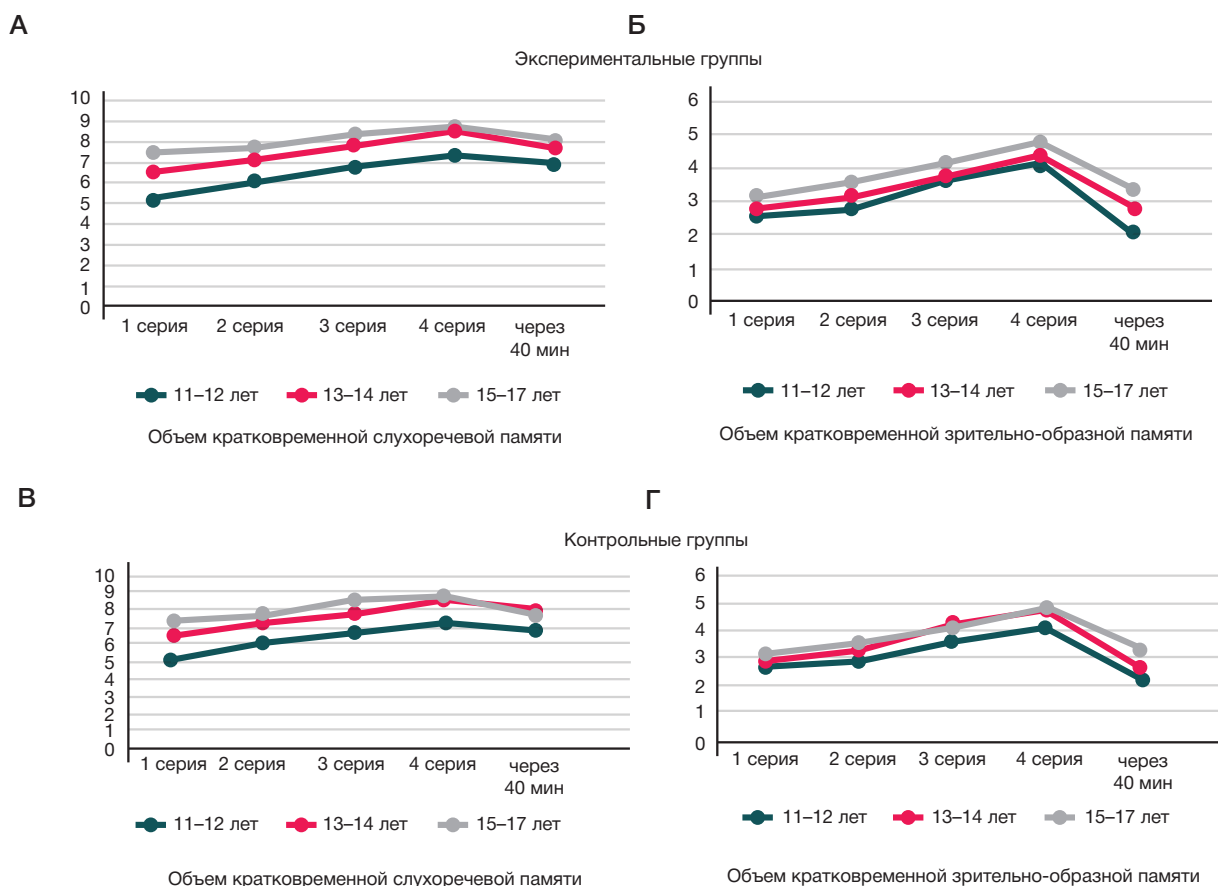


Рис. 2. Показатели объема кратковременной слухоречевой и зрительно-образной памяти у подростков

значений, стандартное отклонение) и сравнительной (непараметрические критерии U-критерий Манна-Уитни, T-критерий Уилкоксона, $p < 0,05$). Исследовательские группы сравнивали по количественным показателям до интерферирующего воздействия (процесс консолидации) и после интерферирующего воздействия (процесс реконсолидации памяти).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первый этап

Решая задачу первого этапа исследования по оценке показателей объема кратковременной и долговременной памяти, а также процессов консолидации и реконсолидации памяти у подростков, выявлено снижение объема по всем видам памяти по группам испытуемых. Максимальное снижение объема кратковременной слухоречевой и зрительно-образной памяти зафиксировано в группах подростков 11–12 лет (рис. 2).

