

ISSN 2542-1174



JOURNAL
of SIBERIAN
MEDICAL
SCIENCES

1
2021

OPEN
ACCESS

JOURNAL of SIBERIAN MEDICAL SCIENCES

Volume 1 (2021)

ПРЕДСЕДАТЕЛЬ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА**Маринкин И.О.**, проф. (Россия)**ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР****Поспелова Т.И.**, проф. (Россия)**ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА****Кузнецова В.Г.**, проф. (Россия)**Савченко С.В.**, проф. (Россия)**ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ****Максимова Е.А.** (Россия)**РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ****Афтанас Л.И.**, акад. РАН (Россия)**Вагенленер Ф.**, проф. (Германия)**Власов В.В.**, акад. РАН (Россия)**Воевода М.И.**, акад. РАН (Россия)**Громб С.**, проф. (Франция)**Дорофеев С.Б.**, канд. мед. наук (Россия)**Дыгай А.М.**, акад. РАН (Россия)**Жданов В.В.**, проф. (Россия)**Мюир Х.А.**, проф. (США)**Нильсон П.М.**, проф. (Швеция)**Ружичка Т.**, проф. (Германия)**Семенов В.М.**, проф. (Беларусь)**Федерико М.**, проф. (Италия)**Черных Е.Р.**, акад. РАН (Россия)**Шайдаров М.З.**, проф., чл.-кор. НАН РК
(Казахстан)**Шкурупий В.А.**, акад. РАН (Россия)**CHAIR OF EDITORIAL COUNCIL****Marinkin I.O.**, Prof. (Russia)**EDITOR-IN-CHIEF****Pospelova T.I.**, Prof. (Russia)**DEPUTIES EDITOR-IN-CHIEF****Kuznetsova V.G.**, Prof. (Russia)**Savchenko S.V.**, Prof. (Russia)**EXECUTIVE SECRETARY****Maksimova E.A.** (Russia)**EDITORIAL COUNCIL****Aftanas L.I.**, Academician of RAS (Russia)**Wagenlehner F.**, Prof. (Germany)**Vlasov V.V.**, Academician of RAS (Russia)**Voevoda M.I.**, Academician of RAS (Russia)**Gromb S.**, Prof. (France)**Dorofeev S.B.**, Cand. Sci. (Med.) (Russia)**Dygay A.M.**, Academician of RAS (Russia)**Zhdanov V.V.**, Prof. (Russia)**Muir H.A.**, Prof. (USA)**Nilsson P.M.**, Prof. (Sweden)**Ruzicka T.**, Prof. (Germany)**Semenov V.M.**, Prof. (Belarus)**Federico M.**, Prof. (Italy)**Chernykh E.R.**, Academician of RAS (Russia)**Shaydarov M.Z.**, Prof., Corresponding Member of NAS RK
(Kazakhstan)**Shkurupiy V.A.**, Academician of RAS (Russia)**РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ****Биттер И.**, проф. (Венгрия)**Бьерклунд Йохансен Т.Е.**, проф. (Норвегия)**Галицкий Ф.А.**, проф. (Казахстан)**Генералов И.И.**, проф. (Беларусь)**Зонова Е.В.**, проф. (Россия)**Карабинцева Н.О.**, проф. (Россия)**Климонтов В.В.**, проф. (Россия)**Ковынев И.Б.**, проф. (Россия)**Кондюрина Е.Г.**, проф. (Россия)**Кохно В.Н.**, проф. (Россия)**Краснов В.А.**, проф. (Россия)**EDITORIAL BOARD****Bitter I.**, Prof. (Hungary)**Bjerkklund Johansen T.E.**, Prof. (Norway)**Galitsky F.A.**, Prof. (Kazakhstan)**Generalov I.I.**, Prof. (Belarus)**Zonova E.V.**, Prof. (Russia)**Karabinceva N.O.**, Prof. (Russia)**Klimontov V.V.**, Prof. (Russia)**Kovynev I.B.**, Prof. (Russia)**Kondyurina E.G.**, Prof. (Russia)**Kohno V.N.**, Prof. (Russia)**Krasnov V.A.**, Prof. (Russia)

Кривцова Л.А., проф. (Россия)
Кульчавеня Е.В., проф. (Россия)
Логвинов С.В., проф. (Россия)
Мадонов П.Г., проф. (Россия)
Надеев А.П., проф. (Россия)
Новоселов В.П., проф. (Россия)
Овчинников А.А., проф. (Россия)
Осипенко М.Ф., проф. (Россия)
Петрек М., проф. (Чехия)
Потеряева Е.Л., проф. (Россия)
Соколова Т.М., проф. (Россия)
Хрянин А.А., проф. (Россия)
Чернов М.Ф., проф. (Япония)
Черных В.В., проф. (Россия)
Чикинев Ю.В., проф. (Россия)
Шпагина Л.А., проф. (Россия)
Яхонтов Д.А., проф. (Россия)

УЧРЕДИТЕЛЬ

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России
Адрес: 630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52
Тел./факс: +7 (383) 222-32-04
E-mail: rector@ngmu.ru
Web: www.ngmu.ru

АДРЕС РЕДАКЦИИ

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России
630091, Россия, г. Новосибирск, Красный просп., 52
Тел./факс: +7 (383) 229-10-82
E-mail: mos@ngmu.ru
Web: <http://jsms.ngmu.ru>

Krivtsova L.A., Prof. (Russia)
Kulchavenya E.V., Prof. (Russia)
Logvinov S.V., Prof. (Russia)
Madonov P.G., Prof. (Russia)
Nadeev A.P., Prof. (Russia)
Novoselov V.P., Prof. (Russia)
Ovchinnikov A.A., Prof. (Russia)
Osipenko M.F., Prof. (Russia)
Petrek M., Prof. (Czechia)
Poteryaeva E.L., Prof. (Russia)
Sokolova T.M., Prof. (Russia)
Hryanin A.A., Prof. (Russia)
Chernov M.F., Prof. (Japan)
Chernykh V.V., Prof. (Russia)
Chikinev Yu.V., Prof. (Russia)
Shpagina L.A., Prof. (Russia)
Yahontov D.A., Prof. (Russia)

FOUNDER

Novosibirsk State Medical University
Address: 52, Krasny Prospect, Novosibirsk, 630091, Russia
Tel./fax: +7 (383) 222-32-04
E-mail: rector@ngmu.ru
Web: www.ngmu.ru

EDITORIAL OFFICE ADDRESS

Novosibirsk State Medical University
52, Krasny Prospect, Novosibirsk, 630091, Russia
Tel./fax: +7 (383) 229-10-82
E-mail: mos@ngmu.ru
Web: <http://jsms.ngmu.ru>

СОДЕРЖАНИЕ	CONTENTS
ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	ORIGINAL RESEARCHES
Микробиота плодных оболочек при интактном плодном пузыре и доношенной беременности Каганова М.А., Спиридонова Н.В., Махлина Е.А.	4 Microbiota of fetal membranes in intact amniotic sac and full-term pregnancy Kaganova M.A., Spiridonova N.V., Makhlina E.A.
Изучение влияния мешающих ионов тяжелых металлов и различной пробоподготовки на определение примеси ртути в протамина сульфате методом инверсионной вольтамперометрии Ким Н.О., Ивановская Е.А.	12 Study of the influence of interfering ions of heavy metals and various sample preparation on the determination of mercury impurity in protamine sulfate by stripping voltammetry Kim N.O., Ivanovskaya E.A.
Сенсибилизация гепарином мю-рецепторов, инициированных фентанилом Хомутов А.Е., Дерюгина А.В., Лизунова А.С., Боброва З.В.	20 Heparin sensitization of fentanyl initiated mu-receptors Khomutov A.E., Deryugina A.V., Lizunova A.S., Bobrova Z.V.
Эволюция условий труда на пылеопасных предприятиях Западной Сибири: 50-летние тренды Потеряева Е.Л., Логвиненко И.И., Смирнова Е.Л., Власов В.Г.	33 Evolution of working conditions at dust-hazardous enterprises in Western Siberia: 50-year trends Poteryaeva E.L., Logvinenko I.I., Smirnova E.L., Vlasov V.G.
Иммуномодулирующие свойства пробиотического препарата «ВедаБиотик» при старении Маркова Е.В., Сорокин О.В., Гольдина И.А., Савкин И.В., Князева М.А., Серенко Е.В., Бакулин К.А., Молокеев А.В.	41 Immunomodulating properties of the probiotic preparation, VedaBiotic in aging Markova E.V., Sorokin O.V., Goldina I.A., Savkin I.V., Knyazheva M.A., Serenko E.V., Bakulin K.A., Molokeyev A.V.
Разработка вольтамперометрической методики количественного определения бендазола гидрохлорида Жеребцова Е.Ю., Терентьева С.В., Ивановская Е.А., Шинко Т.Г.	55 Development of the voltammetric method for the quantitative determination of bendazole hydrochloride Zherebtsova E.Yu., Terentyeva S.V., Ivanovskaya E.A., Shinko T.G.
Оценка деструктивного влияния санитарно-гигиенической обработки на укупорочные резиновые пробки с использованием метода определения краевого угла смачивания поверхности Хусаинов А.Д., Егорова С.Н., Хасанова А.Д., Симонова Н.Н.	65 Assessment of the destructive influence of sanitary cleansing on pharmaceutical rubber stoppers using a method of measuring the contact angle Khusainov A.D., Egorova S.N., Khasanova A.D., Simonova N.N.
Сравнение методик количественного определения фармацевтической субстанции висмута субсалицилата методами УФ-спектрофотометрии и инверсионной вольтамперометрии Визер А.А., Ивановская Е.А., Лигостаев А.В.	73 The comparison of methods for the quantification of the pharmaceutical substance bismuth subsalicylate by UV-spectrophotometry and stripping voltammetry Vizer A.A., Ivanovskaya E.A., Ligostaev A.V.
Фармакоэпидемиологический анализ применения антимикробных препаратов при заболеваниях нижних дыхательных путей в пульмонологическом отделении многопрофильного стационара Республики Таджикистан Саидова М.Н., Пулотзода И.П., Сангинова Н.С.	81 Pharmacoepidemiological analysis of the use of antimicrobial drugs for diseases of the lower respiratory tract in the pulmonary department of a multifield hospital of the Republic of Tajikistan Saidova M.N., Pulotzoda I.P., Sanginova N.S.
ОБЗОР	REVIEW
Новые аспекты этиологии и патогенеза ВИЧ-инфекции (обзор литературы) Капустин Д.В., Ульянова Я.С., Карпович Г.С., Краснова Е.И., Кузнецова В.Г., Извекова И.Я.	92 New aspects of the etiology and pathogenesis of HIV infection (literature review) Kapustin D.V., Ul'yanova Ya.S., Karpovich G.S., Krasnova E.I., Kuznetsova V.G., Izvekova I.Ya.

Микробиота плодных оболочек при интактном плодном пузыре и доношенной беременности

Каганова М.А.¹, Спиридонова Н.В.¹, Махлина Е.А.²

¹ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России

²ООО «Консультативная клиника «Панацея» (Самара)

Microbiota of fetal membranes in intact amniotic sac and full-term pregnancy

Kaganova M.A.¹, Spiridonova N.V.¹, Makhlina E.A.²

¹Samara State Medical University

²Consultative clinic "Panatseya" LLC (Samara)

АННОТАЦИЯ

Цель исследования. Изучить микробный пейзаж плодных оболочек при интактном плодном пузыре и доношенной беременности

Материалы и методы. У 19 беременных (средний возраст 31.0 ± 5.3 года, средний срок гестации 39.3 ± 0.65 нед) с неповрежденными плодными оболочками во время elective кесарева сечения проводился забор ткани плодных оболочек с целью выявления следующих микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции: *Lactobacillus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas* spp., *Eubacterium* spp., *Sneathia* spp./*Leptotrichia* spp./*Fusobacterium* spp., *Megasphaera* spp./*Veillonella* spp./*Dialister* spp., *Lachnobacterium* spp./*Clostridium* spp., *Mobiluncus* spp./*Corynebacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Atopobium vaginae*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma (urealyticum + parvum)*, *Candida* spp., *Mycoplasma genitalium*.

Результаты. Стерильные оболочки обнаружены у 5 беременных (26.3 %), в остальных случаях выявлена общая бактериальная масса (ОБМ) $10^{4.5}$ ($10^{3.5}-10^{5.8}$) геном-эквивалентов (ГЭ)/образец. Преобладали представители семейства *Enterobacteriaceae* — в среднем $10^{4.5}$ ГЭ/образец, лишь в одном случае выявлена *Candida* spp. В 42.1 % случаев при выявлении ОБМ конкретные виды микроорганизмов идентифицированы не были.

Заключение. На плодных оболочках при доношенной беременности допустимо присутствие ОБМ в среднем $10^{4.5}$ ($10^{3.5}-10^{5.8}$) ГЭ/образец, в которой преобладают *Enterobacteriaceae* в среднем $10^{4.5}$ ГЭ/образец.

Ключевые слова: плодные оболочки, плацента, полимеразная цепная реакция, ДНК-технологии, микробиота.

ABSTRACT

Aim of research. To study the microbial landscape of intact fetal membranes in full-term pregnancy.

Materials and methods. In 19 pregnant women (mean age — 31.0 ± 5.3 years, mean gestational age — 39.3 ± 0.65 weeks) with intact fetal membranes, the fetal membrane tissue was collected during elective cesarean section to detect by polymerase chain reaction the following microorganisms: *Lactobacillus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas* spp., *Eubacterium* spp., *Sneathia* spp./*Leptotrichia* spp./*Fusobacterium* spp., *Megasphaera* spp./*Veillonella* spp./*Dialister* spp., *Lachnobacterium* spp./*Clostridium* spp., *Mobiluncus* spp./*Corynebacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Atopobium vaginae*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma (urealyticum + parvum)*, *Candida* spp., *Mycoplasma genitalium*.

Results. Sterile membranes were found in 5 pregnant women (26.3%), in the remaining cases, the total bacterial load (TBL) was $10^{4.5}$ ($10^{3.5}-10^{5.8}$) genome equivalents (GE) per sample. Representatives of the *Enterobacteriaceae* family prevailed — $10^{4.5}$ GE per sample on average, only in one case *Candida* spp. were detected. In 42.1% of cases, when determining TBL, specific types of microorganisms were not identified.

Поступила 23.10.2020

Принята 18.11.2020

Автор, ответственный за переписку

Каганова Мария Александровна: ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России. 443079, г. Самара, ул. Чапаевская, 89.

E-mail: mkaganova@yandex.ru

Received 23.10.2020

Accepted 18.11.2020

Corresponding author

Kaganova Mariya Aleksandrovna: Samara State Medical University, 89, Chapayevskaya str., Samara, 443079, Russia.

E-mail: mkaganova@yandex.ru

Conclusion. On the fetal membranes in full-term pregnancy, the average TBL corresponding to $10^{4.5}$ ($10^{3.5}$ – $10^{5.8}$) GE per sample, in which *Enterobacteriaceae* prevail in the amount of $10^{4.5}$ GE per sample on average, is acceptable.

Keywords: fetal membranes, placenta, polymerase chain reaction, DNA technology, microbiota.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время вопрос о нормальной микрофлоре и патогенных микроорганизмах фетоплацентарного комплекса стал наиболее актуальным. Сформировавшиеся в XX в. устойчивые представления о стерильности амниотической полости, плодных оболочек и плаценты при физиологически протекающей беременности все чаще и чаще подвергаются сомнению. В последние пять лет в результате проведенного масштабного исследования доказано — плацента обладает своей уникальной микрофлорой, которая в большей степени напоминает микрофлору ротовой полости, а не влагалища и цервикального канала [1–5].

Современные молекулярно-генетические исследования позволяют получить максимально полное и объективное представление о составе микрофлоры цервикального канала и фетоплацентарного комплекса. Появились работы, которые доказывают наличие бактерий в плаценте, амниотической жидкости, плодных оболочках, меконии; авторы предполагают, что первое столкновение с микробами происходит внутриутробно даже в условиях физиологически протекающей беременности [6–10]. Так, бактерии были выделены в 21–26 % плацент [11, 12] при доношенной физиологически протекающей беременности. Жизнеспособные бактерии (*Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. или *Propionibacterium* spp.) также были выделены из пуповинной крови здоровых новорожденных [13]. Однако в литературе недостаточно данных о характере микробного пейзажа плодных оболочек при физиологически протекающей беременности в норме, что и послужило причиной написания данной статьи.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить микробный пейзаж интактных плодных оболочек при доношенной беременности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 19 беременных со сроком гестации 37–41 нед. Исследование проводилось на базе родильных отделений ГБУЗ «Самарская городская клиническая больница

INTRODUCTION

Currently, the issue of the normal microbiota and pathogenic microorganisms of the fetoplacental complex has become the most relevant. The stable beliefs, formed in the XX century, about the sterility of the amniotic cavity, fetal membranes and placenta in normal pregnancy are increasingly calling into question. In the last five years, as a result of a large-scale study, it has been proved that the placenta has its own unique microbiota, which is more similar to the microbiota of the oral cavity, rather than of the vagina and cervical canal [1–5].

Modern molecular genetic studies make it possible to obtain the most complete and objective understanding of the cervical canal and fetoplacental complex microbiota. There are works that prove the presence of bacteria in the placenta, amniotic fluid, fetal membranes, meconium; the authors suggest that the first encounter with microbes occurs in utero, even in normal pregnancy [6–10]. Thus, bacteria were isolated in 21–26% of placentas [11, 12] during full-term normal pregnancy. Viable bacteria (*Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., or *Propionibacterium* spp.) have also been isolated from the umbilical cord blood of healthy newborns [13]. However, there is not enough data in the literature about the nature of the fetal membranes' microbial landscape in full-term normal pregnancy, which was the reason for this article being written.

AIM OF THE RESEARCH

To study the microbial landscape of intact fetal membranes in full-term pregnancy.

MATERIALS AND METHODS

The study included 19 pregnant women with a gestation period of 37–41 weeks. The research was conducted on the basis of maternity departments of the Pirogov Samara City Clinical Hospital No. 1. The mean age of the examinees was 31.0 ± 5.3 years, the first birth frequency was 36.8%; mean number of pregnancies per patient was 2.47 ± 1.71 ; mean gestational age was 39.3 ± 0.65 weeks (39–40.5 weeks).

№ 1 им. Н.И. Пирогова». Средний возраст обследуемых составил 31.0 ± 5.3 года, частота первых родов 36.8 %; среднее количество беременностей на одну пациентку 2.47 ± 1.71 ; средний срок гестации 39.3 ± 0.65 нед (39–40.5 нед).

Все пациентки были родоразрешены путем операции кесарева сечения в плановом порядке (показаниями являлись — неправильное положение и предлежание плода, наличие рубца на матке после предыдущей операции кесарева сечения, бесплодие в сочетании с отягощенным акушерским анамнезом, возраст).

Критерии исключения:

1. Беременные, относящиеся к группе высокого риска согласно порядку оказания помощи по профилю «Акушерство и гинекология» № 572 от 01.11.2012, по соматической патологии (сахарный диабет, гестационный диабет), особенностям плацентации.

2. Наличие острых и обострение хронических воспалительных заболеваний, в том числе кольпита.

3. Антибактериальная терапия во время беременности.

Всем пациенткам было выполнено исследование образца плодных оболочек методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ) (набор «Фемофлор 16») с помощью амплификатора ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология» (Москва)). Забор образца плодных оболочек проводился в стерильных условиях интраоперационно при вскрытии матки и плодного пузыря. В области посередине между плацентой и внутренним зевом с помощью стерильного конхотома с диаметром рабочей поверхности 9.4 мм отсекался стандартный образец плодной оболочки, который затем помещался в пробирку Эппендорф 1.5 мл с транспортной средой («Проба-Репид», ООО «НПО ДНК-Технология»). Изначально методика «Фемофлор 16» была разработана для оценки состояния влагалища. Но поскольку данная методика предназначена для анализа биоты различных биотопов, она также может быть применена и для анализа микрофлоры плодных оболочек [14–16]. Методика «Фемофлор 16» позволяет выявлять следующие микроорганизмы: *Lactobacillus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas* spp., *Eubacterium* spp., *Sneathia* spp./*Leptotrichia* spp./*Fusobacterium* spp., *Megasphaera* spp./*Veillonella* spp./*Dialister* spp., *Lachnobacterium* spp./*Clostridium* spp., *Mobiluncus* spp./*Corynebacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Atopobium vaginae*,

All patients were delivered by cesarean section in a planned manner (abnormal fetal lie and malpresentation, the presence of a scar on the uterus after a previous cesarean section, infertility in combination with poor obstetric history, older age were the indications).

Exclusion criteria:

1. Pregnant women belonging to the high-risk group according to the Order determining the Procedure for the provision of medical care in the field of Obstetrics and Gynecology No. 572 of November 1, 2012, having somatic pathology (diabetes mellitus, gestational diabetes), abnormalities of placentation.

2. The presence of acute and exacerbation of chronic inflammatory diseases, including colpitis.

3. Antibacterial therapy during pregnancy.

All patients were performed an examination of a fetal membranes sample by real-time PCR (PCR-RT) method, using Femoflor 16 Kit, and the DT-96 Amplifier (SPA DNA-Technology, Moscow). Samples of fetal membranes were taken under sterile conditions intraoperatively during the uterotomy and amniotomy. In the area between the placenta and the internal orifice of the uterus, a standard sample of the fetal membrane was cut off using a sterile conchotome with working surface of jaws being 9.4 mm in diameter, and put in Eppendorf tube 1.5 ml with transport medium (Proba-Rapid, DNA-Technology). Originally the Femoflor 16 method was developed for evaluation of vagina microbial environment. But since this method is used to analyze biota of various biotopes, it also can be used for fetal membranes microbiota analysis [14–16]. The Femoflor 16 test makes it possible to identify the following microorganisms: *Lactobacillus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas* spp., *Eubacterium* spp., *Sneathia* spp./*Leptotrichia* spp./*Fusobacterium* spp., *Megasphaera* spp./*Veillonella* spp./*Dialister* spp., *Lachnobacterium* spp./*Clostridium* spp., *Mobiluncus* spp./*Corynebacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Atopobium vaginae*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma (urealyticum + parvum)*, *Candida* spp., *Mycoplasma genitalium*.

