

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 Гейдебрехт, 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 (Москва, Россия)

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

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

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

С. Э. Восканян, д. м. н., профессор, член-корр. РАН (Москва, Россия)

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

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

К. А. Зыков, д. м. н., профессор, член-корр. РАН (Москва, Россия)

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

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

Р. Р. Каспранский, к. м. н. (Москва, Россия)

М. А. Лагарькова, д. б. н., профессор, член-корр. РАН (Москва, Россия)

Ю. В. Лобзин, д. м. н., профессор, академик РАН (Санкт-Петербург, Россия)

В. В. Никифоров, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

В. Н. Олесова, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

Р. В. Петров, д. м. н., профессор, академик РАН (Москва, Россия)

Б. А. Поляев, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

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

В. Л. Рейнюк, д. м. н., доцент (Москва, Россия)

В. Р. Рембовский, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)

А. С. Самойлов, д. м. н., профессор, член-корр. РАН (Москва, Россия)

С. В. Сидоренко, д. м. н., профессор, член-корр. РАН (Санкт-Петербург, Россия)

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 (Москва, Россия)

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

А. Н. Усков, д. м. н., доцент (Санкт-Петербург, Россия)

И. Б. Ушаков, д. м. н., профессор, академик РАН (Москва, Россия)

М. Р. Хаитов, д. м. н., профессор, член-корр. РАН (Москва, Россия)

С. М. Юдин, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

А. В. Аклев, д. м. н., профессор (Челябинск, Россия)

С. А. Аракепов, к. б. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

О. М. Панасенко, д. б. н., профессор, 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.2023-01

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 31.03.2023

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 (Moscow, Russia)

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 (Moscow, Russia)

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

Dudarenko SV, DSc (Saint-Petersburg, Russia)

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

Ilyin LA, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

Kaspranskiy RR, PhD (Moscow, Russia)

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

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

Nikiforov VV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Olesova VN, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

Polyaev BA, DSc (Moscow, Russia)

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

Rejniuk VL, DSc, docent (Moscow, Russia)

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

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

Sergienko VI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

Sidorkevich SV, DSc (Moscow, Russia)

Styazhkin KK, DSc, professor (Moscow, Russia)

Troitsky AV, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

Ushakov IB, member of 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)

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

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

Panasenko 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

Scopus®

Indexed in RSCI. IF 2018: 0,570

НАУЧНАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ
БИБЛИОТЕКА
LIBRARY.RU

Listed in HAC 31.01.2020 (№ 1292)



ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)

Open access to archive

CYBERLENINKA

Issue DOI: 10.47183/mes.2023-01

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 31.03.2023

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

Содержание

Contents

ОБЗОР	4
Расчет референтных интервалов для показателей крови у детей и подростков: обзор проектов Ж. В. Гришина, С. О. Ключников, В. С. Фещенко, А. В. Жолинский	
Calculation of reference intervals of blood parameters in children and adolescents: projects review Grishina ZhV, Klyuchnikov SO, Feshchenko VS, Zholinskiy AV	
ОБЗОР	12
Методические аспекты разработки и доклинических исследований лекарственных препаратов в интересах арктической медицины М. В. Волкова, С. А. Бирюков	
Methodological aspects of drug development and preclinical research in the interests of Arctic medicine Volkova MV, Biryukov SA	
МЕТОД	21
Идентификация фосфонилированных пептидов с применением МАЛДИ-мишени, функционализированной стеаратом лантана Н. Н. Бабаков, А. Ю. Горбунов, А. С. Гладчук, Я. К. Калнина, В. В. Шиловских, Н. В. Томили, Н. Г. Суходолов, А. С. Радилов, Е. П. Подольская	
Identification of phosphonylated peptides using a MALDI target functionalized with lanthanum stearate Babakov VN, Gorbunov AY, Gladchuk AS, Kalnina YaK, Shilovskikh VV, Tomilin NV, Sukhodolov NG, Radilov AS, Podolskaya EP	
МЕТОД	31
Модель лечения абсолютного маточного бесплодия на экспериментальных животных А. М. Полстяной, О. Ю. Полстяная, И. В. Рендашкин, О. Н. Якименко, К. О. Туценко, М. Г. Садовский, А. А. Чернова	
Experimental animal model for treatment of absolute uterine factor infertility Polstyanyov AM, Polstyanyaya OYu, Rendashkin IV, Yakimenko ON, Tutsenko KO, Sadovsky MG, Chernova AA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	37
Молекулярное моделирование и экспериментальное подтверждение поиска средств коррекции токсического воздействия сероводорода Л. И. Головацкая, Е. В. Тризно, Ю. А. Смирнова, М. Н. Тризно	
Molecular modeling and experimental confirmation of the search for agents mitigating toxic action of hydrogen sulfide Golovatskaya LI, Trizno EV, Smirnova YuA, Trizno MN	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	44
Оценка персонализированной реакции гемопоэтических стволовых клеток на гамма-облучение с использованием гуманизированных мышей Н. И. Атаманюк, Е. А. Пряхин, Е. В. Стяжкина, Н. А. Обвинцева, Г. А. Тряпицына, А. А. Перетыкин, С. С. Андреев, А. Е. Алдибекова, А. В. Аклев	
Assessment of individual hematopoietic stem cell response to gamma exposure using humanized mice Atamanyuk NI, Pryakhin EA, Styazhkina EV, Obvintseva NA, Tryapitsyna GA, Peretykin AA, Andreev SS, Aldibekova AE, Akleyev AV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	51
Результаты эпидемиологического надзора за COVID-19 среди обучающихся и профессорско-преподавательского состава университета С. А. Сайганов, А. В. Любимова, И. М. Гасанбеков, А. В. Мельцер, В. Лопатин, Б. И. Асланов	
Results of epidemiological surveillance for COVID-19 among students and teaching staff of the university Sayganov SA, Liubimova AV, Gasanbekov IM, Meltser AV, Lopatin ZV, Aslanov BI	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	59
Клинико-вирусологическая характеристика хронического гепатита В и ответ на противовирусную терапию Nguyen Thi-Hanh, Л. И. Мельникова, Л. Ю. Ильченко, К. К. Кюрегян, И. В. Гордейчук, Н. Л. Бондаренко	
Clinical and virological characteristics of chronic hepatitis B and response to antiviral therapy Nguyen Thi-Hanh, Melnikova LI, Ilchenko LY, Kyuregyan KK, Gordeychuk IV, Bondarenko NL	

РАСЧЕТ РЕФЕРЕНТНЫХ ИНТЕРВАЛОВ ДЛЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ: ОБЗОР ПРОЕКТОВ

Ж. В. Гришина [✉], С. О. Ключников, В. С. Фещенко, А. В. Жолинский

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

В обзоре существующих на сегодняшний день проектов по расчету референтных интервалов показателей крови на больших выборках детей разного пола и возраста обсуждены актуальные вопросы расчета педиатрических референтных интервалов для биохимических маркеров, проведено сравнение значений референтных интервалов, полученных в разных проектах. Представлены ограничения, будущие перспективы и гармонизация педиатрических референтных интервалов, в том числе для несовершеннолетних спортсменов.

Ключевые слова: референтные интервалы, показатели крови, педиатрия, дети, несовершеннолетние спортсмены, спортивная медицина

Финансирование: работа выполнена в рамках прикладной научно-исследовательской работы по теме: «Разработка методических рекомендаций по повышению эффективности мероприятий медико-биологического обеспечения несовершеннолетних спортсменов спортивных сборных команд Российской Федерации» (шифр «Дети-22»), государственный контракт ФГБУ ФНКЦСМ ФМБА России № 107.002.22.14 от 11.07.2022.

Вклад авторов: Ж. В. Гришина, С. О. Ключников — сбор и обработка материала, написание текста, редактирование; В. С. Фещенко, А. В. Жолинский — редактирование, утверждение окончательного варианта рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Жанна Валерьевна Гришина
ул. Б. Дорогомилловская, д. 5, г. Москва, 121059, Россия; grinzanetk@gmail.com

Статья получена: 02.03.2023 **Статья принята к печати:** 17.03.2023 **Опубликована онлайн:** 26.03.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.008

CALCULATION OF REFERENCE INTERVALS OF BLOOD PARAMETERS IN CHILDREN AND ADOLESCENTS: PROJECTS REVIEW

Grishina ZhV [✉], Klyuchnikov SO, Feshchenko VS, Zholinskiy AV

Federal Research and Clinical Center of Sports Medicine and Rehabilitation of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

The review of the currently existing projects focused on calculating the reference intervals of blood parameters in large samples of children of different gender and age discusses the urgent issues of calculating pediatric reference intervals of biochemical markers, the paper provides comparison of the reference intervals established within the framework of different projects. The limitations, future prospects and harmonization of pediatric reference intervals, including for juvenile athletes, are provided.

Keywords: reference intervals, blood parameters, pediatrics, children, juvenile athletes, sports medicine

Funding: the study was performed as part of the applied research project "Developing the Guidelines on Increasing the Efficiency of the Measures for Medical and Biological Support of Juvenile Athletes of Russian National Teams" (code "Deti-22"), the Federal Research and Clinical Center of Sports Medicine and Rehabilitation of the Federal Medical Biological Agency State Assignment №107.002.22.14 of 11.07.2022.

Author contribution: Grishina ZhV, Klyuchnikov SO — data acquisition and processing, manuscript writing, editing; Feshchenko VS, Zholinskiy AV — editing, approval of the manuscript final version.

✉ **Correspondence should be addressed:** Zhanna V. Grishina
B. Dorogomilovskaya, 5, Moscow, 121059, Russia; grinzanetk@gmail.com

Received: 02.03.2023 **Accepted:** 17.03.2023 **Published online:** 26.03.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.008

Детский организм отличается от организма взрослого не только физической кондицией, но и зрелостью органов, особенностями метаболизма, реактивностью иммунной и эндокринной систем и др. Динамические физиологические процессы в детском организме сопровождаются существенными изменениями концентрации многих биомаркеров в крови, в том числе гормонов [1].

На практике объективная оценка и последующая интерпретация результатов лабораторных и инструментальных исследований с учетом определенных возрастных периодов ребенка нередко достаточно сложны и не всегда однозначны, что негативно отражается при определении тактики ведения детей и организации лечебно-профилактических мероприятий [2, 3]. Помощь в решении этих проблем могут оказать референтные интервалы — базовый инструмент в медицине, позволяющий правильно интерпретировать результаты анализа крови и отличать нормальные физиологические изменения от дебюта патологических процессов в организме ребенка [2].

С точки зрения статистики, референтный интервал (РИ) — это предельные значения диапазона, в который входит

определенный процент значений (обычно 95%) здоровой популяции. Контрольные пределы определяются путем расчета 2,5-го и 97,5-го перцентилей результатов анализа [2, 4, 5]. Исходя из этого, 5% результатов могут быть интерпретированы как отклонение от нормы.

Согласно нормативным документам, выбор статистического метода расчета референтного интервала обусловлен характером распределения в ряду референтных значений: при наличии нормально распределенных данных применяют параметрические методы, при отсутствии предварительных гипотез касательно распределения данных используют непараметрические методы. Определение 95%-го доверительного интервала возможно при нормальном распределении референтных значений; в свою очередь при расчете референтных интервалов для выборок, которым свойственны распределения значений в референтных группах здоровых субъектов, отличающиеся от нормального распределения, применяют непараметрические методы, и, в частности, ранговый метод [5].

При «прямом» традиционном подходе РИ обычно определяют как интервал между двумя «эталонными»

Таблица. Проекты по расчету референтных интервалов показателей крови, основанных на популяции здоровых детей и подростков

Проект	Страна	Возрастные группы	Пол	Методы статистики, рассчитанные параметры	Исследуемые биомаркеры	Ссылки
AABC	Австралия и Новая Зеландия	Все	М, Ж	Прямой метод, РИ	Ферменты и ионы	12, 13
Caliper	Канада	До 18 лет	М, Ж	Прямой метод, РИ	Показатели общего анализа крови, эндокринные маркеры, онкомаркеры, витамины, биомаркеры отклонений в метаболизме	8, 10, 14, 15–22
CHILDX	США	0,5–17 лет	М, Ж	Прямой метод, РИ	Ферменты, гормоны, витамины, маркеры костного обмена, показатели коагулограммы	23–28
COPENHAGEN	Дания	5–20 лет	М, Ж	Прямой метод, РИ	Показатели биохимического анализа крови	29
KiGGS	Германия	До 18 лет	М, Ж	Прямой метод, РИ, медианы	Биохимические маркеры, иммунологические маркеры, гормоны щитовидной железы, маркеры неинфекционных заболеваний	30–34
LOOK	Австралия	8, 10, 12 лет	М, Ж	Прямой метод, РИ, медианы	Кардиологические маркеры, показатели общего анализа крови	35, 36
NHANES	США	все	М, Ж	Косвенный метод, 2,5; 25; 50; 75; 97,5-й центили	Липидный профиль, иммунологические и гематологические маркеры, витамины, маркеры воспаления	37–44
NORIP	Скандинавские страны	До 18 лет	М, Ж	Прямой метод, РИ	Онкомаркеры, показатели общего биохимического анализа крови	45–48
Референт-20	Россия	Профессиональные спортсмены 14–17 лет	М, Ж	Косвенный метод, РИ; 5; 10; 25; 50; 75; 90; 95-й центили	Показатели общего анализа крови, маркеры метаболизма	11, 49, 50

Примечания: AACB (Australasian Association of Clinical Biochemists) — Австралийская ассоциация клинических биохимиков; CALIPER (Canadian Laboratory Initiative on Paediatric Reference Intervals) — инициатива канадской лаборатории по педиатрическим РИ; CHILDX (Children's Health Improvement through Laboratory Diagnostics) — улучшение здоровья детей с помощью лабораторной диагностики; COPENHAGEN (The Copenhagen Puberty Study) — копенгагенское исследование полового созревания; KiGGS (German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents) — немецкий опрос и исследование здоровья детей и подростков; LOOK (Lifestyle of Our Kids) — Образ жизни наших детей; NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey) — Национальное исследование здоровья и питания; NORIP (Nordic Reference Interval Project) — скандинавский проект о референтных интервалах.

пределами (2,5 и 97,5-й процентиля), полученными из выборки эталонной популяции [4, 5].

На сегодняшний день широкое распространение получили также косвенные методики установления РИ, в которых анализируют базы данных лабораторных параметров. Главной проблемой, ограничивающей применение косвенной методики, является наличие сложных статистических алгоритмов, необходимых для создания и применения критериев исключения нездоровых субъектов.

Следует отметить, что расчет и верификация РИ довольно сложные процессы. В 2008 г. сотрудниками института стандартов клинических лабораторий (CLSI) и Международной федерацией клинической химии и лабораторной медицины (IFCC) было создано руководство (C28-A3) для определения и проверки РИ [6]. Точно установленные РИ имеют решающее значение для корректной постановки диагноза и выбора метода лечения, тогда как общепопуляционные и неадаптированные для детей РИ показателей крови могут привести к постановке ошибочного диагноза, неадекватного лечения, более высоких расходов на здравоохранение и т. д.

Анализ литературных данных о педиатрических РИ выявил основные направления современных исследований по расчету РИ показателей крови у детей: костные маркеры [7], маркеры сердечно-сосудистых заболеваний и риска возникновения метаболического синдрома [8], гормоны щитовидной железы и соматотропный гормон [9], а также врожденные особенности метаболизма [10].

За рубежом в последние годы были опубликованы итоги нескольких масштабных проектов по расчету РИ показателей крови на многочисленных выборках здоровых

детей (таблица). К сожалению, в нашей стране до настоящего времени подобных проектов нет. Исключением является реализованный в 2020 г. в ФГБУ ФНКЦСМ ФМБА России проект по расчету РИ показателей крови у несовершеннолетних спортсменов, который по объему выборки может сравниться с зарубежными проектами, указанными выше [11].

Проект KiGGS

В Европе одним из наиболее масштабных проектов по расчету РИ показателей крови у детей и подростков стал проект KiGGS, реализованный в институте Роберта Коха (RKI) в Германии. В рамках KiGGS на выборке здоровых детей были определены РИ для многочисленных лабораторных параметров сыворотки крови и мочи [30–34]. Выборка состояла из 17 641 образцов крови и мочи детей и подростков в возрасте 0–17 лет. Были изучены 43 показателя крови, разделенных на три основные категории в зависимости от их связи с питанием, риском неинфекционных заболеваний и иммунного статуса. Рассчитаны медиана и РИ для таких показателей, как общий уровень холестерина, липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), триглицеридов, кальцидиола. Для тиреоидных гормонов были определены значения медианы, 25-го и 75-го перцентилей у 12 756 субъектов старше трехлетнего возраста. В KiGGS, кроме того, изучали взаимосвязь биомаркеров. Например, была выявлена положительная взаимосвязь между тиреотропным гормоном и концентрацией показателей липидного обмена, за исключением ЛПВП.

Важной задачей проекта KiGGS было набрать большое число участников (получить репрезентативную выборку), чтобы иметь возможность разделить их на возрастные группы для дифференцированной оценки с достаточной статистической значимостью. Определенной проблемой стало включение в выборку детей и подростков разных национальностей, проживающих в Германии, большая численность которых была способна исказить результаты расчета РИ показателей крови для европейской популяции. В результате формирования выборки доля детей и подростков без немецкого гражданства в выборке составила 8,4%, что является незначительным показателем. Авторы планируют продолжить проект и рассчитать РИ показателей крови детей, дифференцированные по полу и возрасту, федеральным землям Германии, статусу мигранта и т. д.

Проект NORIP

Другим проектом по расчету педиатрических норм является скандинавский проект NORIP, инициированный еще в 1998 г. [45–48]. Общим критерием включения в выборку для расчета РИ показателей крови были здоровые лица младше 18 лет. Сыворотка крови, образцы плазмы и цельной крови были получены от 3036 здоровых детей в Дании, Финляндии, Исландии, Норвегии и Швеции. РИ были рассчитаны для 25 показателей сыворотки крови, включая ферменты. Выборка была дифференцирована по возрасту и полу.

Проект COPENHAGEN

В проекте COPENHAGEN (2006–2008 гг.) исследователи анализировали 21 показатель крови на основе 1421 образца крови здоровых детей (596 мальчиков и 825 девочек) в возрасте 5–20 лет [29]. Для расчета РИ использовали методы непараметрической статистики. РИ были получены для обоих полов и шести возрастных групп. Кроме того, было проведено сравнение РИ самой старшей по возрасту группы детей проекта COPENHAGEN с результатами самой младшей группы проекта NORIP. Многие рассчитанные значения РИ были схожи между этими проектами, некоторые различия наблюдались для таких показателей, как щелочная фосфатаза, лактатдегидрогеназа и креатинин. Эти различия вполне закономерны, поскольку данные показатели увеличиваются или уменьшаются с возрастом по мере роста ребенка. Особенность проекта COPENHAGEN заключалась в том, что выборку детей формировали из здоровых школьников без жалоб и отклонений в состоянии здоровья, тогда как в других проектах образцы крови брали у детей, которые находились на амбулаторном лечении. Кроме того, рассчитанные в этом проекте РИ сравнивали между собой с учетом метода измерения.

Проект CHILDX

В США с 2002 г. реализовывали проект CHILDX, в котором педиатрические РИ рассчитывали на основе здоровой когорты детей, в возрасте от 6 месяцев до 17 лет [23–28]. Были определены РИ для целого ряда показателей крови: витаминов, ферментов, гормонов, коагуляционных параметров и маркеров костной ткани. В 2005 г. в проекте CHILDX на основе образцов крови 902 здоровых детей и подростков

в возрасте 7–17 лет определяли РИ для показателей свертывающей системы крови (протромбиновое время; частичное тромбопластиновое время; факторы VIII, IX и XI; антиген фактора фон Виллебранда). В итоге обнаружено несколько существенных различий между РИ показателей свертывающей системы крови у детей и взрослых, что еще раз подтверждает необходимость расчета РИ, адаптированных для детей. Например, медиана протромбинового времени детей составила 14,0 с, что почти на 1 с больше, чем среднее значение для взрослых, равное 13,2 с.

Другое исследование CHILDX, проведенное в 2011 г., было посвящено расчету РИ таких показателей крови, как ферменты, преальбумины и мочевая кислота, на основе образцов сыворотки крови 1765 здоровых детей и подростков [25]. Выборка включала разные возрастные группы. Рассчитывали среднее значение, медиану и статистически значимые различия между возрастными и половыми группами (половые различия были определены примерно для 35% показателей). Например, для показателя альдолазы установлены гендерные различия в возрасте 6–8, 12–14 и 15–17 лет. Только уровень фермента амилаза не имел существенных гендерных различий ни в одной из исследованных возрастных групп. Наряду с этим церулоплазмин и мочевая кислота различались между группами детей 12–14 и 15–17 лет. У показателя креатинкиназы выявлены статистически значимые гендерные различия во всех возрастных группах, за исключением группы 6–8 лет.

Проект NHANES

В проекте NHANES, тоже реализованном в США, изучали влияние возраста, пола, индекса массы тела, социально-экономического статуса и этнической принадлежности на различные параметры здоровья, включая показатели крови. Для него собирали данные лабораторных исследований и опросов, а также набирали тысячи дополнительных участников каждый год [37–44]. Например, в исследовании, опубликованном в 2000 г., рассматривали верхний 95-й перцентиль концентрации С-реактивного белка (CRP) в выборке из более чем 22 000 здоровых детей и взрослых с учетом возраста, пола и этнической принадлежности [43]. Женщины, как правило, имели более высокую концентрацию CRP по сравнению с мужчинами. Его уровень был также выше у пожилых людей по сравнению с детьми. Кроме того, в 2004 г. в рамках данного проекта рассчитывали РИ показателей крови на основе 25 000 здоровых людей в возрасте 10–75 лет, разделенных по возрасту, полу и этнической принадлежности [41]. Кроме этого, определяли РИ содержания витаминов и липидного обмена для разных этнических групп.

Проект LOOK

В проведенном в Австралии масштабном исследовании «Образ жизни наших детей» (LOOK) изучали влияние физической активности на здоровье 3528 здоровых детей и подростков. В одном из наиболее значимых исследований, проведенных в рамках этого проекта, на основе выборки из 852 здоровых детей, разделенных по полу и возрасту, были рассчитаны РИ и медианы для 37 показателей крови [36]. Образцы крови собирали у одних и тех же детей в 8, 10 и 12 лет. Среди важных обнаруженных закономерностей были следующие:

- активность фермента щелочной фосфатазы (ЩФ) у девочек выше, чем у мальчиков, в 8 и 10 лет, но к 12 годам у мальчиков она становилась выше;

- активность креатинкиназы у мальчиков выше, чем у девочек, во всех возрастах;

- уровень холестерина выше у девочек, чем у мальчиков, в возрасте 10 и 12 лет, в то время как уровень ЛПВП выше у мальчиков во всех возрастах. Концентрация триглицеридов выше у девочек во всех возрастах;

- уровень уратов значительно выше у мальчиков в возрасте 12 лет;

- уровень ферритина выше у мальчиков, чем у девочек, в возрасте 12 лет (во время забора крови у 50 из 256 девушек была менструация, чем можно объяснить данное различие);

- концентрация глюкозы практически одинакова у мальчиков и девочек и прогрессивно возрастала у обоих полов с возрастом. Концентрация инсулина у девочек выше, чем у мальчиков, и у обоих полов прогрессивно возрастала с возрастом.

В работе LOOK 2012 г. данные 854 детей использовали при расчете РИ для NT-proBNP (N-terminal pro-brain natriuretic peptide B-type, аминокотерминальный фрагмент промозгового натрийуретического пептида типа В) в крови [36]. Медиану, доверительные интервалы и РИ рассчитывали в зависимости от пола и для трех возрастных групп (8, 10 и 12 лет). Было показано, что в возрасте 8–12 лет концентрация NT-proBNP у здоровых детей снижается.

Проект AACB

В проекте по адаптации общих РИ, рассчитанных на образцах крови здоровых людей, используемых в больницах Австралии и Новой Зеландии (AACB), 123 лаборатории в 2014 г. представили РИ, используемые каждой лабораторией, а также новые результаты анализов крови с разделением по полу [12, 13]. С помощью этих данных выявляли различия в РИ и аналитических методах, используемых каждой лабораторией. Применяя линейную регрессию, сравнивали результаты расчета верхних и нижних пределов РИ. Группа AACB определяла расположение значений нового образца относительно РИ каждой лаборатории, и его относительное расположение от верхнего и нижнего пределов РИ. Затем результаты сравнивали между лабораториями. Этот проект предоставил ценную информацию об используемых РИ показателей крови в Австралии и Новой Зеландии.

Проект CALIPER

Одним из масштабных проектов по расчету педиатрических РИ показателей крови является проект «Инициатива Канадской лаборатории по педиатрическим референтным интервалам» (CALIPER), который направлен на создание базы данных по педиатрическим РИ для использования в детских центрах на национальном и глобальном уровнях [8, 10, 14, 15–22]. В этом проспективном исследовании у тысяч здоровых детей и подростков рассчитывали дифференцированные по полу и возрасту РИ для многих рутинных и специализированных биохимических маркеров. На начальных этапах проект CALIPER включал 2809 образцов сыворотки и плазмы крови от внешне здоровых и метаболически стабильных детей из амбулаторных клиник. Было проанализировано более 50 показателей крови методами биохимического и

иммуноферментного анализа. На основании полученных данных разработаны предварительные РИ в соответствии с CLSI и рекомендациями IFCC C28-A3.

На начальном этапе были установлены РИ для пяти возрастных групп, разделенных по полу. Данный этап послужил основой для дальнейших проектов в рамках CALIPER. Однако, как указано в руководстве CLSI/IFCC C28-A3, для установления РИ выборка должна состоять по меньшей мере из 120 здоровых людей по каждому показателю. В первоначальных пилотных исследованиях CALIPER принимали участие внешне здоровые дети из амбулаторных клиник, но имеющие заболевание, которое могло оказать влияние на показатели крови. Кроме того, выборка была недостаточного объема на один показатель крови. Затем исследователи усовершенствовали места сбора образцов, помимо клиник забор крови стали осуществлять и в общественных центрах, детских садах, церквях и школах. Первое из этих исследований было посвящено установлению РИ по возрастным группам для более чем 40 часто определяемых показателей крови. Этот этап проекта был первым из многих исследований CALIPER, который позволил начать заполнять пробелы в педиатрических РИ для показателей крови, включая маркеры костной ткани, маркеры риска сердечно-сосудистых заболеваний и метаболизма [8].

Результаты исследования показали, что РИ многих показателей крови различаются в зависимости от возрастных диапазонов. При этом возрастные диапазоны не обязательно коррелируют с общепринятыми возрастными этапами развития. Например, при расчете РИ было выявлено, что для ЩФ требуется разбить выборку на семь возрастных диапазонов (от 0 до 14 дней, от 15 дней до < 1 года, от 1 года до < 10 лет, от 10 до < 13 лет, от 13 до < 15 лет, от 15 до < 17 лет и от 17 до < 19 лет), в то время как для аланинаминотрансферазы (АЛТ) достаточно трех возрастных диапазонов (от 0 до < 1 года, от 1 года до < 13 лет, от 13 до < 19 лет) [8].

Что касается эндокринных маркеров, то в 2013 г. в рамках проекта CALIPER была собрана выборка здоровых детей и подростков для расчета РИ семи половых гормонов. В этом исследовании были определены РИ половых гормонов, специфичных для конкретной стадии развития по Таннеру (эстрадиол, тестостерон, прогестерон, глобулин, связывающий половые гормоны, пролактин, фолликулостимулирующий гормон и лютеинизирующий гормон). Стадии развития по Таннеру используют для мониторинга полового созревания у детей. Особенно важно иметь РИ для половых гормонов, специфичных для стадии развития по Таннеру, поскольку каждый ребенок вступает в период полового созревания в разном возрасте. Стадии развития по Таннеру основаны на пятиступенчатой шкале, где I степень соответствует препубертатному развитию, а V степень — взрослому развитию. Развитие по Таннеру было определено субъективным методом: участникам исследования показывали изображения стадий развития по Таннеру от I до V, и они оценивали свое развитие относительно этих изображений [14].

После расчета РИ половых гормонов были установлены педиатрические РИ для других биохимических маркеров, а также возрастная специфика стероидных гормонов, РИ для витаминов А и Е [15], и витамина D [16]. В дополнение к этим крупным этапам в рамках проекта CALIPER проводили и более мелкие, но практически актуальные исследования. В них анализировали влияние условий замораживания на образцы и стабильность аналитов, суточные колебания в

крови концентраций маркеров, и влияние голодания на концентрацию некоторых биомаркеров [17–19].

Для дальнейшего расширения базы данных CALIPER были установлены возрастные и половые РИ для онкомаркеров, биомаркеров метаболических заболеваний, индексов тестостерона и специализированных биохимических маркеров. На сегодняшний день CALIPER создал всеобъемлющую и надежную базу РИ для педиатрии с учетом возраста и пола для более чем 100 показателей крови [20–22].

Рассмотренные проекты по расчету РИ показателей крови у детей и подростков широко изучают концентрации показателей крови в зависимости от возраста и пола. Однако влияние дополнительных параметров, таких как этническая принадлежность, индекс массы тела (ИМТ), объем физической нагрузки и т. д., на концентрацию показателей до сих пор недостаточно изучены.

Еще одной актуальной темой при расчете РИ показателей крови является ожирение в детском возрасте. Необходимо учитывать, как изменяются концентрации веществ в крови в зависимости от ИМТ [51]. Референтная популяция должна состоять из субъектов, репрезентативных для местного населения, но некоторые факторы, например ИМТ, постоянно меняются с течением времени, что усложняет получение репрезентативной выборки. По мере того как средний показатель ИМТ в выборке увеличивается, РИ для показателей крови, зависящих от ИМТ, могут тоже изменяться. Поэтому важно понимать, на какие показатели крови оказывает значительное влияние ИМТ, и являются ли эти изменения физиологическими или имеют клиническое значение, указывая, например, на субклиническое прогрессирование метаболического синдрома [51].

Проект «Референт-20»

Среди проектов по расчету педиатрических РИ показателей крови отметим проект «Референт-20», выполненный в 2020 г. в Федеральном научно-клиническом центре спортивной медицины ФМБА России (ФНКЦСМ ФМБА России). Исследование проводили на многотысячной выборке несовершеннолетних профессиональных спортсменов (2986 мальчиков и 2181 девочек), сформированной на основе результатов углубленного медицинского обследования (УМО) членов спортивных сборных команд России в 2015–2019 гг. на базе клиники ФНКЦСМ ФМБА России [11, 49, 50]. В рамках проекта были рассчитаны РИ для маркеров крови, характеризующих отдельные звенья метаболизма, а также для показателей общего анализа крови, всего 26 показателей.

Спортсмены были разбиты на группы по полу, возрасту (14–15 и 16–17 лет) и спортивным специализациям: циклические (группа «выносливость» (стайеры) и группа «скорость + выносливость» (спринтеры), скоростно-силовые (технические виды легкой атлетики), сложно-координационные, игровые и единоборства. При расчете РИ для анализируемых параметров крови были исключены результаты обследования спортсменов, не допущенных к учебно-тренировочному процессу в результате прохождения УМО по уровню функциональных возможностей организма и состоянию здоровья [11, 49].

После формирования выборки с учетом всех критериев исключения проводили проверку типа распределения данных, исключали статистические выбросы и рассчитывали РИ изучаемых в рамках УМО биохимических

маркеров крови. Учитывая отсутствие нормального распределения по целому ряду изучаемых показателей крови, для построения соответствующих РИ использовали центильный метод, относящийся к непараметрическим методам [11, 49].

В результате сравнения РИ для некоторых показателей крови, например, маркеров переносимости физических нагрузок, рассчитанных на выборке несовершеннолетних спортсменов, с РИ этих же показателей, полученных в рамках зарубежных педиатрических проектов, мы пришли к выводу о различиях как в ширине самого референтного диапазона, так и в его максимальных и минимальных значениях [11]. Например, при сравнении РИ содержания креатинина в крови, рассчитанных на выборке несовершеннолетних спортсменов (PI sport) с РИ, рассчитанными в рамках проектов Caliper/Norip, было обнаружено, что в выборке спортсменов мальчиков 14–15 лет максимальные значения РИ для этого показателя на 30% больше, чем РИ Caliper/Norip-мальчиков, тогда как в 16–17-летнем возрасте они практически идентичны. В выборке спортсменок 14–15 лет максимальные значения РИ содержания креатинина больше на 13%, а в 16–17-летнем возрасте — на 16%, чем РИ Caliper\Norip. В спорте содержание креатинина в крови также используют как маркер переносимости физических нагрузок. Увеличение максимальных значений РИ содержания креатинина у несовершеннолетних спортсменов по сравнению с обычными подростками может быть обусловлено значительными физическими нагрузками и повышенным потреблением белковой пищи [11].

В данном проекте было также показано, что максимальные и минимальные значения РИ для кортизола, рассчитанные на выборке несовершеннолетних спортсменов, выше на 58–67%, чем у нетренированных детей. Причем у мальчиков и девочек, занимающихся спортом, одного возраста рассчитанные РИ кортизола схожи. Если сравнивать рассчитанные РИ для кортизола в проекте «Референт-20» и в проекте Caliper/Norip, то можно отметить следующее: у мальчиков 14–15 лет, занимающихся спортом, максимальные значения РИ для кортизола на 64,7% больше по сравнению с максимальными значениями РИ для кортизола у мальчиков в проекте Caliper/Norip, а в возрасте 16–17 лет максимальные значения РИ для кортизола больше на 67,2%. У девочек 14–15 лет, занимающихся спортом, максимальные значения РИ кортизола на 64,8% больше по сравнению с максимальными значениями РИ для кортизола у девочек в проекте Caliper/Norip, а в возрасте 16–17 лет — на 66,7%. Полученные данные о более высоких максимальных значениях РИ для кортизола у несовершеннолетних спортсменов могут быть обусловлены уровнем стресса, который они испытывают при занятиях профессиональным спортом [11].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, анализ мировой и отечественной литературы свидетельствует о том, что в последние годы предприняты весьма успешные попытки по установлению РИ для показателей крови в популяции несовершеннолетних детей и подростков. Однако остается открытым вопрос по расчету педиатрических РИ для показателей крови у отдельных когорт детей, например, спортсменов или детей из различных этнических групп или детей с разным ИМТ. Необходимы дальнейшие

исследования по определению РИ для маркеров крови несовершеннолетних спортсменов с учетом не только их пола и возраста, но и специфики спортивной нагрузки, профессионального стажа и спортивной результативности.

Данные, полученные в результате этих исследований, помогут врачам по спортивной медицине своевременно планировать и проводить коррекционные мероприятия по оптимизации функционального состояния.

Литература

1. Дёмин В. Ф., Ключников С. О., Балыковой Л. А., Самойлова А. С., редакторы. Авторские лекции по педиатрии. Детская спортивная медицина. 2017; 10: 81–99.
2. Tahmasebi H, Higgins V, Fung A, Truong D, White-Al Habeeb N, Adeli K. Pediatric reference intervals for biochemical markers: gaps and challenges, recent national initiatives and future perspectives. 2017; 28 (1): 43–63.
3. Дудникова Э. В., редактор. Физиологические константы у детей: учеб.-методическое пособие. Ростов-н/Д: Изд-во РостГМУ, 2016; 46 с.
4. Евгина С. А., Савельев Л. И. Современные теория и практика референтных интервалов. Лабораторная служба. 2019; 8 (2): 36–44.
5. ГОСТ Р 53022.3-2008 «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Ч. 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов». М.: Стандартинформ, 2009; 22 с.
6. Boyd JC. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; Approved guideline, CLSI document C28-A3. 2010; 28 (3).
7. Yang L, Grey V. Pediatric reference intervals for bone markers. Clin Biochem. 2006; 39: 561–8.
8. Colantonio DA, Kyriakopoulou L, Chan MK, Daly CH, Brinc D, Venner AA, et al. Closing the gaps in pediatric laboratory reference intervals: a CALIPER database of 40 biochemical markers in a healthy and multiethnic population of children. Clin Chem. 2012; 58: 854–68.
9. Delvin EE, Laxmi Grey V, Vergee Z, CALIPER Working Group. Gap analysis of pediatric reference intervals related to thyroid hormones and the growth hormone-insulin growth factor axis. Clin Biochem. 2006; 39: 588–94.
10. Konforte D, Shea JL, Kyriakopoulou L, Colantonio D, Cohen AH, Shaw J, et al. Complex biological pattern of fertility hormones in children and adolescents: a study of healthy children from the CALIPER cohort and establishment of pediatric reference intervals. Clin Chem. 2013; 59: 1215–27.
11. Гришина Ж. В., Ключников С. О., Яшин Т. А., Макарова Г. А., Ломазова Е. В., Бушуева И. Е. и др. Референтные интервалы биохимических показателей крови у юных спортсменов. Вопросы практической педиатрии. 2022; 17 (1): 71–78.
12. Tate JR, Sikaris KA, Jones GR, Yen T, Koerbin G, Ryan J, et al. Harmonising adult and paediatric reference intervals in australia and new zealand: an evidence-based approach for establishing a first panel of chemistry analytes. Clin Biochem Rev. 2014; 35: 213–35.
13. Jones GR, Koetsier SD. RCPAQAP First Combined Measurement and Reference Interval Survey. Clin Biochem Rev. 2014; 35: 243–50.
14. Bailey D, Colantonio D, Kyriakopoulou L, Cohen AH, Chan MK, Armbruster D, et al. Marked biological variance in endocrine and biochemical markers in childhood: establishment of pediatric reference intervals using healthy community children from the CALIPER cohort. Clin Chem. 2013; 59: 1393–405.
15. Raizman JE, Cohen AH, Teodoro-Morrison T, Wan B, Khun-Chen M, Wilkenson C, et al. Pediatric reference value distributions for vitamins A and E in the CALIPER cohort and establishment of age-stratified reference intervals. Clin Biochem. 2014; 47: 812–5.
16. Yazdanpanah M, Bailey D, Walsh W, Wan B, Adeli K. Analytical measurement of serum 25-OH-vitamin D(3), 25-OH-vitamin D(2) and their C3-epimers by LC-MS/MS in infant and pediatric specimens. Clin Biochem. 2013; 46: 1264–71.
17. Brinc D, Chan MK, Venner AA, Pasic MD, Colantonio D, Kyriakopoulou L, et al. Long-term stability of biochemical markers in pediatric serum specimens stored at –80 degrees C: a CALIPER Substudy. Clin Biochem. 2012; 45: 816–26.
18. Bailey D, Bevilacqua V, Colantonio DA, Pasic MD, Perumal N, Chan MK, et al. Pediatric within-day biological variation and quality specifications for 38 biochemical markers in the CALIPER cohort. Clin Chem. 2014; 60: 518–29.
19. Pasic MD, Colantonio DA, Chan MK, Venner AA, Brinc D, Adeli K. Influence of fasting and sample collection time on 38 biochemical markers in healthy children: a CALIPER substudy. Clin Biochem. 2012; 45: 1125–30.
20. Bevilacqua V, Chan MK, Chen Y, Armbruster D, Schodin B, Adeli K. Pediatric population reference value distributions for cancer biomarkers and covariate-stratified reference intervals in the CALIPER cohort. Clin Chem. 2014; 60: 1532–42.
21. Teodoro-Morrison T, Kyriakopoulou L, Chen YK, Raizman JE, Bevilacqua V, Chan MK, et al. Dynamic biological changes in metabolic disease biomarkers in childhood and adolescence: A CALIPER study of healthy community children. Clin Biochem. 2015; 48: 828–36.
22. Raizman JE, Quinn F, Armbruster DA, Adeli K. Pediatric reference intervals for calculated free testosterone, bioavailable testosterone and free androgen index in the CALIPER cohort. Clin Chem Lab Med. 2015; 53: e239–e243.
23. Flanders MM, Crist RA, Roberts WL, Rodgers GM. Pediatric reference intervals for seven common coagulation assays. Clin Chem. 2005; 51: 1738–42.
24. Kushnir MM, Rockwood AL, Roberts WL, Pattison EG, Owen WE, Bunker AM, et al. Development and performance evaluation of a tandem mass spectrometry assay for 4 adrenal steroids. Clin Chem. 2006; 52: 1559–67.
25. Clifford SM, Bunker AM, Jacobsen JR, Roberts WL. Age and gender specific pediatric reference intervals for aldolase, amylase, ceruloplasmin, creatine kinase, pancreatic amylase, prealbumin, and uric acid. Clin Chim Acta. 2011; 412: 788–90.
26. Johnson-Davis KL, Moore SJ, Owen WE, Cutler JM, Frank EL. A rapid HPLC method used to establish pediatric reference intervals for vitamins A and E. Clin Chim Acta. 2009; 405: 35–38.
27. Meikle AW, Kushnir MM, Rockwood AL, Pattison EG, Terry AH, Sandrock T, et al. Adrenal steroid concentrations in children seven to seventeen years of age. J Pediatr Endocrinol Metab. 2007; 20: 1281–91.
28. Wyness SP, Roberts WL, Straseski JA. Pediatric reference intervals for four serum bone markers using two automated immunoassays. Clin Chim Acta. 2013; 415: 169–72.
29. Hilsted L, Rustad P, Akglaede L, Sorensen K, Juul A. Recommended Nordic paediatric reference intervals for 21 common biochemical properties. Scand J Clin Lab Invest. 2013; 73: 1–9.
30. Kohse KP. KiGGS — the German survey on children's health as data base for reference intervals and beyond. Clin Biochem 2014; 47: 742–3.
31. Kamtsiuris P, Lange M, Schaffrath RA. The German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents (KiGGS): sample design, response and nonresponse analysis. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 2007; 50: 547–56.
32. Kohse KP, Thamm M. KiGGS-the German survey on children's health as database for reference intervals. Clin Biochem. 2011; 44: 479.

33. Thierfelder W, Dortschy R, Hintzpeter B, Kahl H, Scheidt-Nave C. Biochemical measures in the German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents (KiGGS). *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2007; 50: 757–70.
34. Witte T, Ittermann T, Thamm M, Riblet NB, Volzke H. Association between serum thyroid-stimulating hormone levels and serum lipids in children and adolescents: a population-based study of german youth. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015; 100: 2090–97.
35. Southcott EK, Kerrigan JL, Potter JM, Telford RD, Waring P, Reynolds GJ, et al. Establishment of pediatric reference intervals on a large cohort of healthy children. *Clin Chim Acta*. 2010; 411: 1421–7.
36. Koerbin G, Abhayaratna WP, Potter JM, Apostoloska S, Telford RD, Hickman PE. NTproBNP concentrations in healthy children. *Clin Biochem*. 2012; 45: 1158–60.
37. Mortensen ME, Caudill SP, Caldwell KL, Ward CD, Jones RL. Total and methyl mercury in whole blood measured for the first time in the U.S. population: NHANES 2011–2012. *Environ Res*. 2014; 134: 257–64.
38. Kamycheva E, Goto T, Camargo CA, Jr. Celiac disease is associated with reduced bone mineral density and increased FRAX scores in the US National Health and Nutrition Examination Survey. *Osteoporos Int*. 2016.
39. Breslow RA, Wideroff L, Graubard BI, Erwin D, Reichman ME, Ziegler RG, et al. Alcohol and prostate cancer in the NHANES I epidemiologic follow-up study. First National Health and Nutrition Examination Survey of the United States. *Ann Epidemiol*. 1999; 9: 254–61.
40. Patel MA, Mener DJ, Garcia-Esquinas E, Navas-Acien A, Agrawal Y, Lin SY. Tobacco smoke exposure and eustachian tube disorders in US children and adolescents. *PLoS One*. 2016; 11: e0163926.
41. Cheng CK, Chan J, Cembrowski GS, van Assendelft OW. Complete blood count reference interval diagrams derived from NHANES III: stratification by age, sex, and race. *Lab Hematol*. 2004; 10: 42–53.
42. Hollowell JG, van Assendelft OW, Gunter EW, Lewis BG, Najjar M, Pfeiffer C. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics. Hematological and iron-related analytes-reference data for persons aged 1 year and over: United States, 1988–94. *Vital Health Stat*. 2005; (247): 1–156.
43. Wener MH, Daum PR, McQuillan GM. The influence of age, sex, and race on the upper reference limit of serum C-reactive protein concentration. *J Rheumatol*. 2000; 27: 2351–9.
44. Kant AK, Graubard BI. Race-ethnic, family income, and education differentials in nutritional and lipid biomarkers in US children and adolescents: NHANES 2003–2006. *Am J Clin Nutr*. 2012; 96: 601–12.
45. Rustad P, Felding P, Lahti A, Hyltoft Petersen P. Descriptive analytical data and consequences for calculation of common reference intervals in the Nordic Reference Interval Project 2000. *Scand J Clin Lab Invest*. 2004; 64: 343–70.
46. Rustad P, Felding P, Franzson L, Kairisto V, Lahti A, Martensson A, et al. The Nordic Reference Interval Project 2000: recommended reference intervals for 25 common biochemical properties. *Scand J Clin Lab Invest*. 2004; 64: 271–84.
47. Urdal P, Bolann B, Marstein S, Rustad P, Steensland H, Asberg A. Updated reference intervals for clinical chemical components. *Tidsskr Nor Lægeforen*. 2004; 124: 1515–7.
48. Rustad P, Felding P, Lahti A. Nordic Reference Interval Project 2000. Proposal for guidelines to establish common biological reference intervals in large geographical areas for biochemical quantities measured frequently in serum and plasma. *Clin Chem Lab Med*. 2004; 42: 783–91.
49. Макарова Г. А., Гришина Ж. В., Чернуха С. М., Базанович С. А., Ядгаров М. Я., Фещенко В. С. Центильные градации морфологических и биохимических показателей крови у спортсменов: особые подходы к анализу и оценке. *Лечебная физкультура и спортивная медицина*. 2020; 1 (155): 14–21.
50. Гришина Ж. В., Макарова Г. А., Базанович С. А., Чернуха С. М., Ядгаров М. Я., Фещенко В. С. и др. Скрытые нарушения метаболизма у высококвалифицированных спортсменов. *Спортивная медицина: наука и практика*. 2020; 10 (4): 64–75.
51. Wilasco MI, Goldani HA, Dornelles CT, Maurer RL, Kielling CO, Porowski M, et al. Ghrelin, leptin and insulin in healthy children: Relationship with anthropometry, gender, and age distribution. *Regul Pept*. 2012; 173: 21–26.