Максимальный объем кратковременной памяти (как слухоречевой, так и зрительно-образной) выявлен в экспериментальной группе подростков 15–17 лет. В экспериментальных группах подростков выявлены статистически значимые различия между тремя группами. По показателям объема кратковременной слухоречевой памяти статистически значимые различия отсутствуют только между экспериментальными группами подростков 13–14 и 15–17 лет в четвертой серии воспроизведения (непосредственное воспроизведение после четвертого повторения слов-стимулов) ($p = 0,137$). Аналогичные результаты выявлены и в контрольных группах. Отсутствие статистически значимых различий по показателям объема

кратковременной слухоречевой памяти зафиксировано между контрольными группами подростков 13–14 и 15–17 лет в четвертой серии воспроизведения ($p = 0,132$).

При воспроизведении двух групп по три слова также фиксируется снижение объема кратковременной слухоречевой памяти в группах подростков. В полном объеме после четвертой серий две группы по три слова не доступны к воспроизведению. В контрольной и экспериментальной группах подростков 11–12 лет к воспроизведению доступно по одному (последнему) слову из каждой серии. Остальные называемые слова являются привнесенными и схожими по семантическому значению со словами-стимулами. Подростки 13–14 лет обеих групп воспроизводят по два слова из каждой группы. Группировка не соблюдалась: подростки называли вместе два слова, которые при предъявлении назывались в разных группах. Следует отметить отсутствие замен словами со схожим семантическим значением (что свойственно подросткам 11–12 лет). Среди подростков 15–17 лет после четвертой серии предъявления из первой группы подростки воспроизводят безошибочно два слова — первое и последнее; из второй группы — все три, но с изменением последовательности.

При попарном сравнении экспериментальных и контрольных групп по возрастным диапазонам (подростков 11–12 лет с контрольной группой подростков 11–12 лет; подростков 13–14 лет с контрольной группой подростков 13–14 лет; подростков 15–17 лет с контрольной группой подростков 15–17 лет) при оценке объема кратковременной слухоречевой и зрительно-образной памяти статистически значимых различий выявлено не было.

Полученные данные также подтверждаются результатами выполнения аппаратной методики Block

Таблица 1. Показатели средних значений по суммарным параметрам смысла, деталей и впечатления в группах подростков по предъявляемым сериям видеоконтента

Группы испытуемых	Параметры				
	Смысл (число семантических единиц)	Детали		Впечатление	
		Число героев	Число объектов	Понравился	Не понравился
Визуально-акустический контент (18 видеороликов)					
11–12 лет	11	8	6	15	2
13–14 лет	16	14	12	10	8
15–17 лет	24	18	16	9	9
Визуально-речевой контент (22 видеоролика)					
11–12 лет	14	10	7	18	4
13–14 лет	19	14	9	14	8
15–17 лет	26	18	12	12	10

Спан. Таким образом, можно констатировать изначальное снижение объема кратковременной памяти у подростков, которые проводят в сети интернет и социальных сетях не менее 6 ч в сутки. В группах подростков 11–12 лет (экспериментальной и контрольной) выявлено максимальное снижение объема кратковременной памяти (как слухоречевой, так и зрительно-образной). Снижение объема приводит к тому, что уже на этапе сохранения информационное содержание упрощается и сокращается, что в свою очередь, приводит к консолидации изначально искаженного информационного содержания. Искажения проявляются в упрощении и сокращении запоминаемой информации. Потеря исходной информации в среднем составляет в экспериментальной группе 44,16%, в контрольной — 44,89% от общего информационного содержания. Для подростков 13–14 лет тоже характерно снижение объема кратковременной памяти. Однако, в отличие от подростков 11–12 лет, потеря семантического содержания в экспериментальной группе составляет 32,56%, в контрольной — 33,04%. На этапе консолидации происходит подмена формы аналогичным или схожим семантическим содержанием. При воспроизведении слухоречевой информации подростки данной группы слова-стимулы заменяют семантически схожими или синонимичными словами. В группах подростков 15–17 лет выявлено минимальное снижение объема кратковременной памяти. При этом искажение информации на этапе сохранения минимально. Чаще, чем в других группах, фиксируются ошибки потерь — подростки воспроизводят лишь часть информационного содержания, не искажая и не подменяя ее семантически сходной информацией.