The analysis assessed the swab quality (SQ), which in all cases was adequate (more than 104 genome equivalents (GE) per sample); determined the amount of total bacterial load (TBL) — laboratory TBL (TBL), identified *Lactobacillus* spp. and other types listed above that are on this test panel. The quantitative assessment of the identified microor-

Mycoplasma hominis, *Ureaplasma (urealyticum + parvum)*, *Candida* spp., *Mycoplasma genitalium*.

При анализе оценивалось качество взятия мазка (КВМ), которое во всех случаях было адекватным (более 10^4 геном-эквивалентов (ГЭ)/образец), определялось количество общей бактериальной массы (ОБМ) — лабораторная ОБМ (ОБМл), *Lactobacillus* spp. и остальных вышеперечисленных видов, входящих в данную панель. Количественная оценка выявленных микроорганизмов приводилась как в абсолютных, так и в относительных показателях к ОБМл. Частота выявления данных микроорганизмов представлена в процентах к количеству пациенток в группах. Абсолютный показатель — количество ДНК искомого микроорганизма в образце, выраженное в ГЭ/мл, представленное в виде десятичного логарифма — lg. Относительный количественный показатель микроорганизма рассчитывали как отношение абсолютного количества искомого микроорганизма к абсолютному количеству рассчитанной ОБМ (ОБМр) в процентах. ОБМр получена из суммы абсолютного количества выявленных микроорганизмов в образце.

Обработку результатов исследования проводили с помощью программ STATISTICA 10.0, SPSS 13. Данные представлены как абсолютные количества в виде среднего десятичных логарифмов. Частота выявления микроорганизмов — в процентах; относительное содержание микроорганизмов — в процентах относительно рассчитанной ОБМр. Количественные показатели представлены в виде среднего арифметического (M) со стандартным отклонением (δ). Сравнение абсолютного количества в группах выполнялось с помощью критерия Манна — Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенного анализа плодных оболочек представлены в табл. 1. Как видно из таблицы, ОБМл определялась только в 14 случаях (73.6 %), в среднем титре $10^{4.54}$ ГЭ/образец. Частота ОБМр составила 6 случаев (31.5 %) (табл. 1).

В 8 случаях (42.1 %) наблюдалось превышение ОБМл над ОБМр — выявлялись так называемые неизвестные виды, которые идентифицировать с помощью панели реагентов «Фемофлор 16» не представляется возможным. Относительно идентифицированных видов процент «неизвестных» видов был низким (2.08 ± 0.08 %). Стерильные оболочки (ОБМл = 0 и ОБМр = 0) наблюдались в 5 случаях (26.3 %).

анализ был проведен как в абсолютных, так и в относительных показателях с reference to the TBLl. The frequency of detection of these microorganisms is presented as a percentage of the number of patients in the groups. The absolute quantity of DNA of the desired microorganism in the sample expressed in GE per ml, presented as a decimal logarithm — lg. The relative quantity of the microorganism was calculated as the ratio of the absolute amount of the desired microorganism to the absolute amount of the calculated TBL (TBLc) as a percentage. The TBLc is derived from the sum of the absolute quantity of detected microorganisms in the sample.

The results of the study were processed using the STATISTICA 10.0, SPSS 13 softwares. The data is presented as absolute quantities in the form of the mean of decimal logarithms. The detection frequency of microorganisms — as a percentage; the relative quantity of microorganisms — as a percentage relative to the calculated TBLc. Quantitative indicators are presented in the form of an arithmetic mean (M) with a standard deviation (δ). The comparison of the absolute quantity in the groups was performed using the Mann-Whitney test. The differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the fetal membranes analysis are presented in Table 1. As it can be seen, TBLl was detected only in 14 cases (73.6%), the mean titer is $10^{4.54}$ GE/ml. The frequency of TBLc was 6 cases (31.5%) (Table 1).

In 8 cases (42.1%) TBLl exceeded TBLc — so called unknown species were detected, which could not be identified with Femoflor 16 test panel. The percentage of “unknown” species relative to identified species was low ($2.08 \pm 0.08\%$). Sterile membranes (TBLl = 0 and TBLc = 0) were seen in 5 cases (26.3%).

In intact fetal membranes, mainly the representatives of the *Enterobacteriaceae* family were detected (5 cases (26.3%)), only in 1 case — *Candida* spp., which can be associated with the contact of the fetal membranes with the cervical canal.

In recent years, the research is conducted for studying the microbiota of the fetoplacental complex, and it is reported of the detection of bacteria in the placental and fetal membrane samples without signs of infection, based on the results of clinical and histological analysis [12, 17]. Back in 2005, it was shown that the fetal membranes in normal pregnancy often contain bacteria, but this does not

Таблица 1. Распределение микроорганизмов интактных плодных оболочек при доношенной беременности
Table 1. Distribution of microorganisms in intact fetal membranes in full-term pregnancy

Показатель, микроорганизмы Indicator, microorganisms	Частота выявления, абс. (%) Detection rate, abs. (%)	Абсолютный показатель — lg (M) Absolute indicator — lg (M)	Относительная частота (%) Relative ratio (%)
КВМ / SQ	19 (100)	5.04	—
ОБМл / TBLl	14 (73.7)	4.54	100
ОБМр / TBLc	6 (31.5)	4.53	97.8 ± 0.08
<i>Lactobacillus</i> spp.	0 (0)	—	0.00 ± 0.00
<i>Enterobacteriaceae</i> spp.	5 (26.3)	4.53	97.8 ± 0.08
<i>Streptococcus</i> spp.	0 (0)	—	0.00 ± 0.00
<i>Staphylococcus</i> spp.	0 (0)	—	0.00 ± 0.00
<i>Gardnerella vaginalis</i> + <i>Prevotella bivia</i> + <i>Porphyromonas</i> spp.	0 (0)	—	0.00 ± 0.00
<i>Eubacterium</i> spp.	0 (0)	—	0.00 ± 0.00
<i>Sneathia</i> spp. + <i>Leptotrichia</i> spp. + <i>Fusobacterium</i> spp.	0 (0)	—	0.00 ± 0.00
<i>Megasphaera</i> spp. + <i>Veillonella</i> spp. + <i>Dialister</i> spp.	0 (0)	—	0.00 ± 0.00
<i>Lachnobacterium</i> spp. + <i>Clostridium</i> spp.	0 (0)	—	0.00 ± 0.00
<i>Mobiluncus</i> spp. + <i>Corynebacterium</i> spp.	0 (0)	—	0.00 ± 0.00
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	0 (0)	—	0.00 ± 0.00
<i>Atopobium vaginae</i>	0 (0)	—	0.00 ± 0.00
<i>Candida</i> spp.	1 (5)	1.82	0.19 ± 0.02
<i>Mycoplasma hominis</i>	0 (0)	—	0.00 ± 0.00
<i>Ureaplasma (urealyticum + parvum)</i>	0 (0)	—	0.00 ± 0.00
<i>Mycoplasma genitalium</i>	0 (0)	—	0.00 ± 0.00
Неизвестные виды / Undetected species	8 (42.1)	2.89	2.08 ± 0.08

В интактных плодных оболочках выявлялись в основном представители семейства *Enterobacteriaceae* (5 случаев (26.3 %)), только в 1 случае выявлена *Candida* spp., что можно связать с ее контактным попаданием на плодные оболочки из цервикального канала.

В последние годы проводятся исследования, направленные на изучение микробиоты фетоплацентарного комплекса, а также сообщается об обнаружении бактерий в образцах плаценты и плодных оболочек без признаков инфекции по результатам клинического и гистологического анализа [12, 17]. Еще в 2005 г. было показано, что плодные оболочки при физиологически протекающей беременности часто содержат бактерии, но к осложнениям гестации это не приводит, и данных о наличии инфекции при гистологическом исследовании плодных оболочек и плаценты нет [18].

Было установлено, что плацентарный микробиом наиболее сходен с микробиомом полости рта (наддесневой бляшки и спинки языка) и не

lead to gestational complications, and there is no data on the presence of infection during histological examination of the fetal membranes and placenta [18].

It was found that the placenta microbiome is most similar to the microbiome of the oral cavity (supragingival plaque and dorsum of the tongue) and is not identical to the intestinal and vaginal microbiomes [4, 5]. Thus, the ascending pathway of bacterial colonization of the placenta and fetal membranes is not dominant and, most likely, is realized with the loss of the barrier function of the cervical canal and the fetal membranes continuity [4], which, in fact, confirms our study. In pregnant women with intact fetal membranes, the frequency of microbial DNA detection is 73.7%; but in 42.1% of cases, it was impossible to identify microorganisms using the Femoflor 16 test panel, which is due to its orientation to identify representatives of the vaginal biotope, while the DNA of other species is present on the fetal membranes. Our results are

идентичен кишечным и влагалищным микробиомам [4, 5]. Таким образом, восходящий путь бактериальной колонизации плаценты и плодных оболочек не является доминирующим и, скорее всего, реализуется при утрате барьерной функции цервикального канала, нарушении целостности плодных оболочек [4], что, по сути, подтверждает наше исследование. У беременных с интактными плодными оболочками частота выявления ДНК микроорганизмов составляет 73.7 %, но в 42.1 % случаев идентифицировать микроорганизмы с помощью стандартной панели реагентов «Фемофлор 16» было невозможно, что связано с ориентацией панели на выявление представителей влагалищного биотопа, а на плодных оболочках присутствует ДНК других видов. Наши данные подтверждаются данными литературы, где несовпадения ОБМл и ОБМр при анализе ДНК методом ПЦР-РВ аналогично объясняются тем, что к части ДНК бактерий в стандартных панелях не представлены реагенты, лаборатория определяет некую бактериальную массу, но выделить конкретное семейство не представляется возможным [3]. В результате нашего исследования у пациенток на плодных оболочках выделены исключительно представители семейства *Enterobacteriaceae*, лишь в одном случае грибы рода *Candida*.

Семейство *Enterobacteriaceae* выявлялось в исследованиях других авторов, которые также идентифицировали: *Protobacteria*, *Bacteroides*, *Fusobacteria* и *Tenericutes* [19, 20]. Мнения о жизнеспособности данных бактерий в литературе разнятся. В недавнем исследовании L. Zhu et al. [21] микробы культивировались с плодной части плаценты в 20.7 % случаев (379 из 1832 образцов), полученной во время кесарева сечения при доношенной беременности без клинических признаков хориоамнионита; из них в 13.5 % (247 из 1832 образцов) случаев в плацентах обнаружена культура *E. coli*. Однако ряд других исследований свидетельствует о том, что вклад в выявление ДНК различных бактерий как на плаценте, так и на плодных оболочках вносит загрязнение образцов, либо наличие ДНК свидетельствует лишь о том, что данные виды бактерий присутствовали на плаценте и плодных оболочках, но они не жизнеспособны и не дают роста при культивировании на средах. Возможно, активно размножающейся динамичной микробиоты в плаценте и плодных оболочках и не существует, как это имеет место во влагалище, но сам факт наличия ДНК определенных микроорганизмов свидетельствует в пользу важных им-

confirmed by the literature data, where the discrepancies between TBLl and TBLc in the analysis of DNA by PCR-RT are similarly explained by the fact that the reagents for the part of the bacterial DNA are not presented in the standard test panels, so the laboratory determines a certain bacterial load, but has no opportunity to detect a specific bacteria family [3]. As a result of our research, only representatives of the *Enterobacteriaceae* family were identified on the fetal membranes of patients; and only in one case — fungi of the *Candida* spp.

The *Enterobacteriaceae* family was detected by other authors, who have also identified: *Protobacteria*, *Bacteroides*, *Fusobacteria*, and *Tenericutes* [19, 20]. Opinions concerning the viability of these bacteria differ in the literature. In the recent study by L. Zhu et al. [21], in 20.7% of cases (379 out of 1.832 samples) the viable bacteria were obtained from the fetal part of placenta during cesarean section in full-term pregnancy without clinical signs of chorioamnionitis; of these, in 13.5% (247 out of 1.832 samples) of cases, *E. coli* culture was identified in the placentas. However, a number of other studies indicate that the contamination of the samples contributes to the detection of DNA of various bacteria both on the placenta and on the fetal membranes; or the presence of DNA only shows that these species of bacteria were present on the placenta and the fetal membranes, but they are not viable and do not exhibit growth when cultured on media. It is possible that the actively growing dynamic microbiota in the placenta and the fetal membranes does not exist as is the case in the vagina, but the very fact of the presence of certain microorganisms' DNA suggests important immunological processes, which are based on the microbial antigen presentation and the production of the cellular and humoral immunity factors in response [4, 5].

CONCLUSION

On the fetal membranes in full-term pregnancy, the presence of a total bacterial load of $10^{4.5}$ ($10^{3.5}$ – $10^{5.8}$) GE per sample is acceptable. Unidentified microorganisms were detected in the fetal membrane samples in 42.1% of cases, but their titer was insignificant ($10^{2.89}$ GE per sample). With an intact amniotic sac, the quantity of *Enterobacteriaceae* spp. representatives detected on the fetal membranes corresponds to $10^{4.5}$ GE per sample on average.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

мунологических процессов, в основе которых лежит презентация антигенов микробов и выработка в ответ факторов клеточного и гуморального иммунитета [4, 5].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На плодных оболочках при доношенной беременности допустимо присутствие общей бактериальной массы — $10^{4.5}$ ($10^{3.5}$ – $10^{5.8}$) ГЭ/образец.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Parnell L.A., Briggs C.M., Cao B. et al. Microbial communities in placentas from term normal pregnancy exhibit spatially variable profiles // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7: 11200. doi: 10.1038/s41598-017-11514-4.
2. Bagga R., Arora P. Genital micro-organisms in pregnancy // *Front. Public Health.* 2020. Vol. 8: 225. doi: 10.3389/fpubh.2020.00225.
3. Lim E.S., Rodriguez C., Holtz L.R. Amniotic fluid from healthy term pregnancies does not harbor a detectable microbial community // *Microbiome.* 2018. Vol. 6: 87. doi: org/10.1186/s40168-018-0475-7.
4. Aagaard K., Ma J., Antony K.M. et al. The placenta harbors a unique microbiome // *Sci. Transl. Med.* 2014. Vol. 6 (237): 237ra65.
5. Collado M.C., Rautava S., Aakko J., Isolauri E., Salminen S. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6: 23129.
6. Ardisson A.N., de la Cruz D.M., Davis-Richardson A.G. et al. Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth // *PLoS One.* 2014. Vol. 9 (3): e90784.
7. Moles L., Gómez M., Heilig H. et al. Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life // *PLoS One.* 2013. Vol. 8 (6): e66986.
8. Satokari R., Grönroos T., Laitinen K., Salminen S., Isolauri E. *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* DNA in the human placenta // *Lett. Appl. Microbiol.* 2009. Vol. 48 (1). P. 8–12.
9. Bearfield C., Davenport E.S., Sivapathasundaram V., Allaker R.P. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth // *BJOG.* 2002. Vol. 109 (5). P. 527–533.
10. Rautava S., Collado M.C., Salminen S., Isolauri E. Probiotics modulate host-microbe interaction in the placenta and fetal gut: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial // *Neonatology.* 2012. Vol. 102 (3). P. 178–184.
11. Hillier S.L., Martius J., Krohn M. et al. A case-control study of chorioamnion infection and histologic chorioamnionitis in prematurity // *N. Engl. J. Med.* 1988. Vol. 319. P. 972–978.
12. Stout M.J., Conlon B., Landeau M. et al. Identification of intracellular bacteria in the basal plate of the human placenta in term and preterm gestations // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2013. Vol. 208. P. 226.e1–226.e7. doi: org/10.1016/j.ajog.2013.01.018.
13. Jimenez E., Fernandez L., Marin M.L. et al. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of

В образцах плодных оболочек выявлены неидентифицированные микроорганизмы в 42.1 % случаев, но их титр был незначительным ($10^{2.89}$ ГЭ/образец). При целом плодном пузыре на плодных оболочках определяются представители *Enterobacteriaceae* в среднем $10^{4.5}$ ГЭ/образец.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

REFERENCES

1. Parnell L.A., Briggs C.M., Cao B. et al. (2017). Microbial communities in placentas from term normal pregnancy exhibit spatially variable profiles. *Sci. Rep.*, 7: 11200. doi: 10.1038/s41598-017-11514-4.
2. Bagga R., Arora P. (2020). Genital micro-organisms in pregnancy. *Front. Public Health*, 8: 225. doi: 10.3389/fpubh.2020.00225.
3. Lim E.S., Rodriguez C., Holtz L.R. (2018). Amniotic fluid from healthy term pregnancies does not harbor a detectable microbial community. *Microbiome*, 6: 87. doi: org/10.1186/s40168-018-0475-7.
4. Aagaard K., Ma J., Antony K.M. et al. (2014). The placenta harbors a unique microbiome. *Sci. Transl. Med.*, 6 (237): 237ra65.
5. Collado M.C., Rautava S., Aakko J., Isolauri E., Salminen S. (2016). Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci. Rep.*, 6: 23129.
6. Ardisson A.N., de la Cruz D.M., Davis-Richardson A.G. et al. (2014). Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth. *PLoS One*, 9 (3): e90784.
7. Moles L., Gómez M., Heilig H. et al. (2013). Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PLoS One*, 8 (6): e66986.
8. Satokari R., Grönroos T., Laitinen K., Salminen S., Isolauri E. (2009). *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* DNA in the human placenta. *Lett. Appl. Microbiol.*, 48 (1), 8–12.
9. Bearfield C., Davenport E.S., Sivapathasundaram V., Allaker R.P. (2002). Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG*, 109 (5), 527–533.
10. Rautava S., Collado M.C., Salminen S., Isolauri E. (2012). Probiotics modulate host-microbe interaction in the placenta and fetal gut: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neonatology*, 102 (3), 178–184.
11. Hillier S.L., Martius J., Krohn M. et al. (1988). A case-control study of chorioamnion infection and histologic chorioamnionitis in prematurity. *N. Engl. J. Med.*, 319, 972–978.
12. Stout M.J., Conlon B., Landeau M. et al. (2013). Identification of intracellular bacteria in the basal plate of the human placenta in term and preterm gestations. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 208, 226.e1–226.e7. doi: org/10.1016/j.ajog.2013.01.018.
13. Jimenez E., Fernandez L., Marin M.L. et al. (2005). Isolation of commensal bacteria from umbilical cord

- healthy neonates born by cesarean section // *Curr. Microbiol.* 2005. Vol. 51. P. 270–274.
14. Болдырева М.Н., Липова Е.В., Алексеев Л.П., Витвицкая Ю.Г., Гуськова И.А. Характеристика биоты урогенитального тракта у женщин репродуктивного возраста методом ПЦР в реальном времени // *Журн. акушерства и женских болезней.* 2009. Т. 58, № 6. С. 36–42.
 15. Сухих Г.Т., Прилепская В.Н., Трофимов Д.Ю. и др. Применение метода полимеразной цепной реакции в реальном времени для оценки микробиоценоза урогенитального тракта у женщин: медицинская технология. М., 2011. 34 с.
 16. Ворошилина Е.С., Тумбинская Л.В., Донников А.Е., Плотно Е.Э., Хаютин Л.В. Биocenоз влагалища с точки зрения количественной полимеразной цепной реакции: что есть норма? // *Акушерство и гинекология.* 2011. № 1. С. 57–65.
 17. Fortner K.B., Grotegut C.A., Ransom C.E. et al. Bacteria localization and chorion thinning among preterm premature rupture of membranes // *PLoS One.* 2014. Vol. 9 (1): e83338. doi: org/10.1371/journal.pone.0083338.
 18. Steel J.H., Malatos S., Kennea N. et al. Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor // *Pediatr. Res.* 2005. Vol. 57 (3). P. 404–411. doi: org/10.1203/01.PDR.0000153869.96337.90.
 19. Mitchell C.M., Haick A., Nkwopara E. et al. Colonization of the upper genital tract by vaginal bacterial species in nonpregnant women // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2015. Vol. 212 (5). P. 611.e1–611.e9.
 20. Younes J.A., Lievens E., Hummelen R. et al. Women and their microbes: the unexpected friendship // *Trends. Microbiol.* 2017. Vol. 26. P. 16–32. doi: 10.1016/j.tim.2017.07.008.
 21. Zhu L., Luo F., Hu W. et al. Bacterial communities in the womb during healthy pregnancy // *Front. Microbiol.* 2018. Vol. 9: 2163.
 - blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr. Microbiol.*, 51, 270–274.
 14. Boldyreva M.N., Lipova E.V., Alexeev L.P., Vitviskaya Ju.G., Gouskova I.A. (2009). Features of urogenital tract's biota determined by means of real-time PCR among women of reproductive age. *Journal of Obstetrics and Women's Diseases*, 58 (6), 36–42.
 15. Suhik G.T., Prilepskaja V.N., Trofimov D.Ju. et al. (2011). *Assessment of Microbiocenosis of Woman's Genitourinary Tract by Real-time PCR: Medical Technology.* Moscow, 34 p. In Russ.
 16. Voroshilina E.S., Tumbinskaya L.V., Donnikov A.E., Plotko E.A., Khayutin L.V. (2011). Vaginal biocenosis in the context of view of quantitative polymerase chain reaction: what is its norm? *Obstetrics and Gynecology*, 1, 57–65. In Russ.
 17. Fortner K.B., Grotegut C.A., Ransom C.E. et al. (2014). Bacteria localization and chorion thinning among preterm premature rupture of membranes. *PLoS One*, 9 (1): e83338. doi: org/10.1371/journal.pone.0083338.
 18. Steel J.H., Malatos S., Kennea N. et al. (2005). Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor. *Pediatr. Res.*, 57 (3), 404–411. doi: org/10.1203/01.PDR.0000153869.96337.90.
 19. Mitchell C.M., Haick A., Nkwopara E. et al. (2015). Colonization of the upper genital tract by vaginal bacterial species in nonpregnant women. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 212 (5), 611.e1–611.e9.
 20. Younes J.A., Lievens E., Hummelen R. et al. (2017). Women and their microbes: the unexpected friendship. *Trends. Microbiol.*, 26, 16–32. doi: 10.1016/j.tim.2017.07.008.
 21. Zhu L., Luo F., Hu W. et al. (2018). Bacterial communities in the womb during healthy pregnancy. *Front. Microbiol.*, 9: 2163.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Каганова Мария Александровна — канд. мед. наук, доцент кафедры акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Спирidonova Наталья Владимировна — д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Махлина Елена Алексеевна — врач акушер-гинеколог ООО «Консультативная клиника «Панацея» (Самара).