References

1. Dyomin VF, Klyuchnikov SO, Balykovej LA, Samojlova AS, redaktory. *Avtorskie lekciy po pediatrii. Detskaya sportivnaya medicina*. 2017; 10: 81–99. Russian.
2. Tahmasebi H, Higgins V, Fung A, Truong D, White-Ai Habeeb N, Adeli K. Pediatric reference intervals for biochemical markers: gaps and challenges, recent national initiatives and future perspectives. 2017; 28 (1): 43–63.
3. Dudnikova EhV, redaktor. *Fiziologicheskie konstanty u detej: ucheb.-metodicheskoe posobie*. Rostov-n/D: Izd-vo RostGMU, 2016; 46 s. Russian.
4. Evgina SA, Savelev LI. *Sovremennye teoriya i praktika referentnyy intervalov. Laboratornaya sluzhba*. 2019; 8 (2): 36–44. Russian.
5. GOST R 53022.3-2008 «*Texnologii laboratornye klinicheskie. Trebovaniya k kachestvu klinicheskix laboratornyx issledovaniy. Ch. 3. Pravila ocenki klinicheskoy informativnosti laboratornyx testov*». M.: Standartinform, 2009; 22 c.
6. Boyd JC. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; Approved guideline, CLSI document C28-A3*. 2010; 28 (3).
7. Yang L, Grey V. Pediatric reference intervals for bone markers. *Clin Biochem*. 2006; 39: 561–8.
8. Colantonio DA, Kyriakopoulou L, Chan MK, Daly CH, Brinc D, Venner AA, et al. Closing the gaps in pediatric laboratory reference intervals: a CALIPER database of 40 biochemical markers in a healthy and multiethnic population of children. *Clin Chem*. 2012; 58: 854–68.
9. Delvin EE, Laxmi Grey V, Vergee Z, CALIPER Working Group. Gap analysis of pediatric reference intervals related to thyroid hormones and the growth hormone-insulin growth factor axis. *Clin Biochem*. 2006; 39: 588–94.
10. Konforte D, Shea JL, Kyriakopoulou L, Colantonio D, Cohen AH, Shaw J, et al. Complex biological pattern of fertility hormones in children and adolescents: a study of healthy children from the CALIPER cohort and establishment of pediatric reference intervals. *Clin Chem*. 2013; 59: 1215–27.
11. Grishina ZhV, Klyuchnikov SO, Yashin TA, Makarova GA, Lomazova EV, Bushueva IE, i dr. *Referentnyye intervaly bioximicheskix pokazatelej krvi u yunyx sportsmenov. Voprosy prakticheskoy pediatrii*. 2022; 17 (1): 71–78. Russian.
12. Tate JR, Sikaris KA, Jones GR, Yen T, Koerbin G, Ryan J, et al. Harmonising adult and paediatric reference intervals in australia and new zealand: an evidence-based approach for establishing a first panel of chemistry analytes. *Clin Biochem Rev*. 2014; 35: 213–35.
13. Jones GR, Koetsier SD. RCPAQAP First Combined Measurement and Reference Interval Survey. *Clin Biochem Rev*. 2014; 35: 243–50.
14. Bailey D, Colantonio D, Kyriakopoulou L, Cohen AH, Chan MK, Armbruster D, et al. Marked biological variance in endocrine and biochemical markers in childhood: establishment of pediatric reference intervals using healthy community children from the CALIPER cohort. *Clin Chem*. 2013; 59: 1393–405.
15. Raizman JE, Cohen AH, Teodoro-Morrison T, Wan B, Khun-Chen M, Wilkenson C, et al. Pediatric reference value distributions for vitamins A and E in the CALIPER cohort and establishment of age-stratified reference intervals. *Clin Biochem*. 2014; 47: 812–5.
16. Yazdanpanah M, Bailey D, Walsh W, Wan B, Adeli K. Analytical measurement of serum 25-OH-vitamin D(3), 25-OH-vitamin D(2) and their C3-epimers by LC-MS/MS in infant and pediatric specimens. *Clin Biochem*. 2013; 46: 1264–71.
17. Brinc D, Chan MK, Venner AA, Pasic MD, Colantonio D,

- Kyriakopoulou L, et al. Long-term stability of biochemical markers in pediatric serum specimens stored at -80 degrees C: a CALIPER Substudy. *Clin Biochem.* 2012; 45: 816-26.
18. Bailey D, Bevilacqua V, Colantonio DA, Pasic MD, Perumal N, Chan MK, et al. Pediatric within-day biological variation and quality specifications for 38 biochemical markers in the CALIPER cohort. *Clin Chem.* 2014; 60: 518-29.
 19. Pasic MD, Colantonio DA, Chan MK, Venner AA, Brinc D, Adeli K. Influence of fasting and sample collection time on 38 biochemical markers in healthy children: a CALIPER substudy. *Clin Biochem.* 2012; 45: 1125-30.
 20. Bevilacqua V, Chan MK, Chen Y, Armbruster D, Schodin B, Adeli K. Pediatric population reference value distributions for cancer biomarkers and covariate-stratified reference intervals in the CALIPER cohort. *Clin Chem.* 2014; 60: 1532-42.
 21. Teodoro-Morrison T, Kyriakopoulou L, Chen YK, Raizman JE, Bevilacqua V, Chan MK, et al. Dynamic biological changes in metabolic disease biomarkers in childhood and adolescence: A CALIPER study of healthy community children. *Clin Biochem.* 2015; 48: 828-36.
 22. Raizman JE, Quinn F, Armbruster DA, Adeli K. Pediatric reference intervals for calculated free testosterone, bioavailable testosterone and free androgen index in the CALIPER cohort. *Clin Chem Lab Med.* 2015; 53: e239-e243.
 23. Flanders MM, Crist RA, Roberts WL, Rodgers GM. Pediatric reference intervals for seven common coagulation assays. *Clin Chem.* 2005; 51: 1738-42.
 24. Kushnir MM, Rockwood AL, Roberts WL, Pattison EG, Owen WE, Bunker AM, et al. Development and performance evaluation of a tandem mass spectrometry assay for 4 adrenal steroids. *Clin Chem.* 2006; 52: 1559-67.
 25. Clifford SM, Bunker AM, Jacobsen JR, Roberts WL. Age and gender specific pediatric reference intervals for aldolase, amylase, ceruloplasmin, creatine kinase, pancreatic amylase, prealbumin, and uric acid. *Clin Chim Acta.* 2011; 412: 788-90.
 26. Johnson-Davis KL, Moore SJ, Owen WE, Cutler JM, Frank EL. A rapid HPLC method used to establish pediatric reference intervals for vitamins A and E. *Clin Chim Acta.* 2009; 405: 35-38.
 27. Meikle AW, Kushnir MM, Rockwood AL, Pattison EG, Terry AH, Sandrock T, et al. Adrenal steroid concentrations in children seven to seventeen years of age. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2007; 20: 1281-91.
 28. Wyness SP, Roberts WL, Straseski JA. Pediatric reference intervals for four serum bone markers using two automated immunoassays. *Clin Chim Acta.* 2013; 415: 169-72.
 29. Hilsted L, Rustad P, Aksglaede L, Sorensen K, Juul A. Recommended Nordic paediatric reference intervals for 21 common biochemical properties. *Scand J Clin Lab Invest.* 2013; 73: 1-9.
 30. Kohse KP. KiGGS — the German survey on children's health as data base for reference intervals and beyond. *Clin Biochem* 2014; 47: 742-3.
 31. Kamtsiuris P, Lange M, Schaffrath RA. The German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents (KiGGS): sample design, response and nonresponse analysis. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2007; 50: 547-56.
 32. Kohse KP, Thamm M. KiGGS-the German survey on children's health as database for reference intervals. *Clin Biochem.* 2011; 44: 479.
 33. Thierfelder W, Dortschy R, Hintzpete B, Kahl H, Scheidt-Nave C. Biochemical measures in the German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents (KiGGS). *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2007; 50: 757-70.
 34. Witte T, Ittermann T, Thamm M, Riblet NB, Volzke H. Association between serum thyroid-stimulating hormone levels and serum lipids in children and adolescents: a population-based study of german youth. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015; 100: 2090-97.
 35. Southcott EK, Kerrigan JL, Potter JM, Telford RD, Waring P, Reynolds GJ, et al. Establishment of pediatric reference intervals on a large cohort of healthy children. *Clin Chim Acta.* 2010; 411: 1421-7.
 36. Koerbin G, Abhayaratna WP, Potter JM, Apostoloska S, Telford RD, Hickman PE. NTproBNP concentrations in healthy children. *Clin Biochem.* 2012; 45: 1158-60.
 37. Mortensen ME, Caudill SP, Caldwell KL, Ward CD, Jones RL. Total and methyl mercury in whole blood measured for the first time in the U.S. population: NHANES 2011-2012. *Environ Res.* 2014; 134: 257-64.
 38. Kamycheva E, Goto T, Camargo CA, Jr. Celiac disease is associated with reduced bone mineral density and increased FRAX scores in the US National Health and Nutrition Examination Survey. *Osteoporos Int.* 2016.
 39. Breslow RA, Wideroff L, Graubard BI, Erwin D, Reichman ME, Ziegler RG, et al. Alcohol and prostate cancer in the NHANES I epidemiologic follow-up study. *First National Health and Nutrition Examination Survey of the United States.* *Ann Epidemiol.* 1999; 9: 254-61.
 40. Patel MA, Mener DJ, Garcia-Esquinas E, Navas-Acien A, Agrawal Y, Lin SY. Tobacco smoke exposure and eustachian tube disorders in US children and adolescents. *PLoS One.* 2016; 11: e0163926.
 41. Cheng CK, Chan J, Cembrowski GS, van Assendelft OW. Complete blood count reference interval diagrams derived from NHANES III: stratification by age, sex, and race. *Lab Hematol.* 2004; 10: 42-53.
 42. Hollowell JG, van Assendelft OW, Gunter EW, Lewis BG, Najjar M, Pfeiffer C. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics. Hematological and iron-related analytes-reference data for persons aged 1 year and over: United States, 1988-94. *Vital Health Stat.* 2005; (247): 1-156.
 43. Wener MH, Daum PR, McQuillan GM. The influence of age, sex, and race on the upper reference limit of serum C-reactive protein concentration. *J Rheumatol.* 2000; 27: 2351-9.
 44. Kant AK, Graubard BI. Race-ethnic, family income, and education differentials in nutritional and lipid biomarkers in US children and adolescents: NHANES 2003-2006. *Am J Clin Nutr.* 2012; 96: 601-12.
 45. Rustad P, Felding P, Lahti A, Hyltoft Petersen P. Descriptive analytical data and consequences for calculation of common reference intervals in the Nordic Reference Interval Project 2000. *Scand J Clin Lab Invest.* 2004; 64: 343-70.
 46. Rustad P, Felding P, Franzson L, Kairisto V, Lahti A, Martensson A, et al. The Nordic Reference Interval Project 2000: recommended reference intervals for 25 common biochemical properties. *Scand J Clin Lab Invest.* 2004; 64: 271-84.
 47. Urdal P, Bolann B, Marstein S, Rustad P, Steensland H, Asberg A. Updated reference intervals for clinical chemical components. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 2004; 124: 1515-7.
 48. Rustad P, Felding P, Lahti A. Nordic Reference Interval Project 2000. Proposal for guidelines to establish common biological reference intervals in large geographical areas for biochemical quantities measured frequently in serum and plasma. *Clin Chem Lab Med.* 2004; 42: 783-91.
 49. Makarova GA, Grishina ZhV, Chernuxa SM, Bazanovich SA, Yadgarov MYa, Feshhenko VS. Centil'nye gradacii morfologicheskix i bioximicheskix pokazatelej krovi u sportsmenov: osobye podxody k analizu i ocenke. *Lechebnaya fizkul'tura i sportivnaya medicina.* 2020; 1 (155): 14-21. Russian.
 50. Grishina ZhV, Makarova GA, Bazanovich SA, Chernuxa SM, Yadgarov MYa, Feshhenko VS, i dr. Skrytye narusheniya metabolizma u vysokokvalificirovannyx sportsmenov. *Sportivnaya medicina: nauka i praktika.* 2020; 10 (4): 64-75. Russian.
 51. Wilasco MI, Goldani HA, Dornelles CT, Maurer RL, Kieling CO, Porowski M, et al. Ghrelin, leptin and insulin in healthy children: Relationship with anthropometry, gender, and age distribution. *Regul Pept.* 2012; 173: 21-26.

МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РАЗРАБОТКИ И ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ В ИНТЕРЕСАХ АРКТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

М. В. Волкова [✉], С. А. Бирюков

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Москва, Россия

Освоение арктических территорий неразрывно связано с возникновением медико-биологических проблем. Необходима разработка медицинских изделий и лекарственных средств для профилактики или оказания неотложной помощи в условиях Арктики. В обзоре представлен анализ дополнительных требований к лекарственным препаратам, предназначенным для использования в условиях Крайнего Севера, и аналитическое сравнение методов моделирования экстремальных состояний у животных. Обозначены медико-биологические проблемы региона и акцентировано внимание на основных направлениях арктической фармакологии: выборе лекарственной формы, использовании криопротекторов и разработке адаптогенов. Основное внимание уделено поиску информации по моделированию экстремальных факторов окружающей среды в экспериментах на животных, так как это является ключевым звеном в доклинических исследованиях препаратов для арктической медицины. Показаны актуальные направления дальнейшей работы для развития данного направления: разработка критериев оценки состояния гипоксии и гипотермии, разработка методов моделирования на крупных лабораторных животных, совершенствование технического оснащения.

Ключевые слова: гипоксия, гипотермия, фотопериодизм, экстремальные факторы внешней среды, исследования на животных

Вклад авторов: М. В. Волкова — разработка концепции, сбор и анализ литературы, подготовка рукописи; С. А. Бирюков — редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: работа выполнена с соблюдением принципов Хельсинкской декларации Всемирной медицинской организации (2013 г.) и последующих ее пересмотров.

✉ **Для корреспонденции:** Марина Викторовна Волкова
Институтский пер., д. 9, г. Долгопрудный, 141701, Россия; biotech.volkova@list.ru

Статья получена: 06.12.2022 **Статья принята к печати:** 25.01.2023 **Опубликована онлайн:** 26.02.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.004

METHODOLOGICAL ASPECTS OF DRUG DEVELOPMENT AND PRECLINICAL RESEARCH IN THE INTERESTS OF ARTIC MEDICINE

Volkova MV [✉], Biryukov SA

Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Moscow, Russia

There is an inextricable link between exploration and development of the Arctic territories and emergence of associated problems of medical and biological nature. It is necessary to design and develop emergency care and prevention drugs and medical devices for use in the Arctic. This review presents an analysis of additional requirements for drugs intended for the Far North and compares methods of modeling extreme conditions in animals. We outline medical and biological problems of the region highlight key areas of Arctic pharmacology: choice of pharmaceutical form, use of cryoprotectants and design of adaptogens. The study mainly revolves around the search for information on modeling extreme environmental factors in animal experiments, as this is a key stage in preclinical studies of drugs for the Arctic medicine. We present the relevant directions of further work promoting the subject: development of the hypoxia and hypothermia assessment criteria, development of modeling methods employing large laboratory animals, improvement of the equipment used.

Keywords: hypoxia, hypothermia, photoperiodism, extreme environmental factors, animal research

Author contribution: Volkova MV — development of the concept, collection and analysis of the published papers, manuscript authoring; Biryukov SA — manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the work was carried out in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki.

✉ **Correspondence should be addressed:** Marina V. Volkova
Instititsky per., 9, Dolgoprudny, 141701, Russia; biotech.volkova@list.ru

Received: 06.12.2022 **Accepted:** 25.01.2023 **Published online:** 26.02.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.004

Почти 18% территории Российской Федерации находятся в Арктическом регионе (АР): от земли Франца-Иосифа до островов Врангеля и Геральд, что составляет около трети всей площади шельфа Арктики. АР значим для России, так как через полярные территории проходят важные транспортные коридоры. Одним из направлений освоения территорий значится добыча углеводородов. В совокупности с другими факторами Арктика имеет глобальное геополитическое значение [1–4].

Постоянно проживающие в регионе люди обеспечивают освоение АР: способствуют комплексному социально-экономическому развитию, проведению научных исследований, формированию инфраструктуры и обеспечению экологической безопасности [3–5]. В то же время, освоение территорий Крайнего Севера неразрывно связано с возникновением медико-физиологических проблем, обусловленных воздействием на организм

человека суровых природно-климатических условий: холода, повышенной электромагнитной активности, радиации, специфического фотопериодизма и т. д. [4, 6–8]. С целью разработки эффективных мер профилактики и лечения была выделена область медицинской науки — арктическая медицина, которая нацелена на выявление и изучение внутренних механизмов адаптации организма человека, выявление особенностей течения различных заболеваний и разработку методов их лечения [9].

При подготовке настоящего обзора использованы ресурсы поисковых систем PubMed и Google Scholar. Предпочтение было отдано источникам, опубликованным за последние 10 лет в базах данных Scopus и Web of Science. Поиск литературы для контент-анализа проведен по вышеуказанным ключевым словам.

Цель обзора — рассмотреть дополнительные требования к лекарственным препаратам (ЛП),

предназначенным для использования в условиях Крайнего Севера, и аналитически сравнить методы моделирования экстремальных состояний у животных.

Медико-биологические проблемы арктического региона

На жизнедеятельность человека оказывают значительное влияние климатогеографические и психофизиологические факторы АР. Это приводит к вовлечению всех физиологических резервов организма и сложной перестройке гомеостатических систем [10–12].

Под действием экстремально низких температур окружающей среды возрастают потребности организма в обогреве, увеличивается теплопродукция тела, что приводит к снижению коэффициента полезного действия физической работы [13]. Происходят изменения в обмене веществ: повышается потребность в белках и жирах, а также в жирорастворимых витаминах, таких как А, D и E [6, 13]. В связи с этим, появляются особые требования к питанию и режиму труда и отдыха [14].

Кроме того, в условиях АР развивается тканевая гипоксия, которая может иметь разные физико-химические или физиологические причины (изменение структуры мембран эритроцитов, осуществляющих доставку кислорода к тканям и т. д.) [14–15]. Высокий кислородный запрос тканей влияет на дыхательную систему организма, вызывая адаптационные изменения органов дыхания для улучшения газообмена: увеличение площади альвеолярной поверхности легких и объема легочных капилляров [14].

Влияние низких температур и разреженной атмосферы Арктики необходимо рассматривать в совокупности, так как не исключается их взаимопотенцирующий эффект [15]. В частности, холод способствует сужению сосудов и снижению интенсивности кровотока, в первую очередь, к коже. Это приводит к локальному охлаждению рук и ног, лица и верхнего дыхательного пути, что является причиной снижения физической работоспособности и изменения функций внешнего дыхания [16–17]. Кроме того, гипоксия в сочетании с холодовым стрессом способствует развитию ишемических изменений кардиомиоцитов, оказывая влияние на сердечно-сосудистую систему [15].

Наравне с воздействием низких температур существенное влияние на физиологическое состояние человека в АР оказывает фотопериодизм [18–19]. Почти все клеточные функции и физиологические системы организма подвержены циркадному контролю, способствующему оптимальной активности организма, энергосбережению и поддержанию внутреннего гомеостаза [20]. Циркадным ритмом (ЦР) управляют внутренние «механизмы», но он синхронизируется с внешними стимулами, основной из которых — свет определенного спектра и интенсивности [21–22]. Для полярной зоны характерны недостаток ультрафиолета и выраженная сезонная асимметрия. Световой стресс в совокупности с холодом вызывают сдвиги в функционировании гормональных систем организма [21, 23]. Рассогласование между ЦР и внешними сигналами может приводить к развитию метаболических, иммунных и психических заболеваний, а также усугублению заживления ран, снижению детоксикации организма и т. д. [24]. Происходит развитие десинхронозов, характеризующихся снижением физической и умственной работоспособности, нарушением сна и непредсказуемостью поведения человека [10, 13, 25].

При изучении факторов АР изменение ЦР организма необходимо рассматривать в совокупности с гипотермией.

Температура тела повышается днем и снижается ночью, что обеспечивает оптимальное течение физиологических процессов. Различные заболевания и особенности их течения тоже связаны с нарушением температуры тела, например, высокая температура, как правило, свидетельствует о значительной системной воспалительной реакции [26].

В АР световой эффект, обусловленный прямыми и отраженными от снежного покрова солнечными лучами, выступает в качестве агрессивного фактора. Воздействие света видимого и ультрафиолетового спектра усугубляется малым углом падения. Без профилактики и средств защиты происходит ожог конъюнктивы и роговой оболочки глаза, называемый снежной слепотой [27].

Другой медико-биологической проблемой АР является широкое распространение инфекционных заболеваний, в том числе природно-очагового характера (сибирская язва и др.). Это обусловлено как большим количеством кровососущих двукрылых в летний период, так и скученным размещением людей, большую часть времени пребывающих в искусственной среде [6, 28]. Немалую роль играет и низкое качество воды. Талые воды содержат тяжелые металлы, органические загрязнители и различных микроорганизмов. При длительном употреблении такая вода нарушает водно-солевой обмен в организме, способствуя вымыванию солей и замедлению восстановления тканей при травмах [29].

Отдельно следует выделить заболевания, которые в АР распространены больше, чем в средней полосе [1]. Заживление различных травм кожи и мягких тканей, в частности обморожений, осложнено наличием тканевой гипоксии и развитием ишемически-реперфузионного синдрома в следствие общего переохлаждения. Переохлаждение приводит к увеличению тяжести травм путем нарушения плазматической коагуляции и функций тромбоцитов, иммуносупрессии, повышению риска развития сепсиса. Повреждение местных сосудов увеличивает гипоксию в травмированных тканях, что препятствует синтезу коллагена и ангиогенезу и значительно снижает темпы регенерации тканей в целом. В результате, хирургическое вмешательство в сроки, установленные принятыми стандартами лечения, может быть отложено. Это увеличивает риск смерти тяжелораненого пациента [30–31].

Экстремальные климатические условия, низкая плотность населения, удаленность и труднодоступность районов сказываются на организации систем оказания медицинской помощи (МП), в том числе при спасении людей, пострадавших в чрезвычайных ситуациях [30]. Поэтому разработка новых методов лечения также необходима в связи с особенностями оказания МП.

Осуществление большинства медицинских манипуляций невозможно в условиях холодного климата. Поэтому создание современного оборудования, медицинских изделий (МИ) и ЛП, пригодных для применения в АР, стратегически важно. Одним из ключевых условий становится устойчивость к воздействию экстремально низких температур. В качестве дополнительных можно отметить устойчивость к влажности и радиации, ветровым нагрузкам и осадкам, а также стабильность при множественных циклах воздействия неблагоприятных факторов.

Применение ЛП и МИ для лечения заболеваний в АР можно разделить на три категории. В первую группу входят ЛП, необходимые для оказания первой помощи при

жизнеугрожающем состоянии. Использование таких ЛП и МИ, в частности для обезболивания, остановки массивных кровотечений или предотвращения асфиксии, происходит на открытом воздухе в наиболее агрессивных условиях. Во вторую группу можно объединить ЛП, предназначенные для использования в условиях ограниченного объема помещений, например медпункта. Воздействие ветров, осадков и низкой температуры в этом случае минимально и происходит преимущественно при транспортировке. В эту группу помимо ЛП для оказания первой помощи могут быть включены и профилактические средства. Третья группа объединяет в себе ЛП, МИ и, потенциально, может включать клеточные продукты, применяемые в условиях медицинского стационара вне АР. Выделение данной группы из всего спектра разработанных ЛП обусловлено сочетанным воздействием факторов Крайнего Севера на организм, которое приводит к усложнению патогенеза заболеваний.

Лекарственные препараты для профилактики и лечения

Для профилактики заболеваний и оказания первой помощи пострадавшим на Севере нужен определенный набор ЛП и МИ. Можно выделить следующие группы необходимых ЛП: сердечно-сосудистые препараты, анальгетики и спазмолитики, антибиотики и противовирусные препараты, ЛП для оказания помощи при респираторных заболеваниях и отморожениях, адаптогены и профилактические препараты (например, для защиты глаз), витамины.

При выборе конкретных ЛП необходимо учитывать ряд факторов, ограничивающих их применение в АР. Многие ЛП нельзя замораживать. Жидкие лекарственные формы (ЛФ) рассчитаны преимущественно на использование при положительной температуре окружающей среды. На стабильность ЛП может оказывать влияние транспортировка, которую проводят на сотни километров зачастую без использования специально оборудованного транспорта. Низкие температуры, высокая влажность, яркое освещение и механические воздействия, а также неконтролируемые циклы размораживания/замораживания непосредственно влияют на качество ЛП. Необходимо также учитывать возможное усиление побочных реакций ЛП на организм.

Наиболее удобными в применении остаются твердые и мягкие ЛФ. Воздействие низких температур приводит к повышению хрупкости ЛФ, нарушению целостности пленочной оболочки таблеток и капсул. Различные пластыри и повязки под воздействием низких температур могут терять клейкие и функциональные свойства. При оказании МП на месте их применение сильно ограничено из-за наличия многослойной одежды. Использование порошков и гранул для приготовления жидких форм может быть затруднено.

Для оказания первой помощи наиболее эффективны инъекционные ЛП (например, обезболивающие). Они менее устойчивы к многократным циклам размораживания/замораживания. С целью сокращения времени разморозки и/или предотвращения замерзания, а также защиты активного компонента от деградации могут быть использованы криопротекторы: спирты, полимерные соединения и др. [32]. Криопротектор должен быть не токсичным, не накапливаться в организме и быстро выводиться из него, чтобы предотвратить развитие побочных эффектов [33]. Другим важным требованием является отсутствие отрицательного влияния на активное вещество.

Одним из перспективных криопротекторов может быть пропиленгликоль — многоатомный спирт, полностью метаболизирующийся в организме [33–34]. На сегодняшний день его используют в качестве вспомогательного вещества в ЛП диазепама (200 мг пропиленгликоля на 1 мл препарата, что составляет 19% от объема) и других для внутримышечного или внутривенного введения. Предварительные исследования показали, что добавление к анестетику пропиленгликоля в концентрации менее 40% обеспечивало снижение температуры замерзания до значений ниже минус 25 °С. При этом отсутствовал негативный эффект пропиленгликоля на эффективность активного компонента (неопубликованные данные).

Помимо совершенствования имеющихся ЛП, разрабатываются адаптогены — биологически активные вещества растительного или животного происхождения, предназначенные для холодовой и когнитивной адаптации организма к экстремальным условиям и повышению физических возможностей. Разработка адаптогенов является сложной задачей: отсутствует конкретная фармакологическая мишень, необходимо комплексное действие на различные органы и системы. Кроме того, существует проблема, что препараты данной группы отличаются по своей активности в зависимости от производителя [35].

Только малое количество ЛП и МИ выпускается специально для использования в условиях Арктики. Это связано с тем, что к данным препаратам предъявляют дополнительные требования по оценке возможности их применения в условиях сочетанного действия экстремальных внешних факторов.

Моделирование экстремальных условий в экспериментах на животных

Оценить *in vitro* стабильность ЛП, как и МИ, после воздействия агрессивных факторов, присущих Крайнему Северу, можно путем испытаний на климатических стендах с последующим использованием современных физико-химических и биохимических методов.

Возможности проведения исследований *in vivo* сильно ограничены. Требуются разработка и внедрение моделей, позволяющих оценивать функции сердечно-сосудистой и нервной, эндокринной и иммунной систем организма, а также внешнего дыхания. Такие исследования позволили бы регулировать адаптационные возможности человека в условиях АР [4, 36].

Фактором, значительно ограничивающим работоспособность, является гипоксия. Экспериментально установлено, что дыхание газовой смесью с 10% кислорода приводит к изменениям в легочной вентиляции уже в первые минуты: гипервентиляция и возрастание минутного объема дыхания являются наиболее ранними компенсаторными механизмами [37]. Поэтому первоочередными условиями для изучения адаптационных возможностей организма являются эксперименты в условиях гипоксической гипоксии, связанной с изменением барометрического давления вдыхаемого воздуха или понижением процентного содержания кислорода в воздухе [38]. Исследования преимущественно проводят на грызунах, которых помещают в гермокамеры различного объема с заданным уровнем разрежения атмосферы или газовой смеси. Тем не менее для разных моделей отсутствует единый методический подход для оценки выраженности созданного гипоксического состояния. Использование

Таблица 1. Способы моделирования гипотермии у грызунов

Вид	Способ	$t_{\text{внеш}}^{\circ}\text{C}$	τ	N	$t_{\text{рект}}^{\circ}\text{C}$	Дополнительные факторы	Ссылка
Мыши	контактный (метал. пластина)	18	8 ч	1	33	наркоз	42
Крысы	холодная вода	12–14	10–20 мин	1	34–35	фиксация	41
	гермокамера	4–6	160 мин	1	36–38	фиксация, влажность 75–80%	
Крысы	гермокамера	1–2	3,5–4 ч	1	14–18	гипоксия (камера 5л)	43
Крысы	гермокамера	2–6	2 суток	10	36–37	гипоксия (15% O ₂)	44
Крысы	гермокамера	минус 25	3-9 ч	1	30	нет	45
Крысы	гермокамера	4-6	14 суток	группы	33	гипоксия (30–50 мг/кг NaNO ₂), влажность 75–80%, стрессовые факторы (свет, звук, ограничение корма)	23

Примечание: $t_{\text{внеш}}$ — температура окружающей среды; τ — время содержания в имитируемых экстремальных условиях; N — количество животных, одновременно находившихся в имитируемых условиях (в одной клетке в случае использования гермокамер; группы — точное количество животных в одной клетке не указано); $t_{\text{рект}}$ — ректальная температура животных, по истечении времени содержания или по достижении которой животных удаляли из имитируемых условий; в дополнительных факторах перечислены условия, созданные во время содержания животных в имитируемых экстремальных условиях, например фиксация животных в пластиковом пенале.

тестов с гипоксической гипоксией для оценки действия ЛП на организм не позволяют конкретизировать ее уровень, а только подтверждают наличие и выраженность антигипоксического действия препаратов [38].

Моделирование гипотермии более вариабельно. Добиться снижения температуры тела можно с помощью охлаждения воздуха в гермокамере, путем погружения в холодную воду [39–40], обкладыванием тела фиксированного животного льдом или помещением на холодную поверхность [41], а также их комбинированием. Понижение температуры тела животного и влияние индивидуальных различий на результаты будут зависеть от условий эксперимента (табл. 1).

Соответствие температуры тела определенному состоянию необходимо оценивать с учетом физиологических особенностей грызунов, но единой классификации для этого нет. В одних исследованиях температура тела ниже 37 °C является пониженной, а 35 °C — критической [46], в других ориентируются на показатели умеренной гипотермии 32–35 °C [23]. Таким образом, для моделирования гипотермии тоже необходима разработка единых методических рекомендаций на основе справочных данных о физиологических особенностях выбранных животных.

Несмотря на то что для достижения нужной температуры тела животного в условиях холодного воздуха требуется больше времени, моделирование гипотермии преимущественно осуществляют с помощью гермокамер (табл. 1), так как возможно успешное их сочетание с другими факторами, например, гипоксией [15]. Для усиления холодового воздействия на животных создают повышенную влажность в камере. В одном исследовании использовали свет как дополнительный стрессорный фактор.

Как говорилось ранее, наравне с гипотермией и гипоксией значительное влияние на организмы в АР оказывает фотопериодизм. ЦР следует учитывать при разработке режимов дозирования и оценке эффективности ЛП, а также при измерении их уровня в крови. Подтверждено также, что острые симптомы многих заболеваний и состояний проявляются в определенное время суток (инфаркт миокарда, ревматоидный артрит). Таким образом, циркадная регуляция молекулярных процессов может влиять на патологическое состояние и на результаты терапии [20].

Изменение ЦР у животных в эксперименте возможно тремя способами: светом, едой и температурой.

Температура окружающей среды обладает слабым синхронизирующим эффектом, так как животные имеют внутренние механизмы, обеспечивающие температурную компенсацию. Сбросить ЦР можно и с помощью несветового стимула. Питание, ограниченное по времени, часто используют для изучения ЦР, но при периоде менее 6 ч животные не могут съесть эквивалентное количество корма по сравнению с режимом *ad libitum* [44]. Это дополнительное стрессорное воздействие необходимо учитывать в эксперименте.

Для экспериментов по моделированию условий АР наиболее предпочтителен, на наш взгляд, световой фактор. Под стандартным содержанием животных подразумевают, как правило, использование равноденственного фотопериода (12-часовой день). Увеличение светового дня до 22 ч или его снижение до 2 ч позволяет создать условия, сбивающие ЦР животных. Например, грызуны активны в темное время суток, поэтому стрессом для них будет увеличение светового дня.

По литературным данным проведем сравнение всех имеющихся методов и возможность их сочетания (табл. 2). Большинство методов охарактеризовано на основании единичных публикаций. Поэтому недостаток числа экспериментальных исследований остается одной из основных проблем при формировании методических рекомендаций для доклинических исследований ЛП, предназначенных для применения в АР. Единственным документом на сегодняшний день являются рекомендации по изучению антигипоксической активности лекарств [38], рассматривающие моделирование различных гипоксических состояний у животных. К сожалению, подобных методических рекомендаций для моделирования гипотермии или фотопериодизма обнаружено не было.

С учетом достоинств и недостатков конкретных методов, а также возможности их сочетания можно сформулировать следующие рекомендации по моделированию арктических факторов в доклинических исследованиях на мелких лабораторных животных. Проведение исследований требует длительного содержания грызунов, поэтому для создания гипотермии необходимо использование гермокамеры. Рекомендуемая температура — 2–6 °C. Число животных в клетке — не более пяти, так как в больших группах они сбиваются вместе и согреваются друг друга. Содержание по одной особи в клетке предпочтительно, но не всегда возможно. Для увеличения воздействия холодового фактора в камере может быть создана повышенная влажность. Если эксперимент

Таблица 2. Методы моделирования экстремальных условий Арктики

Фактор	Способ	Достоинства	Недостатки	Возможные сочетания с другими стрессовыми факторами	Возможность оценки физической или поведенческой активности*	Длительность эксперимента
Гипоксия	Использование гермокамеры	Применим для группы животных; использование не требует дополнительных навыков	Преимущественно для мелких лабораторных животных; необходимо ограничение манипуляций с животными; контроль заданных параметров в разных точках камеры	Гипотермия (гермокамера, холодная вода), фотопериодизм (свет, корм)	Тесты, которые могут быть проведены внутри камеры, или другие тесты вне камеры в течение короткого промежутка времени (до 5 мин)	Несколько суток и более
	Ингаляция (маска)	Точно заданный состав вдыхаемого воздуха	Преимущественно для крупных лабораторных животных; необходимо приучение к ношению маски	Гипотермия (все), фотопериодизм (свет)	В зависимости от теста	Несколько часов
	Гемическая (в/в введение окислителя гемоглобина)	Создание определенного уровня гипоксии	Необходим подбор концентрации и способа введения для каждого вида животных; возможна индивидуальная непереносимость	Гипотермия (все), фотопериодизм (свет, корм)	Проведение любых тестов (теоретически)	Несколько суток и более
Гипотермия	Использование гермокамеры	Применим для группы животных; использование не требует дополнительных навыков	Преимущественно для мелких лабораторных животных; контроль заданных параметров в разных точках камеры	Гипоксия (все), фотопериодизм (свет, корм)	Тесты, которые могут быть проведены внутри камеры, или другие тесты вне камеры в течение короткого промежутка времени (до 5 мин)	Несколько суток и более
	Помещение в холодную воду	Быстрое достижение требуемой температуры тела животного; возможно совмещение с физической нагрузкой (плавание, плавание с грузом)	Выше разница между резистентными и чувствительными к холоду животными	Гипоксия (гермокамера, гемическая)	Плавание либо извлечение животного из воды на короткий промежуток времени для проведения других тестов	Несколько часов
	Контактный (холодная поверхность, лед)	Удобно контролировать физиологические параметры при снижении температуры тела	Требуется наркоз; для каждого животного индивидуально	Гипоксия (маска, гемическая)	Невозможно	Несколько часов

Примечание: * — указывается возможность проведения тестов при сохранении воздействия стрессовых факторов на организм.

не подразумевает проведение поведенческих или длительных экспериментов (более 5 мин) с извлечением животного из камеры в ходе всего периода нахождения его в контролируемых условиях, то гипоксию также предпочтительнее создавать ингаляционно, путем поддержания в гермокамере заданного уровня кислорода. При необходимости проведения периодических тестов или неоднократных ежедневных манипуляций следует рассмотреть возможность использования гермокамер небольшого объема на 2–3 клетки с несколькими животными, индивидуальных гермокамер или создание гемической гипоксии. Это необходимо для сокращения времени пребывания животных вне условий гипоксии и времени на восстановление заданного уровня кислорода в воздухе в случае использования гермокамер.

Ввиду отсутствия рекомендаций, стандартизованного оборудования и достаточного объема практических исследований, перед каждым исследованием необходимо проведение предварительного эксперимента на конкретной установке. Во-первых, это позволит оценить влияние гипоксии и гипотермии на организм животного в каждом конкретном случае (измерение температуры тела через короткие промежутки времени, забор крови и т. д.), и значительно сократит число манипуляций во время проведения основного эксперимента, сохранив информативность получаемых данных. Например, в предварительном эксперименте измерение ректальной

температуры у животных может быть проведено каждые 6–12 ч на протяжении нескольких суток, а во время основного эксперимента его можно сократить до одного раза в сутки и проводить сравнение получаемых значений с полученными в ходе предварительного исследования данными. Во-вторых, значение предварительного эксперимента заключается в выявлении резистентных и чувствительных к стрессовым условиям особей. В исследованиях [23, 41] было показано различное влияние внешних стрессовых факторов на животных: около 10–20% крыс в эксперименте были резистентными, так как температура тела у них снижалась значительно медленнее, чем у других грызунов. Таким образом, в зависимости от условий испытания возможен предварительный отбор, а также формирование экспериментальных групп, содержащих одинаковое число чувствительных и резистентных животных. С учетом литературных данных можно отметить, что для выявления резистентных особей и определения ключевых параметров состояния животных достаточно 2–3 суток. При этом основной эксперимент может занимать до двух недель. Стоит также отметить, что такое двухстадийное исследование подразумевает использование одних и тех же животных. Это требует особого контроля со стороны биоэтической комиссии к процедурам, проводимым в ходе предварительного испытания. Крайне важно минимизировать негативное влияние на состояние животных на первом этапе и

установить оптимальный срок между предварительным и основным экспериментами для их полного восстановления.

Наиболее популярными моделями для исследований являются крысы. Спланировать эксперимент и создать условия АР для других более крупных видов сложно, так как устойчивость к гипоксии крупных лабораторных животных ниже, чем у грызунов [38]. В связи с этим одной из актуальных задач является масштабирование имеющихся или разработка иных способов моделирования экстремальных условий окружающей среды для других видов животных.

Существенным пробелом являются и критерии оценки тяжести факторов. Для мелких лабораторных животных разработаны физиологические и биохимические критерии тяжести гипоксических состояний [38], но для крупных животных подобной характеристики нет. Оценку гипотермии, как правило, проводят по одному показателю — ректальной температуре, а степень устанавливают с опорой на другие литературные данные, выбранные исследователем исходя из личных предпочтений. Стоит отметить, что эти данные пусть и не полностью, но согласуются друг с другом и есть возможность сопоставления полученных результатов. При включении в моделирование экстремальных условий такого фактора, как фотопериодизм, потребуется разработка основных критериев оценки светового стресса у животных, например, температуры и/или уровня кортизола и мелатонина [20].

В связи с широким использованием гермокамер для моделирования условий АР (табл. 1) целесообразно отметить техническую проблему: ввиду отсутствия специализированного оборудования большинство используемых установок созданы под конкретный эксперимент. Это важно, так как воспроизводимость результатов во многом зависит от возможности стандартизации оборудования. Используемые камеры должны обеспечивать максимально равномерное поддержание технологических параметров (температура, уровень кислорода и др.) по всему объему камеры. Отдельной задачей стоит подбор оптимальных способов регистрации жизненных показателей животных, так как открывание гермокамеры влечет за собой нарушение заданных условий и требует времени на восстановление установленных параметров внутри нее. Технологические аспекты необходимо рассматривать и при разработке иных способов моделирования условий АР на других видах животных.

Устойчивость организма к экстремальным воздействиям, а также патогенез заболеваний зависят от множества факторов (возраста, пола и т. д.). Моделирование экстремальных состояний преимущественно проводят на здоровых животных, но в клинической практике воздействию экстремальных факторов больше подвержены люди, имеющие хронические заболевания. Поэтому для объективной экстраполяции предложено работать и с животными, имеющими стойкое патологическое состояние, например, не имеющим одного парного органа [47]. Данное исследование не учитывалось нами при сопоставлении способов моделирования гипотермии у грызунов, так как содержит недостаточно данных о характеристиках моделируемых состояний у животных, но оно подтверждает снижение жизнеспособности животных в экстремальных условиях после нефрэктомии и показывает возможности осуществления данного подхода в экспериментах для оценки ЛП.

В связи с этим, важным аспектом доклинических исследований в интересах арктической медицины

является моделирование патологических состояний. Жители АР имеют свои характерные заболевания. Например, наиболее часто встречаются обморожения, определяемые как комплекс патологических изменений при местном и общем охлаждении организма. Для изучения механизмов развития и лечения, а также исследования ЛП и терапевтических методов, существует несколько экспериментальных моделей [48]. Возможно создание разных степеней обморожения, но при некоторых из них наблюдается плохая воспроизводимость. Кроме того, для большинства клинических случаев характерно поражение конечностей, в то время как в экспериментах на животных травму наносят преимущественно на туловище. Поэтому необходима дальнейшая разработка моделей с целью сочетания криотравмы с другими воздействиями и обеспечения воспроизводимости характеристик ран [48–49].

Исследований по моделированию иных заболеваний, которые могут быть осложнены факторами экстремальной среды Арктики, обнаружено не было. Это является еще одной проблемой в дальнейшем проведении доклинических исследований, так как протекание патологического процесса без лечения в экстремальных условиях потребует дополнительного моделирования и изучения. Оценку эффективности ЛП необходимо будет проводить в сравнении с его действием на животных, которых содержат в стандартных условиях. Нами были разработаны модели рвано-ушибленной раны [44], обморожения и химического ожога, полученные в условиях, имитирующих АР. При разработке последней модели на мышах обнаружено, что нанесение ожога III степени животным, которые в течение суток находились в климатической камере, отличается меньшим временем экспозиции по сравнению с аналогичной разрабатываемой моделью на животных, которых не помещали в гермокамеру (неопубликованные данные). Это может быть обусловлено значительным снижением температуры кожи по сравнению с ректальной температурой, так как известно, что температура спины и конечностей у животных отличается от температуры прямой кишки примерно на 0,5 и 6 °C соответственно [46]. Подобные нюансы могут возникать и при разработке других моделей заболеваний, в первую очередь касающихся кожи, опорно-двигательного аппарата, дыхательной системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на накопленные знания и опыт, апробированного и сертифицированного блока методик для оценки воздействия холода на организм животных не сформировано [37]. Это характерно и для исследования гипоксических состояний *in vivo*. Роль фотопериода в создании экстремальных условий зачастую упускается из виду. В целом, сложное многофакторное моделирование подобных экспериментов обуславливает на сегодняшний день отсутствие единого подхода. Тем не менее эксперименты с воссозданием гипоксии и гипотермии в контролируемых условиях необходимы для проведения не только фармакологических, но и физиологических исследований [37], что, в свою очередь, требует развития теоретической и нормативно-правовой базы, а также создания методических рекомендаций с целью разработки воспроизводимых моделей.

При разработке ЛП для арктической медицины необходимо акцентировать внимание на выборе оптимальной ЛФ, улучшении свойств инъекционных препаратов с помощью криопротекторов. В качестве

одного из актуальных направлений можно выделить разработку адаптогенов.

Наиболее сложной задачей, на наш взгляд, является моделирование экстремальных условий АР в экспериментах на животных. В качестве ключевых факторов стоит выделить гипотермию, гипоксию и фотопериодизм. На сегодняшний день возможно формирование рекомендаций по проведению подобных исследований на мелких лабораторных животных, но существуют значительные пробелы в понимании того, какими методами возможно воссоздать воздействие арктических факторов в эксперименте на крупных моделях. Требуется разработка критериев оценки всех перечисленных состояний и стандартизация технической базы.

Отдельной сферой исследований является моделирование патологических состояний (заболеваний), развитие которых может сопровождаться осложнениями, обусловленными воздействием агрессивных факторов АР. Развитие данного направления способно стимулировать

разработку новых более эффективных ЛП, которые будут применимы не только на Крайнем Севере.

Стоит отметить положительную динамику: с каждым годом данных по адапционным возможностям организмов к экстремальным условиям АР становится все больше. Методики и разрабатываемые гермокамеры для экспериментов *in vivo* могут быть применимы и в других сферах, например, для разработки методов лечения пострадавших в катастрофах, связанных с быстрым охлаждением, таких как аварии на подводных лодках. Данные исследования во многом перекликаются с элементами экстремальных природных факторов высокогорья. Ведущим биотропным фактором в этом случае аналогично выступает падение парциального давления кислорода, способствующее развитию тканевой гипоксии. Низкая температура воздуха со значительными суточными колебаниями и сильные ветры увеличивают риски развития заболеваний органов дыхания, обморожений и озноблений [50].

Литература

1. Азаров И. И., Бутаков С. С., Жолус Б. И., Зеткин А. Ю., Реммер В. Н. Опыт сохранения здоровья военнослужащих в Арктике в повседневной деятельности и чрезвычайных ситуациях. *Морская медицина*. 2017; 3 (3): 102–111.
2. Казакевич Е. В., Архиповский В. Л., Середа А. П., Абакумов А. А. Особенности организации медицинской помощи морякам в условиях Арктики. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2017; 4 (62): 15–20.
3. О национальных целях и стратегических задачах развития Российской Федерации на период до 2024 года: указ Президента Российской Федерации от 07.05.2018 № 204. Доступно по ссылке: <http://www.kremlin.ru/acts/bank/43027>.
4. Сергейчик О. И., Ярославская Е. И., Плюснин А. В. Влияние факторов внешней среды на риск сердечно-сосудистых заболеваний населения Арктики. *Журнал медико-биологических исследований*. 2022; 10 (1): 64–72.
5. Krutikov AV, Smirnova OO, Bocharova LK. Strategy for the Development of the Russian Arctic. *Results and Prospects. Artic and North*. 2020; (40): 213–26.
6. Солонин Ю. Г., Бойко Е. Р. Медико-физиологические проблемы в Арктике. *Известия Коми научного центра УрО РАН*. 2017; 4 (32): 33–40.
7. Журавель В. П. Российская армия, МЧС и росгвардия в Арктике: вопросы безопасности и международного сотрудничества. *Научно-аналитический вестник Института Европы РАН*. 2018; (5): 158–164.
8. Watts N, Amann M, Arnell N, Ayeb-Karlsson S, Beagley J, Belesova K, et al. The 2020 report of the Lancet Countdown on health and climate change: responding to converging crises. *The Lancet*. 2021; 397 (10269): 129–170.
9. Тихонов Д. Г. Арктическая медицина. Якутск: Изд-во ЯНЦ СО РАН, 2010; 320 с.
10. Пряничников С. В. Психофизиологическое состояние организма в зависимости от длительности пребывания в высоких широтах Арктики. *Экология человека*. 2020; 27 (12): 4–10.
11. Grimaldi S, Partonen T, Haukka J, Aromaa A, Lonnqvist. Seasonal vegetative and affective symptoms in the Finnish general population: testing the dual vulnerability and latitude effect hypotheses. *Nordic Journal of Psychiatry*. 2009; 63 (5): 397–404.
12. Гришин О. В., Устюжанинова Н. В. Дыхание на Севере. Функция. Структура. Резервы. Патология. Новосибирск: Art-Avenue, 2006; 253 с.
13. Панин Л. Е. Фундаментальные проблемы приполярной и арктической медицины. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2013; 33 (6): 5–10.
14. Нагибович О. А., Уховский Д. М., Жекалов А. Н., Ткачук Н. А., Аржавкина Л. Г., Богданова Е. Г. и др. Механизмы гипоксии в Арктической зоне Российской Федерации. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2016; (2): 202–5.
15. Заднипрный И. В., Сатаева Т. П., Третьякова О. С. Патоморфологические изменения миокарда крыс при воздействии гипобарической холодовой гипоксии. *Оперативная хирургия и клиническая анатомия*. 2019; 3 (2): 13–18.
16. McDonald A, Stubbs R, Lartey P, Kokot S. *Environmental Injuries: Hypothermia and Hypothermia*. MacEwan University Student Journal. 2020; 4 (1): 1–14.
17. Овечкина Е. С., Овечкин Ф. Ю. Патопфизиология человека в условиях севера России. *Бюллетень науки и практики*. 2021; 7 (8): 185–91.
18. Кочан Т. И. Сезонные изменения показателей углеводного, липидного и белкового обмена у жителей Европейского Севера. *Евразийский союз ученых*. 2016; 7–1 (28): 32–35.
19. Грибанов А. В., Аникина Н. Ю., Котцова О. Н., Вилова Т. В. Сезонная динамика церебрального энергообмена у человека в арктической зоне. *Экология человека*. 2021; (5): 13–19.
20. Gaspar LS, Alvaro AR, Carmo-Silva S, Mendes AF, Relogio A, Cavadas C. The importance of determining circadian parameters in pharmacological studies. *British Journal of Pharmacology*. 2019; 176 (16): 2827–47.
21. Ульяновская С. А., Баженов Д. В., Шестакова В. Г., Калинин М. Н. Влияние климатогеографических факторов Севера на адаптивные реакции организма человека. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2020; 64 (1): 147–154.
22. Arendt J, Middleton B. Human seasonal and circadian studies in Antarctica (Halley, 75 S). *General and comparative endocrinology*. 2018; 258: 250–8.
23. Ганопольский В. П., Агафонов П. В., Матыцын В. О. Моделирование холодо-стрессовой дезадаптации у крыс с целью разработки методов ее фармакологической коррекции. *Российские биомедицинские исследования*. 2022; 7 (1): 3–15.
24. Finger AM, Dibner C, Kramer A. Coupled network of the circadian clocks: a driving force of rhythmic physiology. *FEBS letters*. 2020; 594 (17): 2734–69.
25. Хаснулин В. И., Хаснулин П. В. Современные представления о механизмах формирования северного стресса у человека в высоких широтах. *Экология человека*. 2012; (1): 3–11.
26. Coiffard B, Diallo AB, Mezouar S, Leone M, Mege J-L. A tangled

- threeosome: circadian rhythm, body temperature variations, and the Immune System. *Biology*. 2021; 10 (1): 65.
27. Келехашвили Л. В., Волченкова А. В., Соколова А. С. Гигиеническое обоснование методов коррекции синдрома «снежная слепота» в условиях Арктики. В сборнике: Материалы III Дальневосточного медицинского молодежного форума; 2–4 октября 2019; Хабаровск. Актуальные вопросы современной медицины. 2019: 317–320.
 28. Солдатов Е. А., Голота А. С., Корнилова А. А., Крассий А. Б., Левандо К. К., Чувашев М. Л. и др. Медицинское обеспечение в Арктике: 2015 г. Военно-медицинский журнал. 2016; 337 (5): 44–51.
 29. Мирошниченко Ю. В., Кононов В. Н., Родионов Е. О., Мустаев О. З., Солдатов Е. А., Чувашев М. Л. и др. Влияние особых медико-географических условий Арктики на обеспечение соединений и воинских частей медицинским имуществом. *Фармация и фармакология*. 2017; 5 (4): 368–79.
 30. Котенко П. К., Шевцов В. И. Анализ медико-социальных факторов, определяющих перспективный облик системы оказания медицинской помощи пострадавшим в чрезвычайных ситуациях в Арктической зоне Российской Федерации. *Морская медицина*. 2019; 4 (4): 44–54.
 31. Moffatt SE. Hypothermia in trauma. *Emergency Medicine Journal*. 2013; 30 (12): 989–996.
 32. Raja R, Bryant SJ, Wilkinson BL, Bryant G. The need for novel cryoprotectants and cryopreservation protocols: Insights into the importance of biophysical investigation and cell permeability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2021; 1865 (1): 129749.
 33. Bozkurt Y, editor. *Cryopreservation biotechnology in biomedical and biological sciences*. BoD-Books on Demand; 2018.
 34. Warner RM, Brown KS, Benson JD, Eroglu A, Higgins AZ. Multiple cryoprotectant toxicity model for virification solution optimization. *Cryobiology*. 2022; 108: 1–9.
 35. Куркин В. А., Петрухина И. К., Акушская А. С. Исследование номенклатуры адаптогенных лекарственных препаратов, представленных на фармацевтическом рынке Российской Федерации. *Фундаментальные исследования*. 2014; 8 (4): 898–902.
 36. Pomatto LCD, Davies KJA. Adaptive homeostasis and the free radical theory of ageing. *Free Radical Biology and Medicine*. 2018; 124: 420–30.
 37. Голубев В. Н., Королев Ю. Н., Белокопытова Е. В. Индивидуальная стратегия адаптации дыхательной системы человека как реакция на гипоксическую гипоксию. *Известия Российской Военно-медицинской академии*. 2019; 38 (3): 172–7.
 38. Каркищенко Н. Н., Каркищенко В. Н., Шустов Е. Б., Канападзе Г. Д., Ревякин А. О., Семенов Х. Х. Биомедицинское (доклиническое) изучение антигипоксической активности лекарственных средств. М.: Научный центр биомедицинских технологий ФМБА, 2017; 97 с.
 39. Бобров И. П., Лепилов А. В., Гулдаева З. Н., Долгатов А. Ю., Алымова Е. Е., Крючкова Н. Г. и др. Тучноклеточная инфильтрация легких крыс после гипотермии. *Современные проблемы науки и образования*. 2019; (1): 1–8.
 40. Кличханов Н. К., Исмаилова Ж. Г., Астаева М. Д. Интенсивность свободнорадикальных процессов в крови крыс при глубокой гипотермии и в ходе самосогревания. *Acta Biomedica Scientifica*. 2016; 1 (5): 104–9.
 41. Шустов Е. Б., Канападзе Г. Д., Фокин Ю. В., Матвеев Е. Л. Методические особенности биомедицинских исследований влияния фармакологических средств на устойчивость организма к острой общей гипотермии. *Биомедицина*. 2017; (3): 4–15.
 42. Акимов А. Г., Егорова М. А. Влияние гипотермии на импульсную активность нейронов первичной слуховой коры домовой мыши (*Mus musculus*). *Интегративная физиология*. 2022; 3 (1): 100–9.
 43. Аксёнова Г. Е., Логвинович О. С., Фиалковская Л. А., Афанасьев В. Н., Игнатъев Д. А., Коломийцева И. К. и др. Влияние гипотермии на активность орнитиндекарбоксилазы в тканях крыс. *Доклады академии наук*. 2009; 428 (4): 547–9.
 44. Волкова М. В., Бояринцев В. В., Трофименко А. В., Рыбалкин С. П., Ковалева Е. В., Бирюков С. А. и др. Эффективность применения мезенхимальных стромальных клеток для лечения рвано-ушибленных ран в условиях гипотермии и гипоксии. *Известия Российской военно-медицинской академии*. 2022; 41 (3): 261–8.
 45. Лычева Н. А., Шахматов И. И., Киселев В. И., Вдовин В. М. Изучение отставленного влияния гипотермии на параметры системы гемостаза у крыс. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2014; 34 (4): 25–29.
 46. Абрашова Т. В., Гуцин Я. А., Ковалева М. А., Рыбакова А. В., Селезнева А. И., Соколова А. П. и др. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. СПб: ЛЕМА, 2013; 116 с.
 47. Шорманов И. С., Косенко М. В., Петровский А. К., Петровская А. Ю., Андреева Л. А., Федоров В. Н. и др. Фармакологическая поддержка адаптивных возможностей организма в условиях экспериментального операционного стресса. *Медицинский вестник Башкортостана*. 2016; 11 (2): 47–52.
 48. Байкалов Г. И., Ершов К. И., Бахарева К. И. Экспериментальные методы моделирования отморожений. *Сибирский медицинский вестник*. 2020; (3): 44–49.
 49. Handford C, Thomas O, Imray CHE. Frostbite. *Emergency Medicine Clinics*. 2017; 35 (2): 281–99.
 50. Солдатов Е. А., Анисимов А. С., Блинов В. А., Белкин Н. В. Совершенствование медицинского обеспечения мероприятий по подготовке военнослужащих для выполнения задач в высокогорной местности. *Известия Российской военно-медицинской академии*. 2017; 36 (2): 3–8.