Второй этап

На втором этапе проводили анализ фактора интерференции.

Оценку консолидированного интерферирующего содержания в экспериментальных группах подростков после просмотра 10-минутного видеоконтента осуществляли по трем параметрам: смысл (количество семантических единиц), детали (количество героев — людей и животных, а также количество объектов в видеоролике), впечатление (понравился ролик или не понравился). Данные параметры фиксировали по каждому видеоролику в общей длительности видеоряда (табл.).

Представим качественную структуру консолидированного содержания просмотренного видеоконтента по двум сериям (визуально-акустического и визуально-речевого контента).

При просмотре как визуально-акустического, так и визуально-речевого контента во всех группах подростков фиксируется потеря семантического содержания видеоконтента. При описании просмотренных видеофрагментов нарушается их последовательность (все подростки, участвующие в исследовании, описывая содержание и героев видеофрагментов, представляли описание в последовательности, отличной от последовательности предъявления). Происходит «смешение» содержания разных видеофрагментов: описывая семантическое содержание видеофрагмента, подростки указывают героев и другие объекты из других, предшествующих или последующих роликов. Следует отметить, что чаще всего подростки описывают героев либо из первых двух-трех видеофрагментов контента, либо из последних в демонстрируемом ряду. Данная особенность закономерна и соответствует эффекту края.

В экспериментальной группе подростков 11–12 лет смысл одного видеофрагмента формулируется в виде простого предложения или словосочетания «существительное + прилагательное». Описанию доступны лишь 15% видеофрагментов (шесть видеороликов). Как правило, называется участник видеоролика (человек или животное) и его действие или характеристика. Если подросток при этом называет героя, то не называет объекты, которые присутствовали на видеозаписи ролика. И, наоборот, если подросток называет объекты, присутствующие на видеозаписи, то не может назвать и описать героя. По критерию впечатления 90% видеофрагментов, составляющих как визуально-акустический, так и визуально-речевой контент, понравились подросткам и отмечены ими как «интересные», «смешные», «любопытные», «прикольные», «суперские» и пр. Достоверно установлен тот факт, что в процессе консолидации и реконсолидации видеоконтента не фиксируется исходное содержание, а фиксируется лишь эмоциональный отклик на него. Информацию, которая вызвала конкретное впечатление, подросток не идентифицирует. Участники экспериментальной группы 13–14 лет, описывая смысл просмотренных видеофрагментов как визуально-акустического, так и визуально-речевого контента, применяют развернутые простые предложения, характеризующие взаимосвязи между героем видеоролика и внешними объектами. Для описания доступны всего 32% (13) видеороликов, преимущественно из визуально-акустического контента. Преобладают положительные впечатления над отрицательными в соотношении 60/40. Не воспроизводя семантическое содержание и детали видеоролика, подростки фиксируют свои впечатления.