Образец цитирования: Каганова М.А., Спирidonova Н.В., Махлина Е.А. Микробиота плодных оболочек при интактном плодном пузыре и доношенной беременности // *Journal of Siberian Medical Sciences.* 2021. № 1. С. 4–11.

ABOUT THE AUTHORS

Kaganova Mariya Aleksandrovna — Cand. Sci. (Med.), Assistant Professor, Obstetrics and Gynecology Department, Samara State Medical University.

Spiridonova Natalya Vladimirovna — Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Obstetrics and Gynecology Department, Samara State Medical University.

Makhlina Elena Alekseevna — Obstetrician-gynecologist, Consultative clinic "Panatseya" LLC (Samara).

Citation example: Kaganova M.A., Spiridonova N.V., Makhlina E.A. (2021). Microbiota of fetal membranes in intact amniotic sac and full-term pregnancy. *Journal of Siberian Medical Sciences*, 1, 4–11.

Изучение влияния мешающих ионов тяжелых металлов и различной пробоподготовки на определение примеси ртути в протамина сульфате методом инверсионной вольтамперометрии

Ким Н.О., Ивановская Е.А.

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России

Study of the influence of interfering ions of heavy metals and various sample preparation on the determination of mercury impurity in protamine sulfate by stripping voltammetry

Kim N.O., Ivanovskaya E.A.

Novosibirsk State Medical University

АННОТАЦИЯ

Цель. Определить содержание ртути в образцах протамина сульфата с различной пробоподготовкой. Изучить влияние мешающих ионов на содержание примеси ртути в протамина сульфате методом инверсионной вольтамперометрии (ИВА).

Материалы и методы. Использовали раствор для инъекций протамина сульфата серий 515091, 514062, 514111, для пробоподготовки образцов — различные варианты разбавления и осаждения. Разбавление проводили бидистиллированной водой, а осаждение белков — вольфраматом натрия в 2 вариантах. Примеси ртути определяли методом ИВА.

Результаты. Содержание ртути в образцах протамина сульфата составило 0.000417 ± 0.00140 и 0.000420 ± 0.00152 мг/л при разбавлении водой 1 : 2 и 1 : 1 соответственно и 0.000462 ± 0.00131 и 0.000459 ± 0.00121 при осаждении вольфраматом в варианте 1 и 2 соответственно. При добавлении мешающего иона, например, Cu^{2+} содержание ртути в ЛП равнялось 0.000606 ± 0.00015 , 0.000452 ± 0.00013 и 0.0004212 ± 0.00011 мг/л для серий протамина сульфата 514062, 515091 и 514111 соответственно, что не превышает значений, определяемых нормативной документацией. Добавление ионов Pb^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} и Cd^{2+} также не оказало влияния на определение содержания ртути в образцах протамина сульфата.

Заключение. Для определения примеси ртути в препарате протамина сульфата специальная пробоподготовка не требуется. Ионы Cu^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} не оказывают влияния на результат определения содержания ртути в образцах протамина сульфата методом ИВА, что говорит о высокой избирательности применяемой методики.

Ключевые слова: инверсионная вольтамперометрия, протамина сульфат, мешающий ион, пробоподготовка.

ABSTRACT

Aim. To determine the content of mercury in protamine sulfate samples with different sample preparation. To study the effect of interfering ions on the content of mercury impurity in protamine sulfate by stripping voltammetry (SV).

Materials and methods. We used a solution for injection of protamine sulfate, batches 515091, 514062, 514111; for sample preparation — various options for dilution and precipitation. Dilution was carried out with bidistilled water, and the precipitation of proteins — with sodium tungstate in 2 options. Mercury impurities were determined by the SV method.

Results. The mercury content in protamine sulfate samples was 0.000417 ± 0.00140 and 0.000420 ± 0.00152 mg/l when diluted with water 1 : 2 and 1 : 1 respectively and 0.000462 ± 0.00131 and 0.000459 ± 0.00121 when precipitated with tungstate in options 1 and 2 respectively. With the addition of an interfering ion, for example, Cu^{2+} , the content of

Поступила 01.12.2020
Принята 28.01.2021

Автор, ответственный за переписку
Ким Надежда Олеговна: ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. 630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52.
E-mail: Kim Nadia@mail.ru

Received 01.12.2020
Accepted 28.01.2021

Corresponding author
Kim Nadezda Olegovna: Novosibirsk State Medical University, 52, Krasny Prospekt, Novosibirsk, 630091, Russia.
E-mail: Kim Nadia@mail.ru

mercury in the medicinal product was 0.000606 ± 0.00015 , 0.000452 ± 0.00013 and 0.0004212 ± 0.00011 mg/l for protamine sulfate batches 514062, 515091 and 514111 respectively, which does not exceed the values determined by the product specification. The addition of Pb^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , and Cd^{2+} ions also had no effect on the determination of the mercury content in protamine sulfate samples.

Conclusion. To determine the mercury impurity in the protamine sulfate, special sample preparation is not required. Ions of Cu^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} do not affect the result of determining the mercury content in protamine sulfate samples by the SV method, which indicates a high selectivity of the method used.

Keywords: stripping voltammetry, protamine sulfate, interfering ion, sample preparation.

ВВЕДЕНИЕ

Определение примесей в лекарственных средствах — актуальная задача фармацевтического анализа. Одними из опасных загрязнителей водной среды являются тяжелые металлы, такие как Zn, Cd, Pb, Cu и Hg. Эти металлы накапливаются в мельчайших микроорганизмах, которыми питается рыба, и затем аккумулируются в ней [1, 2]. Протамин сульфат состоит из сульфатов основных пептидов, извлеченных из спермы или икры рыб, обычно видов Salmonidae и Clupeidae [3]. На сегодняшний день протамины являются единственными препаратами для нейтрализации гепарина, используемыми в клинической медицине [4]. Поскольку протамин сульфат может содержать в своем составе примесь ртути, а этот металл является тяжелым и токсичным и может оказывать негативное влияние на организм человека — важно определять этот показатель на стадии контроля качества. Протамин сульфат также содержит примесь железа, которая может затруднять определение ртути и других тяжелых металлов. В связи с этим необходимо оценить влияние мешающих ионов на определение ртути как количественно, так и качественно.

Мешающий ион — это ион, который в условиях обнаружения искомого дает сходный аналитический эффект с тем же реактивом либо аналитический эффект, маскирующий нужную реакцию [5]. Так как протамин является белоксодержащим препаратом, можно предположить, что катионы ртути могут образовывать комплексные соединения с белковой составляющей. Для устранения этого влияния необходимо проводить пробоподготовку по удалению белковой части путем осаждения белков [6].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить содержание ртути в образцах протамин сульфата с различной пробоподготовкой. Изучить влияние мешающих ионов на содержание примеси ртути в протамин сульфате методом инверсионной вольтамперометрии (ИВА).

INTRODUCTION

Determination of impurities in drug products is an urgent task of pharmaceutical analysis. Heavy metals such as Zn, Cd, Pb, Cu and Hg are among the hazardous pollutants in the aquatic environment. These metals accumulate first in the smallest microorganisms that fish feed on, and then in the fish itself [1, 2]. Protamine sulfate consists of sulfates of basic peptides extracted from the sperm or eggs of fish, usually of the Salmonidae and Clupeidae families [3]. Currently protamines are the only drugs for neutralization of heparin in clinical settings [4]. Since protamine sulfate can contain a mercury impurity, and this metal is heavy and toxic with a negative impact on the human body, it is important to determine this indicator at the quality control stage. Protamine sulfate also contains iron impurity which can make it difficult to detect mercury and other heavy metals. In this regard, it is necessary to assess the influence of interfering ions on the determination of mercury both quantitatively and qualitatively.

An interfering ion is an ion that, under the conditions of detection of the desired one, gives a similar analytical effect with the same reagent or an analytical effect that masks the desired reaction [5]. Since protamine is a protein-containing drug, it can be assumed that mercury cations can form complex compounds with a protein component. To eliminate this effect, it is necessary to carry out sample preparation to remove the protein fraction by precipitation [6].

AIM OF THE RESEARCH

To determine the content of mercury in protamine sulfate samples with different sample preparation. To study the effect of interfering ions on the mercury impurity in protamine sulfate by stripping voltammetry (SV).

MATERIALS AND METHODS

We used a solution for injection of protamine sulfate, batches 515091, 514062, 514111 (Novosibirskpharm JSC, Russia).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для работы использовали раствор для инъекций протамина сульфата серий 515091, 514062, 514111 (ОАО «Новосибхимфарм»).

Известно, что растворимость белков зависит от многих факторов — природы, состава и pH растворителя, температуры и др. По этой причине для пробоподготовки образцов использовали различные варианты разбавления и осаждения.

Пробоподготовку проб протамина сульфата проводили путем разбавления бидистиллированной водой в соотношениях:

1 : 1 — 1 мл протамина сульфата и 1 мл бидистиллированной воды;

1 : 2 — 1 мл протамина сульфата и 2 мл бидистиллированной воды.

Для получения необходимой pH среды использовали различные варианты осадителей белков, описанные в [6]. Для вариантов 1 и 2, с разным соотношением реагентов — осадителей белка, значение pH составляло 6.5, для варианта 3 — 7.5.

Растворы готовили в 3 вариантах:

1. Брали 1 мл раствора протамина сульфата, добавляли 7 мл бидистиллированной воды для гомогенизации, 1 мл 10% раствора вольфрамата натрия ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) в воде и 1 мл 0.335 М H_2SO_4 .

2. Брали 1 мл раствора протамина сульфата, добавляли 8 мл бидистиллированной воды для гомогенизации, 0.5 мл 10% раствора вольфрамата натрия ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) в воде и 0.5 мл 0.335 М H_2SO_4 .

3. Брали 1 мл раствора протамина сульфата, добавляли 7 мл бидистиллированной воды, 7 мл 10% раствора $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и 1 мл 0.5 М раствора NaOH.

После осаждения белков проводили центрифугирование растворов в течение 3 мин в центрифуге Multicentrifuge CM 6M со скоростью 3000 об./мин. После отделения белков центрифугированием в безбелковой части измеряли примесь ртути.

Определение содержания ртути в образцах протамина сульфата проводили с помощью методики, описанной в [7], методом инверсионной вольтамперометрии при следующих параметрах: время растворения 10 с, уровень вибрации на стадии растворения 6, время накопления 80 с, уровень вибрации на стадии накопления 9, время успокоения 5 с. Потенциал накопления -0.6 В, потенциал на этапе растворения 0.75 В, потенциал успокоения 0.35 В, что соответствует началу развертки потенциала, растворение концентрата ртути с поверхности электрода при постоянном

It is known that the solubility of proteins depends on many factors — the nature, composition and pH of the solvent, temperature, and others. For this reason, various dilution and sedimentation options were used for sample preparation.

The sample preparation of protamine sulfate samples was carried out by dilution with bidistilled water at the ratio:

1 : 1 — 1 ml protamine sulfate and 1 ml bidistilled water;

1 : 2 — 1 ml protamine sulfate and 2 ml bidistilled water.

To obtain the required pH of the medium, various options of protein precipitants described in [6] were used. For options 1 and 2, with different ratios of reagents — protein precipitants, the pH value was 6.5, for option 3 — 7.5.

The solutions were prepared in 3 options:

1. We took 1 ml of protamine sulfate solution, added 7 ml of bidistilled water for homogenization, 1 ml of 10% sodium tungstate solution ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) in water and 1 ml of 0.335 М H_2SO_4 .

2. We took 1 ml of protamine sulfate solution, added 8 ml of bidistilled water for homogenization, 0.5 ml of 10% sodium tungstate solution ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) in water and 0.5 ml of 0.335 М H_2SO_4 .

3. We took 1 ml of protamine sulfate solution, added 7 ml of bidistilled water, 7 ml of 10% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ solution and 1 ml of 0.5 М NaOH solution.

After precipitation of proteins, the solutions were centrifuged for 3 min in a Multicentrifuge CM 6M at a speed of 3000 rpm. After separation of proteins by centrifugation, the mercury impurity was measured in the protein-free part.

To determine the mercury content in protamine sulfate samples, we performed stripping voltammetry using the technique described in [7] with the following parameters: dissolution time — 10 s, vibration level at dissolution stage — 6, accumulation time — 80 s, vibration level at accumulation stage — 9, settling time — 5 s. The accumulation potential was -0.6 V, the potential at the dissolution stage — 0.75 V, and the settling potential — 0.35 V, which corresponds to the beginning of the potential sweep. At a constant current of potential sweep from 0.35 to 0.75 V, mercury concentrate from the electrode surface was dissolved at a rate of 40 mV/s.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the mercury detecting in protamine sulfate samples with preliminary sample preparation are presented in Table 1.

токе развертки потенциала от 0.35 до 0.75 В проходило со скоростью 40 мВ/с.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты определения ртути в образцах протамина сульфата с предварительной пробоподготовкой представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, содержание ртути в готовом лекарственном препарате и в образцах с предварительной пробоподготовкой значительно не отличается. При осаждении белков содержание возрастает, но при данных концентрациях примеси ртути это увеличение является незначительным. В связи с вышеизложенным можно сделать вывод, что предварительной пробоподготовки не требуется.

Чтобы оценить влияние ионов Cu^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} на содержание ртути в образцах протамина сульфата, в электрохимическую ячейку вносили 50 мкл пробы (раствор протамина сульфата), регистрировали аналитический сигнал пробы, затем вносили по 10 мкл растворов государственных стандартных образцов изучаемых ионов, регистрировали аналитический сигнал, после этого вносили 50 мкл раствора ртути с концентрацией 0.1 мг/л, регистрировали аналитический сигнал и оценивали результат.

Обычно для определения ионов Cu^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} используют ртутно-пленочный электрод. В нашем исследовании применялся золотоуглеродсодержащий электрод в качестве рабочего, электродом сравнения служил хлорсеребряный электрод. Поскольку золотоуглеродсодержащий электрод является селективным, предназначенным для определения ртути и мышьяка [8], то изучаемые катионы тяжелых металлов теоретически не могли помешать определению ртути.

Полученные результаты представлены в табл. 2 и на рис. 1–5.

As you can see from Table 1, the mercury levels in the finished pharmaceutical product and in the samples with preliminary sample preparation do not differ significantly. During the precipitation of proteins, the mercury content increases, but at given concentrations of mercury impurity, this increase is insignificant. In connection with the above, it can be concluded that preliminary sample preparation is not required.

To assess the effect of Cu^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} ions on the mercury level in protamine sulfate samples, we dispensed 50 μl of a sample (protamine sulfate solution) into the electrolytic cell, the analytical signal of the sample was recorded; then 10 μl of solutions of state standard samples of the studied ions were added, the analytical signal was recorded; then 50 μl of a mercury solution with a concentration of 0.1 mg/l was added, the analytical signal was recorded, and the result was evaluated.

A mercury film electrode is normally used to determine the Cu^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} ions. In this study, we used a gold-carbon electrode as a working one; a silver-chloride electrode served as a reference electrode. Since the gold-carbon electrode is selective and is designed to determine mercury and arsenic [8], the studied cations of heavy metals theoretically could not interfere with the detection of mercury.

The results obtained are presented in Table 2 and Fig. 1–5.

Data of Table 2 indicate that metal cations do not interfere with the determination of content of mercury in protamine sulfate. The mercury content in protamine sulfate with the addition of heavy metal cations differs quantitatively by a value that is within the range of acceptable error.

According to the product specification, namely the certificate of analysis for protamine sulfate,

Таблица 1. Содержание ртути в образцах протамина сульфата с различной пробоподготовкой
Table 1. Content of mercury in protamine sulfate samples with different sample preparation

Вариант пробоподготовки / Sample preparation option	Содержание ртути, мг/л Mercury content, mg/l
Протамина сульфат серии 514111 без пробоподготовки Protamine sulfate, batch 514111 without sample preparation	0.000423 ± 0.00121
Разбавление водой 1 : 2 / Dilution with water 1 : 2	0.000417 ± 0.00140
Разбавление водой 1 : 1 / Dilution with water 1 : 1	0.000420 ± 0.00152
Осаждение вольфрамом (вариант 1) Precipitation by tungstate (option 1)	0.000462 ± 0.00131
Осаждение вольфрамом (вариант 2) Precipitation by tungstate (option 2)	0.000459 ± 0.00121
Осаждение ZnSO_4 (вариант 3) / Precipitation by ZnSO_4 (option 3)	0.000533 ± 0.00113