References

1. Azarov II, Butakov SS, Zholus BI, Zetkin AYú, Remmer VN. Opyt soxraneniya zdorov'ya voennosluzhashchix v Arktike v povsednevnoj deyatel'nosti i chrezvychajnyx situacijax. *Morskaya medicina*. 2017; 3 (3): 102–111. Russian.
2. Kazakevich EV, Arxipovskij VL, Sereda AP, Abakumov AA. Osobennosti organizacii medicinskoj pomoshhi moryakam v usloviyax Arktiki. *Medicina ehkstremaal'nyx situacij*. 2017; 4 (62): 15–20. Russian.
3. O nacional'nyx celyax i strategicheskix zadachax razvitiya Rossijskoj Federacii na period do 2024 goda: ukaz Prezidenta Rossijskoj Federacii ot 07.05.2018 # 204. Dostupno po ssylke: <http://www.kremlin.ru/acts/bank/43027>. Russian.
4. Sergejchik OI, Yaroslavskaya EI, Plyusnin AV. Vliyanie faktorov vneshnej sredy na risk serdechno-sosudistyx zabolevanij naseleniya Arktiki. *Zhurnal mediko-biologicheskix issledovanij*. 2022; 10 (1): 64–72. Russian.
5. Krutikov AV, Smirnova OO, Bocharova LK. Strategy for the Development of the Russian Arctic. *Results and Prospects. Arctic and North*. 2020; (40): 213–26.
6. Solonin YuG, Bojko ER. Mediko-fiziologicheskie problemy v Arktike. *Izvestiya Komi nauchnogo centra UrO RAN*. 2017; 4 (32): 33–40. Russian.
7. Zhuravel VP. Rossijskaya armiya, MChS i rosgvardiya v Arktike: voprosy bezopasnosti i mezhdunarodnogo sotrudnichestva. *Nauchno-analicheskij vestnik Instituta Evropy RAN*. 2018; (5): 158–164. Russian.
8. Watts N, Amann M, Arnell N, Ayeb-Karlsson S, Beagley J, Belesova K, et al. The 2020 report of the Lancet Countdown on health and climate change: responding to converging crises. *The Lancet*. 2021; 397 (10269): 129–170.
9. Tixonov DG. *Arkticheskaya medicina*. Yakutsk: Izd-vo YaNC SO RAN, 2010; 320 s. Russian.
10. Pryanichnikov SV. Psixofiziologicheskoe sostoyanie organizma v zavisimosti ot dlitel'nosti prebyvaniya v vysokix shirotax Arktiki. *Ehkologiya cheloveka*. 2020; 27 (12): 4–10. Russian.
11. Grimaldi S, Partonen T, Haukka J, Aromaa A, Lonnqvist. Seasonal

- vegetative and affective symptoms in the Finnish general population: testing the dual vulnerability and latitude effect hypotheses. *Nordic Journal of Psychiatry*. 2009; 63 (5): 397–404.
12. Grishin OV, Ustyuzhaninova NV. Dyxanie na Severe. *Funkciya. Struktura. Rezervy. Patologiya*. Novosibirsk: Art-Avenue, 2006; 253 s. Russian.
 13. Panin LE. Fundamental'nye problemy pripolyarnoj i arkticheskoy mediciny. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal*. 2013; 33 (6): 5–10. Russian.
 14. Nagibovich OA, Uxovskij DM, Zhekalov AN, Tkachuk NA, Arzhavkina LG, Bogdanova EG, i dr. Mexanizmy gipoksii v Arkticheskoy zone Rossijskoj Federacii. *Vestnik Rossijskoj voenno-meditsinskoj akademii*. 2016; (2): 202–5. Russian.
 15. Zadnipyryanj IV, Sataeva TP, Tret'yakova OS. Patomorfologicheskie izmeneniya miokarda krys pri vozdejstvii gipobaricheskoy xolodovoy gipoksii. *Operativnaya xirurgiya i klinicheskaya anatomiya*. 2019; 3 (2): 13–18. Russian.
 16. McDonald A, Stubbs R, Lartey P, Kokot S. *Environmental Injuries: Hypothermia and Hypothermia*. MacEwan University Student Journal. 2020; 4 (1): 1–14.
 17. Ovechkina ES, Ovechkin FYu. Patofiziologiya cheloveka v usloviyax severa Rossii. *Byulleten' nauki i praktiki*. 2021; 7 (8): 185–91. Russian.
 18. Kochan TI. Sezonnye izmeneniya pokazatelej uglvodnogo, lipidnogo i belkovogo obmena u zhitelej Evropejskogo Severa. *Evrzjiskij sojuz uchenyx*. 2016; 7–1 (28): 32–35. Russian.
 19. Gribanov AV, Anikina NYu, Kotcova ON, Vilova TV. Sezonnaya dinamika cerebral'nogo ehnergoobmena u cheloveka v arkticheskoy zone. *Ehkologiya cheloveka*. 2021; (5): 13–19. Russian.
 20. Gaspar LS, Alvaro AR, Carmo-Silva S, Mendes AF, Relogio A, Cavadas C. The importance of determining circadian parameters in pharmacological studies. *British Journal of Pharmacology*. 2019; 176 (16): 2827–47.
 21. Ulyanovskaya SA, Bazhenov DV, Shestakova VG, Kalinkin MN. Vliyaniye klimatogeograficheskix faktorov Severa na adaptivnyye reakcii organizma cheloveka. *Patologicheskaya fiziologiya i ehksperimental'naya terapiya*. 2020; 64 (1): 147–154. Russian.
 22. Arendt J, Middleton B. Human seasonal and circadian studies in Antarctica (Halley, 75 S). *General and comparative endocrinology*. 2018; 258: 250–8.
 23. Ganapol'skij VP, Agafonov PV, Matycyn VO. Modelirovaniye xolodo-stressovoy dezadaptacii u krys s cel'yu razrabotki metodov ee farmakologicheskoy korrekcii. *Rossijskie biomeditsinskie issledovaniya*. 2022; 7 (1): 3–15. Russian.
 24. Finger AM, Dibner C, Kramer A. Coupled network of the circadian clocks: a driving force of rhythmic physiology. *FEBS letters*. 2020; 594 (17): 2734–69.
 25. Xasnulin VI, Xasnulin PV. Sovremennyye predstavleniya o mexanizmax formirovaniya severnogo stressa u cheloveka v vysokix shirotax. *Ehkologiya cheloveka*. 2012; (1): 3–11. Russian.
 26. Coiffard B, Diallo AB, Mezouar S, Leone M, Mege J-L. A tangled threesome: circadian rhythm, body temperature variations, and the Immune System. *Biology*. 2021; 10 (1): 65.
 27. Kelexashvili LV, Volchenkova AV, Sokolova AS. Gigienicheskoe obosnovaniye metodov korrekcii sindroma «snezhnaya slepota» v usloviyax Arktiki. V sbornike: *Materialy III Dal'nevostochnogo medicinskogo molodezhnogo foruma; 2–4 oktyabrya 2019; Xabarovsk. Aktual'nye voprosy sovremennoj mediciny*. 2019; 317–320. Russian.
 28. Soldatov EA, Golota AS, Kornilova AA, Krassij AB, Levando KK, Chuvashhev ML, i dr. *Meditsinskoe obespecheniye v Arktike: 2015 g. Voenno-meditsinskij zhurnal*. 2016; 337 (5): 44–51. Russian.
 29. Miroshnichenko YuV, Kononov VN, Rodionov EO, Mustaez OZ, Soldatov EA, Chuvashhev ML, i dr. Vliyaniye osobykh mediko-geograficheskix uslovij Arktiki na obespecheniye soedinenij i voinskix chastej medicinskim imushhestvom. *Farmaciya i farmakologiya*. 2017; 5 (4): 368–79. Russian.
 30. Kotenko PK, Shevcov VI. Analiz mediko-social'nyx faktorov, opredelyayushhix perspektivnyj oblik sistemy okazaniya medicinskoj pomoshhi postradavshim v chrezvychajnyx situaciyax v Arkticheskoy zone Rossijskoj Federacii. *Morskaya medicina*. 2019; 4 (4): 44–54. Russian.
 31. Moffatt SE. Hypothermia in trauma. *Emergency Medicine Journal*. 2013; 30 (12): 989–996.
 32. Raja R, Bryant SJ, Wilkinson BL, Bryant G. The need for novel cryoprotectants and cryopreservation protocols: Insights into the importance of biophysical investigation and cell permeability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2021; 1865 (1): 129749.
 33. Bozkurt Y, editor. *Cryopreservation biotechnology in biomedical and biological sciences*. BoD-Books on Demand; 2018.
 34. Warner RM, Brown KS, Benson JD, Eroglu A, Higgins AZ. Multiple cryoprotectant toxicity model for virification solution optimization. *Cryobiology*. 2022; 108: 1–9.
 35. Kurkin VA, Petrukhina IK, Akushskaya AS. Issledovaniye nomenklatury adaptogennyx lekarstvennyx preparatov, predstavlenykh na farmacevticheskom rynke Rossijskoj Federacii. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2014; 8 (4): 898–902. Russian.
 36. Pomatto LCD, Davies KJA. Adaptive homeostasis and the free radical theory of ageing. *Free Radical Biology and Medicine*. 2018; 124: 420–30.
 37. Golubev VN, Korolev YuN, Belokopytova EV. Individual'naya strategiya adaptacii dyxatel'noj sistemy cheloveka kak reakciya na gipoksicheskuyu gipoksiyu. *Izvestiya Rossijskoj Voenno-meditsinskoj akademii*. 2019; 38 (3): 172–7. Russian.
 38. Karkishhenko NN, Karkishhenko VN, Shustov EB, Kanapadze GD, Revyakin AO, Semenov XX. *Biomeditsinskoe (doklinicheskoe) izuchenie antigipoksicheskoy aktivnosti lekarstvennyx sredstv*. M.: Nauchnyj centr biomeditsinskix texnologij FMBA, 2017; 97 s. Russian.
 39. Bobrov IP, Lepilov AV, Guldaeva ZN, Dolgatov AYu, Alymova EE, Kryuchkova NG, i dr. *Tuchnokletochnaya infil'traciya legkix krys posle gipotermii. Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*. 2019; (1): 1–8. Russian.
 40. Klichxanov NK, Ismailova ZhG, Astaeva MD. Intensivnost' svobodnoradikal'nyx processov v krovi krys pri glubokoy gipotermii i v xode samosogrevaniya. *Acta Biomedica Scientifica*. 2016; 1 (5): 104–9. Russian.
 41. Shustov EB, Kapanadze GD, Fokin YuV, Matveenko EL. Metodicheskie osobennosti biomeditsinskix issledovaniy vliyaniya farmakologicheskix sredstv na ustojchivost' organizma k ostroj obshhej gipotermii. *Biomedicina*. 2017; (3): 4–15. Russian.
 42. Akimov AG, Egorova MA. Vliyaniye gipotermii na impul'snyuyu aktivnost' nejronov pervichnoj sluxovoy kory domovoy myshi (*Mus musculus*). *Integrativnaya fiziologiya*. 2022; 3 (1): 100–9. Russian.
 43. Aksyonova GE, Logvinovich OS, Fialkovskaya LA, Afanasev VN, Ignatev DA, Kolomijceva IK, i dr. Vliyaniye gipotermii na aktivnost' ornitindekarsilazy v tkanyax krys. *Doklady akademii nauk*. 2009; 428 (4): 547–9. Russian.
 44. Volkova MV, Boyarincev VV, Trofimenko AV, Rybalkin SP, Kovaleva EV, Biryukov SA, i dr. *Ehffektivnost' primeneniya mezenximal'nyx stromal'nyx kletok dlya lecheniya rvano-ushiblenykh ran v usloviyax gipotermii i gipoksii. Izvestiya Rossijskoj voenno-meditsinskoj akademii*. 2022; 41 (3): 261–8. Russian.
 45. Lycheva NA, Shaxmatov II, Kiselev VI, Vdovin VM. Izuchenie otstavlennogo vliyaniya gipotermii na parametry sistemy gemostaza u krys. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal*. 2014; 34 (4): 25–29. Russian.
 46. Abrashova TV, Gushhin YaA, Kovaleva MA, Rybakova AV, Selezneva AI, Sokolova AP, i dr. *Fiziologicheskie, bioximicheskie i biometricheskije pokazateli normy ehksperimental'nyx zhivotnyx*. SPb: LEMA, 2013; 116 s. Russian.
 47. Shormanov IS, Kosenko MV, Petrovskij AK, Petrovskaya AYu, Andreeva LA, Fedorov VN, i dr. *Farmakologicheskaya podderzhka adaptivnyx vozmozhnostej organizma v usloviyax ehksperimental'nogo operacionnogo stressa. Medicinskij vestnik Bashkortostana*. 2016; 11 (2): 47–52. Russian.
 48. Bajkalov GI, Ershov KI, Baxareva KI. *Ehksperimental'nye metody modelirovaniya otmorozhenij. Sibirskij medicinskij vestnik*. 2020; (3): 44–49. Russian.
 49. Handford C, Thomas O, Imray CHE. Frostbite. *Emergency Medicine Clinics*. 2017; 35 (2): 281–99.
 50. Soldatov EA, Anisimov AS, Blinov VA, Belkin NV. *Sovershenstvovaniye medicinskogo obespecheniya meropriyatij po podgotovke voennosluzhashhix dlya vypolneniya zadach v vysokogornoj mestnosti. Izvestiya Rossijskoj voenno-meditsinskoj akademii*. 2017; 36 (2): 3–8. Russian.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФОСФОНИЛИРОВАННЫХ ПЕПТИДОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ МАЛДИ-МИШЕНИ, ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННОЙ СТЕАРАТОМ ЛАНТАНА

В. Н. Бабаков¹✉, А. Ю. Горбунов¹, А. С. Гладчук^{2,4}, Я. К. Калнина², В. В. Шиловских⁴, Н. В. Томилин², Н. Г. Суходолов^{3,4}, А. С. Радилов¹, Е. П. Подольская^{2,3}

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

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

³ Институт аналитического приборостроения Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

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

Аddituctы белков крови с фосфорорганическими соединениями (ФОС) как маркеры интоксикации позволяют не только установить факт отравления, но и идентифицировать ФОС по присоединившемуся остатку. Целью работы было разработать методику специфичной и селективной экстракции аддуктов белков крови с ФОС на поверхности матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ) мишени, функционализированной мультимолекулярными структурами на основе стеарата лантана, с помощью металл-аффинной хроматографии. Показано, что сорбент способен удерживать как полноразмерные, так и деалкилированные аддукты белков крови с ФОС. С помощью предложенной методики были экстрагированы и идентифицированы пептиды сывороточного альбумина и бутирилхолинэстеразы человека, модифицированные различными ФОС, после инкубации плазмы крови человека с ФОС в диапазоне концентраций 1×100 нг/мл, что позволяет использовать этот подход для идентификации ФОС при расследовании реальных случаев интоксикаций.

Ключевые слова: стеарат лантана, пленки Ленгмюра–Блоджетт, фосфорорганические соединения (ФОС), аддукты сывороточного альбумина, аддукты бутирилхолинэстеразы

Благодарности: авторы выражают благодарность за техническую поддержку ресурсным центрам «Развитие молекулярных и клеточных технологий» и «Геомодель» Научного парка СПбГУ, а также А. А. Селютину за возможность работы с МАЛДИ масс-спектрометрическим оборудованием.

✉ **Для корреспонденции:** Владимир Николаевич Бабаков
г.п. Кузьмолловский, ст. Капитолово, корп. 93, Ленинградская обл, Россия; babakov@gpetch.ru

Статья получена: 11.11.2022 **Статья принята к печати:** 11.01.2023 **Опубликована онлайн:** 28.01.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.002

IDENTIFICATION OF PHOSPHONYLATED PEPTIDES USING A MALDI TARGET FUNCTIONALIZED WITH LANTHANUM STEARATE

Babakov VN¹✉, Gorbunov AY¹, Gladchuk AS^{2,4}, Kalnina YaK², Shilovskikh VV⁴, Tomilin NV², Sukhodolov NG^{3,4}, Radilov AS¹, Podolskaya EP^{2,3}

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

² Golikov Research Center of Toxicology, St. Petersburg, Russia

³ Institute for Analytical Instrumentation, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

⁴ St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

As markers of intoxication, adducts of blood proteins with organophosphorus compounds (OPs) allow establishing the fact of poisoning and, furthermore, enable identification of the OPs by the attached residue. This study aimed to develop a method of specific and selective extraction of blood protein adducts carrying OPs on the surface of a matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) target functionalized with multimolecular structures based on lanthanum stearate using metal affinity chromatography. We have shown the ability of adsorbent to retain both full-size and dealkylated adducts of blood proteins with OPs. The developed method allowed extraction and identification of peptides of human serum albumin and human butyrylcholinesterase modified with various OPs (after incubation of human blood plasma with OPs in concentrations from 1 to 100 ng/mL), which makes this approach applicable for the purposes of OPs identification in the context of investigation of real cases of intoxication.

Keywords: Lanthanum stearate, Langmuir–Blodgett films, serum albumin adducts, butyrylcholinesterase adducts, organophosphorus compounds

Acknowledgments: the authors express their gratitude for technical support to the resource centers Development of Molecular and Cellular Technologies and Geomodel of the Research Park of St. Petersburg State University, and to A.A. Selyutin for the opportunity to use the MALDI mass spectrometer.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladimir Nikolaevich Babakov
Kuzmolovskiy, st. Kapitolovo, str. 93, Leningradsraja oblast, Russia; babakov@gpetch.ru

Received: 11.11.2022 **Accepted:** 11.01.2023 **Published online:** 28.01.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.002

Фосфорорганические соединения (ФОС) — большой класс используемых в промышленности и сельском хозяйстве соединений, которые могут ингибировать сериновые эстеразы и протеазы [1]. Высокотоксичные представители ФОС внесены в список 1 Конвенции по запрещению химического оружия [2].

Аддукты ФОС с сывороточным альбумином (СА) и бутирилхолинэстеразой (БХЭ) человека являются основными долгоживущими биомаркерами интоксикации ФОС. Время полужизни аддуктов с ФОС составляет 20–25 дней для СА и 11–14 дней для БХЭ [3, 4], что позволяет определять агент в образцах крови спустя несколько

недель после отравления. При этом аддукты ФОС с БХЭ служат самыми надежными биомаркерами, позволяющими детектировать факт отравления при степени ингибирования фермента менее чем 1% [5]. Разработано множество подходов определения этих аддуктов в реальных образцах с помощью целевого анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) [6–8]. Однако МАЛДИ масс-спектрометрия (МС), несмотря на более редкое использование, имеет преимущества для скринингового обзорного анализа аддуктов белков крови с ФОС в случаях идентификации

неизвестных ингибиторов БХЭ. Определение разницы масс (ΔM) между модифицированным и нативным пептидами позволяет подобрать брутто-формулу ФОС.

МАЛДИ-МС приобрела популярность благодаря простоте, надежности, высокой чувствительности и большому диапазону анализируемых масс [9–11], но имеет значительные ограничения из-за эффекта подавления сигналов при большом количестве компонентов, что является существенным недостатком для обнаружения следовых количеств веществ. Поэтому метод зачастую требует предварительной подготовки образца, позволяющей либо снизить компонентность смеси, либо обогатить образец аналитом.

Недавно были предложены подходы, позволяющие не только применять мишень МАЛДИ в качестве носителя образца, но и использовать как часть протокола анализа, придавая ей дополнительную функциональную нагрузку [12]. Для этого поверхность стальной подложки функционализируют, придавая необходимые свойства [13, 14]. В этом случае перед проведением МС-анализа на поверхности мишени могут быть выполнены различные аналитические процедуры, повышающие эффективность всего анализа («лаборатория на мишени»). Формат «лаборатория на мишени» направлен на уменьшение количества образца, требуемого для анализа, и снижения потерь на сорбенте при экстракции, позволяет манипулировать очень малыми объемами проб, а также сводить пробоподготовку к нескольким простым этапам. Функционализированную сорбентом мишень можно использовать для прямого обогащения образца *in situ* с последующим анализом методом МАЛДИ-МС.

Коллапсированные монослои Ленгмюра — тонкопленочные сорбенты, которые имеют уникальную поверхность, состоящую из атомов металла [15], обладают как гидрофильными, так и гидрофобными свойствами [16] и достаточно устойчивы к внешнему воздействию [17]. Ранее было предложено использовать коллапсированные монослои стеарата лантана (FLa) в спиновых колонках для экстракции ряда органических и биоорганических соединений [18], в том числе аддуктов СА человека с 2-(фторметилфосфорил)окси-3,3-диметилбутаном. Нами был предложен подход, позволяющий проводить формирование как коллапсированного монослоя FLa, так и его мультимолекулярных структур непосредственно на МАЛДИ-мишени [19, 20]. Полученный материал имеет развитую поверхность, характеризуется высоким уровнем адгезии к поверхности, полированной МАЛДИ-мишени и при этом сохраняет свойства металл-аффинного сорбента. Целью работы было исследовать возможность специфичной экстракции аддуктов белков крови с ФОС на поверхности МАЛДИ-мишени, функционализированной мультимолекулярными структурами FLa в формате «лаборатория на мишени».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение монослоев стеарата лантана на МАЛДИ-мишени

В качестве подложки использовали полированную МАЛДИ-мишень (MTP 384 target plate polished steel BC; Bruker Daltonics, ФРГ). На поверхность полированной МАЛДИ мишени наносили каплю объемом 0,6 мкл водного раствора соли лантана (III) с концентрацией 1 мМ. На поверхность водной капли сверху наносили 0,6 мкл

насыщенного раствора стеариновой кислоты в *n*-гексане. Процедуру повторяли дважды. Получали три монослоя. Затем убирали остатки капли раствора соли лантана. На ту же ячейку мишени снова наносили каплю 0,6 мкл водного раствора соли лантана, и трижды наносили раствор стеариновой кислоты. В итоге ячейка МАЛДИ-мишени была модифицирована шестью монослоями FLa. Нанесенный сорбент трижды промывали деионизированной водой от соли лантана, для чего 8 мкл воды наносили на ячейку, оставляли на 1 мин, затем убирали дозатором.

Получение образцов белков, модифицированных ФОС

Для получения образцов модифицированного сывороточного альбумина к образцам донорской К2-ЭДТА плазмы крови человека в течение 2 ч после отбора была добавлена серия разведений в изопропиловом спирте 2-(фторметилфосфорил)окси-3,3-диметилбутана, CAS № 96-64-0 (далее PFMP) до конечных концентраций 1 нг/мл – 1 мкг/мл, как было опубликовано ранее [5]. Для получения образцов модифицированного БХЭ фермент предварительно был выделен из донорской плазмы крови человека методом аффинной хроматографии на прокаинамидсефарозе. К очищенному ферменту в концентрации 1 мг/мл добавили PFMP до конечных концентраций 100 мкг/мл, что приводило к более чем 90%-му ингибированию фермента. Инкубированную и контрольную плазму крови гидролизовали ферментом пепсином, инкубированный и контрольный фермент БХЭ — трипсином. Для оценки специфичности и селективности сорбции модифицированных пептидов на FLa гидролизованные инкубированную и контрольную плазму крови и фермент БХЭ смешивали в различных соотношениях. Для определения пределов обнаружения модифицированной БХЭ в плазме крови фермент выделяли из 250 мкл плазмы с помощью иммунопреципитации [21]. Все эксперименты проводили в четырех повторах.

МАЛДИ-масс-спектрометрический анализ

Масс-спектры были получены с помощью тандемного времяпролетного масс-спектрометра UltrafleXtreme (Bruker Daltonics; Германия). Регистрацию спектров осуществляли в режиме рефлектрона с детектированием положительных ионов в диапазоне m/z 1000–3200. Число актов облучения при регистрации одного спектра составляло 20 000, частота выстрелов — 2000 Гц. Регистрацию и интерпретацию спектров осуществляли с использованием программного обеспечения Flex Control 3.4 и Flex Analysis 3.4. Тандемные масс-спектры были получены в режиме LIFT, фрагментацию ионов-предшественников осуществляли в условиях диссоциации, активированной соударениями (CID).

Пробоподготовка и МАЛДИ-масс-спектрометрический анализ образцов 7-го квалификационного биомедицинского теста ОЗХО

Образцы от ОЗХО были получены в рамках участия ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России в 7-м квалификационном биомедицинском тесте ОЗХО и представляли собой пулированную плазму крови человека. К образцам плазмы крови в лаборатории ОЗХО были добавлены вещества VX (O-этил-S-2-диизопропиламиноэтилметилфосфонотиолат, CAS № 50782-69-9) до конечной концентрации 10 нг/мл и

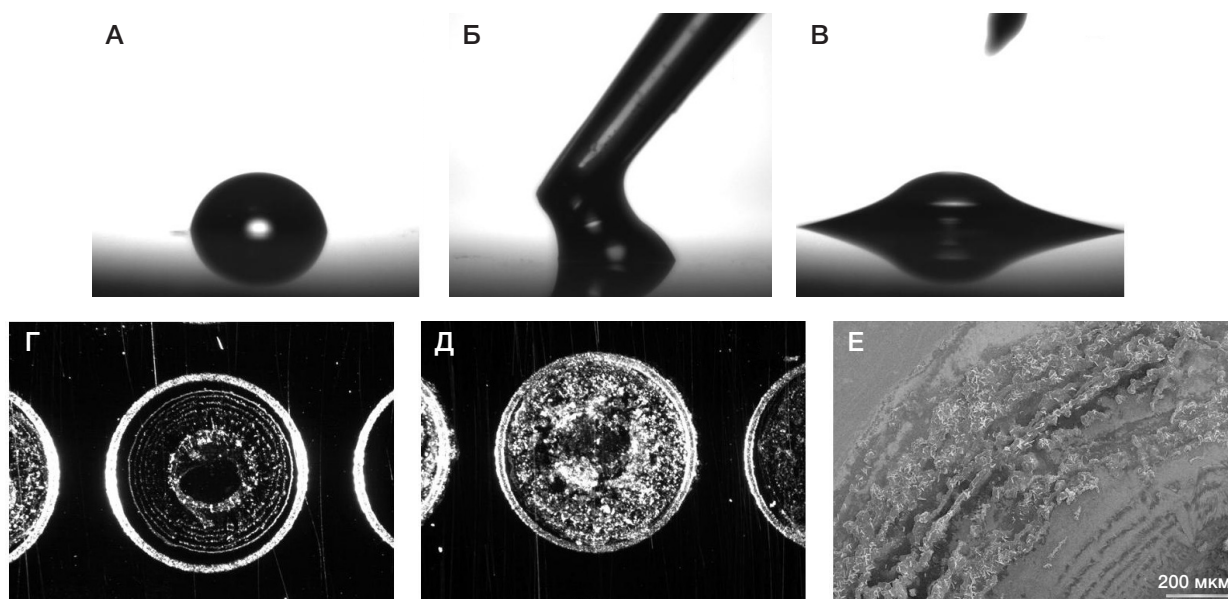


Рис. 1. А. Капля водной субфазы. Б. Нанесение раствора стеариновой кислоты в н-гексане. В. Распределение органической фазы по подложке. Г, Д. Изображение ячеек МАЛДИ-мишени после нанесения одного и шести слоев FLA (стереомикроскоп SMZ 1500 с цифровой камерой DS-2MBWc (Nikon; Япония). Е. СЭМ-изображение шести слоев FLA, сформированных на МАЛДИ-мишени (сканирующий электронный микроскоп S-3400N; Hitachi, Japan).

GE (О-изопропил этилфосфонофторид), CAS № 1189-87-3) до конечной концентрации 20 нг/мл.

БХЭ выделяли из образцов иммунопреципитацией с помощью иммуномагнитных микросфер Dynabeads Antibody Coupling Kit (143.11D; Invitrogen, США) с привитыми антителами против БХЭ (Pierce BChE monoclonal mouse antibody HAN 0020102; Thermo, США). Иммуномагнитные микросферы получали согласно протоколу производителя набора Dynabeads Antibody Coupling Kit. Выделение БХЭ из плазмы осуществляли согласно описанному ранее методу [21].

Для проведения ферментативного гидролиза БХЭ был использован трипсин (Sigma-Aldrich; США). 100 мкл элюата, содержащего БХЭ, трижды промывали водой с использованием центрифужных фильтров Amicon Ultra-0.5, 30K (UFC5030BK; Merck Millipore, США). Далее объем образца доводили до 100 мкл 25 мМ водным раствором бикарбоната аммония, затем добавили 5 мкл трипсина (0,1 мг/мл), инкубировали при 37 °С в течение 4 ч, затем добавляли еще 5 мкл раствора трипсина (0,1 мг/мл), инкубировали при 37 °С в течение 16 ч.

Металл-аффинную хроматографию (МАХ) на сорбенте, содержащем FLA, проводили непосредственно на МАЛДИ-мишени с нанесенными монослоями.

Сорбцию образцов триптического гидролизата БХЭ, модифицированной ФОС, проводили в 2,5%-м водном растворе аммиака в течение 20 мин. Сорбент промывали дважды 5 мкл 2,5%-го водного раствора аммиака и 8 мкл воды для удаления несвязавшейся фракции. Для улучшения десорбции фосфонилированных пептидов добавляли 3 мкл 30%-го ацетонитрила с добавлением 0,1% трифторуксусной кислоты (ТФУ), затем на мишень добавляли 2 мкл матрицы СНСА (5 мг/мл в 70%-м водном ацетонитриле). После МАХ монослои FLA удерживали сорбированные фосфонилированные пептиды белков крови.

Для получения МАЛДИ-масс-спектров образцов 7-го квалификационного биомедицинского теста ОЗХО использовали масс-спектрометр ион-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье, оснащенный лазером SmartBeam-II (355 нм) SolariX XR 7T (Bruker Daltonics; ФРГ). Регистрацию масс-спектров осуществляли в режиме детектирования положительно заряженных ионов

в диапазоне m/z 1000–3200. Масс-спектры обрабатывали с помощью программного обеспечения Data Analysis 5.0 (Bruker Daltonics; Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Функционализация поверхности МАЛДИ-мишени

Для работы была выбрана полированная МАЛДИ-мишень, имеющая такую гидрофобную поверхность, чтобы нанесенная на нее водная капля фиксировалась, сохраняя свою геометрическую форму (рис. 1А). Функционализацию поверхности мишени проводили по методике, опубликованной ранее [20]. Объем растворов был выбран таким образом, чтобы при нанесении раствора стеариновой кислоты в н-гексане на водную каплю (рис. 1Б) не происходило растекания гексана за границы ячейки, и слои формировались строго в ее пределах (рис. 1В–Е). Было показано, что после последовательного формирования шести монослоев материал перестает удерживаться на ячейке, количество монослоев больше шести приводит к меньшей адгезии пленок стеарата лантана к МАЛДИ мишени. МАЛДИ-МС анализ пленок, сформированных на мишени, показал, что основным структурным звеном сорбента является ион дистеарата лантана, о чем свидетельствует сигнал с m/z 705,46. Физико-химические параметры пленок стеарата лантана были охарактеризованы ранее [20]. Поверхность МАЛДИ мишени функционализировали за счет формирования в ячейках сорбента на основе мультимолекулярных структур FLA, состоящих из шести коллапсированных монослоев.

Оценка сорбционных свойств FLA

При разработке подхода для проведения металл-аффинной экстракции в формате «лаборатория на мишени» было показано, что на пятне сорбента, состоящего из шести коллапсированных монослоев FLA, надежно удерживаются капли основных растворов для МАХ в следующих объемах: 2,5%-й водный аммиак — 7–8 мкл; вода — 10–12 мкл; 30%-й водный ацетонитрил — 3–5 мкл. Модельным объектом был

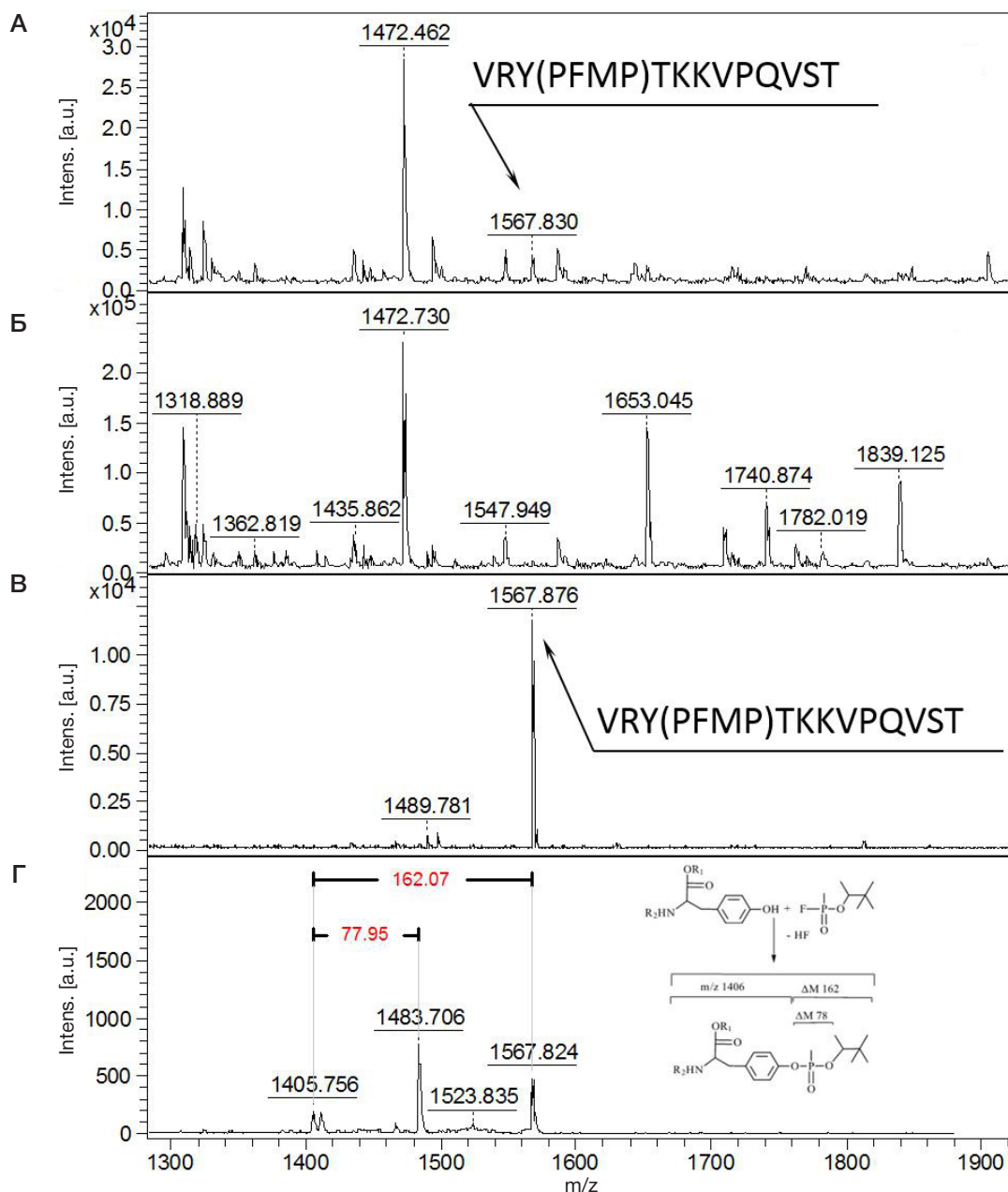


Рис. 2. Масс-спектр пептического гидролизата СА человека, модифицированного PFMP, при соотношении модифицированной формы к немодифицированной, равном 1 : 10. **А.** Масс-спектр исходного образца. **Б.** Масс-спектр несвязавшейся фракции. **В.** Масс-спектр, полученный с пятна сорбента после МАХ. **Г.** Идентификация модификации PFMP по нейтральной потере

выбран пептический гидролизат плазмы крови, в которой сывороточный альбумин (СА) модифицирован PFMP на 90% по тирозину-411. Далее все эксперименты, включающие стадию МАХ, проводили в соответствии со следующей методикой. На сорбент наносили каплю 2,5%-го водного аммиака для уравнивания фазы, выдерживали 5 мин, после чего удаляли и наносили повторно. Затем в каплю добавляли 1 мкл образца, выдерживали 20 мин для прохождения сорбции. Несвязавшуюся фракцию переносили на соседнюю ячейку для дальнейшего МАЛДИ-МС анализа. FLa последовательно промывали 2,5%-м водным раствором аммиака, водой и 0,1%-м водным раствором ТФУ. Сорбент высушивали, для десорбции наносили 3 мкл 30%-го водного раствора ацетонитрила и 2 мкл раствора матрицы СНСА с концентрацией 5 мг/мл и проводили МАЛДИ-МС-анализ.

Для исследования сорбционной способности FLa пептический гидролизат плазмы крови человека,

содержащей модифицированный на 90% сывороточный альбумин, с начальной концентрацией СА 1 мг/мл, разбавляли дистиллированной водой до получения следующих концентраций: 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 и 0,1 мг/мл. МАХ-МАЛДИ-МС-анализ показал, что после МАХ сигнал со значением m/z 1567,87, соответствующий аддукту VRY(PFMP)TKKVPQVST, в масс-спектре несвязавшейся фракции не детектируется после нанесения на сорбент 1 мкл раствора с концентрацией белка 0,5 мг/мл. В масс-спектрах, полученных со всех пятен сорбентов, сигнал с m/z 1567,87 регистрировали с высокой интенсивностью, а результаты фрагментного анализа подтвердили его принадлежность аддукту VRY(PFMP)TKKVPQVST. Исходя из степени модификации белка, соответствующей 90%, и при полном прохождении гидролиза (о чем свидетельствует отсутствие сигнала LVRY(PFMP)TKKVPQVST (продукт неполного гидролиза) с m/z 1680,89 во всех масс-спектрах), можно сделать

Таблица 1. Результаты исследования селективности метода при разбавлении СА, модифицированного PFMP, плазмой крови человека

Молярное соотношение VRY(PFMP)TKKVPQVST/ VRYTKKVPQVST	Объем нанесенного на сорбент образца, мкл	Соотношение сигнал / шум
1 : 10	1	51
1 : 100	1	35
1 : 1000	5	13
	1	5
1 : 10 000	5	3
	1	–

вывод, что шесть слоев FLA способны удерживать 0,012 мкг аддукта VRY(PFMP)TKKVPQVST.

Для оценки специфичности и селективности подхода пептические гидролизаты модифицированного и немодифицированного СА смешивали таким образом, чтобы соотношения VRY(PFMP)TKKVPQVST/ VRYTKKVPQVST составляли 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000 и 1 : 10000. На сформированные и подготовленные пятна FLA наносили образец с начальной концентрацией СА 1 мг/мл в соответствии с данными, представленными в табл. 1. Результаты МАХ-МАЛДИ-МС-анализа (табл. 1; рис. 2) свидетельствуют о высокой эффективности предложенного подхода металл-аффинной экстракции аддуктов СА с PFMP в формате «лаборатория на мишени». Детектировать сигнал, соответствующий аддукту, не удалось только при нанесении 1 мкл смеси при соотношении VRY(PFMP)TKKVPQVST/VRYTKKVPQVST, равном 1 : 10 000. Уже при нанесении 5 мкл этого раствора наблюдается сигнал со значением m/z 1567,87 с соотношением сигнал/шум (S/N) как 2–3 (при различных повторях). В случае анализа 1 мкл смеси 1 : 1000 соотношение S/N составляло 5–6. При более высоких концентрациях аддукт воспроизводимо надежно детектируется.

На следующем этапе работы была исследована возможность экстракции аддуктов БХЭ с PFMP методом МАХ на FLA с последующим их МАЛДИ-МС-анализом. Триптический пептид БХЭ, модифицированный ФОС, более удобный аналит при МАЛДИ-МС-анализе, чем пептический нонапептид активного центра БХЭ, широко используемый в ВЭЖХ-МС/МС-анализе. Триптический пептид, содержащий серин-198 активного центра, состоит из 29 аминокислотных остатков: SVTLFGES*AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR (m/z 2928,521). Однако, в отличие от аддуктов СА с ФОС, аддукты БХЭ подвержены деалкилированию (старению) [22, 23], и при МС-анализе чаще всего детектируют аддукт БХЭ с остатком метилфосфоновой кислоты (МРА). Эксперимент проводили с использованием предварительно выделенной из плазмы крови человека БХЭ, которую инкубировали с PFMP до достижения полного ингибирования фермента. Триптический гидролизат модифицированного белка БХЭ с концентрацией 1 мг/мл в объеме 1 мкл был нанесен на FLA с последующим МАХ-МАЛДИ-МС-анализом. По результатам МАЛДИ-МС-анализа (рис. 3) можно сделать вывод, что FLA, сформированные на мишени, проявляют специфичность по отношению к аддуктам БХЭ как с PFMP, так и с МРА. В масс-спектре присутствуют сигналы с m/z 3006,51, соответствующего аддукту SVTLFGES(MPA)AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR, и с m/z 3090,61, соответствующего аддукту SVTLFGES(PFMP)AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR. При разбавлении гидролизата модифицированной БХЭ гидролизатом немодифицированной специфичность и селективность МАХ-МАЛДИ-МС-анализа заметно ниже, по сравнению с

анализом аддуктов сывороточного альбумина человека с PFMP, тем не менее, при соотношении модифицированной формы к немодифицированной в соотношении 1 : 100 сигналы аддуктов БХЭ с PFMP и МРА надежно детектируются с S/N ≥ 6.

Определение аддуктов в образцах плазмы крови человека, инкубированной с PFMP

В качестве образцов использовали плазму крови человека, инкубированную с PFMP с концентрацией 1 и 10 нг/мл, при этом степень ингибирования БХЭ составила < 5 и 40%, соответственно. Поиск аддукта СА с PFMP проводили в пептическом гидролизате суммарного белка плазмы крови, концентрация СА после осаждения белков и перерастворения в дистиллированной воде составляла 1 мг/мл. В случае БХЭ было важно выделить БХЭ в максимально чистом виде, для этого использовали высокоспецифичный метод иммунопреципитации из 250 мкл плазмы крови. Для МАХ-МАЛДИ-МС был использован раствор с концентрацией БХЭ 1 мг/мл. Результаты МАХ-МАЛДИ-МС-анализа представлены на рис. 4 и в табл. 2. При анализе пептического гидролизата суммарного белка плазмы крови с использованием разработанного подхода сигнал аддукта VRY(PFMP)TKKVPQVST был обнаружен в масс-спектрах обоих образцов. Однако если образец, инкубированный с PFMP в концентрации 10 нг/мл, был нанесен на сорбент в объеме 1 мкл и соотношение S/N сигнала VRY(PFMP)TKKVPQVST составило 5, то во втором случае (с конечной концентрацией PFMP, равной 1 нг/мл) потребовалось обогащение, и на сорбент было нанесено 5 мкл образца. Соотношение S/N при этом составило 4. При этом в обоих образцах плазмы крови был идентифицирован аддукт БХЭ, выделенный с помощью иммунопреципитации, с деалкилированным остатком PFMP SVTLFGES(MPA)AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR с хорошим S/N без дополнительной оптимизации методики.

Определение аддуктов ФОС с БХЭ в образцах плазмы крови человека

Определение аддуктов ФОС с БХЭ с помощью предлагаемого подхода проводили при выполнении 7-го квалификационного теста ОЗХО. БХЭ предварительно выделяли из 250 мкл плазмы крови с добавками ФОС. БХЭ после иммунопреципитации элюировали с сорбента 0,6%-й муравьиной кислотой, переводили элюат в бикарбонатный буфер и гидролизовали трипсином. После МАХ-МАЛДИ-МС-анализа в области m/z 2880–3100 детектируются нативный пептид и модифицированные пептиды с m/z 3034,5397 (VX) и с m/z 3062,5650 (GE) (рис. 5). Молекулярной массе остатка GE соответствуют и другие ФОС, например VR и CVX. Для точного определения агента в этом случае целесообразно использовать

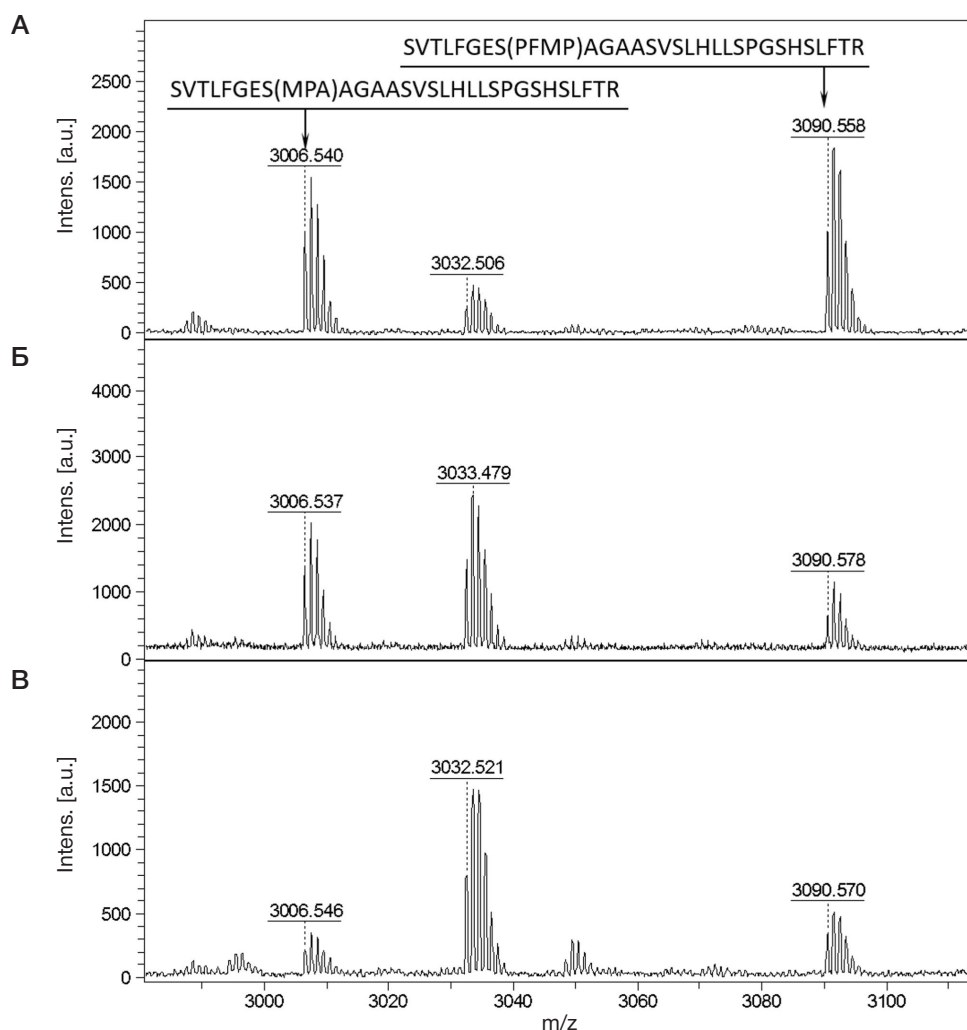


Рис. 3. Результаты MAX(FLa)-МАЛДИ-МС-анализа триптического гидролизата БХЭ (1 мг/мл), модифицированной PFMP при соотношении модифицированной формы к немодифицированной 100 : 0 (А); 1 : 10 (Б); 1 : 100 (В)

метод реактивации агента из белковых аддуктов и идентификации с помощью газовой хроматографии — масс-спектрометрии. Использование масс-спектрометрии ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье позволило определить точную массу присоединенного остатка и существенно сузить перечень возможных ФОС.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Предлагаемый подход позволяет проводить обзорный скрининговый анализ пептидов СА и БХЭ, модифицированных ФОС, в реальных образцах плазмы крови с подозрением на отравление этим классом соединений. Отравление высокотоксичными ФОС сопровождается концентрацией агента в плазме крови, достигающей 100 нг/мл. Идентификация массы присоединенного остатка с использованием МС высокого разрешения позволяет сделать обоснованные предположения об исходном соединении.