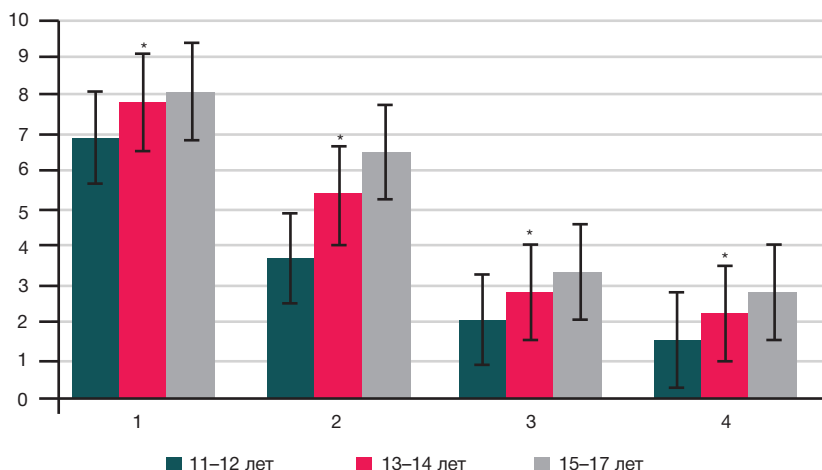


Рис. 3. Гистограмма показателей средних значений объема слухоречевой и зрительно-образной памяти по экспериментальным группам подростков после интерференции

В возрасте 15–17 лет процент доступных для описания роликов возрастает до 48% (19 видеофрагментов). Для данной возрастной группы характерно более точное и детализированное их описание. Подростки максимально точно в сравнении с другими возрастными группами описывают детали — героев и другие объекты.

В результате оценки влияния интерференции социальных сетей на процессы консолидации памяти у подростков можем зафиксировать потерю существенного объема информации в форме пропуска (содержание части видеороликов фиксировалось только через впечатление от просмотра без смыслового содержания и детализации) или ее искажения (смешения содержания нескольких просмотренных видеофрагментов). Максимальные потери как зрительно-образной, так и слухоречевой информации вследствие интерферирующего воздействия социальных сетей зафиксированы в группе подростков 10–12 лет.

Оценку консолидированного содержания в контрольных группах подростков после прочтения текста осуществляли по следующим параметрам: числу действующих лиц; последовательности действий главных героев; числу семантических единиц в пересказе.

Качественная структура консолидированного содержания позволяет констатировать искажение семантического содержания, проявляющееся в нарушении последовательности действий главных героев; действия одного героя приписываются другому; потеря второстепенных действующих лиц. В пересказе отсутствует детализация описания происходящих событий. Образно графическая информация, представленная иллюстрациями по ходу прочтения фрагмента произведения, также претерпевает изменения. Описывая иллюстрации, подростки безошибочно называют главных героев. Однако их действия, а также место расположения указывают с ошибками.

В качестве специфических особенностей консолидированной информации в контрольных группах подростков следует отметить следующие. В возрасте 11–12 лет подростки контрольной группы представляют пересказ преимущественно в форме коротких простых предложений (состоящих в среднем из 4–5 слов). Количество семантических единиц меньше количества предложений: одно и то же семантическое содержание представляется через несколько предложений. Подростки в пересказе воспроизводят преимущественно содержание последних прочитанных 20–25 предложений.

Предшествующее содержание в 90% случаев сводится лишь к описанию увиденных иллюстраций. Подростки контрольной группы 13–14 лет, пересказывая прочитанный фрагмент произведения, применяют развернутые простые предложения. Они передают семантическое содержание, отражающее взаимодействие между героями, в форме диалогов. Семантическое содержание воспроизводится фрагментарно и соотносится с иллюстрациями, которые изображены на прочитанных страницах. В пересказе преобладает детализированное описание иллюстраций над прочитанным семантическим содержанием текста. Для возрастной группы 15–17 лет (контрольной группы) характерен более точный и детализированный пересказ прочитанного фрагмента. Подростки данной группы максимально точно в сравнении с другими группами описывают действия героев. Нарушения последовательности действий в пересказе минимальны, иллюстрации описаны 5–7 предложениями: представлены в форме перечисления изображенных объектов с указанием их характеристик безотносительно к прочитанному тексту.

В результате оценки влияния интерференции прочитанного текста на процессы консолидации памяти у подростков контрольных групп можно зафиксировать искажение существенного объема информации. Искажения зафиксированы в нарушении последовательности действий, совершаемых героями при пересказе текста, а также в отсутствии семантического соответствия прочитанной текстовой информации и иллюстраций. Максимальные искажения зафиксированы в контрольной группе подростков 11–12 лет.