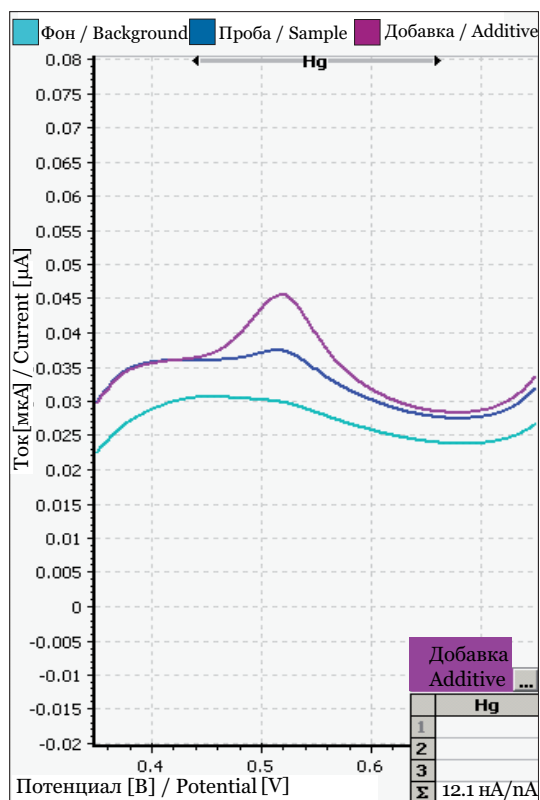


Рис. 1. Вольтамперограмма протамина сульфата с добавлением Cu^{2+}

Fig. 1. Voltammogram of protamine sulfate with the addition of Cu^{2+}

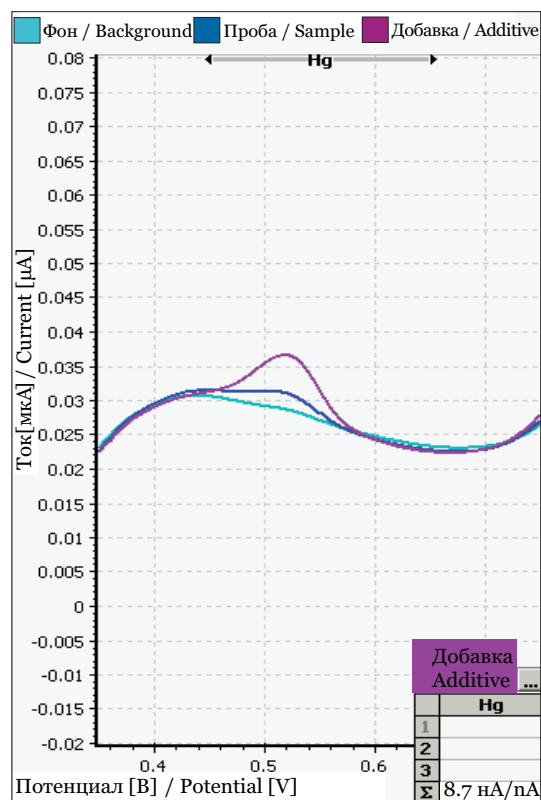


Рис. 2. Вольтамперограмма протамина сульфата с добавлением Pb^{2+}

Fig. 2. Voltammogram of protamine sulfate with the addition of Pb^{2+}

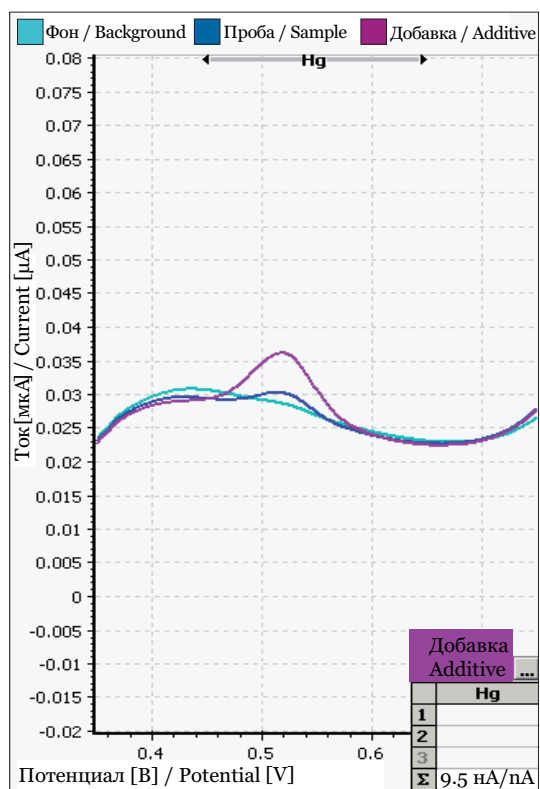


Рис. 3. Вольтамперограмма протамина сульфата с добавлением Zn^{2+}

Fig. 3. Voltammogram of protamine sulfate with the addition of Zn^{2+}

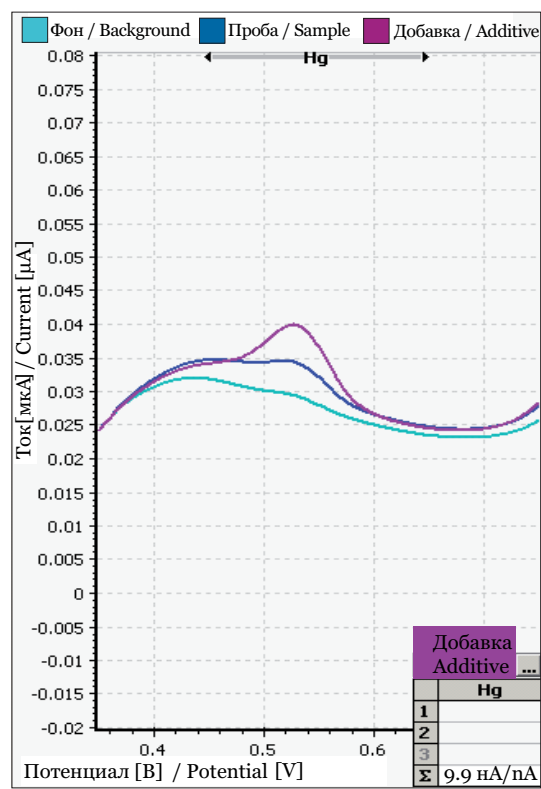


Рис. 4. Вольтамперограмма протамина сульфата с добавлением Cd^{2+}

Fig. 4. Voltammogram of protamine sulfate with the addition of Cd^{2+}

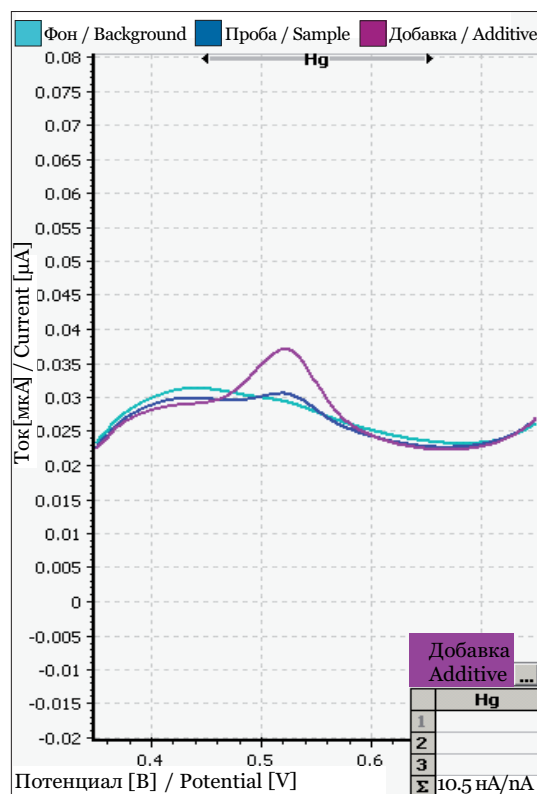


Рис. 5. Вольтамперограмма протамина сульфата с добавлением Fe^{2+}
Fig. 5. Voltammogram of protamine sulfate with the addition of Fe^{2+}

Таблица 2. Содержание ртути в образцах протамина сульфата различных серий при добавлении ионов Cu^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}

Table 2. Content of mercury in protamine sulfate samples of various batches when adding Cu^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}

Протамин сульфат / Protamine sulfate	Содержание ртути, мг/л Mercury content, mg/l
Без добавок / Without additives:	
сер. / b. 514062	0.000633 ± 0.00019
сер. / b. 515091	0.000471 ± 0.00015
сер. / b. 514111	0.000432 ± 0.00013
С добавлением Cu^{2+} / With the addition of Cu^{2+} :	
сер. / b. 514062	0.000606 ± 0.00015
сер. / b. 515091	0.000452 ± 0.00013
сер. / b. 514111	0.000412 ± 0.00011
С добавлением Pb^{2+} / With the addition of Pb^{2+} :	
сер. / b. 514062	0.000661 ± 0.00018
сер. / b. 515091	0.000483 ± 0.00018
сер. / b. 514111	0.000462 ± 0.00014
С добавлением Fe^{2+} / With the addition of Fe^{2+} :	
сер. / b. 514062	0.000651 ± 0.00019
сер. / b. 515091	0.000479 ± 0.00017
сер. / b. 514111	0.000455 ± 0.00012
С добавлением Zn^{2+} / With the addition of Zn^{2+} :	
сер. / b. 514062	0.000686 ± 0.00020
сер. / b. 515091	0.000492 ± 0.00019
сер. / b. 514111	0.000471 ± 0.00018
С добавлением Cd^{2+} / With the addition of Cd^{2+} :	
сер. / b. 514062	0.000658 ± 0.00022
сер. / b. 515091	0.000484 ± 0.00016
сер. / b. 514111	0.000460 ± 0.00017

Примечание. Сер. — серия.

Note. b. — batch number.

Как видно из представленных в табл. 2 данных, катионы металлов не оказывают мешающего влияния на определение содержания ртути в протамина сульфате. Содержание ртути в протамина сульфате при добавлении катионов тяжелых металлов количественно отличается на величину, которая входит в интервал допустимой ошибки.

Согласно нормативной документации, а именно сертификату анализа на протамина сульфат — примеси ртути должно быть ≤ 10 ppm (или 10 мг/л). Содержание ртути в изучаемых образцах соответствует требованиям нормативной документации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволяет сделать следующие выводы:

1. Для определения содержания ртути в образцах протамина сульфата специальная пробоподготовка не требуется.

2. Ионы Cu^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} не влияют на результаты определения содержания ртути в образцах протамина сульфата, что говорит о высокой избирательности используемой нами методики.

mercury impurity should be ≤ 10 ppm (or 10 mg/l). The content of mercury in the samples under study meets the requirements of the product specification.

CONCLUSION

The research results allow us to draw the following conclusions:

1. To determine the mercury content in protamine sulfate samples, special sample preparation is not required.

2. Ions of Cu^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} do not affect the results of determining the mercury content in protamine sulfate samples, which indicates a high selectivity of the procedure we used.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фелленберг Г. Загрязнение природной среды. Введение в экологическую химию: пер. с нем. М.: Мир, 1997. 232 с.
2. Flanagan R.J., Taylor A., Watson I.D. Fundamentals of Analytical Toxicology. Chichester: J. Wiley, 2007. 504 p.
3. D'Amore J.J., Al-Abed S.R., Scheckel K.G., Ryan J.A. Methods of speciation of metals in soils // J. Environ. Qual. 2005. Vol. 34 (5). P. 1707–1745.
4. Eirín-López J.M., Lewis J.D., Howe L.A., Ausió J. Common phylogenetic origin of protamine-like (PL) proteins and histone H1: Evidence from bivalve PL genes // Mol. Biol. Evol. 2006. Vol. 23 (6). P. 1304–1317.
5. Основы аналитической химии: в 2 т. / под ред. Ю.А. Золотова. 5-е изд., стер. М.: Академия, 2012. Т. 2. 409 с.
6. Справочник биохимика: пер. с англ. / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. М.: Мир, 1991. 544 с.
7. Ким Н.О., Ивановская Е.А. Определение микропримесей ртути в лекарственном средстве протамина сульфат методом инверсионной вольтамперометрии // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2019. Т. 8, № 2. С. 103–107.
8. Носкова Г.К., Захарова Э.А., Чернов В.И. и др. Свойства и применение золотоуглеродсодержащих композитных электродов в электрохимических методах анализа // Изв. Томск. политех. ун-та. 2012. Т. 320, № 3. С. 109–115.

REFERENCES

1. Fellenberg G. (1997). *Environmental Pollution. Introduction to Environmental Chemistry* (Trans. from Germ.). Moscow, 232 p. (Original work published 1990). In Russ.
2. Flanagan R.J., Taylor A., Watson I.D. (2007). *Fundamentals of Analytical Toxicology*. Chichester: J. Wiley, 504 p.
3. D'Amore J.J., Al-Abed S.R., Scheckel K.G., Ryan J.A. (2005). Methods of speciation of metals in soils. *J. Environ. Qual.*, 34 (5), 1707–1745.
4. Eirín-López J.M., Lewis J.D., Howe L.A., Ausió J. (2006). Common phylogenetic origin of protamine-like (PL) proteins and histone H1: Evidence from bivalve PL genes. *Mol. Biol. Evol.*, 23 (6), 1304–1317.
5. Zolotov Ya.A. (ed.) (2012). *Fundamentals of Analytical Chemistry*: in 2 vol. 5th ed. Moscow, 2, 409 p. In Russ.
6. Dawson R., Elliot D., Elliot W., Jones K. (1991). *Biochemist's Handbook* (Trans. from Engl.). Moscow, 544 p. In Russ.
7. Kim N.O., Ivanovskaja E.A. (2019). Determination of mercury impurities in protamine sulfate medicament by stripping voltammetry. *Drug Development and Registration*, 8 (2), 103–107. doi: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-103-107.
8. Noskova G.K., Zakharova E.A., Chernov V.I. et al. (2012). Properties and application of gold-carbon composite electrodes in electrochemical analysis methods. *Bulletin of Tomsk Polytechnic University*, 320 (3), 109–115.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Ким Надежда Олеговна — преподаватель кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Ивановская Елена Алексеевна — д-р фармацевт. наук, профессор, заведующий кафедрой фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Образец цитирования: Ким Н.О., Ивановская Е.А. Изучение влияния мешающих ионов тяжелых металлов и различной пробоподготовки на определение примеси ртути в протамина сульфате методом инверсионной вольтамперометрии // *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2021. № 1. С. 12–19.

ABOUT THE AUTHORS

Kim Nadezhda Olegovna — Lecturer, Department of Pharmaceutical Chemistry, Novosibirsk State Medical University.

Ivanovskaya Elena Alekseevna — Dr. Sci. (Pharmaceut.), Professor, Head, Department of Pharmaceutical Chemistry, Novosibirsk State Medical University.

Citation example: Kim N.O., Ivanovskaya E.A. (2021). Study of the influence of interfering ions of heavy metals and various sample preparation on the determination of mercury impurity in protamine sulfate by stripping voltammetry. *Journal of Siberian Medical Sciences*, 1, 12–19.



Сенсибилизация гепарином мю-рецепторов, инициированных фентанилом

Хомутов А.Е.¹, Дерюгина А.В.¹, Лизунова А.С.², Боброва З.В.³

¹ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

²ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Минздрава России

³ФГБУН Институт физиологически активных веществ РАН (г. Черноголовка)

Heparin sensitization of fentanyl initiated mu-receptors

[†] Khomutov A.E.¹, Deryugina A.V.¹, Lizunova A.S.², Bobrova Z.V.³

¹Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod

²Ryazan State Medical University n.a. academician I.P. Pavlov

³Institute of Physiologically Active Substances (Chernogolovka)

АННОТАЦИЯ

Гепарин является антикоагулянтом, широко применяемым в клинической практике. Помимо антикоагуляционной активности гепарин обладает цитостатическим, бактериостатическим, антилипемическим, радиопротективным действием, проявляет антиаллергический и гипотензивный эффекты. Гепарин модулирует кардиотропные, нейротропные, антигипоксические, антиишемические свойства регуляторных пептидов и фармакологических средств, применяющихся при обезболивании и наркозе. При этом крайне мало информации об антиноцицептивном действии гепарина.

Цель настоящей работы — изучение влияния гепарина при сочетанном применении с опиоидным агонистом фентанилом на мю-рецепторы на спинальном и супраспинальном уровнях. В опытах на лабораторных крысах установлено, что гепарин при предварительном и совместном введении с фентанилом увеличивает латентный период реакции отведения хвоста и реакции облизывания лап. Налоксон, являющийся антагонистом опиоидных рецепторов, снижает антиноцицептивную эффективность. Протамина сульфат также снижает уровень сенсибилизации гепарином опиоидных рецепторов.

Таким образом, полученные данные позволяют говорить о сенсибилизирующем действии гепарина на мю-опиоидные рецепторы, инициированные агонистом, на спинальном и супраспинальном уровнях.

Ключевые слова: гепарин, фентанил, налоксон, протамина сульфат, антиноцицептивное действие.

ABSTRACT

Heparin is an anticoagulant widely used in clinical practice. In addition to anticoagulant activity, heparin has a cytostatic, bacteriostatic, antilipemic, radioprotective effect, and exhibits antiallergic and hypotensive action. Heparin modulates cardiotropic, neurotropic, antihypoxic, anti-ischemic properties of regulatory peptides and pharmacological agents used in pain relief and anesthesia. At the same time, there is very little information about the antinociceptive effect of heparin.

The aim of this work is to study the effect of heparin in combination with the opioid agonist fentanyl on mu-opioid receptors at the spinal and supraspinal levels. In experiments on laboratory rats, it was established that heparin, when pre-administered and combined with fentanyl, increases the latency in the tail flick test and the paw licking test. Naloxone, an opioid receptor antagonist, reduces antinociceptive efficacy of the studied compounds. Protamine sulfate also reduces the level of heparin sensitization of opioid receptors.

Поступила 06.10.2020
Принята 15.11.2020

Автор, ответственный за переписку
Лизунова Алла Сергеевна: ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России. 390026, г. Рязань, ул. Высоковольная, 9.
E-mail: lizunova-alla@mail.ru

Received 06.10.2020
Accepted 15.11.2020

Corresponding author
Lizunova Alla Sergeyevna: Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov, 9, Vysokovoltynaya str., Ryazan, 390026, Russia.
E-mail: lizunova-alla@mail.ru

Thus, the obtained data allow us to speak about the sensitizing effect of heparin on initiated by an agonist mu-opioid receptors at the spinal and supraspinal levels.

Keywords: heparin, fentanyl, naloxone, protamine sulfate, antinociceptive action.

ВВЕДЕНИЕ

Гепарин, применяющийся в клинической практике как антикоагулянт первого выбора, обладает целым рядом свойств, выходящих за рамки антикоагулянтной системы [1]. Помимо антикоагуляционной активности гепарин обладает цитостатическим [2], бактериостатическим [3], антилипемическим [4], радиопротективным [5] действием, выявлены его антиаллергический [6] и гипотензивный [7] эффекты. Сравнительно недавно была показана способность гепарина связывать и инактивировать природные токсины, входящие в состав пчелиного яда и некоторых змеиных ядов [8], а также взаимодействовать с некоторыми фармакологическими веществами [9, 10].

Эффекты гепарина обусловлены различными механизмами. В частности, показано, что многие эффекты гепарина связаны с его способностью модулировать уровень ионов кальция (Ca^{2+}) [11]. Процесс повышения внутриклеточного уровня Ca^{2+} обусловлен тем, что вследствие активации фосфолипазы C происходит гидролиз фосфоинозитидов, в результате чего образуется инозитол-1,4,5-трифосфат (ИЗФ), который мобилизует выход внутриклеточного Ca^{2+} [12, 13]. Многие эффекты Ca^{2+} опосредованы белком кальмодулином, уровень которого может повышать цАМФ, что приводит к еще большему выходу Ca^{2+} из внутриклеточных резервов [11]. Гепарин оказывает выраженное гиперполяризующее действие и может изменять зарядность мембран, таким образом модулируя действие кальциевых каналов и регулируя уровень свободных ионов кальция, являющихся одним из важнейших индукторов выделения внутриклеточного Ca^{2+} [14].

Кроме того, у гепарина выявлена возможность образовывать комплексы с различными соединениями. Гепарин способен образовывать комплексы с положительно заряженными ионами металлов, катионами, в том числе органическими: K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , CH_3COO^- [15, 16]). Доказана способность гепарина образовывать комплексы с широким спектром аминокислот, белков, пептидов, ферментов, катионных соединений, при этом могут меняться как его собственные свойства, так и свойства веществ, вступающих с ним во взаимодействие [17–21]. Гепарин может образовывать комплексы с физи-

INTRODUCTION

Heparin, which is used in clinical practice as the first-line anticoagulant, has a number of properties that go beyond the anti-coagulant system [1]. In addition to anticoagulant activity, heparin has cytostatic [2], bacteriostatic [3], antilipemic [4], radioprotective [5] effects; its antiallergic [6] and hypotensive [7] action has been identified. Comparatively recently, the ability of heparin to bind and inactivate natural toxins that are a part of bee venom and some snake venoms [8], as well as interact with some pharmacological substances [9, 10], was shown.

The effects of heparin are due to various mechanisms. In particular, it was shown that many of these effects are associated with the ability to modulate the level of calcium ions (Ca^{2+}) [11]. The process of the intracellular Ca^{2+} level increase is due to the fact that, because of the activation of phospholipase C, the hydrolysis of phosphoinositides occurs, as a result inositol-1,4,5-triphosphate (Ins3P) is formed which mobilizes the release of intracellular Ca^{2+} [12, 13]. Many effects of Ca^{2+} are mediated by the protein calmodulin the level of which can increase cAMP, which leads to an even greater release of Ca^{2+} from intracellular reservoirs [11]. Heparin has a pronounced hyperpolarizing effect and can change the membranes' charge, thus modulating the action of calcium channels and regulating the level of free calcium ions which are one of the most important inducers of intracellular Ca^{2+} release [14].

In addition, it was revealed that heparin could form complexes with various compounds. Heparin is capable of complexing with positively charged metal ions, as well as cations, including organic ones: K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , CH_3COO^- [15, 16]. The ability of heparin to form complexes with a wide range of amino acids, proteins, peptides, enzymes, and cationic compounds has been proven, while both its own properties and the properties of substances interacting with it can change [17–21]. Heparin can form complexes with physiologically active peptides. The interaction of heparin with peptides can significantly affect various parts of the regulatory system. It was found that heparin influences the manifestation of some

ологически активными пептидами. Взаимодействие гепарина с пептидами может существенным образом отражаться на различных звеньях системы регуляции. Установлено, что гепарин *in vivo* влияет на проявление некоторых эффектов ряда регуляторных пептидов: адренокортикотропного гормона [22], тиролиберина [23], лутеинизирующего гормона, опиоидных пептидов [24], брадикинина, инсулина [25].

При этом в научной литературе крайне мало информации об антиноцицептивном действии гепарина. Косвенные данные позволяют только предполагать наличие этих свойств.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение влияния гепарина при сочетанном применении с опиоидным агонистом фентанилом на мю-рецепторы на спинальном и супраспинальном уровнях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на 112 нелинейных лабораторных крысах-самцах массой 200 ± 10 г, содержащихся на общем рационе vivария. Содержание и оперативные вмешательства осуществляли в соответствии с нормативами, представленными в Guide for Care and Use of Laboratory Animals, и требованиями приказа Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

В работе исследовали следующие препараты: 1) высокомолекулярный гепарин, производства ФГУП «Московский эндокринный завод», содержащий в 1 мл раствора 5000 МЕ (1 МЕ = 0.0077 мг); 2) фентанил, производства ФГУП «Московский эндокринный завод», содержащий в 1 мл раствора 0.05 мг сухого вещества, являющийся агонистом мю-рецепторов [26]; 3) протамин сульфат, производства ФГУП «Московский эндокринный завод», содержащий в 1 мл раствора 10 мг сухого вещества, являющегося блоком гепарина [27]; 4) налоксон, производства фармацевтического завода «Польфа» (Польша), 0.4 мг/мл, являющийся антагонистом опиоидных рецепторов [28]. Исследуемые вещества вводили внутрибрюшинно в объеме 1 мл в определенной последовательности, предусмотренной условиями опыта. Время между введениями было постоянным и составляло 10 мин.

В качестве объекта исследования влияния гепарина на чувствительность опиоидных рецепторов использовалась эндогенная ноцицептивная система. Ноцицептивные реакции оценивали по

effects of a number of regulatory peptides *in vivo*: adrenocorticotrophic hormone [22], thyroliberin [23], luteinizing hormone, opioid peptides [24], bradykinin, insulin [25].

At the same time, there is very little information on the antinociceptive effect of heparin in the scientific literature. Indirect data allow us only to assume the presence of these properties.

AIM OF THE RESEARCH

To study the effect of heparin in combination with the opioid agonist fentanyl on mu-receptors at the spinal and supraspinal levels.

MATERIALS AND METHODS

The study was carried out on 112 outbred laboratory male rats weighing 200 ± 10 g, kept on the standard diet of the vivarium. Animal management and surgical interventions were carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and the order of the Ministry of Health of the Russian Federation of April 1, 2016 No. 199n “On the approval of the Rules of good laboratory practice.”