Несмотря на то что аддукты СА с фосфорорганическими соединениями в ряде работ определяются как маркеры интоксикации, позволяющие не только установить ее факт, но и идентифицировать ФОС по присоединившемуся остатку [24–27], большая часть исследователей основным белковым маркером рассматривают аддукт БХЭ, присоединяющей остаток ФОС по серину-198 [28]. Это связано с тем, что концентрации БХЭ и СА в плазме человека значительно различаются — 5 и 40 000 мкг/мл

соответственно. Даже в случае полного ингибирования БХЭ степень модификации СА будет крайне низкой. Но при этом, в отличие от БХЭ, аддукты СА с ФОС не подвергаются деалкилированию, что в большинстве случаев позволяет по ΔM между модифицированным и нативным пептидами, либо идентифицировать ФОС, либо подобрать брутто-формулу, что значительно облегчает дальнейшую идентификацию другими методами. Соответственно, стадия обогащения образца аддуктами СА с ФОС становится необходимой. СА является основным компонентом плазмы крови, поэтому для определения аддуктов сывороточного альбумина, можно использовать ферментативные гидролизаты плазмы крови, без дополнительной стадии выделения белка. Действительно, метод МАХ на поверхности МАЛДИ-мишени, функционализированной FLа, позволяет специфично и селективно экстрагировать аддукты СА с PFMP даже из пептического гидролизата суммарного белка плазмы крови, при том что концентрация СА составляет 40% и остальные белковые компоненты усиливают эффект подавления целевых сигналов. Стоит отметить, что в проведенном исследовании для инкубации плазмы с ФОС были выбраны концентрации PFMP, не приводящие к летальному исходу при попадании ФОС в организм. В случае концентрации PFMP, равной 1 нг/мл, ингибирование БХЭ составило < 5%, что зачастую даже не вызывает клинических проявлений. Однако предложенный подход в формате «лаборатория

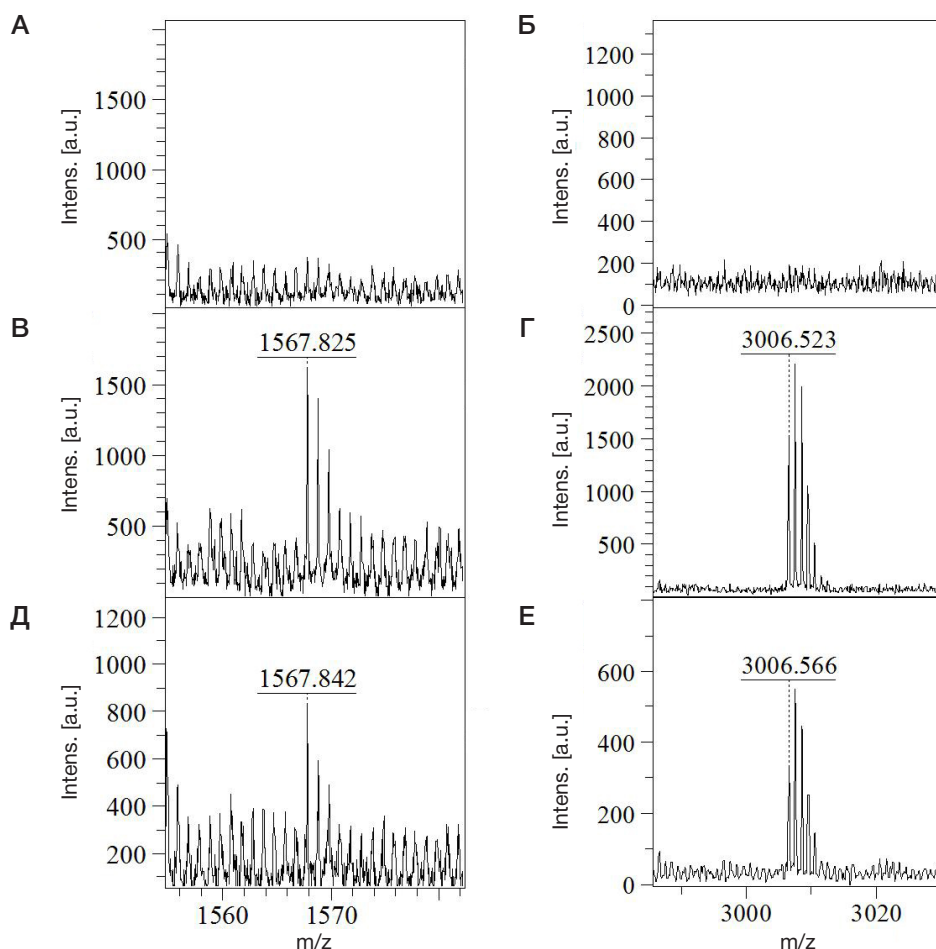


Рис. 4. Результаты MAX(FLa)-МАЛДИ-МС-анализа образцов плазмы крови, инкубированной с PFMP. Представлены масс-спектры контрольных образцов (А, Б); аддуктов VRY(PFMP)TKKVPQVST и SVTLFGES(MPA)AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR, концентрация PFMP — 10 нг/мл (В, Г); аддуктов VRY(PFMP)TKKVPQVST и SVTLFGES(MPA)AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR, концентрация PFMP — 1 нг/мл (Д, Е)

на мишени» не только позволил выявить ингибирование БХЭ по наличию деалкилированного аддукта, но и дал информацию для идентификации PFMP по $\Delta M = 162$. По сравнению с экстракцией в спиновых колонках в разы снижаются затраты на реактивы, сокращается время эксперимента и заметно повышается чувствительность анализа, что имеет существенное значение при работе с крайне ограниченными количествами биообразца.

Последовательное выделение фермента БХЭ из плазмы крови и дальнейшая MAX на FLa триптического гидролизата фермента позволяют детектировать потенциальные

ковалентные аддукты ФОС с серином активного центра БХЭ методом МАЛДИ-МС в диапазоне m/z 3000–3100. Информация о массе присоединенного ингибитора позволяет существенно снизить число возможных веществ, вызвавших отравление. Возможные структурные изомеры, имеющие одинаковый молекулярный вес, могут быть идентифицированы в режиме целевого химического анализа методом газовой хроматографии в сочетании с МС после реактивации из белковых аддуктов или анализом тирозиновых аддуктов белков плазмы крови, не обладающих свойствами спонтанного деалкилирования.

Таблица 2. Чувствительность MAX-МАЛДИ-МС-анализа пептических пептидов СА и триптических пептидов БХЭ, модифицированных PMPF

№	Пептид (m/z)	Соотношение PFMP / плазма, нг/мл	Объем нанесенного на сорбент образца, мкл	Соотношение сигнал / шум
СА				
1	VRY(PFMP)TKKVPQVST (1567,89)	10 : 1	1	5
2	VRY(PFMP)TKKVPQVST (1567,89)	1 : 1	5	4
БХЭ				
3	SVTLFGES(MPA)AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR (3006,54)	10 : 1	1	34
4	SVTLFGES(PFMP)AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR (3090,56)	10 : 1	1	–
5	SVTLFGES(MPA)AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR (3006,54)	1 : 1	1	14
6	SVTLFGES(PFMP)AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR (3090,56)	1 : 1	1	–

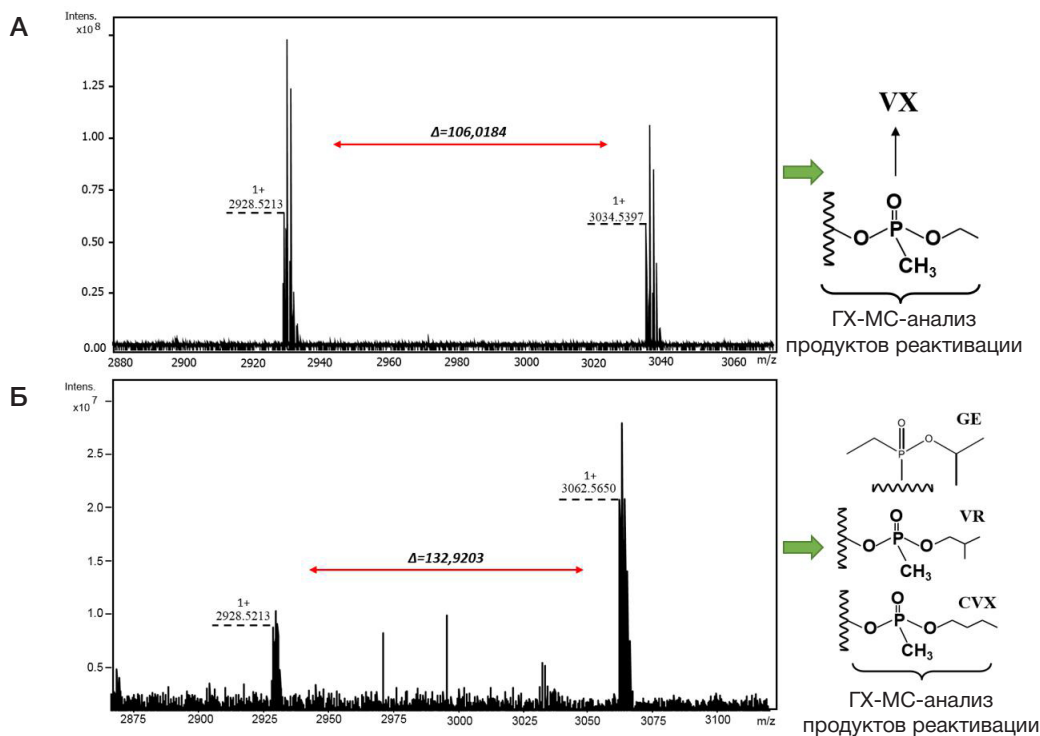


Рис. 5. Результаты МАХ-МАЛДИ-МС-анализа образцов 7-го профессионального теста ОЗХО по анализу биомедицинских проб. **А.** МАЛДИ-масс-спектр триптического гидролизата БХЭ, модифицированной VX, сигнал с m/z 3034,5397 — SVTLFGES(Vx)AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR. **Б.** МАЛДИ-масс-спектр триптического гидролизата БХЭ, модифицированной GE, сигнал с m/z 3062,5650 — SVTLFGES(GE)AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR

ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России является аккредитованной лабораторией ОЗХО, и разработанный подход позволяет проводить быстрый скрининг потенциально возможных токсикантов фосфорорганической природы в плазме крови при расследовании отравлений этим классом соединений.

ВЫВОДЫ

Разработана методика специфичной и селективной экстракции аддуктов белков крови с ФОС на поверхности МАЛДИ-мишени, функционализированной мультимолекулярными структурами на основе стеарата

лантана, методом МАХ в формате «лаборатория на мишени». Показано, что сорбент способен удерживать как полноразмерные, так и деалкилированные аддукты белков крови с 2-(фторметилфосфорил)окси-3,3-диметилбутаном (PFMP). С помощью предложенной методики были экстрагированы и идентифицированы пептиды СА и БХЭ, модифицированные остатком PFMP и МРА, после инкубации плазмы крови человека с ФОС в концентрации 1 и 10 нг/мл, что позволяет использовать этот подход для идентификации ФОС при реальных случаях интоксикации. Разработанная методика была использована при выполнении 7-го квалификационного теста ОЗХО.

Литература

- Mangas J, Estevez E, Vilanova TC, França C. New insights on molecular interactions of organophosphorus pesticides with esterases. *Toxicology*. 2017; 376: 30–43.
- Конвенция о химическом оружии. Доступно по ссылке: https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/CWC/CWC_ru.pdf.
- Schaller J, Gerber S, Kämpfer U, Lejon S, Trachsel Ch. *Human Blood Plasma Proteins: Structure and Function*. John Wiley & Sons, Ltd., 2008; 538 p.
- Van der Schans MJ, Fidder A, van Oeveren D, Hulst AG, Noort D. Verification of exposure to cholinesterase inhibitors: generic detection of OPCW Schedule 1 nerve agent adducts to human butyrylcholinesterase. *J Anal Toxicol*. 2008; 32: 125–9. DOI: 10.1093/jat/32.1.125.
- Dubrovskii Ya, Murashko E, Chuprina O, Belyukov P, Radilov A, Solovyev N, et al. Mass spectrometry based proteomic approach for the screening of butyrylcholinesterase adduct formation with organophosphates. *Talanta*. 2019; 197: 374–82. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.01.059.
- Read RW, Riches JR, Stevens JA, Stubbs SJ, Black RM. Biomarkers of organophosphorus nerve agent exposure: comparison of phosphorylated butyrylcholinesterase and phosphorylated albumin after oxime therapy. *Arch Toxicol*. 2010; 84: 25–36. DOI: 10.1007/s00204-009-0473-4.
- Liu C, Huang G, Xia Ha, Liu S, Liu J, Yu H, et al. Yuan. Simultaneous quantification of soman and VX adducts to butyrylcholinesterase, their aged methylphosphonic acid adducts and butyrylcholinesterase in plasma using an off-column procainamide-gel separation method combined with UHPLC-MS/MS. *J Chromatogr*. 2016; 1036–7: 57–65. DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.09.044.
- Fu F, Guo Y, Lu X, Zhao P, Zou S, Wang H, et al. Forensic analysis of soman exposure using characteristic fragment ions from protein adducts. *Human & Experimental Toxicology*, 2021; 9603271211001111. DOI: 10.1177/09603271211001111.
- Awad H, Khamis MM, El-Aneed A. Mass spectrometry, review of the basics: ionization, *Applied spectroscopy reviews*. 2015; 50: 158–75. DOI: 10.1080/05704928.2014.954046.
- Greco V, Piras C, Pieroni L, Ronci M, Putignani L, Roncada P, et al. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical

- proteomics. *Expert Review of Proteomics*. 2018; 15: 683–96. DOI: 10.1080/14789450.2018.1505510.
11. Israr MZ, Bernieh D, Salzano A, Cassambai Sh, Yazaki Y, Suzuki T. Matrix-assisted laser desorption/ionisation (MALDI) mass spectrometry (MS): basics and clinical applications. *Clin Chem Lab Med*. 2020; 58: 883–96. DOI: 10.1515/cclm-2019-0868.
 12. Urban PL, Amantonico A, Zenobi R. Lab-on-a-plate: extending the functionality of MALDI-MS and LDI-MS targets. *Mass Spectrometry Reviews*. 2011; 30: 435–78. DOI: 10.1002/mas.20288.
 13. Ch-J Chen, Ch-Ch Lai, M-Ch Tseng, Yu-Ch Liu, Sh-Yi Line, Fuu-J Tsai. Simple fabrication of hydrophobic surface target for increased sensitivity and homogeneity in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of peptides, phosphopeptides, carbohydrates and proteins. *Analytica Chimica Acta*. 2013; 783: 31–38. DOI: 10.1016/j.aca.2013.04.029.
 14. Huang H, Sun L, He H, Xia T. A new silicon dioxide-coated MALDI-TOF sample plate for peptide analysis. *BioMed Research International*. 2020; 8597217: 1–6. DOI: 10.1155/2020/8597217.
 15. Gladilovich V, Greifenhagen U, Sukhodolov N, Selyutin A, Singer D, Thieme D, et al. Immobilized metal affinity chromatography on collapsed Langmuir-Blodgett iron (III) stearate films and iron(III) oxide nanoparticles for bottom-up phosphoproteomics. *J Chromatogr A*. 2016; 1443: 181–90. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.03.044.
 16. Рожкова ЕА, Краснов ИА, Суходолов НГ, Иванов НС, Янклвич АИ, Подольская ЕП, и др. Исследование поверхностных свойств наноструктур (пленок Лэнгмюра-Блоджетт), содержащих ионы железа, и определение их состава с привлечением методов масс-спектрометрии. *Научное приборостроение*. 2008; 18: 54–60.
 17. Miyauchi S, Arisawa S, Yamada T, Yamamoto H, Yamamoto R. Adhesion of fatty acid in Langmuir-Blodgett films. *Thin Solid Films*. 1989; 178: 347–50. DOI: 10.1016/0040-6090(89)90320-9.
 18. Shreyner E, Alexandrova M, Sukhodolov N, Selyutin A, Podolskaya E. Extraction of the insecticide dieldrin from water and biological samples by metal affinity chromatography. *Mendelev Comm*. 2017; 27: 304–6. DOI: 10.1016/j.mencom.2017.05.030.
 19. Silyavka ES, Selyutin AA, Sukhodolov NG, Shilovskikh VV, Oleneva PA, Mitrofanov AA, et al. Collapsed monomolecular thin films as surface nanomodification techniques for bioorganic MALDI analysis. *AIP Conf Proc*. 2019; 2064: 030015-1–030015-5. DOI: 10.1063/1.5087677.
 20. Gladchuk AS, Silyavka ES, Shilovskikh VV, Bocharov VN, Zorin IM, Tomilin NV, et al. Self-organization of stearic acid salts on the hemispherical surface of the aqueous subphase allows functionalization of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry target plates for on-plate immobilized metal affinity chromatography enrichment. *Thin Solid Films*. 2022; 756: 139374. DOI: 10.1016/j.tsf.2022.139374.
 21. Корягина Н. Л., Савельева Е. И., Каракашев Г. В., Бабаков В. Н., Дубровский Я. А., и др. Определение конъюгированных с белками метаболитов фосфорорганических отравляющих веществ в плазме крови. *Журнал аналитической химии*. 2016; 71 (8): 883–93.
 22. Masson P, Nachon F, Lockridge O. Structural approach to the aging of phosphylated cholinesterases. *Chemico-Biological Interactions*. 2010; 187: 157–62. DOI: 10.1016/j.cbi.2010.03.027.
 23. Jiang W, Murashko EA, Dubrovskii YA, Podolskaya EP, Babakov VN, Mikler J, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of titanium oxide-enriched peptides for detection of aged organophosphorus adducts on human butyrylcholinesterase. *Anal Biochem*. 2013; 439: 132–41. DOI: 10.1016/j.ab.2013.04.018.
 24. Marsillach J, Costa LG, Furlong CE. Protein adducts as biomarkers of exposure to organophosphorus compounds. *Toxicology*. 2013; 307: 46–54. DOI: 10.1016/j.tox.2012.12.007.
 25. Peebles ES, Schopfer LM, Duysen EG, Spaulding R, Voelker T, Thompson CM, et al. Albumin, a new biomarker of organophosphorus toxicant exposure, identified by mass spectrometry. *Toxicological Sciences*. 2005; 83: 303–12. DOI: 10.1093/toxsci/kfi023.
 26. Bao Y, Liu Q, Chen J, Lin Y, Wu B, Xie J. Quantification of nerve agent adducts with albumin in rat plasma using liquid chromatography–isotope dilution tandem mass spectrometry. *J of Chromatography A*. 2012; 1229: 164–71. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.01.032.
 27. John H, van der Schans MJ, Koller M, H. Spruit ET, Worek F, Thiermann H, et al. Fatal sarin poisoning in Syria 2013: forensic verification within an international laboratory network. *Forensic toxicology*. 2017; 36: 61–71. DOI: 10.1007/s11419-017-0376-7.
 28. Schopfer LM, Lockridge O. Analytical approaches for monitoring exposure to organophosphorus and carbamate agents through analysis of protein adducts. *Drug testing and analysis*. 2012; 4: 246–61. DOI: 10.1002/dta.1325.

References

1. Mangas J, Estevez E, Vilanova TC, França C. New insights on molecular interactions of organophosphorus pesticides with esterases. *Toxicology*. 2017; 376: 30–43.
2. Конвенція о хімічному озброєнні. Доступно по ссылке: https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/CWC/CWC_ru.pdf.
3. Schaller J, Gerber S, Kämpfer U, Lejon S, Trachsel Ch. *Human Blood Plasma Proteins: Structure and Function*. John Wiley & Sons, Ltd., 2008; 538 p.
4. Van der Schans MJ, Fidler A, van Oeveren D, Hulst AG, Noort D. Verification of exposure to cholinesterase inhibitors: generic detection of OPCW Schedule 1 nerve agent adducts to human butyrylcholinesterase. *J Anal Toxicol*. 2008; 32: 125–9. DOI: 10.1093/jat/32.1.125.
5. Dubrovskii Ya, Murashko E, Chuprina O, Beltyukov P, Radilov A, Solov'yev N, et al. Mass spectrometry based proteomic approach for the screening of butyrylcholinesterase adduct formation with organophosphates. *Talanta*. 2019; 197: 374–82. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.01.059.
6. Read RW, Riches JR, Stevens JA, Stubbs SJ, Black RM. Biomarkers of organophosphorus nerve agent exposure: comparison of phosphylated butyrylcholinesterase and phosphylated albumin after oxime therapy. *Arch Toxicol*. 2010; 84: 25–36. DOI: 10.1007/s00204-009-0473-4.
7. Liu C, Huang G, Xia Ha, Liu S, Liu J, Yu H, et al. Yuan. Simultaneous quantification of soman and VX adducts to butyrylcholinesterase, their aged methylphosphonic acid adducts and butyrylcholinesterase in plasma using an off-column procinamide-gel separation method combined with UHPLC–MS/MS. *J Chromatogr*. 2016; 1036–7: 57–65. DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.09.044.
8. Fu F, Guo Y, Lu X, Zhao P, Zou S, Wang H, et al. Forensic analysis of soman exposure using characteristic fragment ions from protein adducts. *Human & Experimental Toxicology*, 2021; 9603271211001111. DOI: 10.1177/09603271211001111.
9. Awad H, Khamis MM, El-Aneed A. Mass spectrometry, review of the basics: ionization, Applied spectroscopy reviews. 2015; 50: 158–75. DOI: 10.1080/05704928.2014.954046.
10. Greco V, Piras C, Pieroni L, Ronci M, Putignani L, Roncada P, et al. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical proteomics. *Expert Review of Proteomics*. 2018; 15: 683–96. DOI: 10.1080/14789450.2018.1505510.
11. Israr MZ, Bernieh D, Salzano A, Cassambai Sh, Yazaki Y, Suzuki T. Matrix-assisted laser desorption/ionisation (MALDI) mass spectrometry (MS): basics and clinical applications. *Clin Chem Lab Med*. 2020; 58: 883–96. DOI: 10.1515/cclm-2019-0868.
12. Urban PL, Amantonico A, Zenobi R. Lab-on-a-plate: extending the functionality of MALDI-MS and LDI-MS targets. *Mass Spectrometry Reviews*. 2011; 30: 435–78. DOI: 10.1002/mas.20288.
13. Ch-J Chen, Ch-Ch Lai, M-Ch Tseng, Yu-Ch Liu, Sh-Yi Line, Fuu-J Tsai. Simple fabrication of hydrophobic surface target for increased sensitivity and homogeneity in matrix-assisted laser

- desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of peptides, phosphopeptides, carbohydrates and proteins. *Analytica Chimica Acta*. 2013; 783: 31–38. DOI: 10.1016/j.aca.2013.04.029.
14. Huang H, Sun L, He H, Xia T. A new silicon dioxide-coated MALDI-TOF sample plate for peptide analysis. *BioMed Research International*. 2020; 8597217: 1–6. DOI: 10.1155/2020/8597217.
 15. Gladilovich V, Greifenhagen U, Sukhodolov N, Selyutin A, Singer D, Thieme D, et al. Immobilized metal affinity chromatography on collapsed Langmuir-Blodgett iron (III) stearate films and iron(III) oxide nanoparticles for bottom-up phosphoproteomics. *J Chromatogr A*. 2016; 1443: 181–90. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.03.044.
 16. Rozhkova EA, Krasnov IA, Sukhodolov NG, Ivanov NS, Yanklovich AI, Podolskaya EP, et al. Surface behavior of nanostructures (Langmuir-Blodgett Films), Containing Fe(III) ions and their composition determination mass-spectrometry methods. *Nauchnoe Priborostr*. 2008; 18: 54–60.
 17. Miyauchi S, Arisawa S, Yamada T, Yamamoto H, Yamamoto R. Adhesion of fatty acid in Langmuir-Blodgett films. *Thin Solid Films*. 1989; 178: 347–50. DOI: 10.1016/0040-6090(89)90320-9.
 18. Shreyner E, Alexandrova M, Sukhodolov N, Selyutin A, Podolskaya E. Extraction of the insecticide dieldrin from water and biological samples by metal affinity chromatography, *Mendeleev Commun*. 2017; 27: 304–6. DOI: 10.1016/j.mencom.2017.05.030.
 19. Silyavka ES, Selyutin AA, Sukhodolov NG, Shilovskikh VV, Oleneva PA, Mitrofanov AA, et al. Collapsed monomolecular thin films as surface nanomodification techniques for bioorganic MALDI analysis. *AIP Conf Proc*. 2019; 2064: 030015-1–030015-5. DOI: 10.1063/1.5087677.
 20. Gladchuk AS, Silyavka ES, Shilovskikh VV, Bocharov VN, Zorin IM, Tomilin NV, et al. Self-organization of stearic acid salts on the hemispherical surface of the aqueous subphase allows functionalization of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry target plates for on-plate immobilized metal affinity chromatography enrichment. *Thin Solid Films*. 2022; 756: 139374. DOI: 10.1016/j.tsf.2022.139374.
 21. Koryagina NL, Saveleva EI, Karakashev GV, Babakov VN, Dubrovskii YaA, et al. Determination of protein adducts of organophosphorus nerve agents in blood plasma. *J Anal Chem*. 2016; 71: 849–59. DOI: 10.1134/S1061934816080086.
 22. Masson P, Nachon F, Lockridge O. Structural approach to the aging of phosphorylated cholinesterases. *Chemico-Biological Interactions*. 2010; 187: 157–62. DOI: 10.1016/j.cbi.2010.03.027.
 23. Jiang W, Murashko EA, Dubrovskii YA, Podolskaya EP, Babakov VN, Mikler J, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of titanium oxide-enriched peptides for detection of aged organophosphorus adducts on human butyrylcholinesterase. *Anal Biochem*. 2013; 439: 132–41. DOI: 10.1016/j.ab.2013.04.018.
 24. Marsillach J, Costa LG, Furlong CE. Protein adducts as biomarkers of exposure to organophosphorus compounds. *Toxicology*. 2013; 307: 46–54. DOI: 10.1016/j.tox.2012.12.007.
 25. Peebles ES, Schopfer LM, Duysen EG, Spaulding R, Voelker T, Thompson CM, et al. Albumin, a new biomarker of organophosphorus toxicant exposure, identified by mass spectrometry. *Toxicological Sciences*. 2005; 83: 303–12. DOI: 10.1093/toxsci/kfi023.
 26. Bao Y, Liu Q, Chen J, Lin Y, Wu B, Xie J. Quantification of nerve agent adducts with albumin in rat plasma using liquid chromatography–isotope dilution tandem mass spectrometry. *J of Chromatography A*. 2012; 1229: 164–71. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.01.032.
 27. John H, van der Schans MJ, Koller M, H. Spruit ET, Worek F, Thiermann H, et al. Fatal sarin poisoning in Syria 2013: forensic verification within an international laboratory network. *Forensic toxicology*. 2017; 36: 61–71. DOI: 10.1007/s11419-017-0376-7.
 28. Schopfer LM, Lockridge O. Analytical approaches for monitoring exposure to organophosphorus and carbamate agents through analysis of protein adducts. *Drug testing and analysis*. 2012; 4: 246–61. DOI: 10.1002/dta.1325.

МОДЕЛЬ ЛЕЧЕНИЯ АБСОЛЮТНОГО МАТОЧНОГО БЕСПЛОДИЯ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

А. М. Полстяной^{1,2}, О. Ю. Полстяная^{1,2}, И. В. Рендашкин¹, О. Н. Якименко^{1,2}, К. О. Туценко^{1,2}, М. Г. Садовский^{1,2,3}, А. А. Чернова^{1,2} ✉

¹ Федеральный Сибирский научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства России, Красноярск, Россия

² Красноярский государственный медицинский университет имени В. Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия

³ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», Красноярск, Россия

До появления современных вспомогательных репродуктивных технологий трансплантацию репродуктивных органов рассматривали как потенциальное лечение яичникового, трубного и маточного бесплодия. Трансплантацию матки можно рассматривать как метод лечения абсолютного маточного бесплодия, подобный пересадке нежизненно важных органов. Однако клиническое применение трансплантации матки у человека вызывает много проблем. Целью исследования было разработать программу по оценке различных хирургических методов реваскуляризации тканей для восстановления репродуктивной функции при маточной форме бесплодия на экспериментальных животных. Выбор кроликов породы шиншилла ($n = 20$) для экспериментальной работы обусловлен идентичностью строения органоматочного комплекса всех млекопитающих. Для разработки хирургического протокола пересадки тканей репродуктивной системы на лабораторных животных применили инновационную методику по использованию яичниковых артерий вместо маточных, как в стандартном протоколе. Согласно результатам, полученным на лабораторных животных, гемодинамические характеристики кровоснабжения пересаженной матки не меняются, что позволяет имплементировать данную хирургическую методику для использования в эксперименте на трупном материале для пересадки матки. Предлагаемый протокол проведения операции по трансплантации матки обеспечивает высокий уровень приживаемости трансплантата и его нормальное кровоснабжение с минимизацией рисков травматизации донора и снижением сложности операции.

Ключевые слова: пересадка матки, лечение маточного бесплодия, трансплантация органов, органное донорство, сравнительный анализ

Финансирование: субсидия на выполнение государственного задания ФМБА России.

Вклад авторов: А. М. Полстяной — создание хирургического протокола трансплантации матки; О. Ю. Полстяная — планирование эксперимента; И. В. Рендашкин — анализ литературы; О. Н. Якименко — этические аспекты планирования исследования, патентование; К. О. Туценко — статистический анализ; М. Г. Садовский — сравнительный анализ экспериментальных данных; А. А. Чернова — руководство, планирование исследования.

Соблюдение этических стандартов: исследование проводили в соответствии с требованиями «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986) и «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ 755 от 12.08.1977 МЗ СССР).

✉ **Для корреспонденции:** Анна Александровна Чернова
ул. Краснодарская 40/4, г. Красноярск, 660133, Россия; chernova-krsk@yandex.ru

Статья получена: 22.09.2022 **Статья принята к печати:** 11.12.2022 **Опубликована онлайн:** 20.01.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.001

EXPERIMENTAL ANIMAL MODEL FOR TREATMENT OF ABSOLUTE UTERINE FACTOR INFERTILITY

Polstyanyoy AM^{1,2}, Polstyanyaya OYu^{1,2}, Rendashkin IV¹, Yakimenko ON^{1,2}, Tutsenko KO^{1,2}, Sadovsky MG^{1,2,3}, Chernova AA^{1,2} ✉

¹ Federal Siberian Research Clinical Center of the Federal Medical Biological Agency, Krasnoyarsk, Russia

² Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia

³ Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russia

Reproductive organ transplantation was considered as a potential method for treatment of the ovarian factor, tubal factor, and uterine factor infertility before the advent of advanced assisted reproductive technologies. Uterus transplantation can be considered as the method for treatment of absolute uterine factor infertility similar to transplantation of non-vital organs. However, the clinical use of uterus transplantation in humans causes a lot of problems. The study was aimed to develop a program for assessment of various surgical tissue revascularization techniques for restoration of reproductive function in experimental animals with uterine factor infertility. Chinchilla rabbits ($n = 20$) were selected for experiments because of the fact that all mammals have similar structure of the organs. The innovative technique involving the use of ovarian arteries instead of uterine arteries (as in the standard protocol) was used in laboratory animals to develop the surgical protocol for transplantation of reproductive tissues. The animal study results show that hemodynamic characteristics of blood supply to the transplanted uterus remain unchanged. This makes it possible to use the surgical method in the experiments on the uterus transplant from a deceased donor. The proposed uterus transplantation protocol ensures high transplant survival rate and normal blood supply to the transplant, along with the reduced risk of injury to the donor and reduced complexity of the surgical procedure.

Keywords: uterus transplantation, treatment of uterine factor infertility, organ transplantation, organ donation, comparative analysis

Funding: the study was conducted as part of the State Assignment of FMBA of Russia.

Author contribution: Polstyanyoy AM — developing the surgical protocol for uterus transplantation; Polstyanyaya OYu — experimental planning; Rendashkin IV — literature analysis; Yakimenko ON — ethical aspects of study planning; Tutsenko KO — statistical analysis; Sadovsky MG — comparative analysis of experimental data; Chernova AA — management, study planning.

Compliance with the ethical standards: the study was conducted in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986) and the Rules for Handling Experimental Animals (order № 755 of 12.08.1977 of the Ministry of Health of the USSR).

✉ **Correspondence should be addressed:** Anna A. Chernova
Krasnodarskaya, 40/4, Krasnoyarsk, 660133, Russia; chernova-krsk@yandex.ru

Received: 22.09.2022 **Accepted:** 11.12.2022 **Published online:** 20.01.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.001

Абсолютную форму маточного бесплодия (АФМБ) исторически считали неизлечимой формой бесплодия, однако в 2014 г. был зарегистрирован случай рождения ребенка после аллогенной трансплантации матки (ТМ) [1]. Успех этой операции стал существенным прогрессом в лечении АФМБ. Причиной АФМБ могут быть перенесенные оперативные вмешательства, препятствующие имплантации эмбриона или вынашиванию беременности [2]. От АФМБ страдают около 20 женщин на каждые 100 000 женского населения фертильного возраста [3, 4]. Трансплантация матки сопряжена с рядом трудностей этического характера, которые, в свою очередь, могут порождать медицинские, психологические и юридические риски как для генетической, так и для биологической матери будущего ребенка [4].

Абсолютное бесплодие маточного генеза (АБМГ) может быть вызвано различными причинами: полным отсутствием матки, аномалиями развития матки, врожденными пороками развития или следствием органосохраняющего оперативного вмешательства в анамнезе, препятствующими имплантации эмбриона либо вынашиванию беременности [2, 4].

Отсутствие матки является наиболее очевидной причиной АБМГ. Основная причина ее отсутствия — гистерэктомия в анамнезе, потребовавшаяся для лечения таких заболеваний, как миома матки, рак шейки матки или эндометриоз, тяжелый аденомиоз [1, 3].

Синдром Рокитанского–Кюстнера–Майера (СРКМ), обусловленный нарушением развития мюллеровых протоков, является причиной врожденного отсутствия матки [4]. Существует ряд причин АБМГ у женщин с сохраненной маткой, к которым относятся врожденные пороки развития матки с частичными дефектами развития или слияния мюллеровских протоков [5].

АБМГ может развиваться вследствие осложнений после внутриматочных манипуляций или тяжелого эндометрита [6]. ТМ может быть единственным способом восстановления фертильности в этой группе пациентов. По оценкам, распространенность АБМГ составляет около 20 000 случаев у женщин детородного возраста на 100 млн человек [4].

Одной из важных проблем, требующей решения при организации лечения бесплодия путем ТМ, является холодовая и тепловая ишемия. Повреждение клеток в трансплантате происходит с момента пережатия сосудов донора до момента реперфузии после реваскуляризации в организме реципиента. В исследовании на мышах было показано, что возможность спонтанной беременности сохраняется после 24 ч холодовой ишемии; потеря данной функции происходит через 48 ч холодовой ишемии [7]. Матка овцы, сопоставимая по размерам с человеческой, показала жизнеспособность после 24 ч холодовой ишемии, при этом оценку жизнеспособности проводили через 8 дней после аутотрансплантации органа [8]. Чувствительность к тепловой ишемии исследовали на крысах [9], макаках *Macaca fascicularis* [10] и овцах [11]. Сохранение жизнеспособности было показано после 5, 4 и 3 ч ишемии соответственно. Врожденный регенеративный потенциал, включающий в себя, помимо прочего, органспецифичные стволовые клетки, обеспечивает способность матки компенсировать возможное повреждение от ишемии во время трансплантации [7–9, 12].

Еще одной важной проблемой является иммуносупрессия. Исследования на крысах демонстрируют отличные результаты применения такролимуса [13] в сравнении с

циклоспоринами [14] для предотвращения отторжения. Такролимус показал также свою эффективность в исследовании на кроликах [15] и, как показывают результаты, эффективно предотвращает отторжение в течение 12 месяцев у свиней [16]. Монотерапия циклоспоринами эффективна в исследованиях на овцах [17]. Эти данные в совокупности свидетельствуют о том, что монотерапия циклоспоринами или такролимусом эффективна у грызунов и крупных домашних видов.

Трансплантация органа является комплексной хирургической проблемой, основным аспектом которой является восстановление перфузии в трансплантате посредством налаживания артериального притока и венозного оттока [2, 15]. При пересадке органов восстановление кровотока происходит за счет наложения анастомоза основного питающего артериального сосуда донорского органа с крупным магистральным сосудом реципиента; аналогичным образом происходит восстановление венозного оттока [18]. В связи с этим многие авторы в своих работах отмечают возникновение осложнений, связанных с нарушением венозного оттока, после пересадки. На основании этих данных было намечено несколько основных путей восстановления кровотока в трансплантате, однако оптимальный метод до сих пор не установлен [7, 11].

В рамках подготовки к первой ТМ у человека от живого донора проводили отработку хирургического метода выделения маточных артерий и вен у пациенток, оперируемых по поводу рака матки и шейки матки с лимфаденэктомией [19]. Результаты данного исследования впоследствии послужили базой для формирования хирургического протокола ТМ от живого донора у человека [20].

В основе исследования лежала гипотеза о том, что маточные вены можно не использовать для трансплантационной методики, яичниковых будет достаточно. В других работах при пересадке использовали обе группы вен [21].

Все исследователи отмечают, что при использовании маточных вен возникает несколько сложностей.

При извлечении органа у живого донора изъять маточные вены проблематично (трудно хирургически отделить от мочеочочника, который анатомически находится в непосредственной близости).

Маточные вены — сложно сплетенные сильно разветвленные тонкие кровеносные сосуды, что представляет собой проблему при хирургическом вмешательстве, вследствие чего операция занимает очень много времени.

При трупном (мультиорганном) донорстве матка не находится в приоритете (ее, при необходимости, извлекают в последнюю очередь), в связи с чем при изъятии почек возникает сложность: для почки необходимо изъять мочеочочник максимальной длины, поэтому матка окажется непригодной (будут разрушены близлежащие маточные сосуды).

В настоящее время в Российской Федерации не существует утвержденного протокола оперативного лечения АФМБ путем трансплантации матки. Целью нашего исследования было проанализировать имеющиеся в мировой литературе результаты исследования по трансплантации матки у модельных животных (кроликов).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили в 2021 г. научным коллективом сотрудников Федерального Сибирского научно-клинического

центра Федерального медико-биологического агентства Российской Федерации. Для исследования использовали лабораторных животных — кроликов-самок породы шиншилла в количестве 20 штук массой 1800–2000 г с подтвержденной нормальной репродуктивной функцией (рожавшие).

До начала эксперимента животных выдерживали на протяжении двухнедельного карантина в условиях вивария с учетом требований к их содержанию на специализированном брикетном вскармливании с добавлением овощей, зерновых, сена и молочной продукции. Дозированное освещение (12 : 12, свет с 08:00 ч). В одной клетке содержали по одному кролику. Оценку состояния животных проводили ежедневно с фиксацией данных в дневнике измерений.

Измерение потоковых показателей кровотока, индекса резистентности сосудов, кровяного давления в сосудах проводили ультразвуковым методом доплерометрии (Hitachi Aloka ProSound Alpha 6; Япония). Все эксперименты протоколировали, имеются фотоматериалы. При статистической обработке материала использовали стандартный алгоритм статистических процедур, при этом методы статистической обработки применялись в зависимости от характера учетных признаков и числа групп сравнения. Для определения характера распределения количественных показателей использовали критерий Шапиро–Уилка. При отсутствии нормального распределения описательная статистика представлена в виде медианы и перцентилей. Для определения значимости различий при множественном сравнении применяли критерий Крускала–Уоллиса, для попарного сравнения — критерий Манна–Уитни.

При нормальном распределении показателей использована описательная статистика, представленная в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. Достоверность различий нормально распределенных показателей в сравниваемых группах определялась с использованием критерия Стьюдента (t -критерия).

Программа экспериментальных исследований

Эксперимент проводили на 20 модельных лабораторных животных (кроликах), которых разделили на четыре исследуемые группы:

- группа 1 ($n = 5$) — подопытным проводили перевязку маточных вен;
- группа 2 ($n = 5$) — подопытным проводили перевязку яичниковых вен;
- группа 3 контрольная ($n = 5$) — интактные животные;
- группа 4 контрольная ($n = 5$) — подопытным проводили перевязку маточных и яичниковых вен.

Эксперименты на лабораторных животных проводили в три этапа. Селективно перевязывали различные сосуды, питающие матку, — всего две группы сосудов: яичниковая артерия плюс яичниковые вены и маточная артерия плюс маточные вены. При перевязке маточных вен при сохранении только яичникового оттока в течение двух недель животных наблюдали с целью установления факта отсутствия дистрофии органа.

Эксперимент 1. Анатомическая оценка бассейнов кровоснабжения (притока и оттока) женских половых органов

Проводили препарирование кровеносных сосудов матки, яичников, влагалища с последующей их маркировкой

для определения длины сосудов, места их анастомоза с магистральными артериями и венами, выявление коллатерального кровотока и идентификации шунтов. После выделения сосудов измеряли длину, диаметр сосуда; методом УЗИ осуществляли доплерометрическое исследование потоковых показателей кровотока, индекса резистентности сосудов, кровяного давления в сосудах.

Эксперимент 2. Оценка компенсационной способности различных венозных бассейнов оттока от половых органов

На данном этапе проводили перевязку различных магистральных сосудов притока и оттока от половых органов с последующей непосредственной и отсроченной оценкой их влияния на кровоток и функциональное состояние половых органов.

Животное оставалось под наблюдением в эксперименте в течение 14 дней. По истечении 14 дней повторно проводили срединное чревосечение с целью ревизии органов малого таза и места предыдущего оперативного вмешательства. Повторно измеряли потоковые показатели кровотока в сосудах малого таза и в матке (методом УЗИ доплерометрии).

Эксперимент 3. Пересадка трансплантата матки с использованием яичниковых вен в качестве единственного русла венозного оттока

Матку выделили из параметральной клетчатки, мочевой пузырь и прямая кишка были отделены от матки, их связи пересечены. Следующим этапом провели пересечение влагалища. Далее проводили перевязывание маточных вен и пересечение, затем — клепирование подвздошных артерий, их пересечение в области отхождения маточных артерий. После этого животное-донор выводили из эксперимента введением летальной дозы сульфата магния внутривенно. Проводили канюлирование маточных артерий и яичниковых вен трансплантата и перфузию трансплантата раствором Кустодиола (не менее 200 мл, с учетом размера трансплантата) в сочетании с раствором Гепарина (1 : 5000). После адекватной отмывки (т. е. при отсутствии кровяных элементов в промывной жидкости) проводили подготовку сосудистых ножек трансплантата к пересадке.

По истечении 14 дней повторно проводили срединное чревосечение с целью ревизии органов малого таза и места предыдущего оперативного вмешательства, ревизии состояния трансплантата, анастомозов. Повторно измеряли потоковые показатели кровотока в сосудах малого таза и в трансплантированной матке (методом УЗ-доплерометрии).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты исследования анатомических параметров и гемодинамических показателей кровотока в половых органах самок кроликов методом УЗ-доплерометрии представлены в табл. 1.

Для каждого из 20 животных проведен сравнительный анализ параметров анатомического и замещающего кровотока, рассмотрим их на примере особи 1 (см. рис.).

На примере данных, представленных на рисунке, можно показать, что разница показателя V_{\min} между маточными и яичниковыми артериями объясняется разницей

Таблица 1. Анатомические и гемодинамические параметры кровеносного русла половых органов самок кролика

Параметр		Значение
Вес		3700 г
Длина тела		37 см
Длина правой маточной артерии		52 мм
Длина левой маточной артерии		54 мм
Длина правой яичниковой артерии		43 мм
Длина левой яичниковой артерии		45 мм
Допплерометрические показатели		
Правая маточная артерия	V_{min}	3,1
	V_{max}	29,7
	PI	3,92
	RI	0,89
Левая маточная артерия	V_{min}	3,3
	V_{max}	27,8
	PI	3,89
	RI	0,88
Правая яичниковая артерия	V_{min}	1,42
	V_{max}	22,78
	PI	4,02
	RI	0,77
Левая яичниковая артерия	V_{min}	1,53
	V_{max}	23,62
	PI	3,97
	RI	0,69

анатомических диаметров сосудов. Не только длина, но и диаметр этих сосудов существенно различаются (маточная артерия по диаметру значительно больше) и, поскольку показатель V_{min} отражает поток крови в период диастолы, то очевидно, что по сосуду с большим диаметром поток крови выше, и различие в сосудах может быть значительным. Поэтому ожидаемо, что показатель V_{min} маточной артерии должен быть существенно выше, чем у яичниковой артерии. Измерения, проведенные у 20 особей, подтверждают разницу в 2–2,5 раза.

Сравнительный анализ параметров кровотока проведен у всех экспериментальных животных.

Показатель V_{max} отражает поток крови в период систолы, и у маточной артерии он будет чуть больше, чем у яичниковой, что тоже объясняется анатомически. Аорта делится на две подвздошные артерии, и каждая из них, в свою очередь, делится еще на две подвздошные артерии — внутреннюю и наружную. Маточная артерия отходит от внутренней подвздошной артерии, яичниковая артерия отходит от аорты напрямую.

Значения V_{max} , в отличие от V_{min} у маточной и яичниковой артерий должны различаться незначительно — на 15–30%. Данный факт подтвердился измерениями показателей методом доплерографии у всех 20 особей. У особи 6 минимальная скорость кровотока в левой МА была выше более чем в два раза по сравнению с ЯА (227%). У особи 7 минимальная скорость кровотока в левой МА была выше в два раза по сравнению с левой ЯА, такая же разница наблюдается и для правых артерий. Значение V_{max} отличается незначительно: на 26% для левых яичниковых артерий и на 22% — для правых.

Статистическая обработка результатов с применением коэффициента Стьюдента представлена в табл. 2.

Было проведено 20 операций на модельных животных (кроликах). У каждого из них определяли параметры притока оттока крови в парах «правая – левая маточная артерия» и «правая – левая яичниковая артерия» (табл. 2). Ни в одной паре статистически достоверного различия показателей суммарного кровотока не наблюдается.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Критерии неудачи трансплантации и удаления матки необходимо определить до ее трансплантации. Функциональная несостоятельность трансплантированной матки определяется следующими признаками: отсутствие восстановления менструаций в течение определенного периода после трансплантации, отсутствие наступления беременности, несмотря на несколько процедур переноса эмбрионов, атрофию матки. Период времени для этих исходов не определен, но необходимо установить его до трансплантации, поскольку длительное применение иммуносупрессивных лекарственных препаратов является риском для реципиента. Меры противодействия функциональной несостоятельности: оценка трансплантированной матки с помощью эхографии и последующее назначение иммуносупрессоров. В нашем исследовании иммуносупрессия не применялась.

Клиническое применение трансплантации матки у людей требует всестороннего обсуждения проблем, связанных с репродуктивной этикой. Медицинские, этические, социальные и религиозные предпосылки различны в странах, осуществивших данный вид операции, например в Саудовской Аравии, Турции и Швеции, поэтому трансплантация матки требует тщательного обсуждения с учетом каждого положения. Важно рассмотреть вопрос,

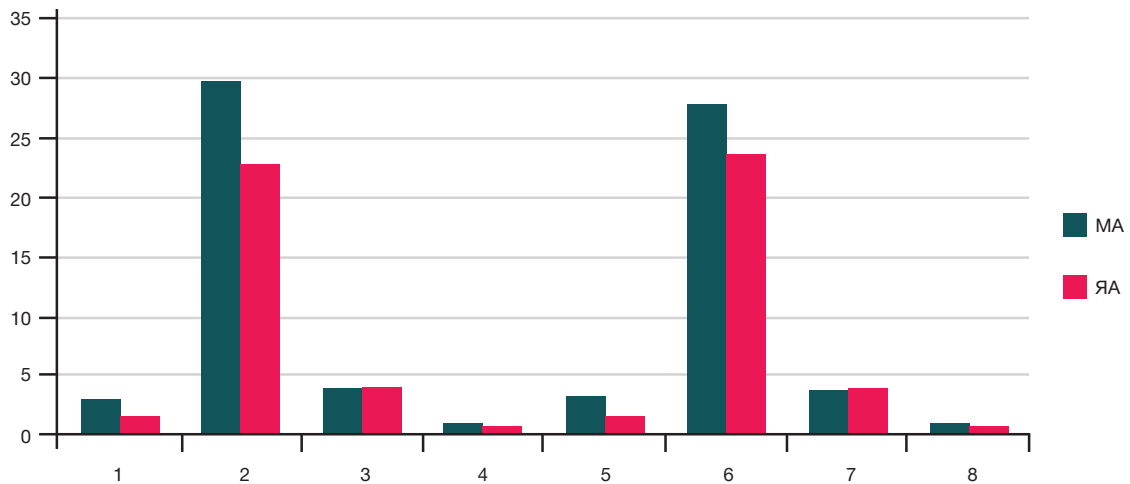


Рис. Допплерометрические параметры особи 1

имеет ли трансплантация матки социальное значение, т. е. удовлетворяет ли методика трансплантации матки социальные потребности пациентов с маточной формой бесплодия в рождении ребенка. Методика трансплантации матки вносит вклад в совершенствование способов лечения таких пациентов и, вероятно, улучшает состояние здоровья и качество жизни. Операция не является бесполезной или излишней исходя из актуальных проблем в стране, где не разрешена суррогатная беременность. Однако небольшое число гинекологов и еще меньшее количество пациентов и членов общества знают о проблемах трансплантации матки, и важно, чтобы операция была широко воспринята обществом. Следующим шагом являются крупномасштабные социологические опросы

населения для изучения социальных потребностей и отношения к операции.

ВЫВОДЫ

Основная идея настоящего исследования заключается в том, что при пересадке матки можно искусственно изменить характер кровотока в имплантируемом органе: цель предлагаемой методики — избежать трудоемкую и потенциально опасную операцию по восстановлению оттока крови через маточную артерию у реципиента. Такой подход позволяет подготовить новый протокол лечения и проведения операции, существенно понижающий риски послеоперационного осложнения.

Таблица 2. Критерий Стьюдента для сравниваемых групп

Сравниваемые группы	<i>p</i>
Правая маточная артерия V_{min}	< 0,001
Правая яичниковая артерия V_{min}	
Правая маточная артерия V_{max}	< 0,001
Правая яичниковая артерия V_{max}	
Правая маточная артерия PI	0,032
Правая яичниковая артерия PI	
Правая маточная артерия RI	0,003
Правая яичниковая артерия RI	
Левая маточная артерия V_{min}	< 0,001
Левая яичниковая артерия V_{min}	
Левая маточная артерия V_{max}	< 0,001
Левая яичниковая артерия V_{max}	
Левая маточная артерия PI	0,491
Левая яичниковая артерия PI	
Левая маточная артерия RI	0,01
Левая яичниковая артерия RI	

Примечание: *p* — уровень значимости различий.