Третий этап

На третьем этапе оценивали процесс реконсолидации слухоречевой и зрительно-образной памяти. В экспериментальных группах после просмотра двух серий видеороликов (визуально-акустического и визуально-речевого контента) подросткам предлагали вспомнить 10 слов, которые они запоминали до просмотра; группы по три слова; а также пять изображений трудновербализуемых фигур и символического изображения буквы древнегреческого алфавита. Аналогичное задание предлагали подросткам контрольных групп после прочтения фрагмента текста с иллюстрациями.

На этапе реконсолидации после интерферирующего воздействия социальных сетей по всем экспериментальным

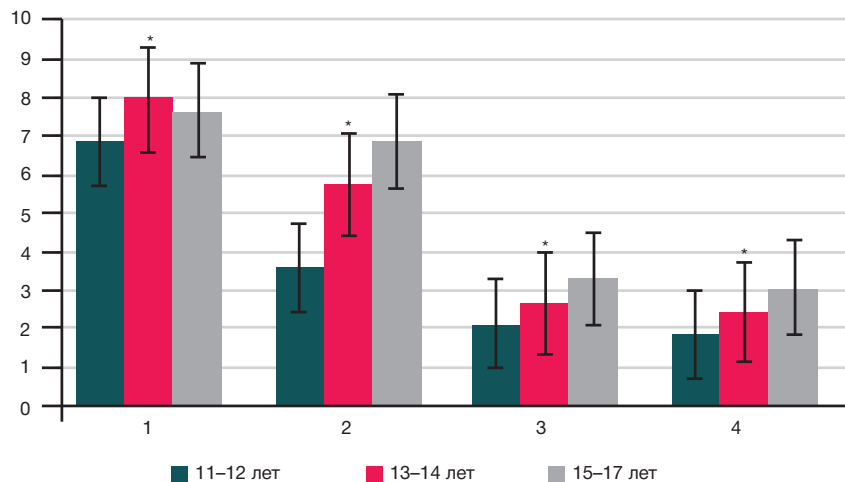


Рис. 4. Гистограмма показателей средних значений объема слухоречевой и зрительно-образной памяти по контрольным группам подростков после интерференции

группам подростков зафиксировано значимое снижение объема и качества воспроизводимой информации. В результате оценки значимости различий показателей объема слухоречевой памяти по экспериментальным группам подростков до и после интерферирующего воздействия выявлено значимое снижение в группе подростков 11–12 лет ($p = 0,026$), 13–14 лет ($p = 0,022$) и 15–17 лет ($p = 0,024$). Аналогичные результаты получены при оценке объема зрительно-образной памяти. Максимальное статистически значимое снижение объема воспроизводимой информации зафиксировано в экспериментальной группе подростков 11–12 лет ($p = 0,024$). В экспериментальных группах 13–14 ($p = 0,022$) и 15–17 лет ($p = 0,021$) показатели объема зрительно-образной памяти тоже значимо снижены (рис. 3).

В условиях интерферирующего воздействия социальных сетей, помимо снижения количественного показателя объема воспроизводимой информации меняется и ее содержание. В группе 11–12 лет идет подмена воспроизводимых слов-стимулов названиями объектов или речевой продукцией (словами) из видеороликов визуально-речевого контента. В воспроизводимых визуальных изображениях также зафиксированы элементы видеороликов визуально-акустического контента (отдельные движения, напоминающие контур воспроизводимых фигур, контуры отображаемых объектов и др.). В группах подростков 13–14 и 15–17 лет качественная трансформация воспроизводимой информации происходит преимущественно в форме ее сокращения. Интерферирующее содержание социальных сетей «блокирует» содержание консолидированной перед интерферирующим воздействием информации. Это, в свою очередь, приводит, к потере информационного содержания.