The following drug preparations were studied in the experiment: 1) high molecular weight heparin, produced by the Moscow Endocrine Plant, containing 5000 IU in 1 ml of solution (1 IU = 0.0077 mg); 2) fentanyl, produced by the Moscow Endocrine Plant, containing 0.05 mg of dry matter in 1 ml of solution, which is an agonist of mu-receptors [26]; 3) protamine sulfate, produced by the Moscow Endocrine Plant, containing 10 mg of dry matter in 1 ml of solution, which is a heparin blocker [27]; 4) naloxone, produced by the Polfa S.A. (Poland), 0.4 mg/ml, which is an antagonist of opioid receptors [28]. The studied substances were injected intraperitoneally in a volume of 1 ml in a certain sequence, provided for by the conditions of the experiment. The time between injections was constant and amounted to 10 min.

The endogenous nociceptive system was used as an object of study of the effect of heparin on the sensitivity of opioid receptors. Nociceptive reactions were assessed by 2 standard tests, which allow to partly estimate the nature of the effect of substances mainly at the spinal (tail flick test (test I)) and supraspinal (hot plate test (test II)) levels [29]. The experiments were carried out on animals that underwent baseline testing, the initial nociceptive thresholds (baseline data) of which did not exceed 8 s in test I and 15 s in test II.

2 стандартным тестам, позволяющим до определенной степени судить о характере влияния веществ преимущественно на спинальном (тест отведения хвоста — tail flick (тест I)) и супраспинальном (тест «горячей пластины» — hot plate (тест II)) уровнях [29]. Опыты проводили на животных, прошедших фоновое тестирование, исходные ноцицептивные пороги (фон) которых в тесте I не превышали 8 с, в тесте II — 15 с.

Тест I основан на рефлекторной реакции отведения хвоста в ответ на нанесение болевого стимула в область верхней трети хвоста. Установка представляет собой следующее. Внутри специального футляра ($37 \times 20 \times 10$ см) помещался источник теплового излучения (кинопроекторная лампа со встроенным отражателем типа K21-150). Питание осуществлялось от источника постоянного тока с напряжением 4.5 В при токе в 2.7 А. Встроенный отражатель лампы позволяет получить сфокусированный световой поток, диаметр светового пятна составляет 6 мм. Температура в фокусе пучка устанавливалась на значениях, вызывающих у контрольных животных четкую аверсивную реакцию отведения хвоста с латентным периодом 5–8 с. Фокус светового пятна совпадал с отверстием на поверхности футляра. Животное (крыса) вручную фиксировалось на операционном поле футляра и на каретке подводилось к области светового пятна. Латентный период реакции отведения хвоста (ЛП РОХ) оценивался по секундомеру.

При оценке ноцицептивной реакции на супраспинальном уровне использовался тест II. Животное помещали на пластину, нагретую до 57–58 °С, температура поверхности пластины регулировалась термостатом. По секундомеру засекалось время от момента помещения животного на пластину до момента первого облизывания лап (задних), что и составляло латентный период реакции облизывания лапок (ЛП РОЛ). Максимальное время нахождения животного на пластине — 25 с. Анальгетический эффект оценивался в процентах от значений контрольной группы, принимаемой за 100 %.

Взаимодействие гепарина с исследуемыми веществами *in vitro* изучали фотоколориметрическим методом, а также по изменению спектров поглощения данных веществ и их смесей в УФ-области. Колориметрирование осуществляли на фотоэлектроколориметре КФК-3 с использованием синего светофильтра (400 нм).

Измерения спектров поглощения в УФ-области проводили на установке, функционально идентичной однолучевому спектрофотометру. Установка включала в себя источник света (водо-

Тест I is based on the tail withdrawal in response to a pain stimulus to the upper third of the tail. Test facility is as follows. A source of thermal radiation (a cinema projection lamp with a built-in reflector, type K21-150) was placed inside a special case ($37 \times 20 \times 10$ cm). Power was supplied from a direct current source with a voltage of 4.5 V and amperage of 2.7 A. The built-in lamp reflector gives a focused luminous flux with the diameter of the light spot being 6 mm. The temperature at the focus of the beam was set at the values causing a distinct aversive tail flick reaction in control animals with a latency of 5–8 s. The focus of the light spot coincided with the hole on the surface of the case. The animal (rat) was manually fixed on the operating field of the case and was brought to the area of the light spot on the carriage. The tail flick latency (TFL) was estimated using a stopwatch timer.

Test II was used to assess the nociceptive response at the supraspinal level. The animal was placed on a plate heated to 57–58 °C; the plate surface temperature was controlled by a thermostat. The stopwatch timer was used to record the time from the moment the animal was placed on the plate until the moment of the first paw licking (hind legs), which constituted the paw licking latency (PLL). The maximum time an animal was on the plate reached 25 s. The analgesic effect was assessed as a percentage of the values of the control group, taken as 100%.

The interaction of heparin with the test substances *in vitro* was studied by the photocolorimetric method, as well as by changes in the absorption spectra of these substances and their mixtures in the ultraviolet. Colorimetry was carried out on a KFK-3 photoelectric colorimeter using a blue light filter (400 nm).

Measurements of absorption spectra in the UV were carried out on an apparatus functionally identical to a single-beam spectrophotometer. The apparatus included a light source (hydrogen lamp or incandescent lamp), a MDR-12 monochromator with a stepping motor, a synchronous detector, a light-receiving chamber in which quartz cuvettes with solutions were located, and a photomultiplier connected to a computer for automatic data recording. The test substances were diluted in phosphate buffer (pH 7.2) or in distilled water, the extinction of solutions was measured with reference to solvents.

The significance of differences between groups was assessed directly by the variant values using

родная лампа или лампа накаливания), монохроматор МДР-12 с шаговым двигателем, синхронный детектор, светоприемную камеру, в которой размещались кварцевые кюветы с растворами, и фотомножитель, подключенный к компьютеру для автоматической регистрации данных. Исследуемые вещества разводили в фосфатном буфере (pH 7.2) или в дистиллированной воде, экстинкцию растворов измеряли относительно растворителей.

Достоверность различий между группами оценивалась непосредственно по значениям вариант с использованием непараметрического критерия Уилкоксона — Манна — Уитни для независимых совокупностей. Для множественных сравнений применяли критерий Данна [30]. Все экспериментальные работы проводились с учетом этических норм обращения с животными и отвечали требованиям Общества защиты животных [31, 32].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что внутрибрюшинное введение фентанила в дозе 0.1 мг/кг достоверно увеличивает длительность латентных периодов (ЛП) болевых реакций на спинальном уровне, особенно в течение первых 40 мин от момента введения, при этом ЛП РОХ превышает контрольные величины в 2–3 раза. Затем следует снижение антиноцицептивной реакции, и к 120-й мин ЛП РОХ возвращается к контрольным величинам. При регистрации болевой реакции на супраспинальном уровне максимальное увеличение ЛП РОЛ регистрируется на 150–180-й мин от момента инъекции (табл. 1).

При предварительном введении гепарина в дозах 50, 500 и 5000 МЕ/кг с последующей инъекцией фентанила в дозе 0.1 мг/кг в первые 40 мин наблюдается увеличение ЛП РОХ в 3–5 раз относительно контроля и в 1.5 раза относительно введения только фентанила. Следует отметить, что повышение порога болевой чувствительности имеет продолжительный характер и его снижение фиксируется на 150–180-й мин от момента инъекции (см. табл. 1).

Несколько иная картина наблюдается при оценке антиноцицептивной реакции на супраспинальном уровне. При тех же условиях опыта, при которых регистрировали ЛП РОХ, латентный период РОЛ при действии фентанила на фоне возрастающих доз гепарина достигает максимальных значений к 150–180-й мин от момента инъекции, в то время как ЛП РОХ в этот временной период снижается до контрольных величин (см. табл. 1).

the Wilcoxon-Mann-Whitney nonparametric test for independent populations. Dunn's test was used for multiple comparisons [30]. All experimental work was carried out taking into account the ethical standards of treatment of animals and met the requirements of the Society for the Protection of Animals [31, 32].

RESULTS AND DISCUSSION

It was found that intraperitoneal administration of fentanyl at a dose of 0.1 mg/kg significantly increases the duration of latencies (L) of pain reactions at the spinal level, especially during the first 40 min from the moment of administration, while TFL exceeds the control values by 2–3 times. This is followed by a decrease in the antinociceptive response, and TFL returns to the control values by the 120th min. When registering a pain reaction at the supraspinal level, the maximum increase of the PLL is recorded at 150–180th min from the moment of injection (Table 1).

With pre-administration of heparin at doses of 50, 500, and 5000 IU/kg followed by the injection of fentanyl at a dose of 0.1 mg/kg in the first 40 min, an increase of TFL is observed by 3–5 times relative to the control, and 1.5 times relative to the administration of fentanyl alone. It should be noted that the increase in the pain threshold has a long-term character, and its decrease is recorded at 150–180th min from the moment of injection (see Table 1).

A somewhat different picture is observed when assessing the antinociceptive response at the supraspinal level. Under the same experimental conditions as with the TFL recording, the latency of PL reflex under the action of fentanyl together with the increasing doses of pre-administered heparin, reaches its maximum values by 150–180th min from the moment of injection, while the TFL at this time period decreases to the control values (see Table 1).

The antinociceptive effect of fentanyl is reduced at both spinal and supraspinal levels by pre-administration of the opioid receptor blocker naloxone. At the spinal level, the TFL consistently decreases with time elapsed from the moment of administration, and by the 180th min it approaches the sub-control values. At the supraspinal level, the opposite picture is observed: the PLL increases by the end of the observation, amounting to 187.1% by the 150th min, which is significantly higher than the control values, the PLL values with the injection of fentanyl and TFL in the naloxone → fentanyl series. The administration of the test substances ac-

Таблица 1. Модуляция гепарином и налоксоном (1 мг/кг) антиноцицептивного действия фентанила (0.1 мг/кг) на спинальном и супраспинальном уровнях, %**Table 1.** Modulation by heparin and naloxone (1 mg/kg) of the antinociceptive action of fentanyl (0.1 mg/kg) at the spinal and supraspinal levels, %

Условия опыта / Experimental conditions	Время после введения веществ, мин Time after administration of substances, min						
	20	40	60	90	120	150	180
Контроль (физиол. р-р) / Control (saline)	100	100	100	100	100	100	100
Фентанил / Fentanyl:							
ЛП РОХ / TFL	304.6**	247.2*	119.1	155.3*	108.1	94.9	98.4
ЛП РОЛ / PLL	118.2*	155.6**	118.5	110.4*	77.7**	162.2**	166.7**
Гепарин (50 МЕ/кг) → фентанил: Heparin (50 IU/kg) → fentanyl:							
ЛП РОХ / TFL	300.3*	286.2**	160.8*	168.1*	232.5**	116.3	98.8
ЛП РОЛ / PLL	158.4*	168.8**	122.3	119.4*	84.9*	158.8**	174.7**
Гепарин (500 МЕ/кг) → фентанил: Heparin (500 IU/kg) → fentanyl:							
ЛП РОХ / TFL	496.1**	478.5**	275.2**	244.3**	158.6**	106.4	96.8
ЛП РОЛ / PLL	208.7**	101.5**	192.1**	115.6*	73.2**	160.7**	164.9**
Гепарин (5000 МЕ/кг) → фентанил: Heparin (5000 IU/kg) → fentanyl:							
ЛП РОХ / TFL	420.4**	412.3**	225.8**	273.8**	408.6**	210**	88.7
ЛП РОЛ / PLL	171.7**	218.9**	138.8**	131.1**	109.5*	242.5**	220.9**
Налоксон → фентанил / Naloxone → fentanyl:							
ЛП РОХ / TFL	121.6**	158.1**	146.3**	82.3*	134.2**	102.6	71.5
ЛП РОЛ / PLL	97.4*	95.5**	110.6*	131.5*	118.2*	187.1**	140.0**
Налоксон → гепарин → фентанил: Naloxone → heparin → fentanyl:							
ЛП РОХ / TFL	119.3*	148.1**	157.1**	148.7**	145.9**	140.0**	109.9
ЛП РОЛ / PLL	102.6*	103.4**	114.1*	123.3*	65.5**	150.0*	153.3*
Протамина сульфат (10 мг/кг) → фентанил: Protamine sulfate (10 mg/kg) → fentanyl:							
ЛП РОХ / TFL	108.5*	110.2*	118.9	112.0*	101.1	74.6**	89.3*
ЛП РОЛ / PLL	102.2	103.2*	112.4	117.3	64.8**	135.1**	130.2**

* Различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0.05$).The differences are statistically significant compared to the control ($p < 0.05$).* Различия статистически значимы по сравнению с серией «Фентанил» ($p < 0.05$).The differences are statistically significant compared to the fentanyl series ($p < 0.05$).

* Различия статистически значимы между ЛП РОХ и ЛП РОЛ.

The differences are statistically significant between the TFL and the PLL.

Антиноцицептивный эффект фентанила снижается на фоне предварительного введения блокатора опиоидных рецепторов налоксона как на спинальном, так и на супраспинальном уровнях. На спинальном уровне ЛП РОХ последовательно снижается с течением времени, прошедшего от момента введения, и к 180-й мин приближается к субконтрольным величинам. На супраспинальном уровне наблюдается обратная картина: ЛП РОЛ возрастает к концу наблюдения, составляя к 150-й мин 187.1 %, что достоверно выше контрольных величин, значений ЛП РОЛ при введении фентанила и ЛП РОХ в серии «Налоксон → фентанил». Введение исследуемых веществ по схеме «Налоксон → гепарин → фентанил» в определенной степени нивелировало антагонистическое действие налоксона на опиоид-

связи к налоксоном → гепарин → фентанил серии нейтрализовало антагонистическое действие налоксона на опиоидные рецепторы до определенной степени, однако, ни ТФЛ, ни PLL не достигли значений, полученных при введении фентанила в одиночку (см. Таблицу 1).

В серии экспериментов с регистрацией антиноцицептивного эффекта фентанила на спинальном и супраспинальном уровнях, роль эндогенного гепарина в реализации действия мю-опиоидных рецепторов агониста особенно выражена. Таким образом, блокада эндогенного гепарина протамином сульфатом в дозе 10 мг/кг сопровождается резким снижением ТФЛ и PLL, что указывает на несомненную роль эндогенного гепарина в реализации антиноцицептивного феномена фентанила.

ные рецепторы, однако ни ЛП РОХ, ни ЛП РОЛ не достигали значений, полученных при инъекции только фентанила (см. табл. 1).

В серии экспериментов с регистрацией антиноцицептивного действия фентанила на спинальном и супраспинальном уровнях особенно ярко проявляется роль эндогенного гепарина в реализации эффектов агониста мю-опиоидных рецепторов. Так, блокада эндогенного гепарина протамином сульфатом в дозе 10 мг/кг сопровождается резким снижением ЛП РОХ и ЛП РОЛ, что свидетельствует о несомненной роли эндогенного гепарина в реализации антиноцицептивного феномена фентанила.

Таким образом, гепарин в дозах 50, 500 и 5000 МЕ/кг потенцирует антиноцицептивное действие фентанила на спинальном и супраспинальном уровне, а протамин сульфат, блокируя эндогенный гепарин, снижает противоболевой эффект агониста опиоидных рецепторов. Сходный с протамином сульфатом эффект регистрируется и при предварительном введении налоксона, однако в данном случае происходит блокада опиоидных рецепторов по пути лиганд-рецепторного взаимодействия.

Для выяснения возможного взаимодействия гепарина с фентанилом *in vivo* была изменена последовательность введений исследуемых веществ. Если в предыдущей серии фентанил вводился на фоне действия гепарина, то в следующей серии гепарин инъецировался в виде смеси, приготовленной *in vitro* при инкубации в течение 30 мин при температуре 37 °С в соотношениях гепарин-фентанил 5 : 1, 50 : 1 и 500 : 1 (табл. 2). В качестве контроля была выбрана концентрация гепарина 500 МЕ/кг, при введении которой регистриро-

Thus, heparin at doses of 50, 500, and 5000 IU/kg potentiates the antinociceptive effect of fentanyl at the spinal and supraspinal levels, and protamine sulfate, blocking endogenous heparin, reduces the analgesic effect of an opioid receptor agonist. An effect similar to protamine sulfate is also recorded with the pre-administration of naloxone, but in this case, the blockade of opioid receptors occurs via the ligand-receptor interaction.

To elucidate the possible interaction of heparin with fentanyl *in vivo*, the sequence of the test substances administration was changed. If in the previous series fentanyl was administered in presence of the heparin action, then in the next series heparin was injected in the form of a mixture prepared *in vitro* during 30 min incubation at 37°C at the heparin-fentanyl ratios of 5 : 1, 50 : 1, and 500 : 1 (Table 2). As a control, the concentration of heparin of 500 IU/kg was chosen, the introduction of which showed the effects of maximum severity in the previous heparin (500 IU/kg) → fentanyl series (see Table 1).

It should be noted that heparin at a dose of 500 IU/kg also has an antinociceptive effect at the spinal level. The latency of tail flick reaction significantly differs from the control when registered at 40th, 60th and 120th min from the moment of injection (see Table 2).

Comparative characteristics of the two methods of administration of the studied compounds showed that in both cases the heparin potentiation of the antinociceptive action of fentanyl takes place. It is known from the literature [13] that when heparin interacts with bioactive substances, their

Таблица 2. Модуляция гепарином антиноцицептивного действия фентанила (0.1 мг/кг) на спинальном (ЛП РОХ) уровне, %

Table 2. Heparin modulation of the antinociceptive action of fentanyl (0.1 mg/kg) at the spinal (TFL) level, %

Условия опыта / Experimental conditions	Время после введения веществ, мин Time after administration of substances, min						
	20	40	60	90	120	150	180
Контроль (физиол. р-р) / Control (saline)	100	100	100	100	100	100	100
Гепарин (500 МЕ/кг) / Heparin (500 IU/kg)	94.2	125.2*	173.3*	88.4	169.2*	101.7	86.9
Фентанил (0.1 мг/кг) Fentanyl (0.1 mg/kg)	298.1*	230.8*	110.0	145.2*	101.8	90.9	98.4
Гепарин + фентанил / Heparin + fentanyl (5 : 1)	269.8*	275.7**	257.8**	251.3**	171.0**	105.5	96.7
Гепарин + фентанил / Heparin + fentanyl (50 : 1)	480.0**	485.4**	300**	269.2**	371.8**	161.4**	96.7
Гепарин + фентанил / Heparin + fentanyl (500 : 1)	406.8**	407.7**	355.5**	215.4**	405.1**	200**	88.7

* Различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0.05$).

The differences are statistically significant compared to the control ($p < 0.05$).

* Различия статистически значимы по сравнению с серией «Фентанил» ($p < 0.05$).

The differences are statistically significant compared to the Fentanyl series ($p < 0.05$).

валась максимальная выраженность эффектов в предыдущей серии «Гепарин (500 МЕ/кг) → фентанил» (см. табл. 1).

Следует отметить, что гепарин в дозе 500 МЕ/кг также обладает антиноцицептивным действием на спинальном уровне. Латентный период реакции отведения хвоста достоверно отличается от контроля при регистрации на 40-й, 60-й и 120-й мин от момента введения (см. табл. 2).

Сравнительная характеристика двух способов введения исследуемых веществ показала, что и в том и в другом случае имеет место потенцирование гепарином антиноцицептивного действия фентанила. Из литературы известно [13], что при взаимодействии гепарина с биологически активными веществами их активность изменяется в ту или другую сторону. Опираясь на полученные данные по предварительному и одновременному введению гепарина, можно предполагать, что комплексобразования между фентанилом и гепарином не происходит. Это предположение подкрепляется колориметрическим и спектрофотометрическим исследованием *in vitro* смеси гепарин-фентанил в соотношении 5 : 1, 50 : 1 и 500 : 1. Фотоэлектроколориметрическое исследование смеси гепарин-фентанил не выявило изменений оптической плотности относительно контроля, в качестве которого использовался раствор гепарина в концентрациях 50, 500 и 5000 МЕ/кг. Анализ спектров поглощения в УФ-области показал, что фентанил в концентрации 0.1 мг/мл характеризуется крутым пиком поглощения в области 0.210 мкм (рис. 1). Амплитуда пика не меняется при исследовании смеси гепарин-фентанил независимо от концентрации использованного гепарина и имеет однотипную кривую, которая для наглядности на рис. 1 представлена для смеси гепарин-фентанил (5 : 1). Опираясь на предыдущие данные, можно предполагать, что фентанил не взаимодействует *in vitro* с гепарином (см. рис. 1).

Агонист мю-опиоидных рецепторов фентанил обладает ярко выраженным антиноцицептивным действием на спинальном и супраспинальном уровне, на что указывает снижение величины ЛП РОХ и ЛП РОЛ при предварительном введении антагониста опиоидных рецепторов — налоксона. Анальгезия, связанная с действием агонистов, обусловлена формированием лиганд-рецепторного комплекса, в котором в качестве лиганда выступает фентанил [26].

Гепарин в дозе 500 МЕ/кг также обладает противоболевым действием, однако этот эффект значительно слабее, чем у фентанила. При термическом болевом воздействии на эксперимен-

activity changes in one direction or another. Based on the data for the pre- and simultaneous administration of heparin, it can be assumed that complexing reaction between fentanyl and heparin does not occur. This assumption is supported by colorimetric and spectrophotometric studies *in vitro* of the heparin-fentanyl mixture at the ratios of 5 : 1, 50 : 1, and 500 : 1. Photoelectrocolorimetric study of a mixture of heparin-fentanyl did not reveal changes in the optical density relative to the control, which was a solution heparin at concentrations of 50, 500, and 5000 IU/kg. Analysis of the UV absorption spectra has shown that fentanyl at a concentration of 0.1 mg/ml is characterized by a steep absorption peak in the range of 0.210 μm (Fig. 1). The peak amplitude does not change in the study of the heparin-fentanyl mixture, regardless of the heparin concentration used and has the same type of curve, which for clarity is shown for a mixture of heparin-fentanyl at the ratio 5 : 1 (see Fig. 1). Based on previous data, it can be assumed that fentanyl does not interact *in vitro* with heparin (see Fig. 1).