Литература

1. Brännström M, et al. Livebirth after uterus transplantation. The Lancet. 2015; 385 (9968): 607–16.
2. Brännström M, et al. Uterus transplantation: animal research and human possibilities. Fertility and Sterility. 2012; 97 (6): 1269–76.
3. Brinsden P. Gestational surrogacy. Human Reproduction Update. 2003; 9 (5): 483–91.
4. Chan Y, et al. Reproductive outcomes in women with congenital uterine anomalies: a systematic review. Ultrasound in Obstetrics

- & Gynecology. 2011; 38 (4): 371–82.
5. El-Akouri R. Successful uterine transplantation in the mouse: pregnancy and post-natal development of offspring. *Human Reproduction*. 2003; 18 (10): 2018–23.
 6. McCulloch P, et al. No surgical innovation without evaluation: the IDEAL recommendations. *The Lancet*. 2009; 374 (9695): 1105–12.
 7. Adachi M, et al. Evaluation of allowable time and histopathological changes in warm ischemia of the uterus in cynomolgus monkey as a model for uterus transplantation. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 2016; 95 (9): 991–8.
 8. Akhi S, et al. Uterine rejection after allogeneic uterus transplantation in the rat is effectively suppressed by tacrolimus. *Fertility and Sterility*. 2013; 99 (3): 862–70.
 9. Díaz-García C, et al. The effect of warm ischemia at uterus transplantation in a rat model. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 2012; 92 (2): 152–9.
 10. Kisu I, et al. A new surgical technique of uterine auto-transplantation in cynomolgus monkey: preliminary report about two cases. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2011; 285 (1): 129–37.
 11. Enskog A, et al. Uterus transplantation in the baboon: methodology and long-term function after auto-transplantation. *Human Reproduction*. 2010; 25 (8): 1980–7.
 12. El-Akouri R. Pregnancy in transplanted mouse uterus after long-term cold ischaemic preservation. *Human Reproduction*. 2003; 18 (10): 2024–30.
 13. Groth K, et al. Effects of immunosuppression by cyclosporine A on allogeneic uterine transplant in the rat. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2012; 163 (1): 97–103.
 14. Tricard J, et al. Uterus tolerance to extended cold ischemic storage after auto-transplantation in ewes. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2017; 214: 162–7.
 15. Wranning C, et al. Uterus transplantation in the rat: Model development, surgical learning and morphological evaluation of healing. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 2008; 87 (11): 1239–47.
 16. Avison D, et al. Heterotopic Uterus Transplantation in a Swine Model. *Transplantation*. 2009; 88 (4): 465–9.
 17. Gauthier T, et al. Uterine allotransplantation in ewes using an aortocava patch. *Human Reproduction*. 2011; 26 (11): 3028–36.
 18. Gonzalez-Pinto I, et al. Uterus Transplantation Model in Sheep With Heterotopic Whole Graft and Aorta and Cava Anastomoses. *Transplantation Proceedings*. 2013; 45 (5): 1802–4.
 19. Gauthier T, et al. Uterus retrieval process from brain dead donors. *Fertility and Sterility*. 2014; 102 (2): 476–82.
 20. Johannesson L, et al. Vascular Pedicle Lengths After Hysterectomy. *Obstetrics & Gynecology*. 2012; 119 (6): 1219–25.
 21. Fronek J, et al. Human Uterus Transplantation from Living and Deceased Donors: The Interim Results of the First 10 Cases of the Czech Trial. *Journal of Clinical Medicine*. 2021; 10 (4): 586.

References

1. Brännström M, et al. Livebirth after uterus transplantation. *The Lancet*. 2015; 385 (9968): 607–16.
2. Brännström M, et al. Uterus transplantation: animal research and human possibilities. *Fertility and Sterility*. 2012; 97 (6): 1269–76.
3. Brinsden P. Gestational surrogacy. *Human Reproduction Update*. 2003; 9 (5): 483–91.
4. Chan Y, et al. Reproductive outcomes in women with congenital uterine anomalies: a systematic review. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2011; 38 (4): 371–82.
5. El-Akouri R. Successful uterine transplantation in the mouse: pregnancy and post-natal development of offspring. *Human Reproduction*. 2003; 18 (10): 2018–23.
6. McCulloch P, et al. No surgical innovation without evaluation: the IDEAL recommendations. *The Lancet*. 2009; 374 (9695): 1105–12.
7. Adachi M, et al. Evaluation of allowable time and histopathological changes in warm ischemia of the uterus in cynomolgus monkey as a model for uterus transplantation. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 2016; 95 (9): 991–8.
8. Akhi S, et al. Uterine rejection after allogeneic uterus transplantation in the rat is effectively suppressed by tacrolimus. *Fertility and Sterility*. 2013; 99 (3): 862–70.
9. Díaz-García C, et al. The effect of warm ischemia at uterus transplantation in a rat model. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 2012; 92 (2): 152–9.
10. Kisu I, et al. A new surgical technique of uterine auto-transplantation in cynomolgus monkey: preliminary report about two cases. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2011; 285 (1): 129–37.
11. Enskog A, et al. Uterus transplantation in the baboon: methodology and long-term function after auto-transplantation. *Human Reproduction*. 2010; 25 (8): 1980–7.
12. El-Akouri R. Pregnancy in transplanted mouse uterus after long-term cold ischaemic preservation. *Human Reproduction*. 2003; 18 (10): 2024–30.
13. Groth K, et al. Effects of immunosuppression by cyclosporine A on allogeneic uterine transplant in the rat. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2012; 163 (1): 97–103.
14. Tricard J, et al. Uterus tolerance to extended cold ischemic storage after auto-transplantation in ewes. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2017; 214: 162–7.
15. Wranning C, et al. Uterus transplantation in the rat: Model development, surgical learning and morphological evaluation of healing. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 2008; 87 (11): 1239–47.
16. Avison D, et al. Heterotopic Uterus Transplantation in a Swine Model. *Transplantation*. 2009; 88 (4): 465–9.
17. Gauthier T, et al. Uterine allotransplantation in ewes using an aortocava patch. *Human Reproduction*. 2011; 26 (11): 3028–36.
18. Gonzalez-Pinto I, et al. Uterus Transplantation Model in Sheep With Heterotopic Whole Graft and Aorta and Cava Anastomoses. *Transplantation Proceedings*. 2013; 45 (5): 1802–4.
19. Gauthier T, et al. Uterus retrieval process from brain dead donors. *Fertility and Sterility*. 2014; 102 (2): 476–82.
20. Johannesson L, et al. Vascular Pedicle Lengths After Hysterectomy. *Obstetrics & Gynecology*. 2012; 119 (6): 1219–25.
21. Fronek J, et al. Human Uterus Transplantation from Living and Deceased Donors: The Interim Results of the First 10 Cases of the Czech Trial. *Journal of Clinical Medicine*. 2021; 10 (4): 586.

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ПОИСКА СРЕДСТВ КОРРЕКЦИИ ТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ СЕРОВОДОРОДА

Л. И. Головацкая¹, Е. В. Тризно², Ю. А. Смирнова³, М. Н. Тризно² ✉

¹ Каспийский институт морского и речного транспорта имени Ф. М. Апраксина — филиал Волжского государственного университета водного транспорта Федерального агентства морского и речного транспорта, Астрахань, Россия

² Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, Россия

³ Астраханский государственный университет имени В. Н. Татищева, Астрахань, Россия

В качестве меры по снижению последствий воздействия на организм сероводородсодержащего газа в результате аварийных ситуаций перспективно использовать математическое моделирование, позволяющее *in silico* рассчитать и предложить средства защиты клеточных мембран. Целью работы было оценить характер взаимодействия сероводорода (H_2S) и ацетилцистеина (АЦЦ) с компонентами клеточных мембран. С помощью математического моделирования межатомных взаимодействий компонентов клеточной мембраны сначала с H_2S , а затем с АЦЦ осуществлены квантово-химические расчеты с использованием авторской методики. Созданы z-матрицы программного комплекса Gamess — метода PM3, отражающие тип и положение атома в молекуле. Оптимизацию структуры молекулы производили с помощью Морас, встроенного в ChemOffice. В качестве экспериментальной модели биологической мембраны использовали липосомы на лецитиновой основе в сульфидном растворе (Na_2S — донор H^- и HS^- -ионов). Параметром сравнения взаимодействия компонентов системы H_2S и АЦЦ с фосфолипидом послужил окислительно-восстановительный потенциал (Redox-потенциал), выраженный в мВ. Представлены схемы, иллюстрирующие блокированные АЦЦ реактивные центры фосфолипида в условиях токсического воздействия H_2S . Сформированы липосомные модели клеточных мембран и замерены Redox-показатели. Биологический эксперимент подтвердил приемлемость авторской методики расчета межмолекулярного взаимодействия в качестве базиса для дальнейшего подбора средств коррекции токсических доз сероводорода. Визуализированы мембранные модели взаимодействия H_2S с белком и лецитином *in silico* и *in vitro*. Подтверждена возможность применения АЦЦ в качестве ингибитора H_2S .

Ключевые слова: математическое моделирование, сероводород, фосфолипид, лецитин, липосомы, редокс-потенциал

Благодарности: авторы выражают глубочайшую благодарность ушедшим из жизни д. х. н., профессору Н. М. Алыкову и д. м. н., профессору Н. Н. Тризно за неоценимый вклад в развитие научных идей и направлений авторов статьи.

Вклад авторов: Л. И. Головацкая — идея и дизайн математической части исследования, анализ, планирование исследования, интерпретация данных; Е. В. Тризно — идея и дизайн экспериментальной части, координация исследования, участие в практической части эксперимента, подготовка рукописи; Ю. А. Смирнова — участие в разработке математической программы, работа с литературой, обсуждение результатов; М. Н. Тризно — практическая постановка эксперимента, визуализация данных, статистический анализ.

✉ **Для корреспонденции:** Екатерина Валерьевна Тризно
ул. Бакинская, д. 121, г. Астрахань, 414000, Россия; neuron-2010@mail.ru

Статья получена: 23.12.2022 **Статья принята к печати:** 27.01.2023 **Опубликована онлайн:** 10.03.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.007

MOLECULAR MODELING AND EXPERIMENTAL CONFIRMATION OF THE SEARCH FOR AGENTS MITIGATING TOXIC ACTION OF HYDROGEN SULFIDE

Golovatskaya LI¹, Trizno EV², Smirnova YuA³, Trizno MN² ✉

¹ Apraksin Caspian Institute of Sea and River Transport — branch of the Volga State University of Water Transport of the Federal Agency for Sea and Inland Water Transport, Astrakhan, Russia

² Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia

³ Tatischev Astrakhan State University, Astrakhan, Russia

Mathematical modeling is a promising method enabling *in silico* calculations with subsequent suggestion of cell membrane protective agents used to reduce the consequences of exposure to hydrogen sulfide-containing gas in emergency situations. This study aimed to investigate the nature of interaction of hydrogen sulfide (H_2S) and N-Acetyl-L-Cysteine (NAC) with the components of cell membranes. We built a mathematical model of interatomic interactions of cell membrane components with H_2S and NAC (two separate models), then made the quantum-chemical calculations using our proprietary technique and set up GAMESS Z-matrices reflecting type and position of atoms in the molecules. The structure of the molecules was optimized with the help of MOPAC package built into ChemOffice. Lecithin-based liposomes in a sulfide solution (with Na_2S being the donor of H^- and HS^- ions) were used as an experimental model of the biological membrane. Redox potential in mV was the comparison parameter in assessment of interaction of the H_2S system components and NAC with phospholipid. The results include patterns showing the phospholipid reactive centers blocked by NAC under toxic exposure to H_2S . Liposomal models of cell membranes were formed and redox parameters measured. Biological experiment confirmed the acceptable accuracy of the designed method of calculation of intermolecular interactions when used as a basis for further selection of agents capable of adjusting toxic doses of hydrogen sulfide. Membrane models of H_2S interaction with protein and lecithin were visualized *in silico* and *in vitro*. The possibility of using NAC as an H_2S inhibitor has been confirmed.

Keywords: mathematical modeling, hydrogen sulfide, phospholipid, lecithin, liposomes, redox potential

Acknowledgments: the authors express their deepest gratitude to the departed Doctor of Chemistry, Professor N. M. Alykov and Doctor of Medical Sciences, Professor N. N. Trizno for their invaluable contribution to the development of scientific ideas and areas investigated by the authors of the article.

Author contribution: Golovatskaya LI — idea and design of the mathematical part of the study, analysis, study planning, data interpretation; Trizno EV — idea and design of the experimental part, coordination of the study, participation in the practical part of the experiment, manuscript authoring; Smirnova YuA — participation in the development of mathematical program, literature selection and analysis, discussion of the results; Trizno MN — practical arrangement of the experiment, data visualization, statistical analysis.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina V. Trizno
Bakinskaya, 121, Astrakhan, 414000, Russia; neuron-2010@mail.ru

Received: 23.12.2022 **Accepted:** 27.01.2023 **Published online:** 10.03.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.007

В эпоху индустриализации возможны выбросы техногенных производств. Так, при добыче и переработке сероводородсодержащего (H_2S) газа не исключены аварии с возгоранием при разгерметизации оборудования скважин и без горения при распространении газового флюида на объектах. Сегодня необходимо быть готовыми к возникновению газопроявлений, которым способствует, в том числе, и нарушение техники производства, например, превышения скорости разбуривания газонасыщенных пород и так далее [1–6].

В подобных случаях сероводород выступает в роли патогенного фактора: способствует нарушению энергетического обмена и усиливает свободнорадикальные процессы в клетке [7, 8]. Это приводит к повреждению мембран и усугубляет дефицит энергии. Впоследствии, с одной стороны, происходит уменьшение уровня макроэргов и накопление в клетках ионов Ca^{2+} , а с другой — понижение уровня аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) способствует выключению ионных насосов и препятствует поступлению ионов Ca^{2+} из межклеточной среды, активации мембраносвязывающих фосфолипаз, гидролизу части фосфолипидов и усилению проницаемости мембран [9, 10].

Можно полагать, что формирование различных патологических состояний и заболеваний сопряжено с молекулярными изменениями плазматических мембран клеток. Являясь мишенью для H_2S , мембраны вовлекаются в патологический процесс, который активизирует универсальные механизмы повреждения клетки, связанные с усилением процессов свободнорадикального окисления и нарушением ионного гомеостаза [11–13].

В последние годы в связи с активным изучением молекулярных основ развития повреждения мембран клеток возрос интерес к особенностям биологического функционирования фосфолипидов [14, 15]. В биомембранах липидный компонент — это функционально активная матрица, интегрирующая внешние влияния и запускающая программы клеточного управления. Выделяют три класса липидов мембран: нейтральные липиды (30%), гликолипиды (10%) и фосфолипиды — наиболее широко представленный класс (60%). Химическая энергия окисляемых субстратов или АТФ превращается в электрическую энергию, а именно в трансмембранную разность электрических потенциалов или в энергию разности концентраций веществ, содержащихся в разделенных мембраной растворах, и наоборот. Мембраны способны превращать одну форму энергии в другую. Фиксация энзимов в митохондриях и окислительное фосфорилирование, активность ферментов и чувствительность клетки к гормональной, нервной регуляции, а также пространственная идентичность зависят от состояния липидной составляющей мембраны [16–19].

Сложность выявления роли отдельных молекулярных механизмов в реализации мембранодеструктивных процессов обоснована их тесной взаимосвязью. В связи с этим, получение обобщающих положений о совокупных закономерностях реакций клеточных систем на патологические импульсы различного генеза не только обещает увеличение глубины представлений о функционировании общебиологических законов, но и разрешает по-новому оценивать методологию их корректировки.

Не зная структуры молекулы, нельзя понять ее реальное поведение. Любое бесконечно малое изменение

совокупности координат ядер приводит к новой геометрии. Пространственная структура молекулы не является неотъемлемым характерным свойством системы. Тем не менее молекулярная структура позволяет зафиксировать некоторое временное положение молекулы и понять концепцию его изменения. Математическое моделирование дает возможность рассматривать поочередно различные внешние факторы воздействия. Для определения равновесной пространственной структуры молекул необходимо оптимизировать взаимное расположение их атомов. Под оптимизацией геометрии понимают поиск координат атомов, при которых система имеет наименьшее значение энергии [20–22]. В результате оптимизации отдельные группы атомов молекулярной системы меняют свое пространственное положение на более выгодное по отношению к соседним атомам. РМЗ (от англ. *parametric method 3*) — один из наиболее последовательных методов, тщательно калиброванный по широкому спектру соединений, включая органические и неорганические молекулы атомов главных подгрупп и водородно-связанные системы. Он хорошо передает структуру, термодинамику, дипольные моменты, потенциалы ионизации, колебательные частоты. Для простых органических соединений по точности он приближается к DFT (от англ. *density functional theory* — теория функционала плотности), превосходя DFT по производительности в десятки раз. Средняя погрешность определения энтальпии образования — около 5 ккал/моль. Преимущество других полуэмпирических методов перед РМЗ в основном проявляется при оценке электронных, магнитно-резонансных параметров и спектров электронного возбуждения [21, 22].

С точки зрения химии, межмолекулярный перенос электрона представляет собой окислительно-восстановительную реакцию reduction/oxidation, или RedOx. Процессы переноса электронов в мембранах митохондрий составляют физико-химическую основу механизмов запасаения энергии в клетке. В настоящее время предполагается, что перенос электронов между компонентами жидкой фазы в клетке и внутриклеточными белками регулирует активность белков клетки. С увеличением уровня окислителей в организме связывают развитие многих заболеваний человека, включая атеросклероз, цирроз печени, катаракту, артриты, ишемическую болезнь сердца, бронхиальную астму, гепатит, диабет. Лауреат Нобелевской премии Альберт Сент-Дьёрдьи писал: «Равновесие между донорами и акцепторами электронов, обладающими различными биопотенциалами, — один из основных параметров жизни...». В ходе редокс-реакции восстановленная форма одной редокс-пары (восстановитель) отдает электроны на окисленную форму (окислитель) другой пары [23–25]. Известно, что H_2S — активный участник ионного обмена, способный связывать атомы меди в цитохромоксидазе и тем самым блокировать перенос электронов с этого фермента дыхательной цепи митохондрий на кислород. Так как физиологические жидкости организма — это открытые системы, постоянно обменивающиеся электронами с окружающей средой, мы дискретизировали возможные перекрестные реакции и использовали липосомную модель мембраны в водной среде.

Цель работы — сравнить степень межмолекулярного взаимодействия двухкомпонентных систем с участием липосомной модели биомембраны в реакции с сероводородом и ацетилцистеином для коррекции мембранного Red-Ox-потенциала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

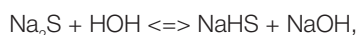
Математические расчеты производили в программе GAMESS с использованием метода PM3 (GBASIS=PM3) с точностью нормы градиента до четвертого знака после запятой включительно (OPTTOL=1.0E-4). Полученные результаты помогли составить z-матрицу. Z-матрица имеет конфигурацию, довольно близкую к точке глобального минимума поверхности потенциальной энергии. Значение градиента, полученное в результате расчета, составляет 0,0000327 ккал/моль/ангстрем, что характеризуется довольно высокими вычислительными возможностями GAMESS по сравнению с ChemOffice. Значение полной энергии (total energy) получаемой конфигурации молекул вычисляют в атомных единицах энергии и выражают в кДж/моль.

Для увеличения точности моделирования адсорбционных взаимодействий мы применяем три критерия: величину переноса заряда (Δq), расстояние между атомами (Å) и тепловые эффекты адсорбционных комплексов ($\Delta E_{адс}$).

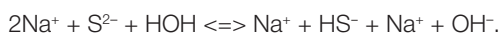
В качестве компонентов клеточной мембраны были выбраны белковый и фосфолипидный. Структуру белка определили в форме простого пентапептида, полученного в результате расчета оптимального равновесного расположения системы с точки зрения минимума общей атомарной энергии. Учитывая, что молекулы фосфолипидов способны к перемещению с одной стороны мембраны на другую, модель *in vitro* исключает варьирование биологического ответа на воздействие патогенных факторов и минимизирует асимметрию фосфолипидов в мембране. В качестве основы липосом мы использовали лецитин, состоящий на две трети из фосфолипидов.

Липосомы формировали по следующей методике.

Готовили сульфидный раствор в пределах первой стадии гидролиза в соответствии с молекулярным уравнением:



а полное ионное уравнение данной реакции выглядит следующим образом:



До образования летучих форм сероводорода согласно второй стадии гидролиза реакции не доводили, ввиду токсичности последнего и специфик-дозирования в данном эксперименте.

В работе использовали весы (Conzept; Италия) с точностью взвешивания 0,1 мг, измеритель окислительно-восстановительного потенциала (Red-Ox-потенциала в милливольтках, или ОВП, мВ) (Россия), магнитную мешалку, химические стаканы и цилиндр (градуированные, объемом 100 мл), пипетки, автоматические дозаторы, ультразвуковой диспергатор (Китай), порошкообразный сульфид натрия, вытяжной шкаф.

Готовили раствор сульфида натрия (10%-й) с концентрацией по сульфидам 88 мг/л. Смешивали 12 г Na_2S (вводили в воду) с 80 мл дистиллированной воды. Экспозицию определили с учетом достижения устойчивого изменения значения параметра на неизменном уровне. Три раза производили замеры и представили средние значения.

Липосомный раствор готовили из соевого лецитина (Protein company; Россия) на основе изопропанола в соотношении 30 : 70. После добавления 0,1%-го

раствора метиленового синего (для лучшей визуализации) производили ультразвуковую (УЗ) обработку 10 мин и добавляли к сульфидному раствору липосомный раствор (1 : 1). К насыщенному раствору лецитина (1 г + 25 мл изопропанола) добавляли 10 мл раствора АЦЦ (10 мг/мл), после чего производили УЗ-воздействие. ОВП замеряли в растворах липосом с лецитином и АЦЦ до и после погружения в сульфидную среду на 15-й минуте с момента приготовления сред.

Тип распределения, отличный от нормального, определяли с помощью критериев Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Цифровые значения представлены в виде медианы и P5-, P95-перцентилей. Уровень значимости различий признаков был принят за $p \leq 0,05$. Анализ производили с помощью дискриптивных статистических методик программы Statistica 11,0 (StatSoft; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Моделирование процесса влияния сероводорода на биологическую мембрану включает в себя создание математической модели и наглядной структуры элементов мембраны и токсиканта. Планируется поиск участков молекулы сорбата, взаимодействие с которыми приводит к выделению наибольшего количества энергии. Активированный комплекс должен обладать минимальной энергией. Согласно приведенным структурам, взаимодействие происходит преимущественно по аминогруппе (NH_2), сульфидной (SH), карбонильной (CO), гидроксильной (OH) и метильной (CH_3) группам, а также с участием атомов водорода бензольного кольца. При этом сероводород может связываться как посредством водорода по amino- и сульфидным группам, так и при участии серы — по amino-, сульфидным и гидроксильным группам. Наиболее прочные связи образуются при участии атома водорода SH-группы белка.

В таблицах представлены результаты расчета энергетических и геометрических свойств наиболее значимых молекулярных адсорбционных комплексов (АК) с пентапептидом (табл. 1) и лецитином (табл. 2). Была рассмотрена следующая последовательность аминокислот в пептиде белка: цистеин–фенилаланин–аланин–цистеин–тирозин.

В таблицах представлены активные позиции образования водородной связи при воздействии АЦЦ и сероводорода на компоненты мембраны клетки. Перераспределение заряда указывает на протекание взаимодействия, а величина переноса заряда — на направление перемещения электронной плотности между атомами взаимодействующих веществ. Знак величины заряда указан по отношению к воздействующей молекуле на мембрану (H_2S или АЦЦ). В случае положительного значения заряд перераспределяется от водорода вещества к более электроотрицательным атомам мембраны (рис. 1). Отрицательное значение указывает на направление движения электронов от водорода мембраны к «насаживаемым» веществам. Наиболее прочные взаимодействия наблюдаются у $\text{H}_{35} \dots \text{S}_7$ группы лецитина и АЦЦ, в отличие от водородных связей молекул белка и АЦЦ (рис. 2). Участие протона SH-группы АЦЦ в образовании водородной связи приводит к увеличению электронной плотности у атома серы и, следовательно, к возрастанию ее нуклеофильных свойств. Свойства АЦЦ обусловлены наличием активной SH-группы в его молекуле. Длина

Таблица 1. Величины энергетических характеристик и значений длин связей в адсорбционных комплексах взаимодействия молекулы пентапептида в парах с сероводородом и АЦЦ по результатам РМЗ-расчета

Пентапептид +	По водородной (...) связи между указанными атомами	Длина связи, Å	Величина переноса заряда Δq , e	Энергетическая характеристика $\Delta E_{адс}$, Кдж/моль
Сероводород	H ₆₁ ...S ₇₇	2,582	135	-5,833
	H ₆₁ ...N ₂₆	1,007	211	-13,448
	H ₇₈ ...S ₇₇	1,293	-0,0167	-16,101
	H ₇₉ ...S ₇₇	1,291	-0,0182	-3,469
АЦЦ	H ₆₆ ...S ₇	2,62	96	-38,38
	H ₆₀ ...S ₇	2,73	28	-36,89
	H ₇₁ ...S ₇	2,53	96	-34,46
	H ₆₅ ...S ₇	1,75	985	-34,39

образующейся связи наиболее характерна для данного типа взаимодействия. А величина энергии адсорбции указывает на прочность адсорбционных комплексов. Лецитин в данном случае — предпочтительная мишень (рис. 3).

Любое изменение координат межатомного расположения влияет на геометрию молекулы в целом, а значит и на свойства системы, но структурированный расчет позволяет зафиксировать временную позицию молекулы и понять принцип изменений в зависимости от воздействия внешних факторов. Это облегчает установление отдельных геометрических положений молекул относительно друг друга, выявить специфику воздействия атакующего вещества, построить карту активных атомов мембранных компонентов, проанализировать и показать конкурентную заменяемость противоядия.

Как видно, взаимодействия сероводорода и АЦЦ имеют более низкую глубину значения минимума энергии адсорбции в случае реакции с лецитином, чем с пептидом. Значит, характеризуем подобные взаимодействия как структуры, имеющие энергетически более устойчивые положения. Поэтому в качестве модели *in vitro* выбран липидный компонент мембраны и сформированы липосомы, диаметром 36,92 [27,98; 54,39] мкм (рис. 4).

ОВП сульфидного раствора составил -718 [699; 723] мВ. Данное значение крайне низкое, что говорит о сильной восстановительной природе сероводородных ионов. Redox-потенциал насыщенного лецитинового раствора составил -77 [-72; -81] мВ. После УЗ-обработки и получения липосомного раствора с АЦЦ ОВП составил -54 [-41; -59] мВ. ОВП конечного раствора сульфидов + лецитин + АЦЦ увеличился до -122 [-120; -131] мВ.

Таким образом, Redox-потенциал восстановился после добавления липосом с АЦЦ, выступающим в

роли окислителя. Следовательно, при взаимодействии с сероводородными ионами активные SH-группы АЦЦ придают раствору буферные свойства.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время ведутся исследования моделей систем молекулярных комплексов с использованием квантово-химических вычислений. Работы ученых представляют собой моделирование комплексов, предварительно описанных вручную, состоящих из двух и более молекул. Так, была предложена модель взаимодействия в трехкомпонентной системе «нефть – вода – деэмульгатор» [26]. Включение воды как одного из компонентов молекулярной системы может быть оправдано только для подробного изучения процесса деэмульсации на конкретном случае случайно заданной пользователем возможности. Альтернативой данному подходу является учет сольватации [27], заложенной в любую квантово-химическую программу, например Gamess. Работы в данной области точно специфичные и в основном специализируются на определении трехмерной структуры молекул, распределении заряда и электронной плотности каждого атома в молекуле, полной энергии молекул, энергий и теплоты образования молекул, энергий электронов, энергий ядер и дипольных моментов атомов, из которых состоит молекула [28, 29].

Проведенное исследование ориентировано на систематический перебор возможных адсорбционных комплексов при образовании водородной связи между молекулами. Это позволило последовательно рассмотреть процесс погружения компонентов мембраны в сероводородную среду, а затем оценить результат введения препарата АЦЦ в качестве конкурентного

Таблица 2. Величины энергетических характеристик и значений длин связей в адсорбционных комплексах взаимодействия молекулы лецитина в парах с сероводородом и АЦЦ по результатам РМЗ-расчета

Лецитин +	По водородной (...) связи между указанными атомами	Длина связи, Å	Величина переноса заряда Δq , e	Энергетическая характеристика $\Delta E_{адс}$, Кдж/моль
АЦЦ	H ₃₅ ...S ₇	3,04	-0,0136	-74,75
	O ₁₄ ...H ₁₂	1,8	-0,0209	-65,13
	H ₂₅ ...S ₇	3,05	221	-57,48
	H ₂₉ ...S ₇	2,57	-0,0311	-56,87
Сероводород	H ₃₃ ...S ₂	2,62	172	-51,52
	O ₁₄ ...H ₁	1,76	-0,0429	-49,7
	H ₄₁ ...S ₂	2,43	294	-48,85
	H ₃₅ ...S ₁	3,03	293	-46,85

для сероводорода. С помощью квантово-химического моделирования определены основные значения энергии образования реагирующих молекул и их систем. Для установления устойчивого положения адсорбционных комплексов для каждого из них были дополнительно определены и рассчитаны три критерия: энергия адсорбции, величина переноса заряда с одной молекулы на другую и размер образовавшейся водородной связи. После устранения структур, не удовлетворяющих критериям, получены сигнатуры активных атомов молекулярной поверхности для данного рода взаимодействий [21].

Липосомы готовили, используя общепризнанные методики [16–18]. В качестве растворителя применяли изопропиловый спирт, как менее токсичный (3600–5740 мг/кг) по сравнению с другими органическими растворителями (ксилолом, хлороформом) [30] и более экономически выгодный, по сравнению, например, с этиловым спиртом. Вместо роторного испарителя спиртового компонента использовали поток газообразного азота, что значительно упростило эксперимент.

Выводы

В целом, предложенный *in silico* метод математического моделирования действия блокаторов токсического влияния на модель мембраны клетки может быть использован для дополнения *in vitro* экспериментов. Наши результаты позволяют подробно описать механизм, протекающий на поверхности мембраны клетки. Дальнейшие исследования помогут улучшить понимание структуры и свойств потенциальных антидотов для ряда веществ, обладающих цитотоксическими свойствами. Наши данные свидетельствуют о том, что реакционные центры для данного вида взаимодействий возможны и образуются преимущественно на атомах, представленных на сигнатурах взаимодействий (рис. 1–3). Изученное взаимодействие между молекулярными компонентами биомембран — белка и фосфолипида с одной стороны и с «насаживаемыми» на них молекулами сероводорода и АЦЦ — с другой является хорошей отправной точкой для дальнейших исследований процессов, протекающих на поверхности клеточной мембраны. Таким образом, можно утверждать, что наиболее предпочтительной мишенью для экспериментального исследования компонента мембраны является лецитин. Согласно расчетам энергий взаимодействия сорбционных комплексов и окислительно-восстановительного потенциала систем, наиболее оптимально соединение у лецитина с АЦЦ, чем с сероводородом. Окислительная обстановка, формируемая при добавлении липосом с АЦЦ в сульфидный раствор, говорит о энергетически выгодном взаимодействии лецитина с АЦЦ, нежели с сульфидными ионами. Конкурентоспособные водородные связи между фосфолипидом и АЦЦ на фоне сероводорода дают основания для дальнейших экспериментов. Так, моделирование липосом в растворе плазмы позволит

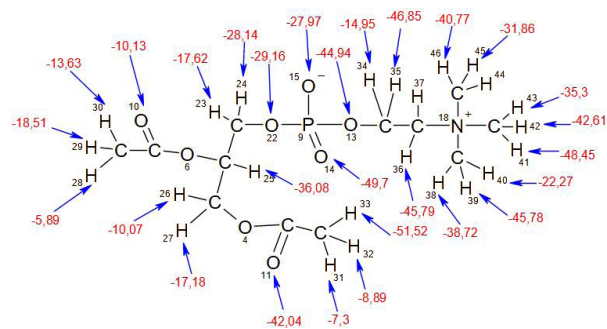


Рис. 1. Пример схемы сигнатуры активных центров при взаимодействии лецитина с сероводородом

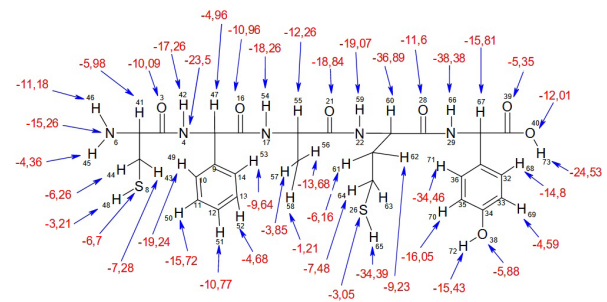


Рис. 2. Пример схемы сигнатуры активных центров при взаимодействии пентапептида с АЦЦ

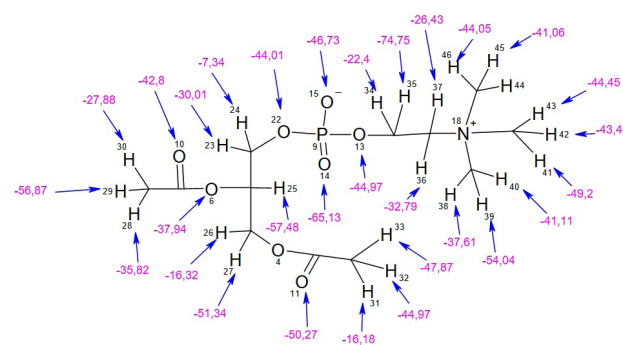


Рис. 3. Пример схемы сигнатуры активных центров при взаимодействии лецитина с АЦЦ

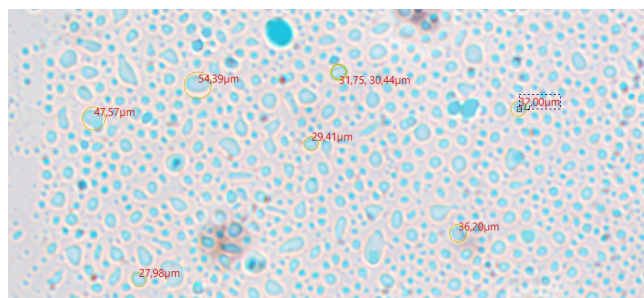


Рис. 4. Липосомы, окрашенные метиленовым синим (увеличение $\times 20$)

приблизиться к изучению взаимодействия молекул АЦЦ и сероводорода на более сложном организмом уровне организации биосистем.

Литература

1. Бубнова Е. С., Капустина М. В. Гидролого-гидрохимические условия в придонном слое Гданьской впадины Балтийского моря в 2003–2018 годах. Известия КГТУ. 2019; 55: 47–58.
2. Колесникова Е. Э., Головина И. В. Активность оксидоредуктаз

в оксифильных тканях морского ерша *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 при краткосрочной сероводородной нагрузке. Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2020; 56 (5): 399–410. DOI: 10.31857/S0044452920050046.

3. Великородов А. В., Тьрков А. Г., Ковалев В. Б., Серебряков О. И., Носачев С. Б. Экологическая оценка атмосферного воздуха в Нижнем Поволжье. География, география и глобальная энергия. 2018; 1 (68): 103–9.
4. Grant RH, Boehm MT, Hagevoort GR. Emissions of hydrogen sulfide from a western open-lot dairy. *J Environ Qual.* 2022; 51 (4): 622–31. DOI: 10.1002/jeq2.20360. Epub 2022 May 26. PMID: 35446998.
5. Chiappe C, Pomelli CS. Hydrogen Sulfide and Ionic Liquids: Absorption, Separation, and Oxidation. *Top Curr Chem (Cham).* 2017; 375 (3): 52. DOI: 10.1007/s41061-017-0140-9. PMID: 28447285.
6. El Hachem K, Kang M. Methane and hydrogen sulfide emissions from abandoned, active, and marginally producing oil and gas wells in Ontario, Canada. *Sci Total Environ.* 2022; 823: 153491. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.153491. PMID: 35124029.
7. Голубкина Е. В., Дюкарева О. С., Тризно Н. Н., Удочкина Л. А., Тризно М. Н. Влияние процессов перекисидации в тромбоцитах на систему гемостаза при воздействии сероводородсодержащего газа. *Журн. медико-биол. иссл.* 2019; 7 (1): 40–48.
8. Malone Rubright SL, Pearce LL, Peterson J. Environmental toxicology of hydrogen sulfide. *Nitric Oxide.* 2017; 1 (71): 1–13. DOI: 10.1016/j.niox.2017.09.011. PMID: 29017846; PMCID: PMC5777517.
9. Рожкова И. С., Тёплый Д. Л., Фельдман Б. В. Анализ морфофизиологических изменений тимуса при хронической интоксикации и введении антиоксидантов. *Астраханский медицинский журнал.* 2015; 10 (4): 73–78.
10. Эсаулова Т. А., Базаева О. В., Зязина Е. Н., Зязин С. Н., Пономарёва А. А. Влияние сероводородсодержащего газа на состояние здоровья населения. *Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки.* 2020; 1: 225–9.
11. Азатян С. Г., Мажитова М. В. Перспективы применения экстракта растений рода *Astragalus* при сердечно-сосудистых патологиях. *Прикаспийский вестник медицины и фармации.* 2022; 3 (1): 6–14. DOI 10.48612/agmu/2022.3.1.6.14.
12. Сентюрова Л. Г., Галимзянов Х. М., Шерышева Ю. В., Хужахметова Л. К., Берлякова Е. М. Биологические ритмы организма млекопитающих и человека. *Астраханский медицинский журнал.* 2018; 13 (2): 54–64. DOI 10.17021/2018.13.2.54.64.
13. Veremchuk LV, Tsarouhas K, Vitkina TI, Mineeva EE, Gvozdenko TA, Antonyuk MV, et al. Impact evaluation of environmental factors on respiratory function of asthma patients living in urban territory. *Environ Pollut.* 2018; 235: 489–96. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.12.122. PMID: 29324378.
14. Yamamoto T, Endo J, Kataoka M, Matsuhashi T, Katsumata Y, Shirakawa K, et al. Decrease in membrane phospholipids unsaturation correlates with myocardial diastolic dysfunction. *PLoS One.* 2018; 13 (12): e0208396. DOI: 10.1371/journal.pone.0208396.
15. Manni MM, Tiberti ML, Pagnotta S, Barelli H, Gautier R, Antonyuk B. Acyl chain asymmetry and polyunsaturation of brain phospholipids facilitate membrane vesiculation without leakage. *Elife.* 2018; 7: e34394. DOI: 10.7554/eLife.34394.
16. Amézqueta S, Fernández-Pumarega A, Farré S, Luna D, Fuguet E, Rosés M. Lecithin liposomes and microemulsions as new chromatographic phases. *J Chromatogr A.* 2020; 1611: 460596. DOI: 10.1016/j.chroma.2019.460596.
17. Urabe G, Shimada M, Ogata T, Katsuki S. Pulsed Electric Fields Promote Liposome Buddings. *Bioelectricity.* 2021; 3 (1): 68–76. DOI: 10.1089/bioe.2020.0016.
18. Dyrda G, Boniewska-Bernacka E, Man D, Barchiewicz K, Stota R. The effect of organic solvents on selected microorganisms and model liposome membrane. *Mol Biol Rep.* 2019; 46 (3): 3225–232. DOI: 10.1007/s11033-019-04782-y.
19. Arai K, Sato Y, Nakajima I, Saito M, Sasaki M, Kanamori A, Iwaoka M. Glutathione peroxidase-like functions of 1,2-diselenane-4,5-diol and its amphiphilic derivatives: Switchable catalytic cycles depending on peroxide substrates. *Bioorg Med Chem.* 2021; 29: 115866. DOI: 10.1016/j.bmc.2020.115866.
20. Жарких Л. И., Голубкина Е. В., Тризно Н. Н., авторы; ФГБОУ ВО «Астраханский ГМУ» Минздрава РФ, патентообладатель. Способ профилактики интоксикации организма животных при остром отравлении сероводородсодержащим газом в эксперименте. 2020. Патент РФ № 2739256 С1, 22.12.2020.
21. Смирнова Ю. А., Головацкая Л. И. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2022614450 Российская Федерация. ПРОГРАММА ДЛЯ ЭВМ "TFinG": № 2022613564: заявл. 15.03.2022; опубл. 22.03.2022; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волжский государственный университет водного транспорта».
22. Смирнова, Ю. А. Головацкая Л. И. Разработка алгоритма и метода трансформации записи атомно-молекулярных систем. *Прикаспийский журнал: управление и высокие технологии.* 2022; 2 (58): 61–67.
23. Cao JT, Fu YZ, Wang YL, Zhang HD, Liu XM, Ren SW, Liu YM. Liposome-assisted chemical redox cycling strategy for advanced signal amplification: A proof-of-concept toward sensitive electrochemiluminescence immunoassay. *Biosens Bioelectron.* 2022; 214: 114514. DOI: 10.1016/j.bios.2022.114514.
24. Li M, Wang S, Xu J, Xu S, Liu H. PH/Redox-Controlled Interaction between Lipid Membranes and Peptide Derivatives with a "Helmet". *J Phys Chem B.* 2019; 123 (31): 6784–91. DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b05367. PMID: 31306021.
25. He W, Du Y, Zhou W, Yao C, Li X. Redox-sensitive dimeric camptothecin phosphatidylcholines-based liposomes for improved anticancer efficacy. *Nanomedicine (Lond).* 2019; 14 (23): 3057–74. Available from: <https://doi.org/10.2217/nnm-2019-0261>.
26. Малова В. О., Золотарёва Н. В. Моделирование межмолекулярных контактов органических кислот с приповерхностным слоем водонефтяной эмульсии. *Фундаментальные и прикладные проблемы получения новых материалов: исследование, инновации и технологии: Материалы XVI Международной научно-практической конференции, Астрахань, 26–28 апреля 2022 г. Под общей редакцией Л.А. Джигола.* Астрахань: Астраханский государственный университет, 2022; с. 101–104.
27. Магдалинова Н. А., Иванова Л. В., Ключев М. В. Влияние растворителя в синтезе гексагидрофеноксазинов: квантово-химический подход. *Научно-исследовательская деятельность в классическом университете: традиции и инновации: Материалы Международного научно-практического фестиваля, Иваново, 19–29 апреля 2022 года.* Иваново: Ивановский государственный университет, 2022; с. 105–112.
28. Рахимов Ф. Ф., Беков У. С. Квантово-химические расчеты зарядов кремниорганических соединений — как основа устойчивости промежуточного и переходного состояний. *Universum: химия и биология.* 2022; 5–2 (95): 47–50.
29. Петрушенко И. К. Квантово-химическое моделирование адсорбции водорода в порах: исследование методами DFT, SAPTO и IGM. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология.* 2022; 12 (3): 363–72. DOI: 10.21285/2227-2925-2022-12-3-363-372.
30. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 3776, Isopropyl Alcohol. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isopropyl-Alcohol>. Accessed Jan. 23, 2023.

References

1. Bubnova ES, Kapustina MV. Hidrologo-gidroximicheskie usloviya v pridonnom sloe Gdan'skoj vpadiny Baltijskogo morya v 2003–2018 godax. *Izvestiya KGTU.* 2019; 55: 47–58. Russian.
2. Kolesnikova EEh, Golovina IV. Aktivnost' oksidoreduktaz v

- oksifil'nyx tkanyax morskogo ersha *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 pri kratkosrochnoj serovodorodnoj nagruzke. Zhurnal ehvolucionnoj bioximii i fiziologii. 2020; 56 (5): 399–410. DOI: 10.31857/S0044452920050046. Russian.
3. Velikorodov AV, Tyrkov AG, Kovalev VB, Serebryakov OI, Nosachev SB. Ehkologicheskaya ocenka atmosfernogo vozduxa v Nizhnem Povolzh'e. Geologiya, geografiya i global'naya ehnergiya. 2018; 1 (68): 103–9. Russian.
 4. Grant RH, Boehm MT, Hagevoort GR. Emissions of hydrogen sulfide from a western open-lot dairy. *J Environ Qual*. 2022; 51 (4): 622–31. DOI: 10.1002/jeq.2.20360. Epub 2022 May 26. PMID: 35446998.
 5. Chiappe C, Pomelli CS. Hydrogen Sulfide and Ionic Liquids: Absorption, Separation, and Oxidation. *Top Curr Chem (Cham)*. 2017; 375 (3): 52. DOI: 10.1007/s41061-017-0140-9. PMID: 28447285.
 6. El Hachem K, Kang M. Methane and hydrogen sulfide emissions from abandoned, active, and marginally producing oil and gas wells in Ontario, Canada. *Sci Total Environ*. 2022; 823: 153491. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.153491. PMID: 35124029.
 7. Golubkina EV, Dyukareva OS, Trizno NN, Udochkina LA, Trizno MN. Vliyanie processov peroksidacii v trombocitax na sistemu gemostaza pri vozdeystvii serovodorodsoderzhashhego gaza. *Zhurn mediko-biol issl*. 2019; 7 (1): 40–48. Russian.
 8. Malone Rubright SL, Pearce LL, Peterson J. Environmental toxicology of hydrogen sulfide. *Nitric Oxide*. 2017; 1 (71): 1–13. DOI: 10.1016/j.niox.2017.09.011. PMID: 29017846; PMCID: PMC5777517.
 9. Rozhkova IS, Tyoplyj DL, Fel'dman BV. Analiz morfofiziologicheskix izmenenij timusa pri xronicheskoj intoksikacii i vvedenii antioksidantov. *Astraxanskij medicinskij zhurnal*. 2015; 10 (4): 73–78. Russian.
 10. Ehsaulova TA, Bazaeva OV, Zyazina EN, Zyazin SN, Ponomaryova AA. Vliyanie serovodorodsoderzhashhego gaza na sostoyanie zdorov'ya naseleniya. *Sovremennaya nauka: aktual'nye problemy teorii i praktiki. Seriya: Estestvennye i texnicheskie nauki*. 2020; 1: 225–9. Russian.
 11. Azatyán SG, Mazhitova MV. Perspektivy primeneniya ehkstrakta rastenij roda *Astragalus* pri serdechno-sosudistyx patologiyax. *Prikaspijskij vestnik mediciny i farmacii*. 2022; 3 (1): 6–14. DOI 10.48612/agmu/2022.3.1.6.14. Russian.
 12. Sentyurova LG, Galimzyanov XM, Sherysheva YuV, Xuzhaxmetova LK, Berlyakova EM. Biologicheskie ritmy organizma mekopitayushhix i cheloveka. *Astraxanskij medicinskij zhurnal*. 2018; 13 (2): 54–64. DOI 10.17021/2018.13.2.54.64. Russian.
 13. Veremchuk LV, Tsarouhas K, Vitkina TI, Mineeva EE, Gvozdenko TA, Antonyuk MV, et al. Impact evaluation of environmental factors on respiratory function of asthma patients living in urban territory. *Environ Pollut*. 2018; 235: 489–96. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.12.122. PMID: 29324378.
 14. Yamamoto T, Endo J, Kataoka M, Matsuhashi T, Katsumata Y, Shirakawa K, et al. Decrease in membrane phospholipids unsaturation correlates with myocardial diastolic dysfunction. *PLoS One*. 2018; 13 (12): e0208396. DOI: 10.1371/journal.pone.0208396.
 15. Manni MM, Tiberti ML, Pagnotta S, Barelli H, Gautier R, Antony B. Acyl chain asymmetry and polyunsaturation of brain phospholipids facilitate membrane vesiculation without leakage. *Elife*. 2018; 7: e34394. DOI: 10.7554/eLife.34394.
 16. Amézqueta S, Fernández-Pumarega A, Farré S, Luna D, Fuguet E, Rosés M. Lecithin liposomes and microemulsions as new chromatographic phases. *J Chromatogr A*. 2020; 1611: 460596. DOI: 10.1016/j.chroma.2019.460596.
 17. Urabe G, Shimada M, Ogata T, Katsuki S. Pulsed Electric Fields Promote Liposome Buddings. *Bioelectricity*. 2021; 3 (1): 68–76. DOI: 10.1089/bioe.2020.0016.
 18. Dyrda G, Boniewska-Bernacka E, Man D, Barchiewicz K, Słota R. The effect of organic solvents on selected microorganisms and model liposome membrane. *Mol Biol Rep*. 2019; 46 (3): 3225–232. DOI: 10.1007/s11033-019-04782-y.
 19. Arai K, Sato Y, Nakajima I, Saito M, Sasaki M, Kanamori A, Iwaoka M. Glutathione peroxidase-like functions of 1,2-diselenane-4,5-diol and its amphiphilic derivatives: Switchable catalytic cycles depending on peroxide substrates. *Bioorg Med Chem*. 2021; 29: 115866. DOI: 10.1016/j.bmc.2020.115866.
 20. Zharkix LI, Golubkina EV, Trizno NN, avtory; FGBOU VO «Astraxanskij GMU» Minzdrava RF, patentoobladatel'. Sposob profilaktiki intoksikacii organizma zhivotnyx pri ostrom otravlenii serovodorodsoderzhashhim gazom v ehksperimente. 2020. Patent RF # 2739256 C1, 22.12.2020. Russian.
 21. Smirnova YuA, Golovackaya LI. Svidetel'stvo o gosudarstvennoj registracii programmy dlya EhVM # 2022614450 Rossijskaya Federaciya. PROGRAMMA DLYa EhVM "TFinG": # 2022613564: zayavl. 15.03.2022; opubl. 22.03.2022; zayavitel' Federal'noe gosudarstvennoe byudzhetnoe obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego obrazovaniya «Volzhskij gosudarstvennyj universitet vodnogo transporta». Russian.
 22. Smirnova YuA, Golovackaya LI. Razrabotka algoritma i metoda transformacii zapisi atomno-molekulyarnyx sistem. *Prikaspijskij zhurnal: upravlenie i vysokie texnologii*. 2022; 2 (58): 61–67. Russian.
 23. Cao JT, Fu YZ, Wang YL, Zhang HD, Liu XM, Ren SW, Liu YM. Liposome-assisted chemical redox cycling strategy for advanced signal amplification: A proof-of-concept toward sensitive electrochemiluminescence immunoassay. *Biosens Bioelectron*. 2022; 214: 114514. DOI: 10.1016/j.bios.2022.114514.
 24. Li M, Wang S, Xu J, Xu S, Liu H. PH/Redox-Controlled Interaction between Lipid Membranes and Peptide Derivatives with a "Helmet". *J Phys Chem B*. 2019; 123 (31): 6784–91. DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b05367. PMID: 31306021.
 25. He W, Du Y, Zhou W, Yao C, Li X. Redox-sensitive dimeric camptothecin phosphatidylcholines-based liposomes for improved anticancer efficacy. *Nanomedicine (Lond)*. 2019; 14 (23): 3057–74. Available from: <https://doi.org/10.2217/nnm-2019-0261>.
 26. Malova VO, Zolotaryova NV. Modelirovanie mezhmolekulyarnyx kontaktov organicheskix kislot s pripoverxnostnym sloem vodoneftyanoj ehmul'sii. *Fundamental'nye i prikladnye problemy polucheniya novyx materialov: issledovaniya, innovacii i texnologii: Materialy XVI Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii, Astraxan', 26–28 aprelya 2022 g. Pod obshhej redakciej L.A. Dzhigola. Astraxan': Astraxanskij gosudarstvennyj universitet, 2022; c. 101–104. Russian.*
 27. Magdalinova NA, Ivanova LV, Klyuev MV. Vliyanie rastvoritelya v sinteze gekzagidrogenokszazinov: kvantovo-ximicheskij podxod. *Nauchno-issledovatel'skaya deyatel'nost' v klassicheskom universitete: tradicii i innovacii: Materialy Mezhdunarodnogo nauchno-prakticheskogo festivalya, Ivanovo, 19–29 aprelya 2022 goda. Ivanovo: Ivanovskij gosudarstvennyj universitet, 2022; c. 105–112. Russian.*
 28. Raximov FF, Bekov US. Kvantovo-ximicheskie raschyoty zaryadov kremniorganicheskix soedinenij — kak osnova ustojchivosti promezhutochnogo i perexodnogo sostoyanij. *Universum: ximiya i biologiya*. 2022; 5–2 (95): 47–50. Russian.
 29. Petrushenko IK. Kvantovo-ximicheskoe modelirovanie adsorbicii vodoroda v porax: issledovanie metodami DFT, SAPTO i IGM. *Izvestiya vuzov. Prikladnaya ximiya i biotexnologiya*. 2022; 12 (3): 363–72. DOI: 10.21285/2227-2925-2022-12-3-363-372. Russian.
 30. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 3776, Isopropyl Alcohol. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isopropyl-Alcohol>. Accessed Jan. 23, 2023.