На этапе реконсолидации после интерферирующего воздействия прочтения текста в контрольных группах подростков также фиксируется значимое снижение объема и качества воспроизводимой информации. В результате оценки значимости различий показателей объема слухоречевой памяти по контрольным группам подростков до и после интерферирующего воздействия выявлено значимое снижение в группе подростков 11–12 лет ($p = 0,044$), 13–14 лет ($p = 0,049$) и 15–17 лет ($p = 0,047$). Аналогичные результаты получены при оценке объема зрительно-образной памяти. Максимальное статистически значимое снижение объема воспроизводимой информации зафиксировано в контрольной группе подростков 11–12 лет

($p = 0,042$). В группах 13–14 лет ($p = 0,044$) и 15–17 лет ($p = 0,044$) показатели объема зрительно-образной памяти тоже значимо снижены (рис. 4).

В условиях интерферирующего воздействия прочтения текста с иллюстрациями помимо снижения количественного показателя объема воспроизводимой информации меняется и ее качественное содержание. В контрольной группе подростки 11–12 лет подменяют воспроизводимые слова-стимулы названиями объектов, изображенных на иллюстрациях к прочитанному тексту. В воспроизводимых визуальных изображениях они также фиксируют элементы иллюстраций. В группах подростков 13–14 и 15–17 лет качественная трансформация воспроизводимой информации происходит преимущественно в форме ее сокращения. Интерферирующее содержание прочитанного текста, так же, как и просмотренный видеоконтент, «блокирует» содержание консолидированной перед интерферирующим воздействием информации, что и является причиной потери информационного содержания.

В результате оценки значимости различий достоверно установлено, что снижение объема как слухоречевой, так и зрительно-образной памяти более выражено в экспериментальных группах подростков, где в качестве интерферирующего воздействия выступал просмотр видеоконтента, в сравнении с контрольными группами, в которых в качестве интерферирующего воздействия выступало прочтение фрагмента художественного произведения с иллюстрациями. У подростков 11–12 лет показатель значимости различий p слухоречевой памяти составил 0,021, зрительно-образной — 0,024; у подростков 13–14 лет показатель значимости различий p объема слухоречевой памяти составил 0,024; зрительно-образной памяти — 0,024; у подростков 15–17 лет показатель значимости различий p объема слухоречевой памяти между экспериментальной и контрольной группами составил 0,019; зрительно-образной памяти — 0,018.

Полученные результаты свидетельствуют о более высоком интерферирующем воздействии видеоконтента в сравнении с прочтением текстовой информации.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно обзору отечественных и зарубежных исследований [15], полученные исследовательские результаты не позволяют говорить о единых, обобщенных

эффектах, которые распространяются на всю популяцию детей и подростков. По мнению авторов обзора, отсутствие однозначных выводов о влиянии цифровых технологий, в том числе и социальных сетей, связано с нелинейностью и дифференциальностью эффектов. Сила такого влияния зависит от целого ряда факторов: индивидуальных характеристик, интенсивности использования технологий, социально-экономических характеристик окружения ребенка. Результаты нашего исследования тоже подтверждают негативное влияние фактора непрерывной длительности просмотра видеопотока. Чем больше длина максимального непрерывного видеопотока, а также общая длительность нахождения подростков в интернете (в том числе и в социальных сетях), тем больше объем потери информации.

Результаты проведенного исследования подтверждают и данные, полученные ранее [16]. Автор указывает на то, что при освоении интернет-ресурсов в течение первых полутора лет эффективность процессов памяти снижается; при более длительной интернет-деятельности (свыше трех лет), приводит к повышению запоминания за счет увеличения взаимодействия функциональных и операциональных механизмов. Кроме того, по мнению автора, способы обработки запоминаемого материала при увеличении длительности интернет-активности становятся менее дифференцированными и более автоматизированными. Согласно полученным нами эмпирическим данным, максимальное снижение объема кратковременной памяти (как слухоречевой, так и зрительно-образной) и искажения существенного

объема информации в результате интерферирующего воздействия фиксируется в группах подростков 11–12 лет. В возрасте 13–14 и 15–17 лет снижения и искажения консолидированной информации менее выражены.