The mu-opioid receptor agonist fentanyl has a pronounced antinociceptive effect at the spinal and supraspinal levels, as indicated by a decrease in the TFL and PLL values with the pre-administration of the opioid receptor antagonist naloxone. Analgesia associated with the action of agonists is due to the formation of a ligand-receptor complex in which fentanyl acts as a ligand [26].

Heparin at a dose of 500 IU/kg also has an analgesic effect, but this effect is much weaker than that of fentanyl. On exposure to the thermal painful effects, when the nociceptive system of the experimental animals is activated, a stress response to this type of irritation is formed [33]. One of the components of the mechanism of the antistress heparin action is its antinociceptive effect revealed in our experiments [34].

The heparin relationships with mediator systems, including receptors, are of greater interest. It turned out that heparin affects the desensitization of opioid receptors, in an uncompetitive way inhibits the binding of the 3H⁺-N-allyl normetazocine opioids to sigma receptor in the microsomal fraction of rat brain and liver membranes. Heparin downregulates the phosphorylation of G-protein coupled opioid receptors (GPCR), and, as a consequence, reduces hyposensitization caused by the specific opioid agonist etorphin and D-Ala²-D-Leu⁵-enkephalin (DADLE); blocks the release of Ca²⁺ [24, 35]; like inositol-1,4,5-trisphosphate in-

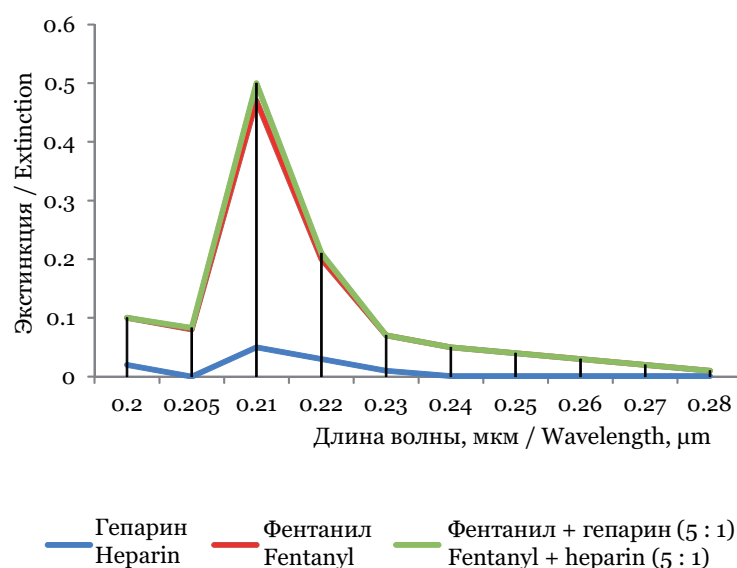


Рис. 1. Спектры поглощения фентанила, гепарина и их смеси в УФ-области
Fig. 1. UV absorption spectra of fentanyl, heparin and their mixtures

тальных животных, когда активируется ноцицептивная система организма, формируется стресс-реакция на данный вид раздражения [33]. Одним из компонентов механизма антистрессорного эффекта гепарина является обнаруженное в наших экспериментах антиноцицептивное действие этого препарата [34].

Большой интерес представляют взаимоотношения гепарина с медиаторными системами, в том числе и с рецепторами. Оказалось, что гепарин влияет на десенситизацию опиоидных рецепторов, подавляет неконкурентным способом связывание с сигма-рецептором опиоидов $3H^+$ -N-аллилнорметазоцина в микросомальной фракции мозга и мембран печени крыс. Гепарин уменьшает фосфорилирование опиоидных рецепторов, соединенных с G-белком (GPCR), и, как следствие, снижает гипосенсибилизацию, вызванную специфическим опиоидным агонистом эторфином и D-Ala₂-D-Leu₅-энкефалином (DADLE); блокирует выход Ca^{2+} [24, 35]; как и ингибитор инозитол-1,4,5-трисфосфат, гепарин тормозит развитие морфиновой толерантности. Развитие десенситизации, т. е. уменьшение чувствительности (гипосенсибилизация) и сокращение числа рецепторов на клеточной поверхности (интернализация), выявлено не только для опиоидных рецепторов, но и для других, также принадлежащих к GPCR, в частности β_2 - и α_2 -адренергических, для A₁-аденозиновых и м₂-мускариновых рецепторов [26]. Недавно были изучены рецепторы FMRFa-пептидов [36], они так-

же являются ингибиторами, гепарин hampers the development of morphine tolerance. The desensitization enhancement, i.e. a decrease in sensitivity (hyposensitization) and a decrease in the number of receptors on the cell surface (internalization), was revealed not only for opioid receptors, but for the others also belonging to the GPCR, in particular β_2 - and α_2 -adrenergic, as well as A₁-adenosine and m₂-muscarinic receptors [26]. Recently FMRFa-peptide receptors have been studied [36]; they also belong to the GPCR class. Heparin is a non-specific protein kinase blocker for opioid and β -adrenergic receptors. Perhaps, interacting with this type of receptor, heparin inhibits the desensitization process caused by the action of synthetic agonists, thereby increasing the sensitivity of the receptors to analgesics, as a result of which a lower dose is required to prolong the effect.

The study showed that heparin enhances the analgesic activity of the opioid agonist fentanyl in the tail flick test and paw licking test. This phenomenon has a multicomponent character since it involves both opioid and adrenergic mechanisms which are possibly separated in time. High heparin level is a necessary condition for the long-term functioning of the system through which the analgesic effect of opioid agonists is realized. It can be assumed that the endogenous heparin, the release of which occurs upon activation of the adrenergic system, affects the receptors of the opioid system and does not determine the interaction with the opioid agonist.

же относятся к классу GPCR. Гепарин является неспецифическим блокатором протеинкиназы для опиоидных и β -адренергических рецепторов. Возможно, взаимодействуя с данным видом рецепторов, гепарин тормозит процесс десенситизации, вызванный воздействием синтетических агонистов, тем самым повышая чувствительность рецепторов к анальгетикам, вследствие чего требуется меньшая доза для продления эффекта.

Проведенное исследование показало, что гепарин усиливает анальгетическую активность опиоидного агониста — фентанила в тесте отведения хвоста и облизывания лап. Данное явление носит многокомпонентный характер, поскольку в нем задействованы как опиоидные, так и адренергические механизмы, которые, возможно, разобщены во времени. Повышенное содержание гепарина — необходимое условие длительного функционирования системы, через которую реализуется обезболивающее действие опиоидных агонистов. Можно предположить, что эндогенный гепарин, выброс которого происходит при активации адренергической системы, воздействует на рецепторы опиоидной системы и не определяет взаимодействие с опиоидным агонистом.

Высокий уровень различий ЛП РОХ и ЛП РОЛ, возможно, связан с тем, что анальгезия на супраспинальном уровне обусловлена μ_1 -опиоидными рецепторами, а на спинальном уровне — μ_2 -рецепторами [26].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные экспериментальные данные позволяют говорить о сенситизирующем действии гепарина на мю-опиоидные рецепторы, инициированные агонистом — фентанилом, на

The high level differences between TFL and PLL are probably due to the fact that analgesia at the supraspinal level depends on μ_1 -opioid receptors, and at the spinal level — μ_2 -receptors [26].

CONCLUSION

The obtained data allow us to speak of the sensitizing effect of heparin on the mu-opioid receptors initiated by the agonist at the spinal and supraspinal levels. The pre-administration of the opioid receptor antagonist naloxone reduces both the antinociceptive effect of fentanyl and the analgesia caused by the combined use of heparin and fentanyl. Protamine sulfate, blocking endogenous heparin, reduces the aversive reaction latency (TFL and PLL) of rats to thermal pain stimulus, which indicates the potentiating effect of endogenous heparin.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

спинальном и супраспинальном уровнях. Предварительное введение антагониста опиоидных рецепторов налоксона снижает как антиноцицептивный эффект фентанила, так и анальгезию, вызванную сочетанным применением гепарина и фентанила. Протамин сульфат, блокируя эндогенный гепарин, снижает аверсивную реакцию (ЛП РОХ и ЛП РОЛ) крыс на термическое болевое воздействие, что говорит о потенцирующем действии эндогенного гепарина.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кондашевская М.В., Кудрин В.С., Клодт П.М. Новые аспекты действия гепарина // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2000. Т. 130, № 12. С. 613–616.
2. Mishra-Gorur K., Castellot J.J., jr. Heparin rapidly and selectively regulates protein tyrosine phosphorylation in vascular smooth muscle cells // J. Cell Physiol. 1999. Vol. 178 (2). P. 205–215.
3. Gori A.M., Pepe G., Attanasio M. et al. Tissue factor reduction and tissue factor pathway inhibitor release after heparin administration // Thromb. Haemost. 1999. Vol. 81 (4). P. 589–593.
4. Hakala J.K., Oörni K., Ala-Korpela M., Kovanen P.T. Lipolytic modification of LDL by phospholipase A2 induces particle aggregation in the absence and fusion in the presence of heparin // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1999. Vol. 19 (5). P. 1276–1283.

REFERENCES

1. Kondashevskaya M.V., Kudrin V.S., Klodt P.M. (2000). New aspects of the heparin action. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 130(12), 613–616. In Russ.
2. Mishra-Gorur K., Castellot J.J., jr. (1999). Heparin rapidly and selectively regulates protein tyrosine phosphorylation in vascular smooth muscle cells. *J. Cell Physiol.*, 178 (2), 205–215.
3. Gori A.M., Pepe G., Attanasio M. et al. (1999). Tissue factor reduction and tissue factor pathway inhibitor release after heparin administration. *Thromb. Haemost.*, 81 (4), 589–593.
4. Hakala J.K., Oörni K., Ala-Korpela M., Kovanen P.T. (1999). Lipolytic modification of LDL by phospholipase A2 induces particle aggregation in the absence and fusion in the presence of heparin. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19 (5), 1276–1283.

5. Лукашин Б.П., Софронов Г.А. Радиозащитное действие цистамина и гепарина в опытах на мышцах с различной резистентностью // Бюл. эксперимент. биологии и медицины. 1996. Т. 121, № 5. С. 544–546.
6. Lever R., Page C.P. Novel drug opportunities for heparin // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2002. Vol. 1 (2). P. 140–148.
7. Coombe D.R., Kett W.C. Heparan sulfate-protein interactions: therapeutic potential through structure-function insights // *Cell. Mol. Life Sci.* 2005. Vol. 62 (4). P. 410–424.
8. Хомутов А.Е., Пурсанов К.А. Биологические и клинические основы апитерапии: Монография. Н. Новгород, 2011. 400 с.
9. Пурсанов К.А., Хомутов А.Е., Бутылин А.Г. Влияние гепарина на антиноцицептивные свойства окситоцина // *Мед. альманах.* 2009. № 4 (9). С. 198–200.
10. Хомутов А.Е., Дерюгина А.В. Гепаринология: физиолого-биохимические и биомедицинские аспекты: Учеб. пособие. Н. Новгород, 2019. 620 с.
11. Yamamura H., Ohya S., Muraki K., Imaizumi Y. Involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate formation in the voltage-dependent regulation of the Ca^{2+} concentration in porcine coronary arterial smooth muscle cells // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2012. Vol. 342 (2). P. 486–496.
12. Кондашевская М.В. Современные представления о роли гепарина в гемостазе и регуляции ферментативной и гормональной активности // *Вестн. РАМН.* 2010. № 7. С. 35–43.
13. Кондашевская М.В. Роль гепарина в иммунных, воспалительных и репаративных процессах // *Клин. и эксперимент. морфология.* 2012. № 5. С. 64–70.
14. Németh K., Kurucz I. Suppression of Ca^{2+} influx by unfractionated heparin in non-excitable intact cells via multiple mechanisms // *Biochem. Pharmacol.* 2005. Vol. 69 (6). P. 929–940.
15. Феофанова М.А., Францева Ю.В., Журавлёв Е.В., Баранова Н.В., Потеха Е.В. Химические равновесия в системе ион CO_3^{2-} – гепарин – пролин // *Вестн. Тверского гос. ун-та.* 2014. № 2. С. 13–18.
16. Феофанова М.А., Францева Ю.В., Лапшин С.В. Комплексообразование в системе гепарин – ион металла // *Координационная химия.* 2012. Т. 38, № 5. С. 387–392.
17. Арсютлов О.В., Арсютлов В.П. Роль гистамина, серотонина, катехоламинов, гепарина, ксантиноксидазы в заживлении поврежденной во время операции брюшины // *Вестн. Чувашского ун-та.* 2013. № 3. С. 363–368.
18. Кудряшов Б.А. Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания. М.: Медицина, 1975. 488 с.
19. Кудряшов Б.А., Ляпина Л.А., Азиева Л.Д. Комплексное соединение гепарина с гистамином, его физико-химические и биологические свойства // *Вопр. мед. химии.* 1990. Т. 36, № 4. С. 55–57.
20. Ляпина Л.А., Мясоедов Н.Ф., Андреева Л.А. и др. Комплекс гепарина с пептидом Arg-Pro-Gly-Pro и его антикоагулянтно-фибринолитические и гипогликемические эффекты // *Изв. РАН. Серия биологическая.* 2012. № 1. С. 72–77.
5. Lukashin B.P., Sofronov G.A. (1996). Radioprotective effect of cystamine and heparin in experiments on mice with different resistance. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 121 (5), 544–546. In Russ.
6. Lever R., Page C.P. (2002). Novel drug opportunities for heparin. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 1 (2), 140–148.
7. Coombe D.R., Kett W.C. (2005). Heparan sulfate-protein interactions: therapeutic potential through structure-function insights. *Cell. Mol. Life Sci.*, 62 (4), 410–424.
8. Khomutov A.E., Pursanov K.A. (2011). *Biological and Clinical Foundations of Apitherapy*. Nizhny Novgorod, 400 p. In Russ.
9. Pursanov K.A., Khomutov A.E., Butylin A.G. (2009). The influence of heparin on antinociceptive properties of oxytocin. *Med. Almanac*, 4 (9), 198–200.
10. Khomutov A.E., Deryugina A.V. (2019). *Heparinology: Physiological, Biochemical and Biomedical Aspects: Tutorial*. Nizhny Novgorod, 620 p. In Russ.
11. Yamamura H., Ohya S., Muraki K., Imaizumi Y. (2012). Involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate formation in the voltage-dependent regulation of the Ca^{2+} concentration in porcine coronary arterial smooth muscle cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 342 (2), 486–496.
12. Kondashevskaya M.V. (2010). Modern views of the role of heparin in hemostasis and regulation of enzymatic and hormonal activities. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 7, 35–43.
13. Kondashevskaya M.V. (2012). The role of heparin in immune processes, inflammation and reparation. *Clin. and Experimental Morphology*, 5, 64–70.
14. Németh K., Kurucz I. (2005). Suppression of Ca^{2+} influx by unfractionated heparin in non-excitable intact cells via multiple mechanisms. *Biochem. Pharmacol.*, 69 (6), 929–940.
15. Feofanova M.A., Frantseva Yu.V., Zhuravlev E.V., Baranova N.V., Potekha E.V. (2014). Chemical equilibriums in the system CO_3^{2-} ion-heparin-proline. *Annals of the Tver State University*, 2, 13–18.
16. Feofanova M.A., Frantseva Yu.V., Lapshin S.V. (2012). Complexation in the heparin-metal ion system. *Russian Journal of Coordination Chemistry*, 38 (5), 387–392.
17. Arsyutov O.V., Arsyutov V.P. (2013). The role of histamine, serotonin, catecholamines, heparin, and xanthine oxidase in healing of peritoneum damaged during a surgery. *Bulletin of the Chuvash University*, 3, 363–368.
18. Kudryashov B.A. (1975). *Biological Problems of Regulation of the Liquid State of Blood and Its Coagulation*. Moscow, 488 p. In Russ.
19. Kudryashov B.A., Lyapina L.A., Azieva L.D. (1990). Complex compound of heparin with histamine, its physicochemical and biological properties. *Problems of Medical Chemistry*, 36 (4), 55–57. In Russ.
20. Lyapina L.A., Myasoedov N.F., Andreeva L.A. et al. (2012). A complex of heparin with the peptide arg-pro-gly-pro and its anticoagulative, fibrinolytic, and hypoglycemia effects. *Biology Bulletin*, 1, 72–77.
21. Lyapina L.A., Obergan T.Yu., Grigorieva M.E., Maistrenko E.S., Kalugina M.D. (2015). Comparative study of anticoagulant heparin compounds with amino ac-

21. Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю., Григорьева М.Е., Майстренко Е.С., Калугина М.Д. Сравнительные исследования антикоагулянтных соединений гепарина с аминокислотами — аланином, валином и глицином // *Международ. журн. прикладных и фундамент. исследований*. 2015. № 11. С. 412–415.
22. Иванова Д.М., Левицкая Н.Г., Андреева Л.А., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф. Сравнительное исследование анальгетической активности фрагмента АКТГ_{4–10} и его аналога семакса // *Бюл. эксперимент. биологии и медицины*. 2007. Т. 143, № 1. С. 4–12.
23. Хомутов А.Е., Пурсанов К.А., Перепелюк З.В. Модификация гепарином кардиотропных эффектов тиролиберина на модели изолированного сердца крысы после тотальной ишемии // *VIII Междунар. науч.-практ. конф. Прага*, 2012. С. 11–18.
24. Hasbi A., Allouche S., Sichel F. et al. Internalization and recycling of the delta-opioid receptor are dependent on a phosphorylation-dephosphorylation mechanism // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000. Vol. 293 (1). P. 237–247.
25. Ляпина Л.А., Пасторова В.Е., Ульянова А.М., Тарасов Ю.А. Участие гепариновых комплексов в регуляции гемостатической и инсулярной систем организма // *XVIII съезд физиологического общества им. И.П. Павлова: тез. докл. Казань*, 2001. С. 379–380.
26. Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Петров В.И. Рецепторы физиологически активных веществ. М.: Волгоград: Семь ветров, 1999. 640 с.
27. Дрозд Н.Н., Луньков А.П., Ильина А.В., Варламов В.П. Нейтрализация антикоагулянтной активности гепаринов конъюгатом кватернизированного хитозана с галловой кислотой // *Изв. Уфимского научного центра РАН*. 2018. № 3 (2). С. 7–12.
28. Судakov С.К., Башкатова В.Г., Колпаков А.А., Тригуб М.М. Периферическое введение лоперамида и метилналлоксона подавляет тревожность у крыс // *Бюл. эксперимент. биологии и медицины*. 2010. Т. 149, № 3. С. 244–246.
29. Перфилов Д.В., Баранов М.В., Черногоров Р.В. Способы оценки ноцицептивной чувствительности в экспериментальных исследованиях и клинике // *Успехи физиологических наук*. 2007. Т. 38, № 2. С. 75–80.
30. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999. 459 с.
31. Липатов В.А., Крюков А.А., Северинов Д.А., Саакян А.Р. Этические и правовые аспекты проведения экспериментальных биомедицинских исследований *in vivo*. Часть I // *Рос. мед.-биол. вестн. им. академика И.П. Павлова*. 2019. Т. 27, № 1. С. 80–92.
32. Липатов В.А., Крюков А.А., Северинов Д.А., Саакян А.Р. Этические и правовые аспекты проведения экспериментальных биомедицинских исследований *in vivo*. Часть II // *Рос. мед.-биол. вестн. им. академика И.П. Павлова*. 2019. Т. 27, № 2. С. 245–257.
33. Филаретова Л.П. Стресс в физиологических исследованиях // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2010. Т. 96, № 9. С. 924–935.
34. Кондашевская М.В., Кактурский Л.В. Нарушение адаптации при посттравматическом стрессовом расстройстве и его коррекция введением малых доз гепарина в эксперименте // *Клин. и эксперимент. морфология*. 2018. № 3. С. 63–68.
- ids – alanine, valine and glycine. *Intern. Journal of Applied and Fundamental Research*, 11, 412–415. In Russ.
22. Ivanova D.M., Levitskaya N.G., Andreeva L.A., Kamenskii A.A., Myasoedov N.F. (2007). Comparative study of analgesic activity of ACTH_{4–10} fragment and its analog semax. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 143 (1), 4–12. In Russ.
23. Khomutov A.E., Pursanov K.A., Perepeluyk Z.V. (2012). Modification of cardiotropic effects of thyroliberin with heparin in a model of an isolated rat heart after total ischemia. VIII International Scientific and Practical Conference, Praha, pp. 11–18. In Russ.
24. Hasbi A., Allouche S., Sichel F. et al. (2000). Internalization and recycling of the delta-opioid receptor are dependent on a phosphorylation-dephosphorylation mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 293 (1), 237–247.
25. Lyapina L.A., Pastorova V.E., Ulyanova A.M., Tarasov Yu.A. (2001). Participation of heparin complexes in the regulation of hemostatic and insular systems of the body. XVIII Congress of the Pavlov Russian Physiological Society, Kazan, pp. 379–380. In Russ.
26. Sergeev P.V., Shimanovskiy N.L., Petrov V.I. (1999). Receptors of physiologically active substances. Moscow, 640 p. In Russ.
27. Drozd N.N., Lun'kov A.P., Il'ina A.V., Varlamov V.P. (2018). Neutralization of the anticoagulant activity of heparin by conjugates quaternized chitosan with gallic acid. *Proceedings of the RAS Ufa Scientific Center*, 3 (2), 7–12.
28. Sudakov S.K., Bashkatova V.G., Kolpakov A.A., Trigub M.M. (2010). Peripheral administration of loperamide and methylnaloxone decreases the degree of anxiety in rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 149 (3), 244–246. In Russ.
29. Perfilov D.V., Baranov M.V., Chernogorov R.V. (2007). Methods for assessing nociceptive sensitivity in experimental studies and clinical practice. *Progress in Physiological Sciences*, 38(2), 75–80. In Russ.
30. Glants S. (1999). *Biomedical Statistics*. Moscow, 459 p. In Russ.
31. Lipatov V.A., Kryukov A.A., Severinov D.A., Saakyan A.R. (2019). Ethical and legal aspects of *in vivo* experimental biomedical research. Part I. *I.P. Pavlov Russian Medical and Biological Herald*, 27 (1), 80–92.
32. Lipatov V.A., Kryukov A.A., Severinov D.A., Saakyan A.R. (2019). Ethical and legal aspects of *in vivo* experimental biomedical research. Part II. *Pavlov Russian Medical and Biological Herald*, 27(2), 245–257.
33. Filaretova L.P. (2010). Stress in physiological studies. *Russian Journal of Physiology*, 96 (9), 924–935.
34. Kondashevskaya M.V., Kaktursky L.V. (2018). Adaptation abnormalities in posttraumatic stress disorder corrected by low dose heparin injections in an experiment. *Clin. And Experimental Morphology*, 3, 63–68.
35. Smith A., Surviladze Z., Gaudet E.A. et al. (2001). p110 β and p110 δ phosphatidylinositol 3-kinases up-regulate Fc ϵ RI-activated Ca²⁺ influx by enhancing inositol 1,4,5-trisphosphate production. *J. Biol. Chem.*, 276 (20), 17213–17220.