ОЦЕНКА ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОЙ РЕАКЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ГАММА-ОБЛУЧЕНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГУМАНИЗИРОВАННЫХ МЫШЕЙ

Н. И. Атаманюк¹ ✉, Е. А. Пряхин¹, Е. В. Стяжкина^{1,2}, Н. А. Обвинцева¹, Г. А. Тряпицына^{1,2}, А. А. Перетыкин¹, С. С. Андреев¹, А. Е. Алдибекова¹, А. В. Аклев^{1,2}

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

² Челябинский государственный университет, Челябинск, Россия

Оценка персонафицированной реакции клеток, тканей и организма на радиационное воздействие является важной проблемой радиобиологии и радиационной защиты. Целью исследования было разработать метод оценки персонафицированной реакции гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) человека в модели гуманизированных мышей. ГСК пуповинной или периферической крови вводили иммунодефицитным мышам NOD SCID. После острого внешнего гамма-облучения в дозах 0,5 Гр, 1 Гр и 1,5 Гр оценивали число ГСК (CD34⁺-клеток), созревающих и зрелых лейкоцитарных клеток CD45⁺, долю ГСК среди всех CD45^{low/+}-клеток через трое суток (период максимальной гибели) и 14 суток (период активного восстановления) после облучения. Методом регрессионного анализа рассчитывали зависимость показателей от дозы облучения. Описана экспоненциальная зависимость выживаемости ГСК человека у гуманизированных мышей через трое суток после облучения ($R^2 = 0,93$; $F = 211$; $p < 0,01$), линейная зависимость от дозы количества ГСК на 14-е сутки после облучения ($R^2 = 0,65$; $F = 12,9$; $p = 0,01$). В качестве показателя, отражающего гибель ГСК и восстановление их числа и функциональной активности, предложен коэффициент $K_{14/3}$, равный отношению доли ГСК среди всех CD45^{low/+}-клеток человека на 14-е сутки после облучения к этому параметру на третьи сутки. $K_{14/3}$ имел обратную зависимость от дозы облучения ($R^2 = 0,57$; $F = 13,3$; $p = 0,004$), был выше у радиорезистентных мышей и в модели индуцированной цистеамином радиорезистентности у гуманизированных мышей. Модель мышей, гуманизированных ГСК периферической крови, может быть использована для оценки персонафицированных реакций ГСК на острое внешнее гамма-облучение на основе применения показателя $K_{14/3}$, данных о выживаемости и восстановлении ГСК.

Ключевые слова: гемопоэтические стволовые клетки, острый радиационный синдром, гуманизированные мыши, индивидуальная радиочувствительность

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания ФМБА России.

Благодарности: авторы благодарят А. В. Шерстобитова (ГБУЗ «Областной перинатальный центр» г. Челябинска) за помощь в организации и отбор проб пуповинной крови.

Вклад авторов: Н. И. Атаманюк — планирование и проведение экспериментов, написание статьи; Е. А. Пряхин — планирование и руководство работой, написание статьи; Е. В. Стяжкина — выделение ГСК, анализ данных; Н. А. Обвинцева — выполнение измерений, проточная цитометрия; Г. А. Тряпицына — анализ данных; А. А. Перетыкин — облучение животных, дозиметрические исследования; С. С. Андреев — манипуляции с животными, измерения; А. Е. Алдибекова — манипуляции с животными; А. В. Аклев — общее руководство.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБУН УНПЦ РМ (протокол № 2 от 27 июня 2022 г.). Пробы пуповинной крови отбирали в ГБУЗ «Областной перинатальный центр», периферической крови — ГБУЗ «Станция переливания крови» ФМБА России в г. Челябинск в соответствии с Постановлением Правительства РФ № 331. Работа с животными выполнена с учетом Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (1986 г., Страсбург), Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях.

✉ Для корреспонденции: Наталья Игоревна Атаманюк
ул. Воровского, д. 68 А, г. Челябинск, 454141, Россия; vita_pulhira@mail.ru

Статья получена: 22.02.2023 Статья принята к печати: 09.03.2023 Опубликовано онлайн: 11.03.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.006

ASSESSMENT OF INDIVIDUAL HEMATOPOIETIC STEM CELL RESPONSE TO GAMMA EXPOSURE USING HUMANIZED MICE

Atamanyuk NI¹ ✉, Pryakhin EA¹, Styazhkina EV^{1,2}, Obvintseva NA¹, Tryapitsyna GA^{1,2}, Peretykin AA¹, Andreev SS¹, Aldibekova AE¹, Akleyev AV^{1,2}

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

² Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

Assessment of individual responses of cells, tissues and the whole body to radiation exposure is an important challenge for radiobiology and radiation safety. The study was aimed to develop the method for estimation of the human hematopoietic stem cell (HSC) individual response in the humanized mouse model. The cord blood or peripheral blood HSCs were administered to the NOD SCID immunodeficient mice. The number of maturing HSCs (CD34⁺ cells) and mature CD45⁺ leukocytes was assessed after the acute gamma exposure to the doses of 0.5 Gy, 1 Gy, and 1.5 Gy, along with the HSC share among all CD45^{low/+} cells within three days (period of maximum mortality) and 14 days (period of active restoration) after exposure. The relationship between the indicator values and the exposure dose was calculated by regression analysis. There was exponential relationship between the human HSC survival rate in humanized mice and the dose on day three after exposure ($R^2 = 0.93$; $F = 211$; $p < 0.01$), while the relationship between the number of HSCs and the dose on day 14 after exposure was linear ($R^2 = 0.65$; $F = 12.9$; $p = 0.01$). The $C_{14/3}$ coefficient calculated as a ratio of the HSC share among all human CD45^{low/+} cells on day 14 after exposure to the same parameter on day three after exposure was proposed as an indicator of HSC mortality and HSC number restoration. $C_{14/3}$ negatively correlated with the exposure dose ($R^2 = 0.57$; $F = 13.3$; $p = 0.004$), it was higher in radioresistant mice and the model of cysteamine-induced radioresistance in humanized mice. The model mice humanized using the peripheral blood HSCs can be used to assess individual HSC response to acute external gamma exposure based on $C_{14/3}$ and the data on the HSC survival and restoration.

Keywords: hematopoietic stem cells, acute radiation syndrome, humanized mice, individual radiosensitivity

Funding: the study was performed as part of the State Assignment of FMBA of Russia.

Acknowledgments: the authors would like to thank A.V. Sherstobitov (Regional Perinatal Center, Chelyabinsk) for his help in organizing and cord blood sampling.

Author contribution: Atamanyuk NI — planning and conducting experiments, manuscript writing; Pryakhin EA — study planning and management, manuscript writing; Styazhkina EV — HSC isolation, data analysis; Obvintseva NA — measurement, flow cytometry; Tryapitsyna GA — data analysis; Peretykin AA — animal exposure, dosimetry studies; Andreev SS — animal handling, measurement; Aldibekova AE — animal handling; Akleyev AV — general management.

Compliance with the ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Urals Research Center for Radiation Medicine (protocol № 2 of 27 June 2022). Cord blood sampling was performed after obtaining the informed consent from donors at the Chelyabinsk Regional Perinatal Center. Peripheral blood samples were provided by the Blood Transfusion Station of FMBA of Russia (Chelyabinsk) in accordance with the Decree of the Government of the Russian Federation № 331 of 12 April 2013. Animals were handled in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (1986, Strasbourg), Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.

✉ Correspondence should be addressed: Natalia I. Atamanyuk
Vorovskogo, 68A, Chelyabinsk, 454141, Russia; vita_pulhira@mail.ru

Received: 22.02.2023 Accepted: 09.03.2023 Published online: 11.03.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.006

Разработка подходов к оценке индивидуальной радиочувствительности остается актуальным направлением радиационной биологии человека в связи с интенсивным развитием атомных технологий, технологий ядерной медицины, перспективами длительных межпланетных космических полетов [1, 2]. Оценка персонифицированной реакции на облучение необходима для выявления групп повышенного риска в отношении эффектов облучения, что целесообразно как при отборе персонала для работ с источниками ионизирующего излучения, космонавтов, так и для персонификации радиационного риска медицинских эффектов облучения человека.

Явление радиочувствительности исследователи рассматривают на разных уровнях, от радиочувствительности целого организма, проявляющейся в выживаемости или гибели после облучения, до радиочувствительности тканей и клеток и их склонности к развитию неблагоприятных отдаленных последствий облучения [1–3]. При этом нет единой системы определения индивидуальной радиочувствительности человека. Идут интенсивные исследования по изучению молекулярно-генетических, иммунологических, гематологических и других маркеров — персонализированных предикторов тканевых реакций и отдаленных последствий как острого, так и хронического радиационного воздействия [1, 2, 4, 5].

Красный костный мозг является одной из наиболее радиочувствительных тканей организма человека. Устойчивость костного мозга к облучению определяется репарацией повреждений ДНК, репопуляцией клеток ткани за счет выживших пролиферирующих клеток, способностью ткани формировать функциональный резерв клеток и др. [1]. Для костномозговой формы острого лучевого синдрома последствия для организма (вероятность гибели) естественным образом обусловлены выживаемостью гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и кинетикой выживших клеточных популяций [6, 7]. Ионизирующее излучение оказывает подавляющее воздействие на пролиферативный и восстановительный потенциал ГСК. При этом не решен вопрос о связи реакции ГСК на облучение с индивидуальной радиочувствительностью.

Для оценки персонифицированной реакции ГСК человека на ионизирующее излучение перспективно применение гуманизированных мышей [8, 9]. На модели гуманизированных путем пересадки ГСК человека мышей описаны такие реакции ГСК на облучение, как увеличение фокусов γ H2AX, увеличение экспрессии гена *p16INK4a*, потеря способности ГСК к репопуляции после пересадки вторичным реципиентам и сокращение репертуара дифференцировки [10]. Схожие процессы характерны для естественного старения ГСК [11–13], а также отмечаются при внешнем облучении человека и животных [14], в частности отмечается явление клональной экспансии гемопоэтических клеток у облученных животных [15], у астронавтов, получивших повышенное облучение в ходе космических полетов [16].

Вышесказанное определяет актуальность и обоснованность постановки такой задачи, как разработка способов оценки персонифицированной реакции ГСК на облучение и ее связи с радиочувствительностью.

Цель исследования — разработать технологию оценки персонифицированной реакции ГСК человека на облучение на основе их ксенотрансплантации иммунодефицитным мышам для определения радиочувствительности с точки зрения тканевых реакций системы кроветворения на острое облучение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения гуманизированных мышей использовали иммунодефицитных мышей линии NOD SCID (питомник SPF-вивария ИЦиГ СО РАН; Новосибирск, Россия). Животных содержали в SPF-условиях при температуре воздуха 22 ± 2 °C и влажности 50–60% на гранулированном автоклавируемом корме SPF-категории для мышей категории «разведение», без ограничения подачи корма и питьевой воды, при 12-часовом световом дне. Для выведения из эксперимента применяли метод дислокации шейных позвонков.

Животным вводили ГСК из периферической и пуповинной крови [17]. ГСК получали из проб пуповинной крови, отобранных в ГБУЗ Областной перинатальный центр, а также из продукта периферической донорской крови — лейкотромбослоя (ГБУЗ Станция переливания крови ФМБА России; Челябинск, Россия). ГСК выделяли из крови методом иннумомагнитной сепарации с помощью набора EasySep Human Cord Blood CD34 Positive Selection Kit II (Stem Cell Technologies; Канада). ГСК идентифицировали как CD45_{low}CD34⁺-клетки.

Мышам осуществляли инъекцию ГСК пуповинной крови внутривенно в боковую хвостовую вену после предварительного острого внешнего гамма-облучения в дозе 2,5 Гр. В течение девяти недель происходило приживание ГСК в костном мозге мыши и формирование человеческого лимфогранулопоэза. ГСК, полученные от каждого донора пуповинной крови, вводили в равном количестве не менее чем трем мышам (число вводимых ГСК составляло 30–200 тыс. клеток на каждое животное). Одна мышь оставалась контрольной, а двух других вновь облучали через девять недель после трансплантации ГСК в дозах 0,5, 1,0 и 1,5 Гр (по три донора ГСК на каждую дозу). Измеряли число клеток человека и мыши в костном мозге бедренной кости контрольной мыши и у мышей через трое суток и 14 суток после облучения.

ГСК, полученные из периферической крови, вводили внутрикостно в большую берцовую кость мышам после изофлуранового наркоза. ГСК, полученные от каждого донора периферической крови, вводили в равном количестве не менее чем четырем мышам (число вводимых ГСК составляло 30–115 тыс. клеток на каждое животное). При этом двух особей, получивших клетки от одного донора, облучали до введения ГСК (клетки человека необлученные), а двух мышей, получивших клетки от того же донора, облучали после введения ГСК (человеческие клетки облучены). Облучение проводили в тех же дозах — 0,5, 1,0 и 1,5 Гр (по три донора на каждую дозу). Измеряли содержание клеток человека и мыши через трое суток и 14 суток после облучения (для каждого срока — одна мышь с необлученными ГСК человека и одна — с получившими облучение клетками).

Облучение проводили на исследовательской радиобиологической гамма-установке ИГУР-1М («Квант»; Россия). Установка оснащена ¹³⁷Cs-источниками, мощность дозы составляет 0,91 Гр/мин, неравномерность гамма-поля не более 10%.

Методом проточной цитометрии в костном мозге мышей измеряли число мышинных CD45⁺-клеток (окраска моноклональными крысиными антителами антиCD45-PE, клон 30-F11; BD Pharmingen, США), человеческих лейкоцитарных CD45⁺-клеток (окраска моноклональными мышинными антителами антиCD45-FITC, клон HI30; Stem Cell Technologies, Канада) и человеческих стволовых

CD45^{low}CD34⁺-клеток (окраска моноклональными мышиными антителами антиCD34-APC, клон 581; Stem Cell Technologies, Канада). Измерения проводили на цитометре Accuri C6 (BD Biosciences; США), рассчитывали число клеток в миллилитрах суспензии, содержащей клетки из одной кости.

Рассчитывали выживаемость облученных клеток как отношение числа облученных клеток через трое и 14 суток к числу клеток того же донора у контрольной необлученной мыши для ГСК пуповинной крови, как отношение числа облученных клеток к числу необлученных клеток того же донора в тот же срок после облучения для ГСК периферической крови. Рассчитывали процентное содержание ГСК от общего количества всех CD45^{low}/CD45⁺-клеток человека для каждого гуманизированного животного. Также определяли коэффициент, равный отношению доли ГСК на 14-е сутки после облучения к доле ГСК на третьи сутки после облучения ($K_{14/3}$), так как ранее этот показатель продемонстрировал связь с выживаемостью животных и репопуляцией клеток в костном мозге у негуманизированных мышей *in vivo* [18].

Для оценки прогностических свойств коэффициента $K_{14/3}$ с целью определения персонализированной реакции ГСК человека на радиационное воздействие и связь этого показателя с радиочувствительностью проводили два эксперимента. В первом эксперименте измеряли коэффициент $K_{14/3}$ для доли стволовых кроветворных CD117⁺-клеток мышей после облучения в дозе 1 Гр у животных двух линий, отличающихся радиочувствительностью: радиочувствительной линии NOD SCID ($LD_{50/30} = 3,5$ Гр) и относительно радиорезистентной линии C57Bl/6 ($LD_{50/30} = 6,0$ Гр) [18].

Во втором эксперименте ГСК, полученные от трех доноров пуповинной крови, использовали для гуманизации не трех, а пяти гуманизированных мышей. Этим трем дополнительным гуманизированным особям за 30 мин до облучения водили внутривенно препарат с известным радиозащитным действием — 2-меркаптоэтиламин (цистеамин) в дозе 200 мг/кг массы тела (Serva; США). Животных от двух доноров облучали в дозе 0,5 Гр, а от третьего донора — в дозе 1 Гр. Сравнивали коэффициент $K_{14/3}$ у гуманизированных мышей без цистеамина и у мышей с повышенной за счет цистеамина радиорезистентностью.

Для исследуемых показателей рассчитывали среднее значение и стандартную ошибку. Проводили регрессионный анализ для выявления зависимости исследуемых показателей от дозы с помощью

программного пакета Microsoft Office Excel (Microsoft; США). Коэффициенты уравнений в моделях регрессии сравнивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Результаты принимали статистически значимыми при вероятности нулевой гипотезы ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При введении ГСК пуповинной крови мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (NOD SCID) клетки человека заселяют костный мозг мышей и формируют у них пул самоподдерживающихся стволовых гемопоэтических клеток, а также пул созревающих клеток преимущественно лимфогранулоцитарного ряда [17, 19]. Такая модель позволяет изучать радиационно-индуцированную гибель и репопуляцию стволовых клеток человека и их потенциал к поддержанию пула созревающих клеток человека *in vivo* в модели гуманизированных животных.

В наших экспериментах было выявлено, что облучение гуманизированных мышей приводит к дозозависимому снижению выживаемости CD45^{low}CD34⁺-клеток человека через трое суток после облучения (рис. 1А), зависимость от дозы имеет экспоненциальный характер ($R^2 = 0,67$; $F = 38,65$; $p < 0,001$).

На 14-е сутки после облучения число ГСК у облученных мышей увеличивалось и могло у разных доноров превышать исходный контрольный уровень без облучения или не достигать его (рис. 1Б). Статистически значимой зависимости от дозы для снижения числа ГСК на 14-е сутки после облучения в зависимости от дозы облучения получено не было ($R^2 = 0,34$; $F = 4,01$; $p = 0,079$ для линейной зависимости).

После облучения снизилась доля стволовых клеток среди всех клеток человека в костном мозге гуманизированных мышей по сравнению с исходным уровнем $25 \pm 8\%$. Линейную зависимость от дозы в диапазоне 0,5–1,5 Гр имел коэффициент $K_{14/3}$, равный отношению доли стволовых клеток на 14-е сутки после облучения к доле стволовых клеток на третьи сутки после облучения (рис. 2). С увеличением дозы этот показатель снижался ($R^2 = 0,57$; $F = 13,26$; $p = 0,004$). Данный показатель отражает выживаемость стволовых клеток, их восстановление через 14 суток после облучения и их возможность продуцировать дифференцирующиеся клетки.

В эксперименте с применением радиозащитного препарата цистеамина было показано, что у защищенных с помощью радиопротектора гуманизированных мышей

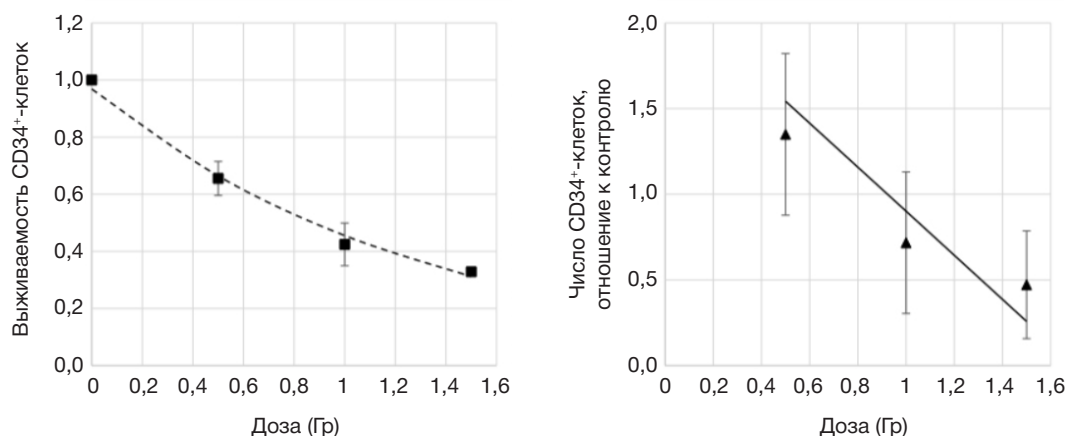


Рис. 1. Выживаемость CD45^{low}CD34⁺-клеток человека в модели мышей, гуманизированных ГСК пуповинной крови, в зависимости от дозы острого внешнего гамма-облучения. А. Выживаемость ГСК через трое суток после облучения. Б. Число ГСК по отношению к необлученному контролю через 14 суток после облучения

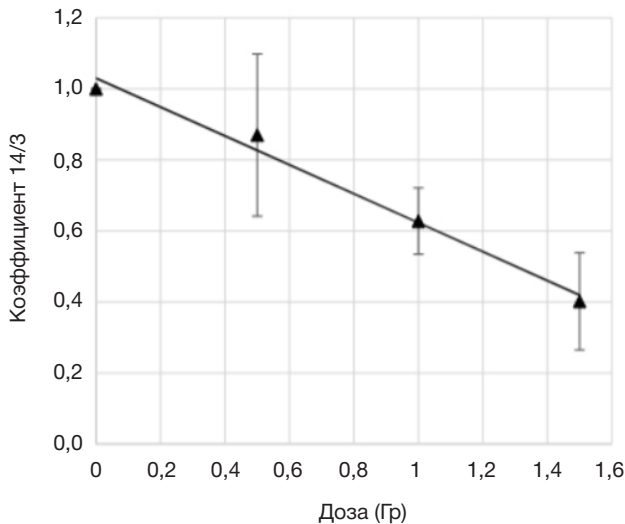


Рис. 2. Зависимость от дозы коэффициента $K_{14/3}$ для $CD45^{low}CD34^{+}$ -клеток человека в модели мышей, гуманизированных ГСК пуповинной крови

коэффициент $K_{14/3}$ был выше, чем у незащищенных, облученных в той же дозе (рис. 3). Таким образом, повышение коэффициента свидетельствует о более высокой радиорезистентности.

Аналогичная закономерность выявлена при сравнении коэффициента $K_{14/3}$ у мышей разных линий, различающихся по радиочувствительности (рис. 4). Так, у радиочувствительных мышей NOD SCID ($LD_{50/30} = 3,5$ Гр, 95%-й ДИ — 3,4–3,8 Гр) $K_{14/3}$ при облучении в дозе 1 Гр составил $0,23 \pm 0,06$, что статистически значимо ($t = 3,9$; $p = 0,003$) отличалось от значения показателя $K_{14/3}$ ($0,98 \pm 0,18$) у мышей C57Bl/6 с нормальной радиочувствительностью ($LD_{50/30} = 6,0$ Гр, 95%-й ДИ — 5,8–6,2 Гр), что подтверждает способность коэффициента отражать различия реакции гемопоэза у мышей с разной радиочувствительностью *in vivo*.

При введении ГСК периферической крови взрослых людей ГСК не способны длительно функционировать в костном мозге мышей, но способны сохранять свой пул и продуцировать созревающие клетки не менее 14 суток [17]. При этом так же, как и в модели гуманизированных ГСК пуповинной крови мышей, выявляется экспоненциальная зависимость выживаемости ГСК человека от дозы внешнего гамма-облучения на третьи сутки после облучения ($R^2 = 0,93$; $F = 211$; $p < 0,001$; рис. 5А).

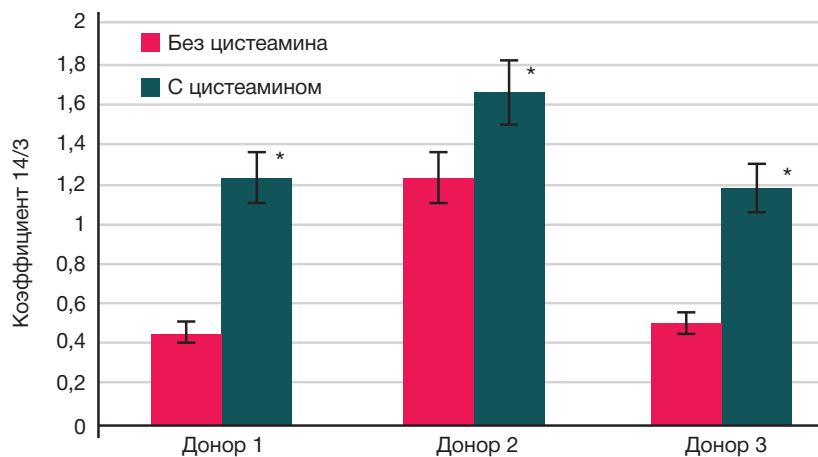


Рис. 3. Коэффициент $K_{14/3}$ для $CD45^{low}CD34^{+}$ -клеток человека в модели мышей, гуманизированных ГСК пуповинной крови трех доноров. Результаты реакции кроветворных клеток человека у гуманизированных мышей на облучение в группах с введением цистеаминa (индуцированная радиорезистентность) и без. * — статистически значимые различия между группами, $p < 0,05$

На 14-е сутки после облучения число ГСК увеличивалось и превышало контрольный уровень без облучения при облучении в дозе 0,5 Гр; при облучении в дозах 1,0 и 1,5 Гр число клеток оставалось сниженным по сравнению с числом ГСК на 14-е сутки без облучения (рис. 5Б). Описана модель линейной зависимости от дозы количества ГСК по отношению к необлученному контролю через 14 суток после облучения ($R^2 = 0,65$; $F = 12,90$; $p = 0,009$).

Важно отметить, что модели, описывающие зависимость выживаемости клеток от дозы, полученные для ГСК пуповинной и периферической крови, не различались: нет статистически значимых различий при сравнении коэффициентов ($t = 1,18$; $p = 0,24$) и свободного члена ($t = 0,15$; $p = 0,88$) в уравнениях зависимости выживаемости ГСК от дозы на третьи сутки после облучения; при сравнении угла наклона ($t = 0,19$; $p = 0,85$) и свободного члена ($t = 0,34$; $p = 0,74$) в уравнениях зависимости относительного числа клеток от дозы на 14-е сутки после облучения.

Коэффициент $K_{14/3}$ в краткосрочной модели гуманизации мышей ГСК периферической крови также, как и в модели гуманизированных ГСК пуповинной крови мышей, зависел от дозы ($R^2 = 0,45$; $F = 5,67$; $p = 0,048$) и отражал индивидуальные особенности ГСК доноров (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Оценка индивидуальной радиочувствительности как с точки зрения тяжести ранних тканевых реакций, так и с точки зрения риска развития отдаленных последствий облучения необходима для выявления групп повышенного риска в отношении неблагоприятных эффектов облучения (в случае повышенной радиочувствительности) и подбора персонала (лица с повышенной радиорезистентностью).

Индивидуальные реакции на облучение могут быть измерены на разных уровнях организации организма на основе оценки различных конечных эффектов облучения, включая гибель организма, рак, нераковые заболевания, тканевые реакции после облучения, хромосомные повреждения и молекулярные изменения [2, 3]. Не во всех работах удается выявить связь между молекулярными и клеточными реакциями *in vitro* и тяжестью тканевых реакций на острое облучение [4, 20, 21].

Хорошим предиктором радиочувствительности, по-видимому, можно считать клоногенное выживание клеток [4]. Для оценки радиочувствительности кроветворной

системы в качестве репрезентативной модели можно рассматривать ГСК. Перспективным методом оценки персонализированной реакции ГСК может оказаться получение гуманизированных мышей [8, 9], которые могут быть рассмотрены как «аватары», отражающие весь комплекс особенностей реакции клеток, свойственных донору клеток. Такой подход разрабатывается в рамках внедрения персонализированной медицины для лечения онкологических пациентов, изучения индивидуальных иммунологических особенностей [22–25].

При трансплантации ГСК человека предварительно облученным в сублетальной дозе мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом человеческие клетки способны занимать опустевшие после облучения ниши в костном мозге животных и длительное время (2–12 месяцев после введения) существовать в организме мыши. При этом ГСК как поддерживают свой пул мультипотентных стволовых клеток, так и дают начало зрелым функционально активным клеткам крови, главным образом миелоидного ростка кроветворения.

Мыши, гуманизированные введением ГСК пуповинной крови, пригодны для моделирования острого радиационного синдрома, так как дают возможность оценить влияние облучения на гибель и последующую репопуляцию и функциональную активность ГСК. В настоящей работе показана зависимость от дозы при облучении в дозах от 0,5 до 1,5 Гр выживаемости ГСК в короткие сроки после облучения (через трое суток) и количества ГСК через 14 суток после облучения, в период восстановления их численности.

Предложенный авторами коэффициент $K_{14/3}$, характеризующий изменение доли ГСК относительно других $CD45^{low/+}$ -клеток человека за 14 суток после облучения, рассматривается как интегральный показатель, отражающий гибель и последующее восстановление, функциональную активность ГСК. В предыдущих работах была показана связь этого показателя с выживаемостью мышей разных линий, т. е. с радиочувствительностью на организменном уровне [18]. В модели гуманизированных ГСК пуповинной крови мышей показана обратная зависимость коэффициента $K_{14/3}$ от дозы облучения, что говорит о возможности использования этого показателя для оценки выраженности тканевой реакции на ионизирующее излучение. В экспериментах по сравнению данного показателя у организмов с заведомо разной радиочувствительностью (мыши NOD SCID и C57Bl/6, гуманизированные мыши с радиопротектором и без

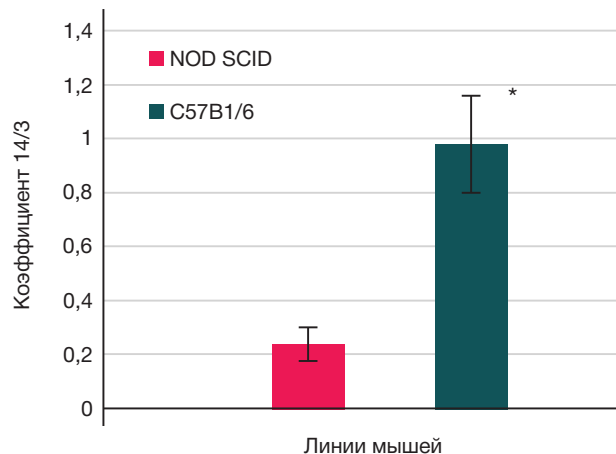


Рис. 4. Коэффициент $K_{14/3}$ для гемопоэтических $CD117^+$ -клеток мышей разных линий с высокой радиочувствительностью (NOD SCID) и нормальной радиочувствительностью (C57Bl/6). * — статистически значимые различия между группами, $p < 0,05$

него) обнаружены однонаправленные различия: значения коэффициента были выше у более радиорезистентных объектов. Ассоциация более высокого значения $K_{14/3}$ с меньшими уровнями дозы и с более высокой радиорезистентностью может быть связана с более эффективной репопуляцией ГСК после облучения, более высоким пролиферативным потенциалом и более эффективным восстановлением пула стволовых клеток до того, как будут запущены процессы дифференцировки, созревания $CD45^+$ -клеток.

При введении иммунодефицитным мышам ГСК периферической крови не удается получить длительно сохраняющийся пул стволовых клеток в костном мозге животных [17], однако возможно применение схемы облучения одновременно с трансплантацией клеток человека и измерения числа ГСК и созревающих кроветворных клеток в течение 14 суток после трансплантации. В работе показано, что дозовая зависимость выживаемости ГСК через трое суток после облучения и их количества через 14 суток после облучения не отличается в моделях гуманизированных мышей с длительно сохраняющимися ГСК пуповинной крови и ГСК периферической крови. Следовательно, не предполагающая длительной репопуляции стволовых клеток модель с использованием ГСК периферической крови также приемлема для моделирования острого лучевого синдрома и оценки радиационно-индуцированной гибели и восстановления

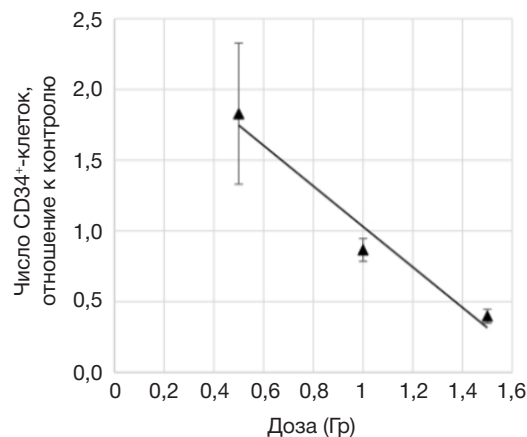
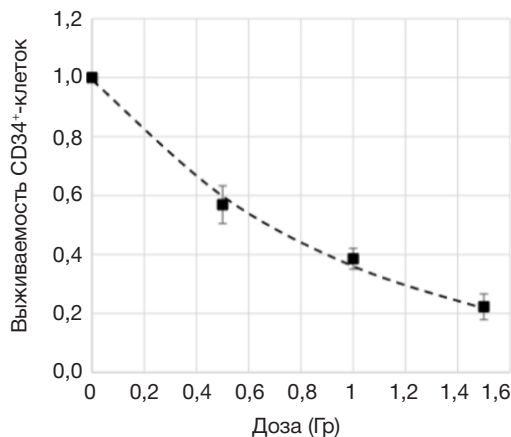


Рис. 5. Выживаемость $CD45^{low/+}CD34^+$ -клеток человека в модели мышей, гуманизированных ГСК периферической крови, в зависимости от дозы острого внешнего гамма-облучения. А. Выживаемость ГСК через трое суток после облучения. Б. Количество ГСК по отношению к необлученному контролю через 14 суток после облучения

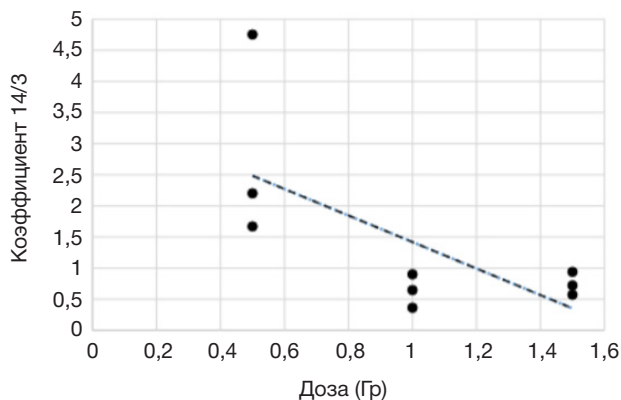


Рис. 6. Зависимость от дозы коэффициента K14/3 для CD45^{low}CD34⁺-клеток человека в модели мышей, гуманизированных ГСК периферической крови взрослых людей

клеток. В модели с использованием ГСК периферической крови рассчитанный коэффициент K14/3 тоже показал обратную зависимость от дозы.

Важно обратить внимание на тот факт, что выживаемость ГСК на третьи сутки после облучения у разных доноров как пуповинной, так и периферической крови, имела гораздо меньшие индивидуальные отличия, чем возросшее через 14 суток число ГСК, а также число созревающих CD45⁺-клеток и, соответственно, относительная доля ГСК среди всех человеческих клеток и коэффициент K14/3.

Литература

- Хаитов Р. М., Аклев А. В., Кофиади И. А. Индивидуальная радиочувствительность и иммунитет: национальное руководство. Челябинск: Книга, 2018; 216 с.
- Applegate KE, Rühm W, Wojcik A, Bourguignon M, Brenner A, Hamasaki K, et al Individual response of humans to ionising radiation: governing factors and importance for radiological protection. *Radiat Environ Biophys.* 2020; 59 (2): 185–209. DOI: 10.1007/s00411-020-00837-y. PMID: 32146555.
- Human Radiosensitivity. Report of the independent Advisory Group on Ionising Radiation Documents of the Health Protection Agency. London, 2013; 164 p.
- Ferlazzo ML, Bourguignon M, Foray N. Functional Assays for Individual Radiosensitivity: A Critical Review. *Semin Radiat Oncol.* 2017; 27 (4): 310–5. DOI: 10.1016/j.semradonc.2017.04.003. PMID: 28865513.
- Когарко И. Н., Аклев А. В., Петушкова В. В., Нейфах Е. А., Когарко Б. С., Ктиорова О. В., и др. Адаптивный ответ как критерий оценки индивидуальной радиочувствительности человека. *Радиация и риск (Бюллетень НРЭР).* 2022; 1. Доступно по ссылке: <https://cyberleninka.ru/article/n/adaptivnyy-otvet-kak-kriteriy-otsenki-individualnoy-radiouchuvstvitelnosti-cheloveka-obzor> (дата обращения: 08.11.2022).
- Fliedner TM, Graessle DH. Hematopoietic cell renewal systems: mechanisms of coping and failing after chronic exposure to ionizing radiation. *Radiat Environ Biophys.* 2008; 47: 63–69. DOI: org/10.1007/s00411-007-0148-6.
- Shao L, Luo Y, Zhou D. Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation. *Antioxid Redox Signal.* 2014; 20 (9): 1447–62. DOI:10.1089/ars.2013.5635.
- Fujiwara S. Humanized mice: a brief overview on their diverse applications in biomedical research. *J Cell Physiol.* 2018; 233: 2889–901.
- Ito R, Takahashi T, Ito M. Humanized mouse models: Application to human diseases. *J Cell Physiol.* 2018; 233 (5): 3723–8.
- Wang C, Oshima M, Sashida G, et al. Non-lethal ionizing radiation promotes aging-like phenotypic changes of human hematopoietic stem and progenitor cells in humanized mice. *PLoS ONE.* 2015; 10 (7): e0132041. DOI: org/10.1371/journal.pone.0132041.
- Zhang L, Mack R, Breslin P, Zhang J. Molecular and cellular mechanisms of aging in hematopoietic stem cells and their niches. *J Hematol Oncol.* 2020; 13 (1): 157. DOI: 10.1186/s13045-020-00994-z. PMID: 33228751; PMCID: PMC7686726.
- de Haan G, Lazare SS. Aging of hematopoietic stem cells. *Blood.* 2018; 131 (5): 479–87. DOI: 10.1182/blood-2017-06-746412. PMID: 29141947.
- Mejia-Ramirez E, Florian MC. Understanding intrinsic hematopoietic stem cell aging. *Haematologica.* 2020; 105 (1): 22–37. DOI: 10.3324/haematol.2018.211342. PMID: 31806687; PMCID: PMC6939535.
- Shao L, Luo Y, Zhou D. Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation. *Antioxid Redox Signal.* 2014; 20 (9): 1447–62. DOI: 10.1089/ars.2013.5635. PMID: 24124731; PMCID: PMC3936513.
- Yoshida K, Satoh Y, Uchimura A, Misumi M, Kyoizumi S, Taga M, et al. Massive expansion of multiple clones in the mouse hematopoietic system long after whole-body X-irradiation. *Sci Rep.* 2022; 12 (1): 17276. DOI: 10.1038/s41598-022-21621-6. PMID: 36241679; PMCID: PMC9568546.
- Brojakowska A, Kour A, Thel MC, et al. Retrospective analysis of somatic mutations and clonal hematopoiesis in astronauts. *Commun Biol.* 2022; 5: 828. Available from: <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03777-z>.
- Атаманюк Н. И., Пряхин Е. А., Андреев С. С., Алдибекова А. Е., Тряпицына Г. А., Шапошникова И. А., и др. Использование ксенотрансплантации гемопоэтических клеток человека, выделенных из периферической крови взрослых людей и пуповинной крови, иммунодефицитным мышам для изучения действия ионизирующего излучения. *Вопросы радиационной безопасности.* 2021; 1: 72–83.
- Атаманюк Н. И., Стяжкина Е. В., Обвинцева Н. А., Тряпицына Г. А., Шапошникова И. А., Андреев С. С., и др. Кинетика гибели и восстановления клеток костного мозга у мышей двух линий с разной радиочувствительностью после острого γ -облучения.

Очевидно, что индивидуальные особенности в меньшей степени влияют на различия радиационно-индуцированной гибели клеток, а в большей — на возможности репарации и последующего восстановления пула стволовых клеток, клоногенную активность ГСК.

Наиболее выраженные индивидуальные отличия были зарегистрированы при облучении гуманизированных мышей в дозе 0,5 Гр. Этот уровень воздействия может быть рекомендован для оценки персонифицированных реакций ГСК, отражающих индивидуальную радиочувствительность, в модели гуманизированных мышей с использованием ГСК периферической крови.

ВЫВОДЫ

Модель гуманизированных ГСК человека, выделенных из пуповинной и периферической крови, может быть использована для изучения реакции ГСК на облучение *in vivo*. Наиболее эффективным, интегральным показателем, отражающим радиационно-индуцированную гибель ГСК, восстановление их числа и функциональную активность, является коэффициент K14/3, равный отношению доли ГСК среди всех CD45^{low/+}-клеток человека на 14-е сутки после облучения к этому параметру на третьи сутки после облучения. Этот коэффициент может быть использован для оценки персонифицированной реакции ГСК человека на облучение.

- Вопросы радиационной безопасности. 2021; 4: 62–72.
19. Biancotti J-C, Town T. Increasing hematopoietic stem cell yield to develop mice with human immune systems. *BioMed Research International*. 2013; 11. DOI: 10.1155/2013/740892.
 20. Brzozowska K, Pinkawa M, Eble MJ, et al. In vivo versus in vitro individual radiosensitivity analysed in healthy donors and in prostate cancer patients with and without severe side effects after radiotherapy. *Int J Radiat Biol*. 2012; 88: 405–13.
 21. Kišonas J, Venius J, Sevriukova O, Grybauskas M, Dabkevičienė D, Burneckis A, et al. Individual Radiosensitivity as a Risk Factor for the Radiation-Induced Acute Radiodermatitis. *Life*. 2022; 12 (1): 20. Available from: <https://doi.org/10.3390/life12010020>.
 22. Yip H, Haupt C, Maresh G, Zhang X, Li L. Humanized mice for immune checkpoint blockade in human solid tumors. *Am J Clin Exp Urol*. 2019; 7 (5): 313–20. PMID: 31763362; PMCID: PMC6872471.
 23. Golebiewska A, Hau AC, Oudin A, Stieber D, Yabo YA, Baus V, et al. Patient-derived organoids and orthotopic xenografts of primary and recurrent gliomas represent relevant patient avatars for precision oncology. *Acta Neuropathol*. 2020; 140 (6): 919–49. DOI: 10.1007/s00401-020-02226-7. PMID: 33009951; PMCID: PMC7666297.
 24. Nilsson JA, Olofsson Bagge R, Ny L. Mouse avatars take off as cancer models. *Nature*. 2018; 562 (7726): 192. DOI: 10.1038/d41586-018-06982-1. PMID: 30305752.
 25. Rottstegge M, Tipton T, Oestereich L, Ruibal P, Nelson EV, Olal C, et al. Avatar Mice Underscore the Role of the T Cell-Dendritic Cell Crosstalk in Ebola Virus Disease and Reveal Mechanisms of Protection in Survivors. *J Virol*. 2022; 96 (18): e0057422. DOI: 10.1128/jvi.00574-22. PMID: 36073921; PM.

References

1. Xaitov RM, Akleev AV, Kofiadi IA. Individual'naya radiochuvstvitel'nost' i immunitet: nacional'noe rukovodstvo. Chelyabinsk: Kniga, 2018; 216 s. Russian.
2. Applegate KE, Rühm W, Wojcik A, Bourguignon M, Brenner A, Hamasaki K, et al Individual response of humans to ionising radiation: governing factors and importance for radiological protection. *Radiat Environ Biophys*. 2020; 59 (2): 185–209. DOI: 10.1007/s00411-020-00837-y. PMID: 32146555.
3. Human Radiosensitivity. Report of the independent Advisory Group on Ionising Radiation Documents of the Health Protection Agency. London, 2013; 164 p.
4. Ferlazzo ML, Bourguignon M, Foray N. Functional Assays for Individual Radiosensitivity: A Critical Review. *Semin Radiat Oncol*. 2017; 27 (4): 310–5. DOI: 10.1016/j.semradonc.2017.04.003. PMID: 28865513.
5. Kogarko IN, Akleev AV, Petushkova VV, Nejfax EA, Kogarko BS, Kitorova OV, i dr. Adaptivnyj otvet kak kriterij ocenki individual'noj radiochuvstvitel'nosti cheloveka. *Radiaciya i risk (Byulleten' NREhR)*. 2022; 1. Dostupno po ssylke: <https://cyberleninka.ru/article/n/adaptivnyy-otvet-kak-kriteriy-otsenki-individualnoy-radiochuvstvitelnosti-cheloveka-obzor> (data obrashheniya: 08.11.2022). Russian.
6. Flidner TM, Graessle DH. Hematopoietic cell renewal systems: mechanisms of coping and failing after chronic exposure to ionizing radiation. *Radiat Environ Biophys*. 2008; 47: 63–69. DOI: org/10.1007/s00411-007-0148-6.
7. Shao L, Luo Y, Zhou D. Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 20 (9): 1447–62. DOI:10.1089/ars.2013.5635.
8. Fujiwara S. Humanized mice: a brief overview on their diverse applications in biomedical research. *J Cell Physiol*. 2018; 233: 2889–901.
9. Ito R, Takahashi T, Ito M. Humanized mouse models: Application to human diseases. *J Cell Physiol*. 2018; 233 (5): 3723–8.
10. Wang C, Oshima M, Sashida G, et al. Non-lethal ionizing radiation promotes aging-like phenotypic changes of human hematopoietic stem and progenitor cells in humanized mice. *PLoS ONE*. 2015; 10 (7): e0132041. DOI: org/10.1371/journal.pone.0132041.
11. Zhang L, Mack R, Breslin P, Zhang J. Molecular and cellular mechanisms of aging in hematopoietic stem cells and their niches. *J Hematol Oncol*. 2020; 13 (1): 157. DOI: 10.1186/s13045-020-00994-z. PMID: 33228751; PMCID: PMC7686726.
12. de Haan G, Lazare SS. Aging of hematopoietic stem cells. *Blood*. 2018; 131 (5): 479–87. DOI: 10.1182/blood-2017-06-746412. PMID: 29141947.
13. Mejia-Ramirez E, Florian MC. Understanding intrinsic hematopoietic stem cell aging. *Haematologica*. 2020; 105 (1): 22–37. DOI: 10.3324/haematol.2018.211342. PMID: 31806687; PMCID: PMC6939535.
14. Shao L, Luo Y, Zhou D. Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 20 (9): 1447–62. DOI: 10.1089/ars.2013.5635. PMID: 24124731; PMCID: PMC3936513.
15. Yoshida K, Satoh Y, Uchimura A, Misumi M, Kyoizumi S, Taga M, et al. Massive expansion of multiple clones in the mouse hematopoietic system long after whole-body X-irradiation. *Sci Rep*. 2022; 12 (1): 17276. DOI: 10.1038/s41598-022-21621-6. PMID: 36241679; PMCID: PMC9568546.
16. Brojakowska A, Kour A, Thel MC, et al. Retrospective analysis of somatic mutations and clonal hematopoiesis in astronauts. *Commun Biol*. 2022; 5: 828. Available from: <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03777-z>.
17. Atamanyuk NI, Pryaxin EA, Andreev SS, Aldibekova AE, Tryapicyna GA, Shaposhnikova IA, i dr. Ispol'zovanie ksenotransplantacii gemopoehticheskix kletok cheloveka, vydelennyx iz perifericheskoy krovi vzroslyx lyudej i pupovinnoy krovi, immunodeficitnym mysham dlya izucheniya dejstviya ioniziruyushhego izlucheniya. *Voprosy radiacionnoj bezopasnosti*. 2021; 1: 72–83. Russian.
18. Atamanyuk NI, Styazhkina EV, Obvinceva NA, Tryapicyna GA, Shaposhnikova IA, Andreev SS, i dr. Kinetika gibeli i vosstanovleniya kletok kostnogo mozga u myshej dvux linij s raznoy radiochuvstvitel'nost'yu posle ostrogo γ -oblucheniya. *Voprosy radiacionnoj bezopasnosti*. 2021; 4: 62–72. Russian.
19. Biancotti J-C, Town T. Increasing hematopoietic stem cell yield to develop mice with human immune systems. *BioMed Research International*. 2013; 11. DOI: 10.1155/2013/740892.
20. Brzozowska K, Pinkawa M, Eble MJ, et al. In vivo versus in vitro individual radiosensitivity analysed in healthy donors and in prostate cancer patients with and without severe side effects after radiotherapy. *Int J Radiat Biol*. 2012; 88: 405–13.
21. Kišonas J, Venius J, Sevriukova O, Grybauskas M, Dabkevičienė D, Burneckis A, et al. Individual Radiosensitivity as a Risk Factor for the Radiation-Induced Acute Radiodermatitis. *Life*. 2022; 12 (1): 20. Available from: <https://doi.org/10.3390/life12010020>.
22. Yip H, Haupt C, Maresh G, Zhang X, Li L. Humanized mice for immune checkpoint blockade in human solid tumors. *Am J Clin Exp Urol*. 2019; 7 (5): 313–20. PMID: 31763362; PMCID: PMC6872471.
23. Golebiewska A, Hau AC, Oudin A, Stieber D, Yabo YA, Baus V, et al. Patient-derived organoids and orthotopic xenografts of primary and recurrent gliomas represent relevant patient avatars for precision oncology. *Acta Neuropathol*. 2020; 140 (6): 919–49. DOI: 10.1007/s00401-020-02226-7. PMID: 33009951; PMCID: PMC7666297.
24. Nilsson JA, Olofsson Bagge R, Ny L. Mouse avatars take off as cancer models. *Nature*. 2018; 562 (7726): 192. DOI: 10.1038/d41586-018-06982-1. PMID: 30305752.
25. Rottstegge M, Tipton T, Oestereich L, Ruibal P, Nelson EV, Olal C, et al. Avatar Mice Underscore the Role of the T Cell-Dendritic Cell Crosstalk in Ebola Virus Disease and Reveal Mechanisms of Protection in Survivors. *J Virol*. 2022; 96 (18): e0057422. DOI: 10.1128/jvi.00574-22. PMID: 36073921; PM.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА COVID-19 СРЕДИ ОБУЧАЮЩИХСЯ И ПРОФЕССОРСКО-ПРЕПОДАВАТЕЛЬСКОГО СОСТАВА УНИВЕРСИТЕТА

С. А. Сайганов¹, А. В. Любимова¹ ✉, И. М. Гасанбеков², А. В. Мельцер¹, З. В. Лопатин¹, Б. И. Асланов¹¹ Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Организация обучения в условиях пандемии COVID-19 потребовала разработки и внедрения активного эпидемиологического надзора за острыми респираторными заболеваниями среди обучающихся и профессорско-преподавательского состава (ППС) медицинского университета. Целью работы было выявить особенности эпидемического процесса COVID-19 среди обучающихся и ППС университета в 2020–2022 гг. Проведен анализ заболеваемости COVID-19 среди обучающихся и ППС за 2020–2021 и 2021–2022 учебные годы. Под наблюдением находились 6293 обучающихся в 2020–2021 учебном году и 6148 в 2021–2022 учебном году, ППС — 772 человека. В 2020–2021 учебном году COVID-19 выявлен у 681 обучающегося, кумулятивная инцидентность (КИ) 10,83 (95% ДИ 10,08–11,61) на 100 обучающихся и 79 человек ППС — КИ 10,23 (95% ДИ 8,09–12,37), в 2021–2022 учебном году — у 690 обучающихся, КИ 11,44 (95% ДИ 10,64–12,24) на 100 обучающихся и 75 человек ППС — КИ 9,71 (95% ДИ 7,62%–11,80%). У 26,3% заболевших COVID-19 инфекция была выявлена при обращении в поликлинику Университета. Заболеваемость обучающихся, проживающих в общежитиях, не превышала заболеваемость среди тех, кто проживал на частных адресах ($p = 0,36$), также не было зарегистрировано вспышек. Найдена сильная положительная связь между заболеваемостью жителей Санкт-Петербурга и заболеваемостью обучающихся ($r = 0,77$). За весь период вероятное место заражения установлено у 39,9% заболевших, наиболее часто (15,2%) — в медицинской организации по месту работы. Заболеваемость новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) среди обучающихся и профессорско-преподавательского состава за 2020–2021 и 2021–2022 учебные годы напрямую обусловлена их вовлечением в эпидемический процесс COVID-19 в Санкт-Петербурге.