ВЫВОДЫ

У подростков 11–12, 13–14 и 15–17 лет зафиксировано снижение объема кратковременной памяти (как слухоречевой, так и зрительно-образной). Снижение объема кратковременной памяти приводит к нарушению процесса консолидации. Уже на этапе сохранения консолидируется информационное содержание в искаженной форме. Происходит либо частичная потеря информационного содержания (в возрастных диапазонах 13–14 и 15–17 лет), либо его трансформация как по форме (например, упрощение), так и по содержанию (например, при воспроизведении двух рядов по три слова стимульные слова воспроизводятся хаотично — из одного ряда привносятся слова в другой ряд; происходит замена слов-стимулов созвучными словами, упрощение и конкретизация зрительно-образной информации).

Таким образом, результаты проведенного исследования должны попасть в содержание программ психогигиены и развития подрастающего поколения в условиях цифровой реальности. Опасность представляет не цифровая реальность как таковая, а неосознаваемое и неконтролируемое ее влияние на базовый механизм, связывающий кратковременную и долговременную системы памяти.

Литература

1. Repovs G, Baddeley A. The multi-component model of working memory: explorations in experimental cognitive psychology. *Neuroscience*. 2006. 139: 5–21
2. Alberini CM. Memory Reconsolidation, 2013; 81–117. DOI: 10.1016/B978-0-12-386892-3.00005-6.
3. Григорьян Г. А., Маркевич В. А. Консолидация, реактивация и реконсолидация памяти. *Журнал Высшей нервной деятельности*. 2014; 64 (2): 123–36
4. Величковский Б. Б. Рабочая память человека: Структура и механизмы. М: Когито-центр, 2015; 247 с.
5. Дозорцева Е. Г., Кирихина Д. В. Кибербуллинг и склонность к девиантному поведению у подростков. *Прикладная юридическая психология*. 2020; 1 (50): 80–87.
6. Андреева А. О. Манипулирование в сети Интернет. Информационная безопасность и вопросы профилактики киберэкстремизма среди молодежи. 2015: 21–28.
7. Кудрявцев И. А. Девиантология изменений личности подростков в социальных сетях (феномены и закономерности дефицитарной трансформации). *Девиантология*. 2021; 5 (2–9): 3–13. DOI: 10.32878/devi.21-5-02(9)-3-13.
8. Юдеева Т. В. Мотивация деструктивного коммуникативного поведения подростков в социальных сетях. *Международный научно-исследовательский журнал*. 2022; 2–2 (116): 178–82. DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.116.2.066>.
9. Письмо Министерства образования и науки Российской Федерации от 28.04.2014 N ДЛ-115/03 «О направлении методических материалов для обеспечения информационной безопасности детей при использовании ресурсов сети Интернет». Доступно по ссылке: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_123707/8968082babe2e09c403b4254022a2abd2ff908e1/.
10. Lewis DJ. Psychobiology of active and inactive memory. *Psychol. Bull.* 1979. 86: 1054–83
11. Lewis DJ, Bregman NJ, Mahan JJ Jr. Cue dependent amnesia in rats. *J Comp Physiol Psychol*. 1972; 81 (2): 243–47
12. Roozendaal B, McGaugh JL. Memory modulation. *Behav Neurosci*. 2011; 125 (6): 797–824. DOI: 10.1037/a0026187. PMID: 22122145; PMCID: PMC3236701.
13. Величковский Б. Б. Тестирование рабочей памяти: от простого к сложному и снова к простому. *Теоретическая и экспериментальная психология*. 2014; 7 (2): 133–42.
14. Анохин К. В. Мозг и память: биология следов прошедшего времени. *Вестник Российской академии наук*. 2010; 80 (5-6): 455.
15. Isaacs E, Vargha-Khadem F. Differential course of development of spatial and verbal memory span: A normative study. *British Journal of Developmental Psychology*. 1989; 7: 377–80. DOI: 10.1111/j.2044-835X.1989.tb00814.x.
16. Бочавер А. А., Докука С. В., Сивак Е. В., Смирнов И. Б. Использование социальных сетей в интернете и депрессивная симптоматика у подростков. *Клиническая и специальная психология*. 2019; 8 (3): 1–18. DOI: 10.17759/psyclin.2019080301.