35. Smith A., Surviladze Z., Gaudet E.A. et al. p110 β and p110 δ phosphatidylinositol 3-kinases up-regulate Fc ϵ RI-activated Ca²⁺ influx by enhancing inositol 1,4,5-trisphosphate production // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276 (20). P. 17213–17220.
36. Хомутов А.Е., Пурсанов К.А., Лушников О.В., Перепелюк З.В. Потенцирование гепарином антиноцицептивного действия нейропептида FMRFa на супраспинальном уровне // Биомедицина. 2015. № 2. С. 73–79.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Хомутов Александр Евгеньевич — д-р биол. наук, профессор кафедры физиологии и анатомии Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского».

Дерюгина Анна Вячеславовна — д-р биол. наук, доцент, заведующий кафедрой физиологии и анатомии Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского».

Лизунова Алла Сергеевна — канд. биол. наук, доцент кафедры фармакогнозии ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Минздрава России.

Боброва Зоя Владимировна — младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФГБУН Институт физиологически активных веществ РАН (г. Черногловка).

Образец цитирования: Хомутов А.Е., Дерюгина А.В., Лизунова А.С., Боброва З.В. Сенситизация гепарином мю-рецепторов, инициированных фентанилом // Journal of Siberian Medical Sciences. 2021. № 1. С. 20–32.

36. Khomutov A.E., Pursanov K.A., Lushnikova O.V., Perepeluyk Z.V. (2015). Heparin potentiation of the antinociceptive action of the neuropeptide FMRFa at the supraspinal level. *Biomedicine*, 2, 73–79. In Russ.

ABOUT THE AUTHORS

***Khomutov Aleksandr Evgenievich** — Dr. Sci. (Biol.), Professor, Department of Physiology and Anatomy, Institute of Biology and Medicine, Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod.

Deryugina Anna Vyacheslavovna — Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor, Head, Department of Physiology and Anatomy, Institute of Biology and Medicine, Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod.

Lizunova Alla Sergeevna — Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of Pharmacognosy, Ryazan State Medical University n.a. academician I.P. Pavlov.

Bobrova Zoya Vladimirovna — Junior Researcher, Laboratory of Immunochemistry, Institute of Physiologically Active Substances (Chernogolovka).

Citation example: Khomutov A.E., Deryugina A.V., Lizunova A.S., Bobrova Z.V. (2021). Heparin sensitization of fentanyl initiated mu-receptors. *Journal of Siberian Medical Sciences*, 1, 20–32.

Эволюция условий труда на пылеопасных предприятиях Западной Сибири: 50-летние тренды

Потеряева Е.Л.¹, Логвиненко И.И.^{1,2}, Смирнова Е.Л.¹, Власов В.Г.³

¹ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России

²НИИ терапии и профилактической медицины — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (Новосибирск)

³ГБУЗ НСО «Государственная Новосибирская клиническая психиатрическая больница № 3»

Evolution of working conditions at dust-hazardous enterprises in Western Siberia: 50-year trends

Poteryaeva E.L.¹, Logvinenko I.I.^{1,2}, Smirnova E.L.¹, Vlasov V.G.³

¹Novosibirsk State Medical University

²Institute of Internal and Preventive Medicine (Novosibirsk)

³Psychiatric Care Hospital No. 3 (Novosibirsk)

АННОТАЦИЯ

Для выявления основных 50-летних трендов эволюции условий труда на пылеопасных предприятиях Западной Сибири проведен анализ санитарно-гигиенических характеристик условий труда работников при подозрении у них профессионального заболевания, выданных территориальными отделениями Роспотребнадзора 447 пациентам с установленным диагнозом «пневмокониоз» в период с 1960 по 2010 г., а также ретроспективный анализ динамики изменений условий труда по данным отчетов о научно-исследовательской работе НИИ гигиены (г. Новосибирск) за период 1930–1960 гг. Наиболее опасные по риску развития силикоза условия труда в 1950-е годы наблюдались у пескоструйщиков, подвергавшихся воздействию вновь образованных модификаций кремнезема в концентрациях 20–340 мг/м³. С 1970-х годов на промышленных предприятиях Новосибирска и Новосибирской области произошло значительное снижение уровней запыленности (в десятки и сотни раз) — до 4–40 мг/м³. В последнее десятилетие XX в. на ряде предприятий сократились объем производств и суммарное рабочее время, в течение которого происходил непосредственный контакт с промышленными аэрозолями, а доля класса условий труда 3.4 уменьшилась в 2.49 раза ($p \leq 0.001$). Произошло изменение условий труда на производствах огнеупорных материалов и керамических изделий. На электросварщиков при всех видах ручной сварки оказывалось комбинированное воздействие вредных профессиональных факторов без существенных изменений уровней промышленных аэрозолей на рабочих местах.

Ключевые слова: эволюция условий труда, пылеопасные предприятия, пневмокониоз, промышленные аэрозоли.

ABSTRACT

To identify the main 50-year trends in evolution of working conditions at dust-hazardous enterprises in Western Siberia, the sanitary and hygienic characteristics of working conditions of staff with suspected occupational diseases, issued by the regional offices of The Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Wellbeing (Rospotrebnadzor) to 447 patients with pneumoconiosis diagnosed from 1960 to 2010 were analyzed, as well as a retrospective analysis of the dynamics of changes in working conditions according to the research reports of the Novosibirsk Research Institute of Hygiene for the period 1930–1960 was made. In the 1950s the most harmful silicotic working conditions were observed in sandblasters exposed to newly formed modifications of silica in concentrations of 20–340 mg/m³. Since the 1970s, in-

Поступила 25.12.2020
Принята 21.01.2021

Автор, ответственный за переписку
Смирнова Елена Леонидовна: ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. 630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52.
E-mail: smelet@mail.ru

Received 25.12.2020
Accepted 21.01.2021

Corresponding author
Smirnova Elena Leonidovna: Novosibirsk State Medical University, 52, Krasny Prospect, Novosibirsk, 630091, Russia.
E-mail: smelet@mail.ru

dustrial enterprises in Novosibirsk and the Novosibirsk Region have experienced a significant decrease in dustiness levels (by tens and hundreds of times) — up to 4–40 mg/m³. In the last decade of the XX century, at a number of enterprises, the volume of production and the overall working time, during which there was direct contact with industrial aerosols, decreased, and the proportion of 3.4 class working conditions over the last decade decreased by 2.49 times ($p \leq 0.001$). There was a change in working conditions for the production of refractory materials and ceramic products. Electric welders with all types of manual welding were exposed to a combined effect of hazardous occupational factors without significant changes in the levels of industrial aerosols in the workplace.

Keywords: evolution of working conditions, dust-hazardous enterprises, pneumoconiosis, industrial aerosols.

ВВЕДЕНИЕ

Перспективы развития страны, ее экономический рост и повышение благосостояния населения во многом зависят от уровня физического и духовного здоровья людей, их профессиональной активности и долголетия, сохранение которых является одной из основных задач общества, важнейшей функцией государства и основой его социальной политики. Для оценки меры воздействия факторов трудовой деятельности и предупреждения их неблагоприятного влияния на организм работающих используется нормирование вредных производственных факторов (установление предельно допустимых концентраций (ПДК) химических веществ в воздухе рабочей зоны).

Оценка условий труда во время Великой Отечественной войны и послевоенные годы затруднена, так как ранее в официальных документах не всегда указывались реальные величины концентраций пыли. В то же время уже в 30–60-х годах XX в. проводились научные работы по изучению запыленности на предприятиях горнодобывающей [1, 2], металлургической [3, 4], энергетической [5] промышленности, машиностроения [6], производства строительных материалов [7].

Крайне высокую запыленность воздуха (превышение ПДК в десятки и сотни раз) в литейном и мартеновском цехах обуславливали применявшиеся до 60-х годов XX в. технологические процессы, отсутствие должной изоляции и герметизации оборудования, неэффективность вентиляционных систем [8, 9]. Механизация и энерговооруженность угольной промышленности облегчили труд горнорабочих, но привели к возрастанию (во много раз) уровней запыленности и повышению дисперсности угольно-породной пыли. Это и обусловило в 70-е годы XX в. резкий рост заболеваемости пневмокониозами у работников угольной промышленности [10].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выявить основные 50-летние тренды эволюции условий труда на пылеопасных предприятиях Западной Сибири.

INTRODUCTION

The prospects of the country's development, its economic growth and the improvement of the human wellbeing largely depend on the level of physical and mental health of people, their professional activity and longevity the preservation of which is one of the main objectives of society, the most important function of the state and the basis of its social policy. To assess the severity of the impact of working activity factors and prevent their unfavorable health effect in workers, the rate setting of harmful occupational factors is used (setting the maximum permissible concentration (MPC) of chemicals in the air of the working area).

An assessment of working conditions during the World War II and post-war years was difficult since earlier official documents did not always indicate the actual value of dust concentrations. At the same time, already in the 30–60s of XX century a scientific research on the dustiness in mining [1, 2], metals [3, 4], energy [5] sectors of industry, machinery [6], construction materials production [7] was carried out.

Technological processes used until the 60s of the XX century, the lack of proper insulation and packaging of equipment, and the inefficiency of ventilation systems caused extremely high dustiness of the air (exceeding the MPC by tens and hundreds of times) in the foundry and open-hearth shop [8, 9]. The mechanization and power availability of the coal industry made the work of miners easier, but led to an increase (many times) in the levels of dustiness and the dispersion of coal rock dust. This led to a sharp increase in the incidence of pneumoconiosis in coal industry workers in the 70s of the XX century [10].

AIM OF THE RESEARCH

To reveal the main 50 year trends in the evolution of working conditions at dust-hazardous enterprises in Western Siberia.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Анализировали санитарно-гигиенические характеристики условий труда работников при подозрении у них профессионального заболевания, выданные территориальными отделениями Роспотребнадзора 447 пациентам с установленным диагнозом «пневмокониоз» в период с 1960 по 2010 г.; оценивали профессиональный маршрут, стаж работы и удельный вес занятости рабочего времени в условиях воздействия вредных веществ и неблагоприятных производственных факторов, данные лабораторных и инструментальных исследований состояния производственной среды на рабочих местах. Общая оценка условий и характера труда работающих проведена согласно Р 2.2.2006-05 [11]. Также проведен ретроспективный анализ динамики изменений условий труда на пылеопасных предприятиях Западной Сибири по данным отчетов о научно-исследовательской работе НИИ гигиены (г. Новосибирск) за период 1930–1960 гг.

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием стандартных математико-статистических методов с предварительной проверкой законов распределения переменных. Доверительный интервал $> 95\%$ принимался как статистически значимый. Различия считались достоверными при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение средних уровней пылевых нагрузок на рабочих местах пациентов, заболевших пневмокониозом, выявило значимые различия в зависимости от вида воздействующего промышленного аэрозоля в динамике 50-летнего периода: значительное снижение высоко- и умеренно-фиброгенных аэрозолей дезинтеграции, превышающих ПДК (в 5–350 раз) ($p \leq 0.0001$) (табл. 1).

На электросварщиков при всех видах ручной сварки, осуществляемой с применением электродов «Комсомолец-100», помимо сварочного аэрозоля, состоящего из окислов марганца, железа, меди, озона, диоксида азота, фтористого водорода, превышающего ПДК в десятки (2–57) раз, и высоко- и умеренно-фиброгенных аэрозолей конденсации (значимо не изменившихся), воздействовал комплекс неблагоприятных факторов, включающий ультрафиолетовую и инфракрасную радиацию (величина интегрального потока 400–1950 кал/см² · с), производственный шум (до 110 дБ) и вибрацию, неблагоприятный микроклимат, варьировавший в широких пределах, в зависимости от технологического процесса и времени года.

MATERIALS AND METHODS

We analyzed sanitary and hygienic characteristics of working conditions of employees with suspected occupational diseases, issued by the regional offices of The Federal Service for Surveillance on Consumer Right Protection and Wellbeing (Rospotrebnadzor) to 447 patients with the confirmed diagnosis of pneumoconiosis from 1960 to 2010; evaluated the occupational history, years of service and the proportion of working time employed under exposure to harmful substances and adverse occupational factors, data from laboratory tests and instrumental examination of the workplace environment. The general assessment of the working conditions and nature of the workers labor was carried out according to the Guidelines [11]. A retrospective analysis of the dynamics of changes in working conditions at dust-hazardous enterprises in Western Siberia was also carried out according to the reports of the Research Institute of Hygiene (Novosibirsk) for the period 1930–1960.

Statistical analysis of the obtained data was carried out using standard mathematical and statistical methods with a preliminary check of the laws of distribution of variables. A confidence interval of more than 95% was assumed to be statistically significant. The differences were considered significant at $p \leq 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

The analysis of the mean levels of dust loads at the workplaces of patients with pneumoconiosis revealed significant differences depending on the type of acting industrial aerosol in the dynamics of the 50-year period: a significant decrease in the high and moderate fibrogenic aerosols of disintegration exceeding the MPC (5–350 times) ($p \leq 0.0001$) (Table 1).

In all types of manual welding carried out with the use of “Komsomolets-100” electrodes, in addition to welding aerosol consisting of oxides of manganese, iron, copper, ozone, nitrogen dioxide, hydrogen fluoride, exceeding the MPC by tens (2–57) of times, and high and moderate fibrogenic aerosols of condensation (not changed significantly), the electric welders were exposed to a wide range of adverse factors, including ultraviolet and infrared radiation (the integral flow of 400–1950 cal/cm² · s), occupational noise (up to 110 dB) and vibration, unfavorable microclimate, which varied widely, depending on the technological process and the time of year.

Таблица 1. Уровни пылевых нагрузок на рабочих местах пациентов с пневмокониозом в динамике 50-летнего (1960–2010 гг.) периода наблюдения (мг/м³) и кратность превышения ПДК (раз)**Table 1.** The levels of dust loads at the workplaces of patients with pneumoconiosis in the dynamics of the 50 year (1960–2010) observation period (mg/m³) and the multiplicity of exceeding the MPC (times)

Пациенты с пневмокониозами, работавшие в условиях воздействия Patients with pneumoconiosis who worked under exposure to	1960–1969 (n = 85)	1970–1979 (n = 155)	1980–1989 (n = 97)	1990–1999 (n = 71)	2000–2010 (n = 39)
Сварочного аэрозоля Welding aerosol (n = 75)	14.0 ± 10.16 (7–26)	13.87 ± 8.88 (5–42)	13.10 ± 9.83 (2–36)	16.12 ± 12.82 (4–57)	5.67 ± 4.18 (2–12)
Угольно-породной пыли Coal rock dust (n = 109)	23.17 ± 9.55 (5–43)	16.31 ± 11.57 (5–73)	14.92 ± 9.76 (6–40)	14.19 ± 9.62 (4–50)	7.89 ± 2.79 (5–10)
Высоко- и умеренно-фиброгенных аэрозолей дезинтеграции High and moderate fibrogenic aerosols of disintegration (n = 213)	66.81 ± 81.11 (6–340)	74.03 ± 92.17 (3–300)	46.36 ± 55.63 (1–225)	20.49 ± 31.33 (1–130)	13.66 ± 14.81 (2–55)
Высоко- и умеренно-фиброгенных аэрозолей конденсации High and moderate fibrogenic aerosols of condensation (n = 50)	23.10 ± 13.59 (4–55)	16.59 ± 6.63 (7–30)	15.80 ± 10.32 (2–36)	31.36 ± 34.33 (3–98)	20.00 ± 20.53 (4–63)
Всех видов пылей / All types of dust (n = 447)	51.59 ± 69.31 (4–340)	43.80 ± 70.66 (3–300)	27.25 ± 39.11 (1–225)	17.82 ± 21.12 (1–130)	13.12 ± 14.69 (2–63)

Примечание. В скобках указана кратность превышения ПДК.

Note. The MPC exceedance factor see in parenthesis.

Оценка эволюции условий труда за 50-летний период позволила установить, что наиболее отчетливо тренд на снижение пылевых нагрузок (в 4.89 раза) прослеживался на рабочих местах пациентов с пневмокониозами от воздействия высоко- и умеренно-фиброгенных аэрозолей дезинтеграции, а самые неблагоприятные условия труда наблюдались до конца 70-х годов XX в.: преобладал класс условий труда 3.4, доля которого за последнее десятилетие уменьшилась в 2.49 раза ($p \leq 0.001$) (рис. 1).

Сварочный аэрозоль и угольно-породная пыль после 2000 г. практически не содержали свободной двуокиси кремния, а их концентрации превышали ПДК не более чем в 10 раз, класс условий труда 3.1 практически отсутствовал. Значимые различия, зависящие от характера пылевого фактора ($p \leq 0.001$), выявлены у работающих в условиях классов 3.4 ($p \leq 0.0001$) и 3.2 ($p \leq 0.05$) (рис. 2).

Наиболее неблагоприятные условия труда (высокие концентрации пыли и ее фиброгенность), вызвавшие развитие пневмокониозов от воздействия высоко- и умеренно-фиброгенных аэрозолей дезинтеграции, по нашим данным, наблюдались у пескоструйщиков, работников керамического и огнеупорного производств, каменных карьеров. При производстве огнеупор-

An assessment of the working conditions evolution over the 50-year period allowed us to establish that the most distinct trend for reducing dust loads (4.89 times) was observed in the workplaces of patients with pneumoconiosis from exposure to high and moderate fibrogenic aerosols of disintegration, and the most unfavorable working conditions were observed until the end of the 70s of the XX century: the proportion of the prevailing 3.4 class working conditions have decreased by 2.49 times ($p \leq 0.001$) over the last decade (Fig. 1).

After 2000, the welding aerosol and coal rock dust hardly contained free silicon dioxide, and their concentrations exceeded the MPC by no more than 10 times, the 3.1 class of working conditions was almost absent. Significant differences, depending on the nature of the dust factor ($p \leq 0.001$), were found in workers who had the 3.4 class ($p \leq 0.0001$) and 3.2 class ($p \leq 0.05$) of working conditions (Fig. 2).