Ключевые слова: новая коронавирусная инфекция, профилактические мероприятия, учебный процесс, медицинская организация, эпидемиологический надзор

Благодарности: заведующей кафедрой семейной медицины ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И. И. Мечникова», профессору О. Ю. Кузнецовой за помощь в сборе первичных данных; заведующей поликлиникой Центра семейной медицины ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» О. В. Ковалевой за помощь в сборе данных и передачу первичных данных.

Вклад авторов: А. В. Любимова — анализ эпидемиологических данных, систематический анализ, написание статьи; И. М. Гасанбеков — статистический анализ, подготовка иллюстраций; А. В. Мельцер — техническая часть исследований, обсуждение результатов, редактирование статьи; З. В. Лопатин — редактирование, утверждение окончательного варианта статьи; С. А. Сайганов — обсуждение результатов, редактирование статьи; Б. А. Асланов — анализ эпидемиологических данных, редактирование статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И. И. Мечникова» (протокол № 7 от 07 октября 2020 г.). Все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Анна Викторовна Любимова
Пискаревский пр., д. 47, г. Санкт-Петербург, Россия, 195067, lubimova@gmail.com

Статья получена: 11.12.2022 **Статья принята к печати:** 25.01.2023 **Опубликована онлайн:** 03.03.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.005

RESULTS OF EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE FOR COVID-19 AMONG STUDENTS AND TEACHING STAFF OF THE UNIVERSITY

Sayganov SA¹, Liubimova AV¹ ✉, Gasanbekov IM², Meltser AV¹, Lopatin ZV¹, Aslanov BI¹¹ Mechnikov North-Western State Medical University, Saint Petersburg, Russia² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Organization of training in the context of COVID-19 pandemic demanded the development and implementation of active epidemiological surveillance for acute respiratory infections in students and teaching staff of the Medical University. The study was aimed to identify the features of the COVID-19 epidemic process among students and teaching staff in 2020–2022. The analysis of COVID-19 incidence among students and teaching staff in the academic years 2020–2021 and 2021–2022 was carried out. The study was conducted on 6293 students enrolled in the academic year 2020–2021, 6148 students enrolled in the academic year 2021–2022, and 772 teaching staff members. In the academic year 2020–2021, COVID-19 was detected in 681 students, among whom the cumulative incidence (CI) was 10.83 (95% CI: 10.08–11.61) per 100 students, and 79 teaching staff members, among whom the CI was 10.23 (95% CI: 8.09–12.37); in the academic year 2021–2022 infection was detected in 690 students, the CI was 11.44 (95% CI: 10.64–12.24) per 100 students, and 75 teaching staff members, the CI was 9.71 (95% CI: 7.62%–11.80%). In 26.3% affected individuals, COVID-19 was detected when contacting the University outpatient clinic. The incidence among students living in the dormitories did not exceed that among students living in private apartments ($p = 0.36$), and no outbreaks were reported. There was a strong positive correlation between the incidence among residents of St. Petersburg and the incidence among students ($r = 0.77$). Over the entire period, probable setting of transmission was determined in 39.9% of infected individuals, contact most often (15.2%) occurred when working in the health care facilities. The incidence of novel coronavirus infection (COVID-19) among students and teaching staff members in the academic years 2020–2021 and 2021–2022 is directly related to their involvement in the COVID-19 epidemic process in St. Petersburg.

Keywords: novel coronavirus infection, preventive measures, educational process, health care facility, epidemiological surveillance

Acknowledgements: the authors would like to thank Professor OYu Kuznesova, Head of the Family Medicine Department, Mechnikov North-Western State Medical University, for assistance in primary data acquisition; OV Kovaleva, Head of the Outpatient Clinic of the Family Medicine Center, Mechnikov North-Western State Medical University, for assistance in data acquisition and primary data provided.

Author contribution: Liubimova AV — epidemiological data analysis, systematic analysis, manuscript writing; Gasanbekov IM — statistical analysis, preparing illustrations; Meltser AV — technical aspects of the study, discussion, manuscript editing; Lopatin ZV — editing, approving the final version of the article; Sayganov SA — discussion, manuscript editing; Aslanov BI — epidemiological data analysis, manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Mechnikov North-Western State Medical University (protocol № 7 of 07 October 2020). The informed consent was submitted by all study participants. The study was approved by the Ethics Committee of Mechnikov North-Western State Medical University (protocol № 7 of 07 October 2020). The informed consent was submitted by all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Anna V. Liubimova
Piskarevsky pr., 47, Saint Petersburg, Russia, 195067, lubimova@gmail.com

Received: 11.12.2022 **Accepted:** 25.01.2023 **Published online:** 03.03.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.005

Данная статья является продолжением серии статей о профилактике распространения новой коронавирусной инфекции среди обучающихся и профессорско-преподавательского состава (ППС) СЗГМУ им. И. И. Мечникова (далее университет) [1, 2].

В условиях пандемии COVID-19 многие высшие учебные заведения были вынуждены перейти на дистанционный формат обучения. Однако медицинское образование не может быть эффективным без практических навыков. В связи с этим с сентября 2020 г. в университете занятия семинарского типа и практические занятия было решено проводить в очном формате в аудиториях университета, если в ходе занятий необходима отработка практических навыков. Это привело к необходимости разработки и внедрения целого ряда профилактических и противоэпидемических мероприятий, с учетом того, что обучающиеся медицинских вузов были привлечены к оказанию медицинской помощи пациентам с COVID-19 как в амбулаторных, так и в стационарных условиях. Несмотря на большое число публикаций по поводу заболеваемости студентов COVID-19, все они основаны на результатах анкетирования обучающихся, а не на результатах объективных данных о заболеваемости.

Целью исследования было выявить особенности эпидемического процесса новой коронавирусной инфекции COVID-19 среди обучающихся и ППС университета в 2020–2021 и 2021–2022 учебных годах на основании внедренного эпидемиологического надзора.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Для проведения и коррекции противоэпидемических мероприятий в условиях очного обучения при текущей пандемии COVID-19 в университете был разработан и внедрен активный эпидемиологический надзор за острыми респираторными заболеваниями среди обучающихся и ППС. Подробно схема эпидемиологического надзора описана ранее [1]. Для своевременной коррекции противоэпидемических мероприятий проводили еженедельный анализ заболеваемости.

Для предотвращения распространения новой коронавирусной инфекции были внедрены мероприятия, рекомендованные Роспотребнадзором [3], и дополнительные.

- информационно-просветительская деятельность (фильмы, видеолекции, постеры, информационные письма);
- активное выявление лиц с признаками ОРЗ;
- выделение бокса в поликлинике университета для приема и обследования обучающихся и сотрудников с

симптомами острого респираторного заболевания (ОРЗ);

- перевод на дистанционную форму обучения лиц с симптомами ОРЗ, подтвержденным случаем COVID-19 и контактных с ними лиц;

- выведение из общежития лиц с симптомами ОРЗ, подтвержденным случаем COVID-19 и контактных с ними лиц.

Заболеваемость COVID-19 изучали за периоды названных учебных лет с 1 сентября по 30 июня. Все обучающиеся и преподаватели были включены в исследование. За исследуемый период под наблюдением находились 4879 студентов в 2020–2021 учебном году и 4703 в 2021–2022 учебном году; ординаторов — 1414 человек в 2020–2021 учебном году и 1445 в 2021–2022 учебном году; ППС — 772 человека. Число студентов, обучающихся по разным направлениям подготовки по курсам, представлено в таблице.

Заболевания выявляли при обращении за медицинской помощью в медицинскую организацию по месту жительства, скорую помощь и при обращении в поликлинику университета. Клиническую диагностику и лабораторное подтверждение проводили согласно версии нормативных документов, актуальной на момент обращения за медицинской помощью [4]. Рассчитывали кумулятивную инцидентность COVID-19 (отношение числа выявленных случаев заболевания среди изучаемой группы к общему числу лиц в группе за изучаемый период времени, умноженное на 100) среди обучающихся разных факультетов и ППС и ее месячную динамику. Рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона между недельной динамикой числа случаев заболеваний среди жителей Санкт-Петербурга и обучающихся университета (r).

Для выявления вероятного места заражения и круга контактных лиц проводили опрос каждого заболевшего. Место заражения считали установленным, если обучающийся указывал на наличие контакта с лицом с подтвержденным случаем COVID-19, в течение 14 дней от момента появления симптомов в 2020–2021 гг. и в течение 7 дней в 2022 г. Рассчитывали кумулятивную инцидентность COVID-19 по вероятному месту заражения у обучающихся в разных семестрах, структуру по вероятному месту заражения (удельный вес от всех случаев заболевания) обучающихся на младших и старших курсах разных факультетов и в ординатуре.

Рассчитывали 95%-е доверительные интервалы по методу Уилсона. Различия считали статистически значимыми при значении уровня значимости p меньше 0,05.

Таблица. Число студентов, обучающихся по разным направлениям подготовки по курсам

Курс	Специальность (факультет)							
	Сестринское дело		Лечебное дело		Медико-профилактическое дело		Стоматология	
	Учебный год							
	2020–2021	2021–2022	2020–2021	2021–2022	2020–2021	2021–2022	2020–2021	2021–2022
1	19	13	695	786	156	156	95	70
2	10	11	718	586	160	125	90	66
3	8	7	581	607	142	140	72	56
4		8	556	505	127	114	66	61
5			581	535	116	123	72	58
6			480	563	135	113		
Всего	37	39	3611	3582	836	771	395	311

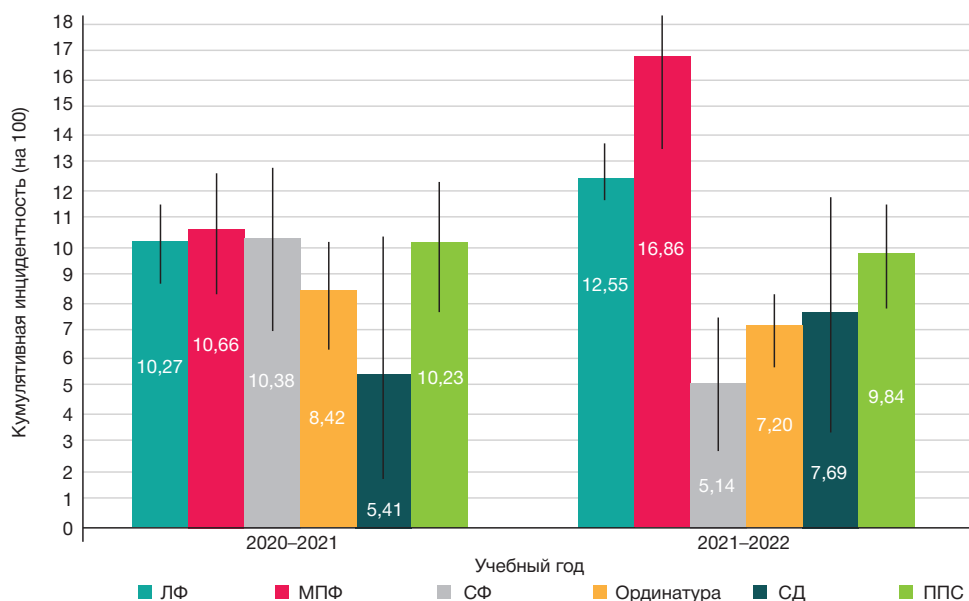


Рис. 1. Кумулятивная инцидентность COVID-19 среди обучающихся и ППС в 2020–2021 и 2021–2022 гг. ЛФ — лечебный факультет, МПФ — медико-профилактический факультет, СФ — стоматологический факультет, СД — сестринское дело, ППС — профессорско-преподавательский состав

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

За изучаемый период COVID-19 выявлен у 1371 обучающихся и 155 человек ППС. При этом в 2020–2021 учебном году: у 681 обучающегося, кумулятивная инцидентность (КИ) составила 10,83 (95%-й ДИ: 10,08–11,61) на 100 обучающихся и 79 человек ППС — КИ составила 10,23 (95%-й ДИ: 8,09–12,37); в 2021–2022 учебном году: у 690 обучающихся, КИ — 11,44 (95%-й ДИ: 10,64–12,24) на 100 обучающихся и 75 человек ППС — КИ составила 9,71 (95%-й ДИ: 7,62–11,80%).

Следует отметить, что практически каждый пятый случай заболевания COVID-19 (19%) был выявлен в поликлинике университета, в которой был организован бокс для приема и обследования обучающихся и сотрудников с симптомами ОРЗ. Всего в поликлинику обратились 1058 человек, у 278 (26,3%) из них был подтвержден диагноз COVID-19. Среди обратившихся в поликлинику 487 (46%) обучающихся проживали в общежитиях университета и COVID-19 был выявлен у 124 (25,4%) из них. Было обеспечено подтверждение диагноза

методом ПЦР в течение 12 ч с момента обращения за медицинской помощью. Информацию немедленно передавали координатору по противоэпидемической работе, начальнику службы организации заселения и социально-бытовой работы, заместителям деканов факультетов. Это позволило на более ранних сроках изолировать заболевших и своевременно проводить противоэпидемические мероприятия. Заболеваемость обучающихся, проживающих в общежитиях, за весь анализируемый период не превышала заболеваемость среди лиц, проживающих на частных адресах, и составила 19,1 и 18,9 на 100 обучающихся соответственно. Не было выявлено вспышечной заболеваемости среди обучающихся, проживающих в общежитиях.

В 2020–2021 гг. заболеваемость среди обучающихся на разных факультетах, ординаторов и ППС была на одинаковом уровне. В 2021–2022 гг. самая высокая заболеваемость была выявлена среди студентов медико-профилактического факультета за счет наибольшего вовлечения во вспышку, обусловленную SARS-CoV-2 омикрон-штаммом (рис. 1, 2).

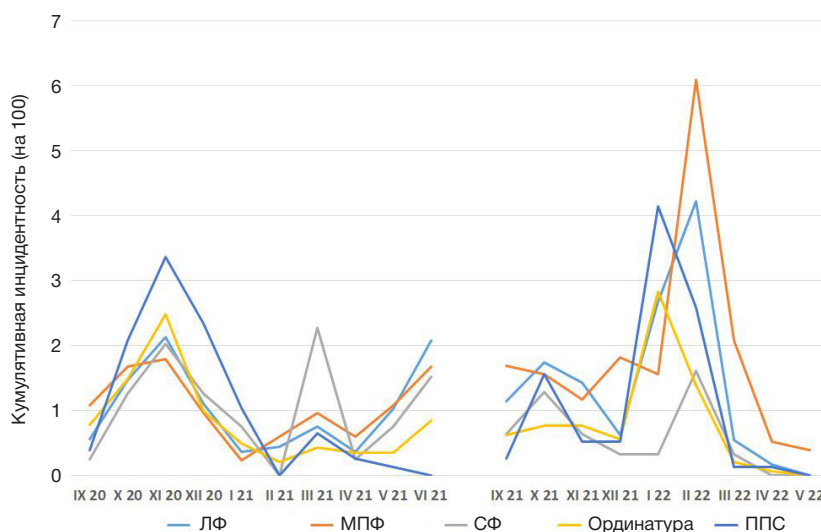


Рис. 2. Помесечная динамика кумулятивной инцидентности COVID-19 среди обучающихся и ППС в 2020–2021 и 2021–2022 гг. ЛФ — лечебный факультет, МПФ — медико-профилактический факультет, СФ — стоматологический факультет, ППС — профессорско-преподавательский состав

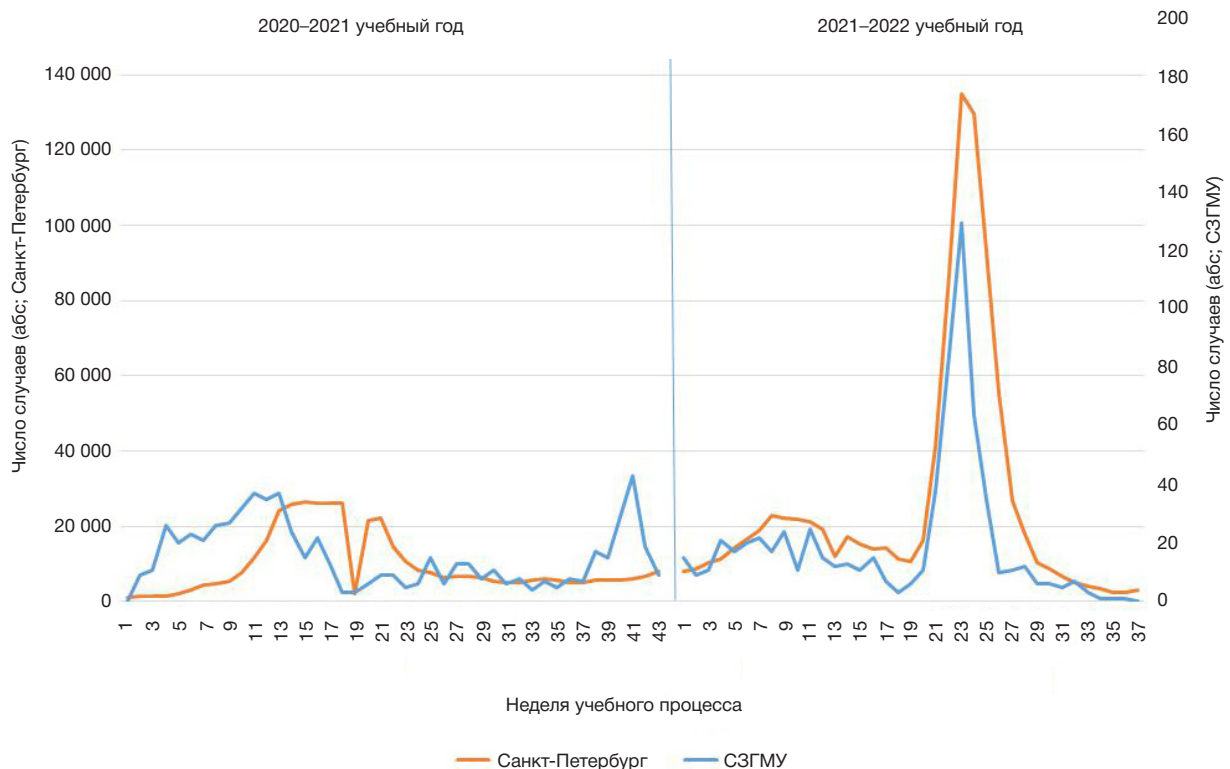


Рис. 3. Динамика числа случаев COVID-19, выявленных у обучающихся и ППС университета и у жителей Санкт-Петербурга

Наибольшая заболеваемость наблюдалась среди студентов старших курсов (4–6 курсы) в 2021–2022 гг. — 12,60 на 100 обучающихся (95%-й ДИ: 11,24–14,09), среди младших курсов (1–3 курсы) заболеваемость составила 11,52 на 100 обучающихся (95%-й ДИ: 10,33–12,76). В 2020–2021 гг. эти показатели были ниже: 9,67 (95%-й ДИ: 8,61–10,84; $p = 0,03$) среди студентов младших курсов и 9,28 — среди студентов старших курсов (95%-й ДИ: 8,12–10,59; $p = 0,0006$).

Максимальные подъемы заболеваемости COVID-19 выявлен осенью 2020 г. и зимой 2022 г. Осенью 2020 г. четверть всех случаев заболеваний среди обучающихся была обусловлена контактами в медицинских организациях, что связано с работой студентов и ординаторов в ковид-центрах. Кроме того, обнаружено большое число случаев несоблюдения режима самоизоляции при появлении симптомов ОРЗ. В период доминирования дельта-штамма SARS-CoV-2 наибольшая заболеваемость зарегистрирована среди ППС, что, по-видимому, было связано с возрастным фактором. Подъем заболеваемости на 40–41-й неделях (31 мая – 13 июня 2021 г.) вызван несоблюдением обучающимися режима самоизоляции при возникновении заболевания в период сессии — 70% заболевших студентов продолжали посещать университет с признаками ОРЗ. Кроме того, при проведении тестирования на SARS-CoV-2 у студентов перед летней практикой было выявлено 30% от общего числа заболеваний [1]. Зимой 2022 г., когда доминировал омикрон-штамм SARS-CoV-2, ППС и ординаторы максимально были вовлечены уже в январе 2022 г., тогда как студенты — в феврале, что связано с периодом студенческих каникул.

Эпидемический процесс COVID-19 среди обучающихся и ППС университета зависел от эпидемического процесса среди жителей Санкт-Петербурга, между которыми имеется сильная положительная связь (коэффициент корреляции $r = 0,77$) (рис. 3).

Повторные случаи заболевания выявлены у 58 обучающихся (4,3% от общего числа заболевших). Максимальное число повторных случаев заболевания было выявлено в период распространения омикрон-штамма SARS-CoV-2 в феврале 2022 г.

За весь период вероятное место заражения удалось установить у 39,9% заболевших. Наиболее часто обучающиеся указывали на наличие контакта с лицом, имеющим подтвержденный случай COVID-19, по месту работы или практики в медицинской организации (15,2% заболевших), 12,1% имели контакт в группе во время очных занятий, контакт в семье по месту жительства отметили 6,6%, в общежитии — 2,2%, при других обстоятельствах — 2,5% и 1,3% указали на наличие контакта с несколькими источниками инфекции. Заболеваемость обучающихся с установленным контактом с лицом, имеющим подтвержденный случай COVID-19, за весь период наблюдения составила 8,8 на 100 обучающихся, с неустановленным источником инфекции — 13,3 на 100 обучающихся. Однако показатели заболеваемости по контакту отличались в зависимости от интенсивности эпидемического процесса и были выше в периоды подъема заболеваемости по сравнению с периодами более низкой заболеваемости (47,8 и 28,9% соответственно; $p << 0,01$), в большей степени за счет заболеваний, возникших в результате контакта по месту работы или практики в медицинской организации и в университете. Множественные контакты, т. е. контакты с несколькими источниками инфекции в течение инкубационного периода, были отмечены в период 2021–2022 гг. (рис. 4).

Наиболее часто о наличии контакта с лицом, имеющим подтвержденный случай COVID-19, по месту работы или практики в медицинской организации сообщали заболевшие со старших курсов лечебного, медико-профилактического факультетов и ординаторы ($p << 0,01$), что неудивительно, так как именно студенты старших курсов и ординаторы работают и проходят практику

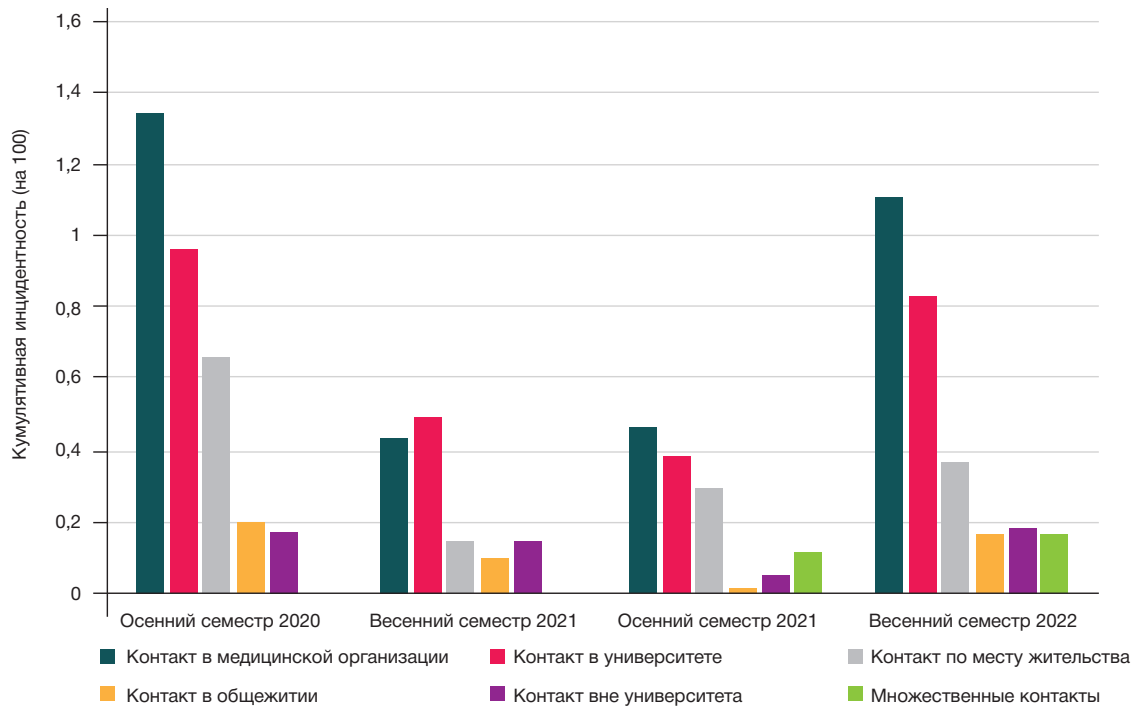


Рис. 4. Кумулятивная инцидентность COVID-19 по вероятному месту заражения у обучающихся в разных семестрах

в медицинских организациях. На младших курсах преобладали заболевания вследствие контакта в университете ($p = 0,0004$). Наибольший удельный вес контактов вне университета при разных обстоятельствах с лицом, имеющим подтвержденный случай COVID-19, отметили студенты стоматологического факультета (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Риск заражения в условиях очной формы обучения в вузах возрастает. Так, в США в начале 2020–2021 гг. наблюдали стремительный рост заболеваемости COVID-19 среди

студентов. При опросе, проведенном *New York Times* в более чем 1600 колледжах, к 26 августа было выявлено более 26 000 случаев заболевания COVID-19 в более чем 750 колледжах по всей стране, более 51 000 случаев COVID-19 в более чем 1020 колледжах США к 3 сентября и более 130 000 случаев в 1300 колледжах к 25 сентября [5]. В другом университете из 2187 студентов 528 (24,1%) получили диагноз COVID-19 в осеннем семестре 2020 г., что в 8 раз выше, чем в нашем исследовании [6]. В пяти университетах Великобритании в декабре 2020 г. серопревалентность SARS-CoV-2 среди 2905 студентов составила 17,8% (95%-й ДИ: 16,5–19,3), в диапазоне от

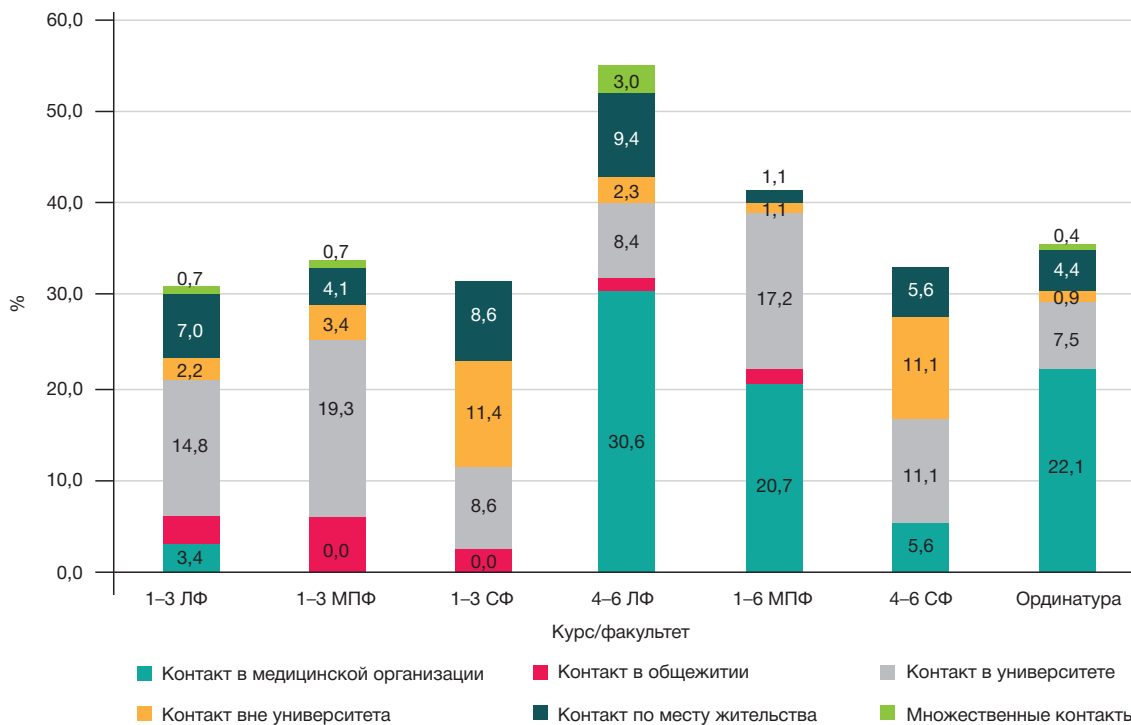


Рис. 5. Вероятное место заражения (удельный вес от всех случаев заболевания) обучающихся на младших и старших курсах разных факультетов и в ординатуре

7,6 до 29,7% [7]. Еще в одном университете заболеваемость студентов в 2020–2021 гг. составила 15,7 на 100 обучающихся [8].

В нашем исследовании мы тоже наблюдали быстрый рост заболеваемости в начале 2020–2021 г. Анализ причин распространения COVID-19 в сентябре 2020 г. показал, что основной причиной роста заболеваемости было посещение университета обучающимися с признаками ОРЗ. Так в сентябре 2020 г. в день появления симптомов в университет приходили 25,4% заболевших, и продолжали посещать занятия в очной форме более одного дня после появления симптомов 32,7% заболевших COVID-19. Исследования, проведенные в других медицинских университетах России, тоже показали, что примерно четверть студентов с симптомами COVID-19 не обращаются за медицинской помощью [9, 10]. Как правило, это связано со страхом перед отработками пропущенных занятий. Руководством университета было принято решение переводить заболевших на дистанционную форму обучения, т. е. заболевшим студентам не отмечали пропущенные дни и в дальнейшем они не должны были отрабатывать занятия. Кроме того, был разработан постер с призывом не посещать занятия при появлении признаков ОРЗ, который был размещен перед входом на каждую кафедру. Эти мероприятия привели к снижению посещений занятий с признаками ОРЗ в два раза, что позволило, в совокупности с внедрением других профилактических и противоэпидемических мер, снизить уровень заболеваемости. Быстрое выявление и изоляция заболевших и контактных лиц и строгое соблюдение масочного режима являются одними из главных мероприятий для сдерживания распространения коронавирусной инфекции.

За период пандемии (с сентября по июль 2020–2021 и 2021–2022 гг.) в целом заболеваемость среди обучающихся и ППС университета была обусловлена их вовлечением в эпидемический процесс COVID-19 в Санкт-Петербурге, но оказалась ниже, чем среди совокупного населения Санкт-Петербурга. За изучаемый период времени в Санкт-Петербурге зарегистрировано более 1 350 000 случаев COVID-19, заболеваемость составила 25 на 100 жителей, что выше заболеваемости в университете. Наиболее высокие показатели заболеваемости отмечены в периоды подъема заболеваемости в Санкт-Петербурге. Связь между заболеваемостью студентов и жителей населенного пункта описывают и другие исследователи [11]. Например, в Пенсильвании среди жителей, не являющихся студентами, было зарегистрировано меньше случаев COVID-19, чем среди студентов [12].

Основным фактором риска заболеваемости у обучающихся была работа в медицинских организациях. Активный опрос заболевших позволил выявить вероятное место заражения более чем в трети случаев. Почти половина из них имели контакт по месту работы в медицинской организации, что в большой степени обусловило заболеваемость студентов старших курсов и ординаторов. Так, заболеваемость студентов, работающих в медицинских организациях в Барнауле, в 4,7 раза превышает средний показатель по региону. Доля заболевших студентов 4–6-х курсов составила 75,3% [13]. Студенты Смоленского

медицинского университета также отметили, что посещение лечебных учреждений является одним из главных мест возможного инфицирования [14]. Это связано с четким статусом по COVID-19 пациентов, находящихся в медицинских организациях, и, возможно, с большим риском заражения в условиях оказания медицинской помощи. Преобладание числа случаев заражения студентов младших курсов в университете, по-видимому, связано с меньшими знаниями и низкой приверженностью соблюдения профилактических мероприятий [15, 16].

Проводимые мероприятия позволили не допустить высокой заболеваемости среди ППС университета, что чрезвычайно важно, так как многие из них имеют факторы риска тяжелого течения COVID-19. Кумулятивная инцидентность COVID-19 среди ППС и обучающихся составила 19,9 и 22,3 на 100 соответственно.

В средствах массовой информации Российской Федерации неоднократно сообщалось о вспышках COVID-19 в студенческих общежитиях. Так, в открытых интернет-источниках была опубликована информация по крайней мере о 15 вспышках с общим числом пострадавших 324 человека (от 4 до 79). В одном из исследований было выявлено, что у студентов, живущих в одной комнате, шансы заразиться COVID-19 были примерно в два раза выше, чем у тех, кто живет один [5]. Активное выявление и изоляция заболевших и контактных позволили избежать вспышечной заболеваемости среди обучающихся, проживающих в общежитиях. Следует отметить низкий процент повторных случаев заболеваний, которые наблюдались лишь при распространении омикрон-штамма SARS-CoV-2.

Выводы

Заболеваемость новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) среди обучающихся и ППС за 2020–2021 и 2021–2022 учебные годы напрямую обусловлена их вовлечением в эпидемический процесс COVID-19 в Санкт-Петербурге. Разработанные и внедренные в университете мероприятия по сдерживанию распространения новой коронавирусной инфекции позволили избежать вспышечной заболеваемости среди обучающихся и ППС и достигнуть уровня заболеваемости ниже, чем в целом по Санкт-Петербургу, несмотря на очный формат обучения. Благодаря разработке и внедрению активного эпидемиологического надзора за острыми респираторными заболеваниями, заболеваемость обучающихся, проживающих в общежитиях, за весь период не превышала заболеваемость среди лиц, проживающих на частных адресах. Не было выявлено вспышечной заболеваемости среди обучающихся, проживающих в общежитиях, тогда как в средствах массовой информации неоднократно сообщалось о вспышках COVID-19 в студенческих общежитиях других вузов. Наиболее часто заражение происходило при контакте с источником инфекции по месту работы в медицинской организации. Опыт университета может быть использован в дальнейшем при появлении новых вызовов распространения инфекционных заболеваний.

Литература

1. Сайганов С. А., Любимова А. В., Мельцер А. В., Лопатин З. В., Кузнецова О. Ю., Ковалева О. В. и др. Эпидемиологические особенности распространения новой коронавирусной инфекции COVID-19 среди обучающихся университета в 2020–2021 учебном году. Профилактическая и клиническая медицина. 2021; 81 (4): 10–19.
2. Сайганов С. А., Мельцер А. В., Любимова А. В., Кузнецова О. Ю., Зуева Л. П., Асланов Б. И. и др. Опыт организации мер по предотвращению распространения новой коронавирусной инфекции среди обучающихся образовательной организации, проживающих в общежитиях. Профилактическая и клиническая медицина. 2020; 76 (3): 4–11.
3. МР 3.1/2.1.0205-20. 3.1. Профилактика инфекционных болезней. 2.1. Коммунальная гигиена. Рекомендации по профилактике новой коронавирусной инфекции (COVID-19) в образовательных организациях высшего образования. Методические рекомендации (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 29.07.2020) (ред. от 11.02.2021). МР 3.1./2.1.02.05.20. Методические рекомендации.
4. Временные методические рекомендации Министерства здравоохранения Российской Федерации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID 19)» версии 8.1-15. Цитировано 21 января 2022. Доступно по ссылке: <https://xn--80aesfpebagmflb0a.xn--p1ai/info/ofdoc/who/>.
5. Watson S, Hubler S, Ivory D, Gebeloff R. A new front in America's pandemic: college towns. *New York Times*. [Internet] September 6, 2020. Updated September 25, 2020. Accessed January 21, 2022. [about 3 p.]. Available from: <https://www.nytimes.com/interactive/2020/us/covid-college-cases-tracker.html>.
6. Bigouette JP, Ford L, Segaloff HE, Langolf K, Kahrs J, Zochert T, et al. Association of Shared Living Spaces and COVID-19 in University Students, Wisconsin, USA, 2020. *Emerg Infect Dis*. 2021; 27 (11): 2882–6.
7. Vusirikala A, Whitaker H, Jones S, Tessier E, Borrow R, Linley E, et al. Seroprevalence of SARS-CoV-2 antibodies in university students: Cross-sectional study. *England. J Infect*. 2021; 83 (1): 104–11.
8. Cass AL, Slining MM, Carson C, Cassidy J, Epright MC, Gilchrist AE, et al. Risk Management of COVID-19 in the Residential Educational Setting: Lessons Learned and Implications for Moving Forward. *Int J Environ Res Public Health*. 2021; 18 (18): 9743.
9. Леленкова Л. Ю., Ножкина Н. В. Оценка информированности и отношения студентов-медиков к эпидемической ситуации и вакцинации против COVID-19. В сборнике: VI Международная (76 Всероссийская) научно-практическая конференция «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения». 2021; 783–8.
10. Немчинова Д. А., Марченко Д. Д. Особенности заболеваемости COVID-19 среди студентов медицинского вуза. *FORCIPE*. 2022; 5 (53): 568.
11. Pollock BH, Kilpatrick AM, Eisenman DP, Elton KL, Rutherford GW, Boden-Albala BM, et al. Safe reopening of college campuses during COVID-19: The University of California experience in Fall 2020. *PLoS One*. 2021; 16 (11): 0258738. PubMed PMID: 34735480.
12. Bharti N, Lambert B, Exten C, Faust C, Ferrari M, Robinson A. Large university with high COVID-19 incidence is not associated with excess cases in non-student population. *Sci Rep*. 2022; 12 (1): 3313.
13. Суворова С. М., Широкоступ С. В., Лукьяненко Н. В. Анализ заболеваемости новой коронавирусной инфекцией COVID-19 среди студентов медицинского вуза. В сборнике: В. Г. Акимкин, редактор. Молекулярная диагностика и биобезопасность-2021. COVID-19: эпидемиология, диагностика, профилактика: сборник тезисов Онлайн-конгресса с международным участием (28–29 апреля 2021 г., Москва). М.: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2021; 48 с.
14. Чубанов В. А., Захаров Е. А., Забоенкова Е. А. Коронавирусная инфекция у студентов Смоленского государственного медицинского университета. *Смоленский медицинский альманах*. 2022; (3): 153–57.
15. Делова Л. А. Соблюдение мер профилактики COVID-19 студентами медицинских специальностей: по материалам социологического опроса. В сборнике: Инновационные исследования: теоретические основы и практическое применение: сборник статей Национальной (Всероссийской) научно-практической конференции, Саратов, 22 июля 2021 года. Уфа: «ОМЕГА САЙНС», 2021; 296–301.
16. Wassif GO, El Din DAG. Relationship between knowledge, attitude, and practice of COVID-19 precautionary measures and the frequency of infection among medical students at an Egyptian University. *PLoS One*. 2022; 17 (9): 0274473. PubMed PMID: 36121862.

References

1. Sayganov SA, Lyubimova AV, Meltser AV, Lopatin ZV, Kuznetsova OYu, Kovaleva OV, i dr. Ehpideimologicheskie osobennosti rasprostraneniya novoj koronavirusnoj infekcii COVID-19 sredi obuchayushhixsya universiteta v 2020–2021 uchebnom godu. *Profilakticheskaya i klinicheskaya medicina*. 2021; 81 (4): 10–19. Russian.
2. Sayganov SA, Meltser AV, Lyubimova AV, Kuznetsova OYu., Zuyeva LP, Aslanov BI, i dr. Opyt organizacii mer po predotvrashheniyu rasprostraneniya novoj koronavirusnoj infekcii sredi obuchayushhixsya obrazovatel'noj organizacii, prozhivayushhix v obshhezhitiyax. *Profilakticheskaya i klinicheskaya medicina*. 2020; 76 (3): 4–11. Russian.
3. МР 3.1/2.1.0205-20. 3.1. Профилактика инфекционных болезней. 2.1. Коммунальная гигиена. Рекомендации по профилактике новой коронавирусной инфекции (COVID-19) в образовательных организациях высшего образования. Методические рекомендации (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 29.07.2020) (ред. от 11.02.2021). МР 3.1./2.1.02.05.20. Методические рекомендации. Russian.
4. Vremennye metodicheskie rekomendacii ministerstva zdravooxraneniya Rossijskoj Federacii «Profilaktika, diagnostika i lechenie novoj koronavirusnoj infekcii (COVID 19)» versii 8.1-15 [Internet] Citirovano 21 yanvara 2022 [okolo 248 str.] Dostupno po sssylke: <https://xn--80aesfpebagmflb0a.xn--p1ai/info/ofdoc/who/>. Russian.
5. Watson S, Hubler S, Ivory D, Gebeloff R. A new front in America's pandemic: college towns. *New York Times*. [Internet] September 6, 2020. Updated September 25, 2020. Accessed January 21, 2022. [about 3 p.]. Available from: <https://www.nytimes.com/interactive/2020/us/covid-college-cases-tracker.html>.
6. Bigouette JP, Ford L, Segaloff HE, Langolf K, Kahrs J, Zochert T, et al. Association of Shared Living Spaces and COVID-19 in University Students, Wisconsin, USA, 2020. *Emerg Infect Dis*. 2021; 27 (11): 2882–6.
7. Vusirikala A, Whitaker H, Jones S, Tessier E, Borrow R, Linley E, et al. Seroprevalence of SARS-CoV-2 antibodies in university students: Cross-sectional study. *England. J Infect*. 2021; 83 (1): 104–11.
8. Cass AL, Slining MM, Carson C, Cassidy J, Epright MC, Gilchrist AE, et al. Risk Management of COVID-19 in the Residential Educational Setting: Lessons Learned and Implications for Moving Forward. *Int J Environ Res Public Health*. 2021; 18 (18): 9743.
9. Lelenkova LYu, Nozhkina NV. Ocenka informirovannosti i otnosheniya studentov-medikov k ehpidemicheskoy situacii i vakcinacii protiv COVID-19. V sbornike: VI Mezhdunarodnaya (76 Vserossijskaya) nauchno-prakticheskaya konferenciya «Aktual'nye voprosy sovremennoj medicinskoj nauki i zdravooxraneniya». 2021; 783–8. Russian.
10. Nemchaninova DA, Marchenko DD. Osobennosti zaboлеваemosti

- COVID-19 sredi studentov medicinskogo vuza. FORCIPE. 2022; 5 (53): 568. Russian.
11. Pollock BH, Kilpatrick AM, Eisenman DP, Elton KL, Rutherford GW, Boden-Albala BM, et al. Safe reopening of college campuses during COVID-19: The University of California experience in Fall 2020. *PLoS One*. 2021; 16 (11): 0258738. PubMed PMID: 34735480.
 12. Bharti N, Lambert B, Exten C, Faust C, Ferrari M, Robinson A. Large university with high COVID-19 incidence is not associated with excess cases in non-student population. *Sci Rep*. 2022; 12 (1): 3313.
 13. Suvorova SM, Shirokostup SV, Lukyanenko NV. Analiz zaboлеваemosti novoj koronavirusnoj infekciej COVID-19 sredi studentov medicinskogo vuza. V sbornike: V. G. Akimkin, redaktor. *Molekulyarnaya diagnostika i biobezopasnost'-2021. COVID-19: ehpidemiologiya, diagnostika, profilaktika: sbornik tezisov Onlajn-kongressa s mezhdunarodnym uchastiem* (28–29 aprelya 2021 g., Moskva). M.: FBUN CNII Ehpidemiologii Rospotrebnadzora, 2021; 48 s. Russian.
 14. Chubanov VA, Zakharov YeA, Zaboyenkova YeA. Koronavirusnaya infekciya u studentov Smolenskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta. *Smolenskij medicinskij al'manax*. 2022; (3): 153–57. Russian.
 15. Delova LA. Soblyudenie mer profilaktiki COVID-19 studentami medicinskix special'nostej: po materialam sociologicheskogo oprosa. V sbornike: *Innovacionnye issledovaniya: teoreticheskie osnovy i prakticheskoe primenenie: sbornik statej Nacional'noj (Vserossijskoj) nauchno-prakticheskoy konferencii, Saratov, 22 iyulya 2021 goda*. Ufa: «OMEGA SAJNS», 2021; 296–301. Russian.
 16. Wassif GO, El Din DAG. Relationship between knowledge, attitude, and practice of COVID-19 precautionary measures and the frequency of infection among medical students at an Egyptian University. *PLoS One*. 2022; 17 (9): 0274473. PubMed PMID: 36121862.

КЛИНИКО-ВИРУСОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА В И ОТВЕТ НА ПРОТИВОВИРУСНУЮ ТЕРАПИЮ

Nguyen Thi-Hanh¹✉, Л. И. Мельникова², Л. Ю. Ильченко^{1,3}, К. К. Кюрегян⁴, И. В. Гордейчук³, Н. Л. Бондаренко²

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

² Клиническая больница № 85 Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

³ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М. П. Чумакова, Москва, Россия

⁴ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова, Москва, Россия

Хронический гепатит В (ХГВ) — широко распространенное инфекционное заболевание, одна из основных причин цирроза печени (ЦП) и гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК). Лечение ХГВ до сих пор затруднено из-за отсутствия препаратов, полностью элиминирующих вирус гепатита В (HBV) из гепатоцита. Целью работы было описать клинико-лабораторные особенности ХГВ, оценить эффективность противовирусной терапии и выявить факторы, ассоциированные с ответом на нее. На основании первичной документации проведена оценка результатов клинико-лабораторного и инструментального обследования, а также данных серологических и молекулярно-биологических методов исследований пациентов ($n = 201$), наблюдавшихся в период 2007–2021 гг. в Центре диагностики и лечения хронических вирусных гепатитов КБ № 85 ФМБА России. Большинство пациентов в группе — мужчины (56,7%); преобладали HBeAg-негативные больные (93%). У девяти (4,5%) пациентов диагностирован ЦП, у одного из них — ГЦК. Генотип D HBV установлен в 95,4% случаев, А — в 3,1% и С — в 1,5%. После года терапии аналогами нуклеоз(т)идов (энтекавир или тенофовир) у 88% пациентов отсутствовала вирусемия, нормализовались биохимические показатели (88%). Общий уровень сероконверсии по HBeAg составил 41,7% и по HBsAg — 3%. Таким образом, получены высокая частота достижения вирусологического ответа и нормализация активности ферментов. Низкий исходный уровень вирусемии является независимым прогностическим фактором для достижения вирусологического ответа. Уровень HBsAg в конце терапии позволяет прогнозировать рецидив после окончания лечения.