References

1. Repovs G, Baddeley A. The multi-component model of working memory: explorations in experimental cognitive psychology. *Neuroscience*. 2006. 139: 5–21
2. Alberini CM. Memory Reconsolidation, 2013; 81–117. DOI: 10.1016/B978-0-12-386892-3.00005-6.
3. Grigoryan GA, Markevich VA. Konsolidaciya, reaktivaciya i rekonsoolidaciya pamyati. *Zhurnal Vyshej nervnoj deyatel'nosti*. 2014; 64 (2): 123–36. Russian.

4. Velichkovskij BB. Rabochaya pamyat' cheloveka: Struktura i mexanizmy. M: Kogito-centr, 2015; 247 s. Russian.
5. Dozorceva EG., Kiryuxina D. V. Kiberbulling i sklonnost' k deviantnomu povedeniyu u podrostkov. Prikladnaya yuridicheskaya psixologiya. 2020; 1 (50): 80–87. Russian.
6. Andreeva AO. Manipulirovanie v seti Internet. Informacionnaya bezopasnost' i voprosy profilaktiki kiberehktremizma sredi molodezhi. 2015: 21–28. Russian.
7. Kudryavcev IA. Deviantologiya izmenenij lichnosti podrostkov v social'nyx setyax (fenomeny i zakonomernosti deficitarnoj transformacii). Deviantologiya. 2021; 5 (2–9): 3–13. DOI: 10.32878/devi.21-5-02(9)-3-13. Russian.
8. Yudeeva TV. Motivaciya destruktivnogo kommunikativnogo povedeniya podrostkov v social'nyx setyax. Mezhdunarodnyj nauchno-issledovatel'skij zhurnal. 2022; 2–2 (116): 178–82. DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.116.2.066>. Russian.
9. Pis'mo Ministerstva obrazovaniya i nauki Rossijskoj Federacii ot 28.04.2014 N DL-115/03 «O napravlenii metodicheskix materialov dlya obespecheniya informacionnoj bezopasnosti detej pri ispol'zovanii resursov seti Internet». Dostupno po ssylke: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_123707/8968082babe2e09c403b4254022a2abd2ff908e1/. Russian.
10. Lewis DJ. Psychobiology of active and inactive memory. Psychol. Bull. 1979. 86: 1054–83
11. Lewis DJ, Bregman NJ, Mahan JJ Jr. Cue dependent amnesia in rats. J Comp Physiol Psychol. 1972; 81 (2): 243–47
12. Roozendaal B, McGaugh JL. Memory modulation. Behav Neurosci. 2011; 125 (6): 797–824. DOI: 10.1037/a0026187. PMID: 22122145; PMCID: PMC3236701.
13. Velichkovskij BB. Testirovanie rabochej pamyati: ot prostogo k slozhnomu i snova k prostomu. Teoreticheskaya i ehksperimental'naya psixologiya. 2014; 7 (2): 133–42. Russian.
14. Anoxin KV. Mozg i pamyat': biologiya sledov proshedshego vremeni. Vestnik Rossijskoj akademii nauk. 2010; 80 (5-6): 455. Russian.
15. Isaacs E, Vargha-Khadem F. Differential course of development of spatial and verbal memory span: A normative study. British Journal of Developmental Psychology. 1989; 7: 377–80. DOI: 10.1111/j.2044-835X.1989.tb00814.x.
16. Bochaver AA, Dokuka SV, Sivak EV, Smirnov IB. Ispol'zovanie social'nyx setej v internete i depressivnaya simptomatika u podrostkov. Klinicheskaya i special'naya psixologiya. 2019; 8 (3): 1–18. DOI: 10.17759/psyclin.2019080301. Russian.