Ключевые слова: хронический гепатит В, противовирусная терапия, прогностические факторы

Вклад авторов: Nguyen Thi-Hanh — сбор материала, анализ полученных данных, написание текста; Л. И. Мельникова — сбор материала, анализ полученных данных; Л. Ю. Ильченко — дизайн исследования, анализ полученных данных, редактирование статьи; К. К. Кюрегян — обзор литературы; И. В. Гордейчук — анализ полученных данных; Н. Л. Бондаренко — редактирование и утверждение финального варианта статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова (протокол № 213 от 13 декабря 2021 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Nguyen Thi-Hanh
ул. Академика Волгина, д. 39, г. Москва, 117437, Россия; drhanh@mail.ru

Статья получена: 08.12.2022 **Статья принята к печати:** 17.02.2023 **Опубликована онлайн:** 05.03.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.003

CLINICAL AND VIROLOGICAL CHARACTERISTICS OF CHRONIC HEPATITIS B AND RESPONSE TO ANTIVIRAL THERAPY

Nguyen Thi-Hanh¹✉, Melnikova LI², Ilchenko LY^{1,3}, Kyuregyan KK⁴, Gordeychuk IV³, Bondarenko NL²

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Clinical hospital № 85 of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

³ Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune and Biological Products, Moscow, Russia

⁴ Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Chronic hepatitis B (CHB) is a common infectious disease that represents one of the main causes of liver cirrhosis (LC) and hepatocellular carcinoma (HCC). CHB is still difficult to treat due to the lack of drugs that completely eliminate hepatitis B virus (HBV) from hepatocytes. The study was aimed to describe the CHB clinical and laboratory features, assess the efficiency of antiviral therapy and identify the factors associated with the response to antiviral therapy. The results of clinical and laboratory assessment, instrumental examination and molecular testing of the patients ($n = 201$) followed up between 2007–2021 in the Viral Hepatitis Diagnosis and Treatment Center at the Clinical Hospital No. 85 of FMBA of Russia were assessed based on primary sources. Most of the patients in the group were males (56.7%); the HBeAg-negative patients predominated (93%). LC was diagnosed in nine patients (4.5%), among them one patient had HCC. The HBV D genotype was determined in 95.4% of cases, A genotype in 3.1% of cases, and C genotype in 1.5% of cases. After a year of treatment with the nucleos(t)ide analogues (entecavir or tenofovir) 88% of patients showed no viremia and their biochemical parameters were back to normal (88%). The overall seroconversion rate was 41.7% for HBeAg and 3% for HBsAg. Thus, high rates of virological response and enzyme activity normalization were obtained. Low baseline viremia level is an independent prognostic factor of achieving a virological response. The HBsAg level in the end of therapy makes it possible to predict relapse after the treatment cessation.

Keywords: chronic hepatitis B, antiviral therapy, prognostic factors

Author contribution: Nguyen Thi-Hanh — sample collection, data analysis, manuscript writing; Melnikova LI — sample collection, data analysis; Ilchenko LY — study design, data analysis, manuscript editing; Kyuregyan KK — literature review; Gordeychuk IV — data analysis; Bondarenko NL — editing and approval of the final version of the article.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Pirogov Russian National Research Medical University (protocol № 213 of 13 December 2021).

✉ **Correspondence should be addressed:** Nguyen Thi-Hanh
Akademika Volgina, 39, Moscow, 117437, Russia; drhanh@mail.ru

Received: 08.12.2022 **Accepted:** 17.02.2023 **Published online:** 05.03.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.003

Хронический гепатит В (ХГВ) широко распространен во всем мире и является серьезной глобальной проблемой здравоохранения. По данным Всемирной организации здравоохранения, в мире насчитывается 296 млн человек с ХГВ, и ежегодно регистрируется до 1,5 млн новых случаев инфицирования. В 2019 г. умерло 820 000 человек, главным образом, от таких осложнений, как цирроз печени (ЦП) и гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) [1].

В Российской Федерации (РФ) заболеваемость ХГВ в 2000–2009 гг. стабилизировалась на уровне 14,0–16,0 на 100 тыс. населения. С 2010 г. наметилась тенденция к снижению заболеваемости ХГВ. В 2020 г. показатель заболеваемости составил 4,4 на 100 тыс. населения, что в 3 раза меньше, чем в 2010 г. — 13,3 на 100 тыс. населения, что, вероятно, связано с активной иммунопрофилактикой населения. Однако уровни заболеваемости ХГВ в некоторых регионах РФ остаются достаточно высокими. Так, в 2019 г. показатель заболеваемости ХГВ в Санкт-Петербурге составил 44,0 на 100 тыс. населения, в Республике Тыва — 54,3 на 100 тыс. населения, в Республике Саха (Якутия) — 25,0 на 100 тыс. населения, а в Москве — 13,0 на 100 тыс. населения. Уровень распространенности ХГВ приближается в некоторых регионах к 1000 на 100 тыс., т. е. составляет около 1% численности всего населения [2–4].

Хроническая инфекция, вызванная вирусом гепатита В (HBV), — это динамический процесс, отражающий взаимодействие между репликацией HBV и иммунным ответом пациента. В естественном течении хронической HBV-инфекции схематично выделяют пять фаз с учетом наличия HBeAg, уровня дезоксирибонуклеиновой кислоты HBV (HBV DNA), уровня активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) и наличия или отсутствия элементов воспаления печени [5]. Хотя течение хронической HBV-инфекции варьируемо, у трети пациентов в итоге развивается ЦП, а в 5–10% случаев — ГЦК [6].

Противовирусная терапия (ПВТ) замедляет прогрессирование заболевания, снижая заболеваемость и смертность. Однако, несмотря на достижения в области терапии, излечение от ХГВ остается сложной задачей, поскольку имеющиеся сегодня в реальной практике противовирусные препараты позволяют достигнуть клинической ремиссии, но не приводят к элиминации HBV. Конечной целью лечения ХГВ является улучшение выживаемости путем предотвращения прогрессирования заболевания, декомпенсации ЦП и развития ГЦК.

Цель исследования — описать клинико-лабораторные особенности ХГВ у пациентов, оценить эффективность ПВТ и выявить факторы, ассоциированные с ответом на нее.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В Центре диагностики и лечения хронических вирусных гепатитов был проведен анализ первичной медицинской документации (амбулаторных карт). Из 989 медицинских карт было отобрано 224 карты всех инфицированных HBV пациентов, наблюдавшихся в период с января 2007 г. по декабрь 2021 г., что явилось основой для создания базы данных.

На основании первичной документации был проведен анализ результатов клинико-лабораторных, серологических, молекулярно-биологических и инструментальных методов исследований.

Критерии включения пациентов в наблюдательное ретроспективное исследование: HBsAg-положительные

пациенты мужского и женского пола; возраст 18–75; наличие информированного согласия.

Критерии исключения: пациенты с неполными данными; пациенты с коинфекцией вирусами иммунодефицита человека (ВИЧ), гепатита С (ВГС), гепатита D (ВГД); отсутствие информированного согласия.

Из-за несоответствия критериям включения 23 пациента были исключены; в клиническую группу вошли 201 человек. Период наблюдения составил от 1 до 15 лет. Основная часть (75,1%) пациентов находилась под наблюдением первые три года, четверть (23,4%) — от 3 до 10 лет и трое (1,5%) — более 10 лет.

Все пациенты, прикрепленные к медицинским учреждениям ФМБА России, при обращении в Центр проходили комплексное обследование, которое включало анализ жалоб и анамнестических данных заболевания, физикальный осмотр. При осмотре регистрировали следующие данные: пол, возраст (на момент первого обращения), время первого обнаружения HBsAg и продолжительность HBV-инфекции. Лабораторные и инструментальные методы проводили в соответствии с клиническими рекомендациями [2, 7]. Клинический анализ крови (эритроциты, гемоглобин, тромбоциты, лейкоциты), биохимический анализ крови (общий белок, альбумин, холестерин, АЛТ, аспартатаминотрансфераза (АСТ), общий билирубин (ОБ), конъюгированный билирубин, щелочная фосфатаза (ЩФ), гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТП)), коагулограмма (активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), международное нормализованное отношение (МНО)), фибриноген, протромбиновый индекс (ПТИ), протромбиновое время) были выполнены на анализаторах, используемых в лаборатории КБ № 85 ФМБА России.

Определяли серологические маркеры инфицирования HBV (HBsAg), антитела к HBsAg (anti-HBs), антитела к ядерному антигену HBV класса иммуноглобулинов G и M (anti-HBcore IgG, anti-HBcore IgM), HBeAg, антитела к HBeAg (anti-HBe). Содержание HBsAg и anti-HBs оценивали методом иммуноферментного анализа (ИФА). HBV DNA выявляли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР; чувствительность метода — не менее 50 МЕ/мл). Генотипы HBV определяли методом ПЦР-амплификации и секвенирования фрагмента вирусного генома, кодирующего малый поверхностный белок (HBsAg).

Всем пациентам выполняли ультразвуковое исследование (УЗИ) органов гепатобилиарной системы и селезенки (AIXPLOERER; Франция) и эзофагогастродуоденоскопию (ЭГДС) — по показаниям (OLYMPUS GIF-E3; Япония). Измерение жесткости печени проводили с помощью аппарата Fibroscan® (модель 502 Touch Echosens; Франция) в соответствии со стандартными операционными процедурами. Стадию фиброза определяли в соответствии с классификацией METAVIR [8].

Вирусологический ответ (ВО) при лечении аналогами нуклеот(з)идов (АН) определяли как достижение неопределяемого уровня вiremии (HBV DNA < 50 МЕ/мл), а ВО при применении пегилированного интерферона альфа (ПЭГ-ИФН-α) в течение 12 месяцев — как уровень HBV DNA < 2000 МЕ/мл; устойчивый вирусологический ответ (УВО) определяли по уровню HBV DNA сыворотки < 2000 МЕ/мл через 12 месяцев после окончания терапии. Биохимический ответ (БО) характеризуется нормальным уровнем активности АЛТ (< 40 Ед/л).

При первом визите, по результатам проведенного обследования, диагностированы в четырех (2%) случаях

Таблица 1. Сравнительная характеристика HBeAg(+)- и HBeAg(-)-пациентов

Показатели	HBeAg(-), n = 187	HBeAg(+), n = 14	p*
Пол			
Мужчины	103 (55,1%)	11 (78,6%)	0,152
Женщины	84 (44,9%)	3 (21,4%)	
Возраст, лет	50,0 [36,0–58,0]	28,5 [20,5–45,5]	0,001
Эритроциты, 10 ¹² /л	4,7 [4,3–5,0]	4,8 [4,5–5,1]	0,488
Гемоглобин, г/л	144,0 [135,0–152,0]	147,5 [138,0–155,0]	0,268
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	5,9 [4,9–6,8]	5,7 [4,3–6,3]	0,329
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	222,0 [194,0–256,0]	224,0 [201,0–267,0]	0,683
Общий холестерин, ммоль/л	4,98 [4,3–5,8]	4,78 [4,1–5,2]	0,149
Общий билирубин, мкмоль/л	14,0 [10,25–18,9]	12,7 [9,1–18,0]	0,39
ГГТП, Ед/л	22,2 [15,9–35,1]	24,3 [18,6–43,0]	0,307
АЛТ, Ед/л	24,0 [18,0–36,0]	57,6 [34,9–78,0]	0,001 < 0,001
> 40,0 Ед/л	37 (19,8%)	10 (71,4%)	
АСТ, Ед/л	23,8 [19,9–34,0]	35,3 [30,3–46,0]	0,020 0,029
> 40,0 Ед/л	32 (17,1%)	6 (42,9%)	
Фиброз, кПа	5,4 [4,5–7,2]	5,7 [5,4–6,9]	0,427
HBV DNA, log ₁₀ МЕ/мл	3,4 [1,0–4,1]	7,5 [3,2–7,8]	0,001
HBsAg, log ₁₀ МЕ/мл	3,4 [2,2–3,7]	4,1 [2,1–4,6]	0,259
Длительность заболевания, лет	5,0 [1,0–11,0]	5,0 [1,0–7,0]	0,726

Примечание: данные представлены в МЕ [25-й и 75-й процентиля], либо в л/л (%); *p — уровень значимости.

HBeAg(+) — хроническая HBV-инфекция, в 10 (5%) — HBeAg(+) ХГВ, в 37 (18,4%) — HBeAg(-) ХГВ, в 150 (74,6%) — HBeAg(-) — хроническая HBV-инфекция (неактивное носительство HBsAg).

В процессе наблюдения в Центре (от года до 10 лет после первичного обращения) у 31 пациента отмечено прогрессирование инфекционного процесса: развитие HBeAg(+) ХГВ — в трех случаях и HBeAg(-) ХГВ — в 19 случаях. Кроме этого у девяти (4,5%) пациентов с HBeAg(-)-статусом сформировался ЦП и у одного из них — ГЦК. Причиной этому, наиболее вероятно, послужило отсутствие ПВТ.

Статистический анализ

Статистический анализ выполняли с использованием SPSS версии 25.0 (SPSS: An IBM Company; США). Количественные показатели представлены как медиана (МЕ) [25-й и 75-й процентиля], категориальные данные — в процентах. Для сравнения категориальных клинических данных между группами использовали тест хи-квадрат и точный тест Фишера, числовых данных — тест Манна-Уитни. Для исследования факторов, связанных с неопределяемым уровнем HBV DNA, использовали логистический регрессионный анализ. Кумулятивную частоту вирусологического рецидива оценивали с помощью анализа Каплана-Майера и сравнивали при помощи log-rank теста. Для оценки взаимосвязи между факторами риска и вирусологическим рецидивом использовали регрессионный анализ Кокса. Уровни HBV DNA и HBsAg логарифмически преобразованы. Уровень $p < 0,05$ расценивался как статистически значимый.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика пациентов

В исследование были включены 201 пациент (114 мужчин и 87 женщин, соотношение М : Ж — 1,3 : 1,0). При первичном обращении МЕ возраста пациентов составила 50,0 [33,5–58,0] лет и МЕ продолжительности заболевания — 5,0 [1,0–11,0] лет. У большей части пациентов клиническая картина характеризовалась минимальными проявлениями — слабостью и болевыми ощущениями в правом подреберье. Пациенты были разделены на две группы: HBeAg-позитивные — HBeAg(+) и HBeAg-негативные — HBeAg(-) в соответствии с исходным HBeAg-статусом. Преобладали HBeAg(-) пациенты (187/201; 93%). Демографические и клинические характеристики групп представлены в табл. 1.

МЕ возраста HBeAg(-)-пациентов была выше, чем у HBeAg(+)-пациентов: 50,0 [36,0–58,0] лет и 28,5 [20,5–45,5] лет соответственно; $p = 0,001$. У HBeAg(+)-пациентов МЕ активности АЛТ выше, чем у HBeAg(-)-пациентов (57,6 Ед/л и 24,0 Ед/л соответственно; $p = 0,001$). При этом у 19,8% HBeAg(-)-пациентов и 71,4% HBeAg(+)-пациентов отмечены повышения значения активности АЛТ ($p < 0,001$).

Среди 37 (19,8%) HBeAg(-)-пациентов в 28 случаях активность АЛТ достигала трех норм от верхней границы нормы (ВГН), в четырех случаях — 3–5 ВГН, в четырех — до 5–10 ВГН и у одного пациента — выше 10 ВГН. Описано 10 (71,4%) HBeAg(+)-пациентов с повышением уровня АЛТ (у восьми из них АЛТ достигала 3 ВГН, у двоих — 5 ВГН).

Аналогично, МЕ уровня АСТ HBeAg(+)-пациентов выше, чем у HBeAg(-)-пациентов (35,3 Ед/л и 23,8 Ед/л соответственно; $p = 0,020$). Доля HBeAg(+)-пациентов с

Таблица 2. Используемые противовирусные препараты для лечения ХГВ ($n = 66$)

Препараты	НВeAg(-)-пациенты	НВeAg(+)-пациенты
ЭТВ	37	6
ТДФ	1	3
ТБВ*	10	2
ЛАМ*	2	0
ПЭГ-ИФН- α -2а	0	1
ЭТВ, ТДФ	3	0
ТБВ**, ЭТВ	1	0

Примечание: ЭТВ — энтекавир; ТБВ — телбивудин; ТДФ — тенофовира дизопроксил фумарат; ЛАМ — ламивудин; ПЭГ-ИФН- α -2а — пегилированный интерферон альфа-2а; * — ПВТ в 2009–2011 гг.; ** — ТБВ 12 месяцев в 2009–2010 гг., далее — ЭТВ.

повышенным уровнем АСТ составила 42,9% в сравнении с НВeAg(-)-пациентами (17,1%) при $p = 0,029$.

Оценка фиброза печени методом транзитной фиброэластометрии выполнена 151/201 (75,1%) пациенту. Индекс массы тела не превышал 25 кг/м². При первичном обращении установлены следующие стадии фиброза: F0/F1/F2 — в 133/151 (88,1%) случаях и F3/F4 — в 18/151 (11,9%). Уровень НВV DNA определяли у 194 пациентов: в группе НВeAg(+)-пациенты он составил 7,5 [3,2–7,8] log ME/мл, в группе НВeAg(-) — 3,4 [1,0–4,1] log ME/мл ($p = 0,001$).

Генотип НВV исследовали у 65/201 (32,3%) пациентов. Отмечено преобладание генотипа D (62/65 — 95,4%) по сравнению с генотипами А (2/65 — 3,1%) и С (1/65 — 1,5%). Проведено генотипирование НВV у двух НВeAg(+)-пациентов, установлены генотипы А и С НВV.

Эффективность ПВТ ХГВ

В настоящее время ПВТ ХГВ в РФ включает применение аналогов нуклеоз(т)идов (АН) и пегилированных интерферонов- α (ПЭГ-ИФН- α). К АН, которые зарегистрированы в РФ и предпочтительны для лечения ХГВ, относят препараты с высоким уровнем противовирусной активности — энтекавир (ЭТВ), тенофовир дизопроксил фумарат (ТДФ) и тенофовир алафенамид (ТАФ). Поскольку в исследование были включены пациенты, наблюдавшиеся в Центре в период 2007–2021 гг., в первые годы наблюдения некоторые пациенты принимали ламивудин (ЛАМ) или телбивудин (ТБВ).

В анализируемой группе 66 (32,8%) пациентам, самостоятельно приобретающим препараты, проводили ПВТ. ЭТВ наиболее часто применяли как НВeAg(-), так

и НВeAg(+)-пациенты: 43/66 (65,2%) принимали только этот препарат, остальные (23) — другие противовирусные средства (табл. 2).

АН назначали 65 пациентам: 61 из них принимали только один препарат, у четырех НВeAg(-)-пациентов лечение изменено (замена одного АН на другой), в связи с этим общее число наблюдений составило 69 (58 НВeAg(-) и 11 НВeAg(+)-пациентов). Три пациента принимали ЭТВ в течение 21–36 месяцев, затем ТДФ и один пациент — ТБВ 12 месяцев, далее ЭТВ (табл. 3).

НВeAg(+)-пациенты отличались более молодым возрастом и высоким уровнем активности АЛТ, АСТ и виремии по сравнению с НВeAg(-)-пациентами (табл. 3). ME длительности терапии составила 12,0 [11,0–30,0] месяцев. Результаты ПВТ АН (ЭТВ, ТДФ, ТБВ, ЛАМ) представлены в табл. 4.

Эффективность ПВТ у НВeAg(+)-пациентов

Отсутствие виремии через 24, 48, 96 недель приема ЭТВ зарегистрировано у 3/6, 4/5 и 1/1 пациентов соответственно. У пациентов, принимающих ТДФ, ВО после 24, 48, 96 недель достигал у 0/3, 1/3 и 1/3 пациентов соответственно. ТБВ принимали два пациента около двух лет; через 24 и 48 недель у одного из них виремия не обнаружена.

УВО после прекращения лечения был достигнут у 3/3 пациентов, из которых один пациент принимал ТБВ и два — ЭТВ.

Сероконверсия НВeAg отмечена у 4/11 (36,4%) пациентов: на фоне приема ЭТВ (в двух случаях), ТДФ и ТБВ — по одному случаю.

На фоне АН у 2/11 (18,2%) НВeAg(+)-пациентов, принимавших ЭТВ, наблюдался клиренс НВsAg, а у

Таблица 3. Сравнительная характеристика НВeAg(+)- и НВeAg(-)-пациентов, принимавших АН

Показатели	НВeAg(-)-пациенты, $n = 58$	НВeAg(+)-пациенты, $n = 11$	p^*
Пол			
Мужчины	28/58 (48,3%)	8/11 (72,7%)	0,137
Женщины	30/58 (51,7%)	3/11 (27,3%)	
Возраст, лет	48,0 [32,0–57,0]	30,0 [25,0–52,0]	0,028
АЛТ, Ед/л	27,7 [18,1–48,4]	60,6 [43,3–90,4]	0,006
> 40,0 Ед/л	20/58 (34,5%)	9/11 (81,8%)	0,006
АСТ, Ед/л	25,3 [19,1–43,4]	44,8 [28,2–70,0]	0,016
> 40,0 Ед/л	15/58 (25,9%)	6/11 (54,5%)	0,078
Тромбоциты, $10^9/л$	227,5 [179,0–269,0]	228,0 [201,0–255,0]	0,670
> $180 \times 10^9/л$	43/58 (74,1%)	11/11 (100,0%)	0,105
Фиброз, кПа	6,6 [5,3–10,4]	6,1 [5,4–7,6]	0,649
НВV DNA, log ₁₀ ME/мл	4,0 [3,3–4,8]	7,0 [3,6–8,0]	0,016
НВsAg, log ₁₀ ME/мл	3,3 [3,0–3,8]	4,3 [3,8–4,5]	0,105

Примечание: данные представлены либо в ME [25-й и 75-й перцентили], либо в n/N (%); * p — уровень значимости.

Таблица 4. Сравнительная эффективность противовирусной терапии АН

Вирусологический ответ	ЭТВ		ТДФ		ТБВ		ЛАМ
	НВеАg(-)-пациенты	НВеАg(+)-пациенты	НВеАg(-)-пациенты	НВеАg(+)-пациенты	НВеАg(-)-пациенты	НВеАg(+)-пациенты	НВеАg(-)-пациенты
Вирусологический ответ							
24 недели	32/41 (78,0%)	3/6 (50,0%)	3/4 (75,0%)	0/3 (0,0%)	9/11 (81,8%)	1/2 (50,0%)	2/2 (100,0%)
48 недель	35/38 (92,1%)	4/5 (80,0%)	4/4 (100,0%)	1/3 (33,3%)	9/10 (90,0%)	1/2 (50,0%)	2/2 (100,0%)
96 недель	16/17 (94,1%)	1/1 (100,0%)	4/4 (100,0%)	1/3 (33,3%)			
Биохимический ответ							
24 недели	39/41 (95,1%)	1/6 (16,7%)	3/4 (75,0%)	0/3 (0,0%)	11/11 (100,0%)	1/2 (50,0%)	2/2 (100,0%)
48 недель	37/38 (97,4%)	3/5 (60,0%)	4/4 (100,0%)	0/3 (0,0%)	10/10 (100,0%)	1/2 (50,0%)	2/2 (100,0%)
96 недель	16/17 (94,1%)	1/1 (100,0%)	4/4 (100,0%)	1/3 (33,3%)			

Примечание: данные представлены в n/N (%).

1/11 (9,1%) были обнаружены анти-НВs. Сероконверсия НВsАg отмечена у этого пациента через 27 месяцев после завершения приема ЭТВ.

Нормализация активности АЛТ через 24, 48, 96 недель приема ЭТВ отмечена у 1/6, 3/5 и 1/1 больных соответственно. Для пациентов, принимавших ТДФ, через 24 и 48 недель терапии БО не наблюдался, через 96 недель получен у одного из трех пациентов. Нормализация активности АЛТ отмечена у одного из двух пациентов, принимавших ТБВ, через 24 недели и сохранялась на 48-й неделе терапии.

ПЕГ-ИФН- α -2а в дозе 180 мг/нед. в течение 48 недель принимал лишь один НВеАg(+)-пациент; в конце терапии зарегистрированы НВsАg- и НВеАg-сероконверсия, неопределяемый уровень НВV DNA.

Эффективность АН у НВеАg(-)-пациентов

НВV DNA через 24, 48, 96 недель приема ЭТВ отсутствовала у 78%, 92,1% и 94,1% пациентов соответственно. У пациентов, принимавших ТДФ, ВО после 24, 48, 96 недель достигал в 3/4, 4/4 и 4/4 случаях соответственно. 11 пациентов принимали ТБВ около двух лет; через 24 и 48 недель у 9/11 и 9/10 пациентов зарегистрирован ВО. Через 24 и 48 недель приема ЛАМ ВО развился у 2/2 пациентов.

УВО достигнут у 11/24 (45,8%) пациентов, из которых три принимали ТБВ и восемь — ЭТВ. Вирусологический рецидив (ВР) отмечен у 13/24 (54,2%) пациентов после отмены препаратов АН с МЕ времени 6,0 [6,0–11,0] месяцев.

Клиренс НВsАg не отмечен ни у одного из НВеАg(-)-пациента, принимавшего АН.

Нормализация АЛТ через 24, 48, 96 недель приема ЭТВ выявлена у 95,1%, 97,4% и 94,1% больных соответственно. Для пациентов, получавших ТДФ, БО через 24, 48, 96 недель достигал у 3/4, 4/4 и 4/4 пациентов соответственно, а для пациентов, принимавших ТБВ или ЛАМ, — через 24 и 48 недель.

Таким образом, пациенты, принимавшие АН с высоким барьером резистентности (ЭТВ и ТДФ), через 24 и 48 недель лечения ВО достигнут в 70,4 и 88,0%, БО — в 79,6 и 88,0% соответственно. Показано, что у НВеАg(-)-пациентов частота достижения ВО и БО через 24 и 48 недель терапии АН выше, чем у НВеАg(+), но не различалась после 96 недель приема АН (табл. 5). После прекращения лечения АН УВО достигнут у 14/27 (51,9%) пациентов. При сравнении частоты достижения УВО достоверных различий между НВеАg(+)- и НВеАg(-)-пациентами выявлено не было ($p = 0,222$). Сероконверсия НВеАg достигнута в пяти (41,7%) случаях: в результате лечения ПЭГ-ИФН- α (один случай), ЭТВ (два случая), ТДФ (один случай) и ТБВ (один случай). Клиренс НВsАg наблюдался у трех (4,5%) пациентов, в том числе у пациента, принимавшего ПЭГ-ИФН- α , и у двух пациентов, принимавших ЭТВ. Сероконверсия НВsАg отмечена в двух (3,0%) случаях терапии ПЭГ-ИФН- α и ЭТВ.

Факторы, влияющие на эффективность ПВТ

Факторы, прогнозирующие вирусологический ответ

Для анализа факторов, ассоциированных с ВО на 48-й неделе терапии АН, применяли одномерную и многомерную модель логистической регрессии. При одномерном

Таблица 5. Сравнительная эффективность противовирусной терапии АН у НВеАg(+)- и НВеАg(-)-пациентов

Вирусологический ответ	НВеАg(-)-пациенты	НВеАg(+)-пациенты	p^*
24 недели	46/58 (79,3%)	4/11 (36,4%)	0,007
48 недель	50/54 (92,6%)	6/10 (60,0%)	0,016
96 недель	20/21 (95,2%)	2/4 (50,0%)	0,057
24 недели	55/58 (94,8%)	2/11 (18,2%)	<0,001
48 недель	53/54 (98,1%)	4/10 (40,0%)	<0,001
96 недель	20/21 (95,2%)	2/4 (50,0%)	0,057
УВО	3/3 (100,0%)	11/24 (45,8%)	0,222

Примечание: данные представлены в n/N (%); * p — уровень значимости.

Таблица 6. Одномерный и многомерный анализ исходных факторов, связанных с ВО после 48 недель терапии аналогами нуклеоз(т)идов

Показатели	Одномерный анализ			Многомерный анализ		
	ОР	95%-й ДИ	<i>p</i> *	ОР	95%-й ДИ	<i>p</i> *
Пол (женский)	0,931	0,212–4,097	0,925			
Возраст (увеличение 1 год)	1	0,954–1,049	0,988			
Статус HBeAg(+)	0,12	0,024–0,609	0,011	0,248	0,027–2,249	0,215
HBV DNA (увеличение 1 log ₁₀ МЕ/мл)	0,336	0,180–0,627	0,001	0,411	0,211–0,800	0,009
АЛТ (увеличение 1 Ед/л)	0,993	0,986–1,000	0,042	0,996	0,986–1,005	0,392
АСТ (увеличение 1 Ед/л)	0,991	0,980–1,001	0,083			
Тромбоциты (менее 180 × 10 ⁹ /л)	0,818	0,146–4,582	0,819			
Фиброз печени (F3/F4)	0,485	0,072–3,290	0,459			

Примечание: **p* — уровень значимости.

анализе среди факторов, связанных с неопределяемым уровнем HBV DNA после 48 недель терапии, выделены следующие: статус HBeAg ($p = 0,011$); уровень HBV DNA ($p = 0,001$) и АЛТ ($p = 0,042$). Многофакторный анализ показал, что исходный уровень HBV DNA (отношение рисков (ОР) — 0,411; 95%-й доверительный интервал (ДИ) — 0,211–0,800; $p = 0,009$) является независимым прогностическим фактором развития авиремии (табл. 6).

HBsAg как предиктор УВО после прекращения терапии АН

После прекращения терапии АН у 27 пациентов, достигших ВО, ВР отмечен у 13/27 (48,1%). Кумулятивная частота ВР через 6, 12, 24 и 36 месяцев после отмены АН достигала 25,9%, 40,7%, 44,4% и 48,1% соответственно. Большинство случаев ВР отмечено в течение первых 12 месяцев наблюдения (11/13; 84,6%). С помощью Cox-регрессионного анализа, учитывавшего возраст, пол, HBV DNA до лечения, статус HBeAg и уровень HBsAg в конце терапии, показано, что более высокий уровень HBsAg в конце терапии был предиктором ВР после отмены препаратов АН (ОР — 3,909; 95%-й ДИ — 1,729–8,835; $p = 0,001$).

У пациентов с УВО наблюдали более низкий уровень HBsAg в конце терапии, чем у пациентов с ВР (1,9 [1,4–2,6] и 3,5 [3,3–4,0] log₁₀ МЕ/мл соответственно; $p < 0,001$).

Пациенты были разделены на три группы с учетом уровня HBsAg в конце терапии:

- 1-я группа: HBsAg < 100 МЕ/мл ($n = 8$);
- 2-я группа: HBsAg — 100–1000 МЕ/мл ($n = 6$);
- 3-я группа: HBsAg > 1000 МЕ/мл ($n = 13$).

У пациентов 1-й группы ВР не наблюдался, у пациентов 2-й группы — 33,3% (2/6) и в 3-й группе — 84,6% (11/13). Было показано, что частота ВР значительно различается в группах (log rank $\chi^2 = 12280$; $p = 0,02$). Уровень HBsAg < 100 МЕ/мл в конце терапии является достоверным предиктором достижения УВО после отмены АН.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для клинической картины хронической HBV-инфекции характерно длительное малосимптомное или бессимптомное течение заболевания с редкими обострениями или их полным отсутствием. Однако главная опасность этой инфекции состоит в высоком риске развития ЦП и ГЦК, достигающем у лиц с хронической HBV-инфекцией от 8 до 20% в течение 5 лет после установления диагноза [2]. Наше исследование описывает

течение ХГВ у пациентов, наблюдавшихся в Центре от 3 до 15 лет. Для большей части из них были характерны минимальные проявления — преобладали слабость и болевые ощущения в правом подреберье. Однако среди этих пациентов ЦП был диагностирован у девяти (4,5%) и у одного из них развилась ГЦК.

HBeAg(–)-форма в настоящее время относится к преобладающему варианту течения этой инфекции во многих странах мира, в том числе в РФ. По данным референс-центра по мониторингу за вирусными гепатитами ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, в 2015 г. доля HBeAg(–)-пациентов составила 90%. В нашем исследовании также был получен аналогичный результат — 93% HBeAg(–)-пациентов. Отмечено преобладание генотипа D HBV (95,4%), что согласуется с данными других работ, касающихся распределения генотипов HBV в России [7, 9].

Группа HBeAg(+)-пациентов представлена лицами более молодого возраста и более высокого уровня вирусемии, а также большей частотой встречаемости гиперферментемии по сравнению с HBeAg(–)-пациентами.

Подавление репликации вируса — важная цель ПВТ и основное условие предотвращения прогрессирования ХГВ. В настоящее время АН применяют в мире и в РФ для лечения ХГВ благодаря мощной противовирусной активности, низкой частоте побочных явлений и простоте применения (1 таблетка в сутки). При этом АН с высоким барьером резистентности (ЭТВ и ТДФ) являются приоритетными препаратами ПВТ.

Полученные данные подтверждают высокую эффективность терапии ЭТВ и ТДФ у больных ХГВ. Отсутствие вирусемии через 48 недель терапии ЭТВ или ТДФ достигнуто в 88% случаев. Так, в ряде работ получено развитие авиремии у 89,4% [10] и 88% [11] больных при лечении ЭТВ в течение года. Другие авторы тоже наблюдали авиремию у 86,2% больных через год терапии ТДФ [12].

Результаты нашего исследования показали разницу в частоте достижения авиремии между HBeAg(–)- и HBeAg(+)-пациентами. При HBeAg(–)-ХГВ частота достижения ВО была выше, чем у HBeAg(+)-пациентов после 24 и 48 недель лечения АН. Ранее было показано, что у 75% HBeAg(+)- и 99% HBeAg(–)-пациентов, принимавших ЭТВ, HBV DNA тоже не обнаружена в течение года терапии [10]. Однако при проведении терапии АН в течение 96 недель различий в ВО среди пациентов Центра получено не было.

Достижение БО, определяемое как нормализация активности АЛТ, может быть расценено как желаемый результат терапии. В анализируемой группе пациентов БО

отмечен в 88% случаев через 48 недель терапии ЭТВ или ТДФ. Другие исследователи тоже демонстрируют высокую частоту нормализации активности АЛТ при лечении ЭТВ и ТДФ [13–15]. При этом нами показано различие в частоте достижения БО между HBeAg(-) и HBeAg(+)-пациентами после 24 и 48 недель терапии АН, что согласуется с данными других авторов [12, 16, 17]. Показали, что наличие HBeAg до лечения может прогнозировать возможность неудачи в достижении нормализации АЛТ [18].

Клиренс HBeAg с сероконверсией или без нее является оптимальным результатом терапии и излечением от ХГВ. Клиренс HBeAg в анализируемой группе наблюдался лишь у трех (4,5%) HBeAg(+)-пациентов: у одного пациента, принимавшего ПЭГ-ИФН- α , и у двоих, принимавших ЭТВ. Сероконверсия HBeAg отмечена в 2 (3%) случаях.

Данные литературы указывают на более высокую частоту клиренса HBeAg у больных с HBeAg(+)-гепатитом В. Так при лечении ТДФ в течение 48 недель клиренс HBeAg наблюдался в 3,2% и 11,8% случаев через 7 лет при HBeAg(+) и в 0% и 0,3% случаев — при HBeAg(-)-ХГВ соответственно [12, 19]. В целом, очень немногие (около 1% случаев) HBeAg(-)-пациенты достигли клиренса HBeAg даже при длительной (> 5 лет) терапии АН [11, 20]. Для пациентов HBeAg(+) ХГВ клиренс и сероконверсия HBeAg отмечаются чаще, в среднем в 5–10% случаев при длительном лечении [21, 22].

Среди пациентов Центра более низкий исходный уровень HBV DNA был независимым фактором, связанным с отсутствием виремии после 48 недель терапии АН, что согласуется с данными других авторов [10]. Они продемонстрировали, что исходный уровень HBV DNA $\leq 7,6 \log_{10}$ копий/мл стал независимым прогностическим

фактором развития ВО к третьему году лечения. В ряде исследований получены аналогичные результаты [23–25].

После прекращения АН-терапии ВР отмечен у 13/27 (48,1%) пациентов Центра, а более высокий уровень HBeAg в конце терапии явился предиктором ВР после отмены АН. Показано, что высокие исходные уровни HBV DNA и HBeAg в конце лечения являются независимыми предикторами ВР [26]. В анализируемой нами группе ВР не наблюдался у пациентов с уровнем HBeAg в конце терапии < 100 МЕ/мл, в отличие от пациентов с уровнем 100–1000 МЕ/мл (33,3%) и >1000 МЕ/мл (86,4%) соответственно.

Недавний системный обзор, включивший 11 исследований с участием 1716 пациентов, позволяет предположить, что уровень HBeAg в конце лечения < 100 МЕ/мл оптимален для прекращения приема АН и снижает риск развития ВР через ≥ 12 месяцев после прекращения терапии [27].

Выводы

Хроническая инфекция, вызванная HBV, является длительно прогрессирующим заболеванием с характерной бессимптомной или малосимптомной клинической картиной, однако риск развития ЦП и ГЦК относительно высок. Единственный способ предотвращения этих осложнений — своевременная ПВТ. ПВТ препаратами АН дает высокую частоту достижения подавления репликации вируса и нормализации АЛТ. Низкий исходный уровень вирусной нагрузки является независимым прогностическим фактором для достижения ВО. Уровень HBeAg в конце терапии полезен для прогнозирования рецидива HBV-инфекции после прекращения лечения.

Литература

- World Health Organization. Hepatitis B Fact Sheet. July 27, 2020.
- Министерство здравоохранения Российской Федерации. Хронический вирусный гепатит В (ХВГВ) у взрослых. 2019.
- Покровский В. И., Тотолян А. А., Эсауленко Е. В., Сухорук А. А. Вирусные гепатиты в Российской Федерации: Аналитический обзор. 11 выпуск. СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2018.
- О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 2021.
- European Association For The Study Of The Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *Journal of hepatology*. 2017; 67 (2): 370–98.
- Torresi J, Locarnini S. Antiviral chemotherapy for the treatment of hepatitis B virus infections. *Gastroenterology*. 2000; 118 (2): S83–S103.
- Ивашкин В. Т., Ющук Н. Д., Маевская М. В., Знойко О. О., Дудина К. Р., Кареткина Г. Н., и др. Клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации и Российского общества по изучению печени по диагностике и лечению взрослых больных гепатитом В. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2014; 3: 58–88.
- Паневкина С., Абдурахманов Д., Ибрагимов Э., Розина Т., Никулкина Е., Танащук Е., и др. Оценка фиброза печени при длительной терапии хронического гепатита В нуклеозидными и нуклеотидными аналогами. *Терапия*. 2021; 7 (6): 24–31.
- Орлов С. Г., Мязин А. Е., Чуланов В. П., редакторы. Распространенность генотипов вируса гепатита В среди лиц, хронически инфицированных вирусом гепатита В в Москве и Московской области. Материалы Российской научно-практической конференции «Генодиагностика инфекционных болезней» 25–27 октября 2005 г. Сосновка, Новосибирская обл. 2005; 56 с.
- Ono A, Suzuki F, Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, et al. Long-term continuous entecavir therapy in nucleos (t) ide-naïve chronic hepatitis B patients. *Journal of hepatology*. 2012; 57 (3): 508–14.
- Luo J, Li X, Wu Y, Lin G, Pang Y, Zhang X, et al. Efficacy of entecavir treatment for up to 5 years in nucleos (t) ide-naïve chronic hepatitis B patients in real life. *International journal of medical sciences*. 2013; 10 (4): 427.
- Marcellin P, Heathcote EJ, Buti M, Gane E, de Man RA, Krastev Z, et al. Tenofovir disoproxil fumarate versus adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B. *New England Journal of Medicine*. 2008; 359 (23): 2442–55.
- Yuen M-F, Seto W-K, Fung J, Wong DK-H, Yuen JC-H, Lai C-L. Three years of continuous entecavir therapy in treatment-naïve chronic hepatitis B patients: VIRAL suppression, viral resistance, and clinical safety. *Official journal of the American College of Gastroenterology* | *ACG*. 2011; 106 (7): 1264–71.
- Kayaaslan B, Akinci E, Ari A, Tufan ZK, Alpat SN, Gunal O, et al. A long-term multicenter study: Entecavir versus Tenofovir in treatment of nucleos (t) ide analogue-naïve chronic hepatitis B patients. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*. 2018; 42 (1): 40–7.
- Batirel A, Guclu E, Arslan F, Kocak F, Karabay O, Ozer S, et al. Comparable efficacy of tenofovir versus entecavir and predictors of response in treatment-naïve patients with chronic hepatitis B: a multicenter real-life study. *International Journal of Infectious Diseases*. 2014; 28: 153–9.
- Chang T-T, Gish RG, De Man R, Gadano A, Sollano J, Chao Y-C, et al. A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg-positive

- chronic hepatitis B. *New England Journal of Medicine*. 2006; 354 (10): 1001–10.
17. Lai C-L, Shouval D, Lok AS, Chang T-T, Cheinquer H, Goodman Z, et al. Entecavir versus lamivudine for patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *New England Journal of Medicine*. 2006; 354 (10): 1011–20.
 18. Jacobson IM, Washington MK, Buti M, Thompson A, Afdhal N, Flisiak R, et al. Factors associated with persistent increase in level of alanine aminotransferase in patients with chronic hepatitis B receiving oral antiviral therapy. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2017; 15 (7): 1087–94.
 19. Buti M, Tsai N, Petersen J, Flisiak R, Gurel S, Krastev Z, et al. Seven-Year Efficacy and Safety of Treatment with Tenofovir Disoproxil Fumarate for Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Digestive Diseases and Sciences*. 2015; 60 (5): 1457–64.
 20. Petersen J, Heyne R, Mauss S, Schlaak J, Schifflholz W, Eisenbach C, et al. Effectiveness and safety of tenofovir disoproxil fumarate in chronic hepatitis B: a 3-year prospective field practice study in Germany. *Digestive diseases and sciences*. 2016; 61 (10): 3061–71.
 21. Gish R, Chang TT, Lai CL, De Man R, Gadano A, Poordad F, et al. Loss of HBsAg antigen during treatment with entecavir or lamivudine in nucleoside-naïve HBeAg-positive patients with chronic hepatitis B. *Journal of viral hepatitis*. 2010; 17 (1): 16–22.
 22. Heathcote EJ, Marcellin P, Buti M, Gane E, Robert A, Krastev Z, et al. Three-year efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate treatment for chronic hepatitis B. *Gastroenterology*. 2011; 140 (1): 132–43.
 23. Park JW, Kwak KM, Kim SE, Jang MK, Suk KT, Kim DJ, et al. Comparison of the long-term efficacy between entecavir and tenofovir in treatment-naïve chronic hepatitis B patients. *BMC gastroenterology*. 2017; 17 (1): 1–9.
 24. Zoutendijk R, Reijnders JG, Brown A, Zoulim F, Mutimer D, Deterding K, et al. Entecavir treatment for chronic hepatitis B: adaptation is not needed for the majority of naïve patients with a partial virological response. *Hepatology*. 2011; 54 (2): 443–51.
 25. Ибрагимов ЭК, Абдурахманов ДТ, Розина ТП, Никулкина ЕН, Танащук ЕЛ, Одинцов АВ, et al. Эффективность и безопасность длительной терапии хронического гепатита В нуклеозидными и нуклеотидными аналогами. *Терапевтический архив*. 2019; 91 (2): 40–7.
 26. Chen C-H, Hung C-H, Wang J-H, Lu S-N, Hu T-H, Lee C-M. Long-term incidence and predictors of hepatitis B surface antigen loss after discontinuing nucleoside analogues in noncirrhotic chronic hepatitis B patients. *Clinical Microbiology and Infection*. 2018; 24 (9): 997–1003.
 27. Liu J, Li T, Zhang L, Xu A. The role of hepatitis B surface antigen in nucleos (t) ide analogues cessation among asian patients with chronic hepatitis B: a systematic review. *Hepatology*. 2019; 70 (3): 1045–55.

References

1. World Health Organization. Hepatitis B Fact Sheet. July 27, 2020.
2. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Хронический вирусный гепатит В (XVGV) у взрослых. 2019. Russian.
3. Pokrovskij VI, Totolyan AA, Ehsaulenko EV, Suxoruk AA. Virusnye gepatity v Rossijskoj Federacii: Analiticheskij obzor. 11 vypusk. SPb.: FBUN NIIeHM imeni Pastera, 2018. Russian.
4. O sostoyanii sanitarno-ehpidemiologicheskogo blagopoluchiya naseleniya v Rossijskoj Federacii v 2020 godu: Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere zashhity prav potrebitel'ej i blagopoluchiya cheloveka. 2021. Russian.
5. European Association For The Study Of The Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *Journal of hepatology*. 2017; 67 (2): 370–98.
6. Torresi J, Locarnini S. Antiviral chemotherapy for the treatment of hepatitis B virus infections. *Gastroenterology*. 2000; 118 (2): S83–S103.
7. Ivashkin VT, Yushhuk ND, Maevskaya MV, Znojko OO, Dudina KR, Karetkina GN, i dr. Klinicheskie rekomendacii Rossijskoj gastroehnterologicheskoy asociacii i Rossijskogo obshhestva po izucheniyu pecheni po diagnostike i lecheniyu vzroslyx bol'nyx gepatitom B. *Rossijskij zhurnal gastroehnterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2014; 3: 58–88. Russian.
8. Panevkina S, Abduraxmanov D, Ibragimov Eh, Rozina T, Nikulkina E, Tanashhuk E, i dr. Ocenka fibroza pecheni pri dlitel'noj terapii xronicheskogo gepatita V nukleozidnymi i nukleotidnymi analogami. *Terapiya*. 2021; 7 (6): 24–31. Russian.
9. Orlov SG, Myazin AE, Chulanov VP, redaktory. Rasprostranennost' genotipov virusa gepatita V sredi lic, xronicheski inficirovannyx virusom gepatita V v Moskve i Moskovskoj oblasti. *Materialy Rossijskoj nauchno-prakticheskoy konferencii «Genodiagnostika infekcionnyx boleznej» 25–27 oktyabrya 2005 g. Sosnovka, Novosibirskaya obl.* 2005; 56 s. Russian.
10. Ono A, Suzuki F, Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, et al. Long-term continuous entecavir therapy in nucleos (t) ide-naïve chronic hepatitis B patients. *Journal of hepatology*. 2012; 57 (3): 508–14.
11. Luo J, Li X, Wu Y, Lin G, Pang Y, Zhang X, et al. Efficacy of entecavir treatment for up to 5 years in nucleos (t) ide-naïve chronic hepatitis B patients in real life. *International journal of medical sciences*. 2013; 10 (4): 427.
12. Marcellin P, Heathcote EJ, Buti M, Gane E, de Man RA, Krastev Z, et al. Tenofovir disoproxil fumarate versus adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B. *New England Journal of Medicine*. 2008; 359 (23): 2442–55.
13. Yuen M-F, Seto W-K, Fung J, Wong DK-H, Yuen JC-H, Lai C-L. Three years of continuous entecavir therapy in treatment-naïve chronic hepatitis B patients: VIRAL suppression, viral resistance, and clinical safety. *Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG*. 2011; 106 (7): 1264–71.
14. Kayaaslan B, Akinci E, Ari A, Tufan ZK, Alpat SN, Gunal O, et al. A long-term multicenter study: Entecavir versus Tenofovir in treatment of nucleos (t) ide analogue-naïve chronic hepatitis B patients. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*. 2018; 42 (1): 40–7.
15. Batirel A, Guclu E, Arslan F, Kocak F, Karabay O, Ozer S, et al. Comparable efficacy of tenofovir versus entecavir and predictors of response in treatment-naïve patients with chronic hepatitis B: a multicenter real-life study. *International Journal of Infectious Diseases*. 2014; 28: 153–9.
16. Chang T-T, Gish RG, De Man R, Gadano A, Sollano J, Chao Y-C, et al. A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *New England Journal of Medicine*. 2006; 354 (10): 1001–10.
17. Lai C-L, Shouval D, Lok AS, Chang T-T, Cheinquer H, Goodman Z, et al. Entecavir versus lamivudine for patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *New England Journal of Medicine*. 2006; 354 (10): 1011–20.
18. Jacobson IM, Washington MK, Buti M, Thompson A, Afdhal N, Flisiak R, et al. Factors associated with persistent increase in level of alanine aminotransferase in patients with chronic hepatitis B receiving oral antiviral therapy. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2017; 15 (7): 1087–94.
19. Buti M, Tsai N, Petersen J, Flisiak R, Gurel S, Krastev Z, et al. Seven-Year Efficacy and Safety of Treatment with Tenofovir Disoproxil Fumarate for Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Digestive Diseases and Sciences*. 2015; 60 (5): 1457–64.
20. Petersen J, Heyne R, Mauss S, Schlaak J, Schifflholz W, Eisenbach C, et al. Effectiveness and safety of tenofovir disoproxil fumarate in chronic hepatitis B: a 3-year prospective field practice study in Germany. *Digestive diseases and sciences*. 2016; 61 (10): 3061–71.
21. Gish R, Chang TT, Lai CL, De Man R, Gadano A, Poordad F, et al. Loss of HBsAg antigen during treatment with entecavir or lamivudine in nucleoside-naïve HBeAg-positive patients with chronic hepatitis B. *Journal of viral hepatitis*. 2010; 17 (1): 16–22.
22. Heathcote EJ, Marcellin P, Buti M, Gane E, Robert A, Krastev Z, et al. Three-year efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate

- treatment for chronic hepatitis B. *Gastroenterology*. 2011; 140 (1): 132–43.
23. Park JW, Kwak KM, Kim SE, Jang MK, Suk KT, Kim DJ, et al. Comparison of the long-term efficacy between entecavir and tenofovir in treatment-naïve chronic hepatitis B patients. *BMC gastroenterology*. 2017; 17 (1): 1–9.
 24. Zoutendijk R, Reijnders JG, Brown A, Zoulim F, Mutimer D, Deterding K, et al. Entecavir treatment for chronic hepatitis B: adaptation is not needed for the majority of naïve patients with a partial virological response. *Hepatology*. 2011; 54 (2): 443–51.
 25. Ibragimov EhK, Abduraxmanov DT, Rozina TP, Nikulkina EN, Tanashhuk EL, Odincov AV, et al. Ehffektivnost' i bezopasnost' dlitel'noj terapii xronicheskogo gepatita V nukleozidnymi i nukleotidnymi analogami. *Terapevticheskij arxiv*. 2019; 91 (2): 40–7.
 26. Chen C-H, Hung C-H, Wang J-H, Lu S-N, Hu T-H, Lee C-M. Long-term incidence and predictors of hepatitis B surface antigen loss after discontinuing nucleoside analogues in noncirrhotic chronic hepatitis B patients. *Clinical Microbiology and Infection*. 2018; 24 (9): 997–1003.
 27. Liu J, Li T, Zhang L, Xu A. The role of hepatitis B surface antigen in nucleos(t)ide analogues cessation among asian patients with chronic hepatitis B: a systematic review. *Hepatology*. 2019; 70 (3): 1045–55.