According to our data, the most unfavorable working conditions (high dust concentrations and its fibrogenicity), which caused the development of pneumoconiosis from exposure to high and moderate fibrogenic aerosols of disintegration, were observed in sandblasters, workers of ceramic and

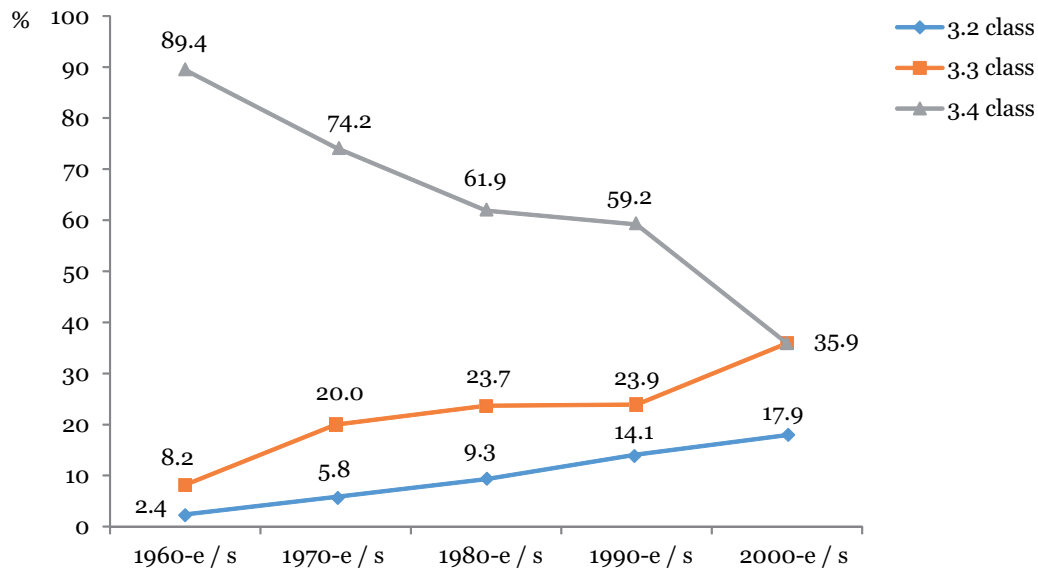


Рис. 1. Динамика классов условий труда у пациентов с пневмокониозами в течение 50-летнего периода
Fig. 1. Dynamics of working conditions classes in patients with pneumoconiosis over the 50-year period

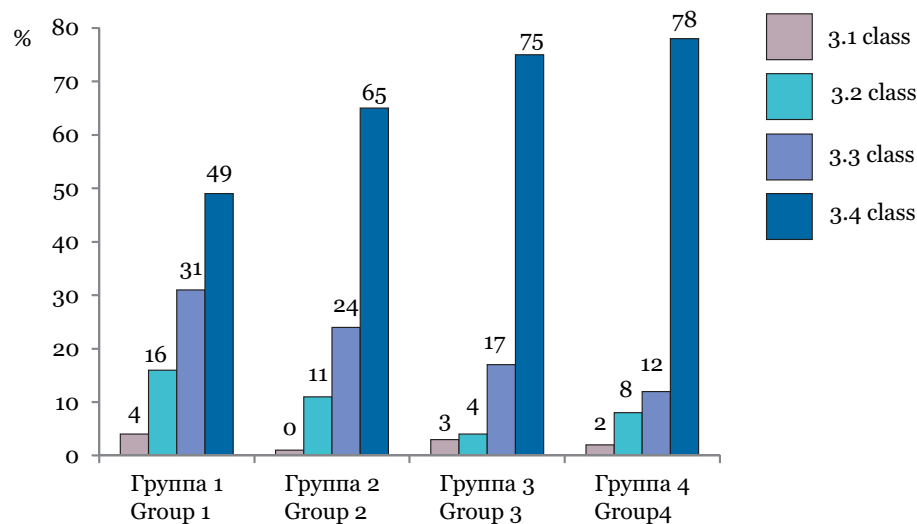


Рис. 2. Удельный вес классов условий труда у пациентов с пневмокониозами в зависимости от вида промышленных аэрозолей
 (группа 1 — работа в условиях воздействия сварочного аэрозоля;
 группа 2 — работа в условиях воздействия угольно-породной пыли;
 группа 3 — работа в условиях воздействия высоко- и умеренно-фиброгенных аэрозолей дезинтеграции;
 группа 4 — работа в условиях воздействия высоко- и умеренно-фиброгенных аэрозолей конденсации)
Fig. 2. The proportion of the working conditions classes in patients with pneumoconiosis depending on the type of industrial aerosols
 (group 1 — work under exposure to welding aerosol; group 2 — work under exposure to coal rock dust;
 group 3 — work under exposure to high and moderate fibrogenic aerosols of disintegration;
 group 4 — work under exposure to high and moderate fibrogenic aerosols of condensation)

ных материалов и керамических изделий регистрировалась высоко-дисперсная кварцсодержащая пыль (15–75 % свободной двуокиси кремния), превышающая ПДК (1.0–2.0 мг/м³) в десятки и сотни (от 5 до 289) раз в сочетании с не-

refractory industries, stone quarries. In the refractory processing and ceramic ware, microsilica with quartz (15–75% free silicon dioxide) exceeding the MPC (1.0–2.0 mg/m³) by tens and hundreds (from 5 to 289) times in combination with an unfavorable

благоприятным микроклиматом (высокая температура воздуха рабочей зоны) и токсичными газами (преимущественно оксид углерода и сернистый газ). При контакте с огнеупорными материалами (шамот, диас) в 50-е годы XX в. концентрации пыли в воздухе рабочей зоны превышали ПДК в десятки и сотни раз [8]. Наиболее опасные по риску развития силикоза условия труда, по мнению В.Л. Боннер, Е.П. Гладышевой [12], также отмечались у пескоструйщиков, подвергавшихся воздействию вновь образованных модификаций кремнезема (содержание свободной двуокиси кремния не менее 90 %, ПДК пыли 1 мг/м³) в непосредственной близости от источника пылеобразования в концентрациях 20–340 мг/м³.

Наиболее высокие пылевые нагрузки наблюдались до конца 70-х годов XX в. ($p \leq 0.0001$). Удельный вес рабочих мест пациентов с установленным диагнозом «пневмокониоз», на которых концентрации пыли превышали ПДК более чем в 20 раз, уменьшился в 4.81 раза и составил в первом десятилетии XXI в. 15.4 %. Доля рабочих мест, на которых концентрации пыли превышали ПДК в 10–19 раз, была достаточно стабильной в динамике и составила в последнем десятилетии 56.4 % (рис. 3).

Удельный вес рабочих мест, концентрации пыли на которых превышали ПДК до 5 раз, возрос в 11.25 раза и составил в первом десятилетии XXI века 28.2 %. Последний случай впервые установленного пневмокониоза у шлифовщиков сухой шлифовки зарегистрирован в 2004 г. Этому способствовало значительное сокращение пы-

microclimate (high air temperature of the working area) and toxic gases (mainly carbon monoxide and sulfur dioxide) were recorded. In contact with refractory materials (chamotte, ganister) in the 50s of the XX century, dust concentrations in the air of the working area exceeded the MPC by tens and hundreds of times [8]. According to V.L. Bonner and E.P. Gladysheva [12], the most hazardous silicotic working conditions were also observed in sandblasters who were exposed to newly formed modifications of silica (content of free silicon dioxide at least 90%, the MPC of dust of 1 mg/m³) in close proximity of the dust source in concentrations of 20–340 mg/m³.

The highest dust loads were observed until the end of the 70s of the XX century ($p \leq 0.0001$). The proportion of workplaces of patients with a confirmed diagnosis of pneumoconiosis, where dust concentrations exceeded the MPC by more than 20 times, decreased by 4.81 times and amounted to 15.4% in the first decade of the XXI century. The proportion of workplaces, where dust concentrations exceeded the MPC by 10–19 times, was quite stable in dynamics and amounted to 56.4 % in the last decade (Fig. 3).

The proportion of workplaces, where dust concentrations exceeded the MPC up to 5 times, increased by 11.25 times and amounted to 28.2% in the first decade of the XXI century. The last case of newly diagnosed pneumoconiosis in dry grind-

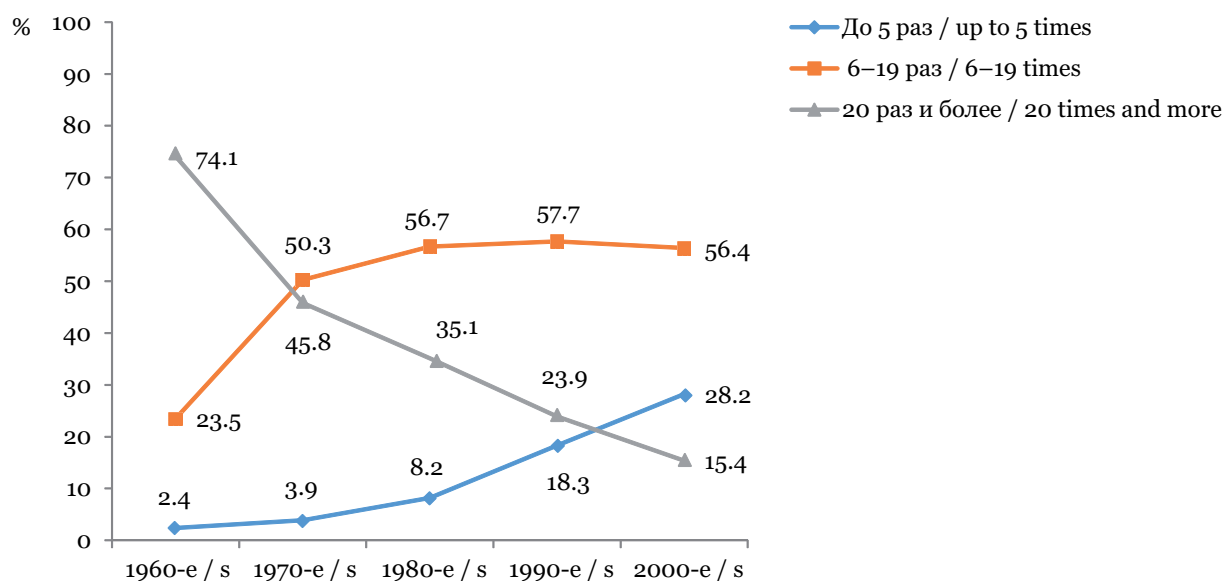


Рис. 3. Динамика пылевых нагрузок на рабочих местах пациентов с пневмокониозами в течение 50-летнего периода
Fig. 3. Dynamics of dust loads in the workplaces of patients with pneumoconiosis during the 50-year period

левых нагрузок в связи с уходом в прошлое производственных процессов без использования систем туманообразования. Улучшение условий труда привело к отсутствию пневмокониозов у работников керамического производства и рабочих каменных карьеров.

В настоящее время наиболее кониозоопасными (из исследованных) следует считать обрубные, землеприготовительные и формовочные участки литейных цехов, огнеупорное, чугуно- и сталелитейное производство.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что в течение 50-летнего периода наблюдения отчетливо прослеживается изменение условий труда: наиболее высокие пылевые нагрузки наблюдались до конца 1970-х годов XX в., самый значимый риск развития силикоза отмечен у пескоструйщиков, при производстве огнеупорных материалов и керамических изделий, а на электросварщиков при всех видах ручной сварки оказывалось комбинированное воздействие вредных профессиональных факторов без существенных изменений уровней промышленных аэрозолей на рабочих местах.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сахарова А.В. Гигиеническая оценка запыленности и методов борьбы с пылью в шахтах при работе проходческих машин и изучение заболеваемости органов дыхания у шахтеров, занятых на этих работах: Отчет № 137. Новосибирск, 1950. 69 с.
2. Сахарова А.Я. Изучение санитарно-гигиенических условий труда и заболеваемости шахтеров на проходческих, закладочных и углеобогажительных работах: Отчет № 162. Новосибирск, 1951. Т. 2. 84 с.
3. Хлебникова М.И. Гурьевский металлургический завод. Обследование санитарно-гигиенических условий труда в 1941 г.: Отчет № 53. Новосибирск, 1942. 46 с.
4. Гигиеническое значение пылевого фактора в производстве олова: Отчет о НИР. Новосибирск, 1955. 112 с.
5. Гаврусейко О.М. Данные санитарно-гигиенического обследования котельных цехов и тепловой лаборатории правобережной ТЭЦ г. Новосибирска: Отчет о НИР № 49. Новосибирск, 1941. 34 с.
6. Хлебникова М.И. Санитарная характеристика условий труда пескоструйщиков Новосибирского инструментального завода: Отчет о НИР № 186. Новосибирск, 1952. 22 с.
7. Сахарова А.В. и др. Санитарно-гигиенические условия труда, состояние здоровья, анализ заболеваемости рабочих Чернореченского цементного за-

ing worker was registered in 2004. This was facilitated by a significant reduction in dust loads due to the obsolescence of production processes without the use of misting systems. The working conditions improvement led to the absence of pneumoconiosis both in ceramic industry and stone quarries workers.

Currently, the fettling, sand preparation and molding shops, refractory processing, iron and steel founding should be considered posing the maximum risk for coniosis development (of those studied).

CONCLUSION

The conducted research showed that during the 50-year observation period changes in working conditions could be seen distinctly: the highest dust loads were observed till the end of the 1970s, the most prominent risk of silicosis development was noted in sandblasters, in the production of refractory materials and ceramic ware, while the electric welders with all types of manual welding were exposed to a combined effect of harmful occupational factors without significant changes in the levels of industrial aerosols in the workplace.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Sakharova A.V. (1950). *Hygienic Assessment of Dustiness and Methods of Dust Control in Coal Mines During the Work of Heading Machines and the Study of Respiratory Morbidity in Miners Employed in These Works: Report 137*. Novosibirsk, 69 p. In Russ.
2. Sakharova A.Ya. (1951). *Study of Sanitary and Hygienic Working Conditions and Morbidity of Miners in Headwork, Stowing and Coal Preparation: Report 162*. Novosibirsk, 84 p. In Russ.
3. Khlebnikova M.I. (1942). *Gurievsky Metallurgical Plant. Survey of Sanitary and Hygienic Working Conditions in 1941: Report 53*. Novosibirsk, 46 p. In Russ.
4. *Hygienic Significance of the Dust Factor in Tin Production: Research Report (1955)*. Novosibirsk, 112 p. In Russ.
5. Gavruseiko O.M. (1941). *Data of Sanitary and Hygienic Survey of Boiler Shops and the Thermal Laboratory of the Right-bank Thermal Power Station in Novosibirsk: Research Report 49*. Novosibirsk, 34 p. In Russ.
6. Khlebnikova M.I. (1952). *Sanitary Characteristics of the Working Conditions of Sandblasters of the Novosibirsk Tool Plant: Research Report 186*. Novosibirsk, 22 p. In Russ.
7. Sakharova A.V. et al. (1950). *Sanitary and Hygienic Working Conditions, Health Condition, Analysis of the Morbidity of Workers of the Chernorechensky Ce-*

- вода в г. Искитиме, Новосибирской области: Отчет о НИР № 128. Новосибирск, 1950. 93 с.
8. Бажанова З.В., Гладышева Е.П., Баранова Е.П. Санитарно-гигиенические условия труда, общая и профессиональная заболеваемость рабочих горячих цехов завода «Тяжстанкогидропресс» им. Ефремова: Отчет о НИР № 317; Новосибирский научно-исследовательский санитарный институт. Новосибирск, 1960. 155 с.
 9. Ромейко В.Л., Ивлева Г.П. Разработка комплекса гигиенических, лечебно-оздоровительных и реабилитационных мероприятий по профилактике и снижению общей и профессиональной заболеваемости у рабочих ведущих профессий АО «Новосибирский металлургический завод»: Отчет о НИР; Новосибирский филиал НПО «Гигиена и профпатология». Новосибирск, 1993. 37 с.
 10. Кончаловская Н.М. Современные формы пневмокониозов // Патогенез пневмокониозов. Караганда, 1978. С. 3–10.
 11. Гигиена труда. Руководство по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда: Руководство Р 2.2.2006-05. URL: <https://ohranatruda.ru/upload/iblock/c5a/4293853008.pdf>. Дата обращения: 18.01.2021.
 12. Боннер В.Л., Гладышева Е.П. Результаты исследования воздушной среды в некоторых цехах завода п/я 49: Отчет о НИР № 235. Новосибирск, 1955. 27 с.
- ment Plant in Iskitim, Novosibirsk Region: Research Report 128. Novosibirsk, 93 p. In Russ.
8. Bazhanova Z.V., Gladysheva E.P., Baranova E.P. (1960). *Sanitary and Hygienic Working Conditions, General and Occupational Morbidity of Workers of Hot Shops of the "Tyazhstankohidropress" n.a. Efremov Plant: Research Report 317*; Novosibirsk Scientific Research Institute of Hygiene. Novosibirsk, 155 p. In Russ.
 9. Romeiko V.L., Ivleva G.P. (1993). *Development of a Complex of Hygienic, Health-Improving and Rehabilitation Measures for the Prevention and Reduction of General and Occupational Morbidity in Workers of the Leading Professions of Novosibirsk Metallurgical Plant: Research Report*; Hygiene and Occupational Pathology, Novosibirsk branch. Novosibirsk, 37 p. In Russ.
 10. Konchalovskaya N.M. (1978). Current forms of pneumoconiosis (pp. 3–10). In *The Pathogenesis of Pneumoconiosis*. Karaganda. In Russ.
 11. Occupational hygiene. Guidelines for the hygienic assessment of factors of the working environment and the labor process. Criteria and classification of working conditions: Guideline R 2.2.2006-05. Retrieved on January 18, 2021 from <https://ohranatruda.ru/upload/iblock/c5a/4293853008.pdf>. In Russ.
 12. Bonner V.L., Gladysheva E.P. (1955). *Results of the Study of the Air Environment in Some Shops of the Plant PO Box 49: Research Report 235*. Novosibirsk, 27 p. In Russ.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Потеряева Елена Леонидовна — д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой неотложной терапии с эндокринологией и профпатологией ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Логвиненко Ирина Ивановна — д-р мед. наук, профессор кафедры неотложной терапии с эндокринологией и профпатологией ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; заместитель руководителя по лечебной работе НИИ терапии и профилактической медицины — филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск).

Смирнова Елена Леонидовна — д-р мед. наук, доцент, профессор кафедры неотложной терапии с эндокринологией и профпатологией ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Власов Владислав Геннадьевич — канд. мед. наук, врач-рентгенолог ГБУЗ НСО «Государственная Новосибирская клиническая психиатрическая больница № 3».

Образец цитирования: Потеряева Е.Л., Логвиненко И.И., Смирнова Е.Л., Власов В.Г. Эволюция условий труда на пылеопасных предприятиях Западной Сибири: 50-летние тренды // Journal of Siberian Medical Sciences. 2021. № 1. С. 33–40.

ABOUT THE AUTHORS

Poteryaeva Elena Leonidovna — Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Emergency Therapy with Endocrinology and Occupational Pathology Department, Novosibirsk State Medical University.

Logvinenko Irina Ivanovna — Dr. Sci. (Med.), Professor, Emergency Therapy with Endocrinology and Occupational Pathology Department, Novosibirsk State Medical University; Deputy Head for Medical Work, Institute of Internal and Preventive Medicine (Novosibirsk).

Smirnova Elena Leonidovna — Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Professor, Emergency Therapy with Endocrinology and Occupational Pathology Department, Novosibirsk State Medical University.

Vlasov Vladislav Gennadyevich — Cand. Sci. (Med.), Radiologist, Novosibirsk Psychiatric Hospital No. 3 (Novosibirsk).

Citation example: Poteryaeva E.L., Logvinenko I.I., Smirnova E.L., Vlasov V.G. (2021). Evolution of working conditions at dust-hazardous enterprises in Western Siberia: 50-year trends. *Journal of Siberian Medical Sciences*, 1, 33–40.

Иммуномодулирующие свойства пробиотического препарата «ВедаБиотик» при старении

Маркова Е.В.¹, Сорокин О.В.², Гольдина И.А.¹, Савкин И.В.¹, Княжева М.А.¹, Серенко Е.В.¹, Бакулин К.А.³, Молокеев А.В.⁴

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (Новосибирск)

²ООО «ВедаГенетика» (Новосибирск)

³ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России

⁴АО «Вектор-БиАльгам» (р.п. Кольцово, Новосибирская обл.)

Immunomodulating properties of the probiotic preparation, VedaBiotic in aging

Markova E.V.¹, Sorokin O.V.², Goldina I.A.¹, Savkin I.V.¹, Knyazheva M.A.¹, Serenko E.V.¹, Bakulin K.A.³, Molokeev A.V.⁴

¹Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (Novosibirsk)

²VedaGenetika LLC (Novosibirsk)

³Novosibirsk State Medical University (Novosibirsk)

⁴Vector-BiAlgam JSC (Koltsovo settlement, Novosibirsk Region)

АННОТАЦИЯ

Гомеостатический иммунологический «диалог» между хозяином и его микробиотой является критически важным для поддержания здоровья. Происходящее с возрастом ослабление организма, большая его зависимость от внешних условий жизни делают старость периодом наибольшей заболеваемости. В условиях прогрессирующего увеличения продолжительности жизни все большее внимание привлекает возможность влияния на здоровье человека с помощью персонализированных пищевых и терапевтических стратегий, направленных на модифицирование кишечной микробиоты, к которым относят использование про- и пребиотиков.

Цель настоящей работы — исследование влияния препарата «ВедаБиотик», представляющего собой оригинальный комплекс пробиотиков (лиофилизированная биомасса живых активных бифидобактерий, лактобактерий, термофильного стрептококка), пребиотиков (микрористаллическая целлюлоза, лактулоза) и витамина С, на клеточный иммунный ответ и функциональную активность иммунокомпетентных клеток у возрастных млекопитающих (мышей-самцов в возрасте 10 мес). Установлено, что у возрастных млекопитающих курсовое введение препарата приводит к стимуляции пролиферативной активности иммунокомпетентных клеток и клеточного иммунного ответа, в том числе и при индуцированной иммуносупрессии (реакция гиперчувствительности замедленного типа повышалась до уровня, наблюдаемого у интактных животных аналогичного возраста). «ВедаБиотик» оказывает также модулирующее влияние на продукцию цитокинов, вызывая снижение провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β и ИФН- γ и повышение противовоспалительного цитокина ИЛ-10.

Таким образом, препарат «ВедаБиотик» оказывает позитивный иммуномодулирующий эффект и может быть использован в качестве биологически активной добавки к пище — в качестве источника пробиотических микроорганизмов — для снижения негативных побочных эффектов цитостатической терапии, а также лицами пожилого возраста для улучшения качества жизни и профилактики развития возраст-ассоциированной патологии.

Ключевые слова: старение, пробиотики, иммунный ответ, иммунокомпетентные клетки, цитокины.

Поступила 15.10.2020
Принята 28.11.2020

Автор, ответственный за переписку
Маркова Евгения Валерьевна: ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии». 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
E-mail: evgenya_markova@mail.ru

Received 15.10.2020
Accepted 28.11.2020

Corresponding author
Markova Evgeniya Valeryevna: Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, 14, Yadrintsevskaya str., Novosibirsk, 630099, Russia.
E-mail: evgenya_markova@mail.ru

ABSTRACT

The homeostatic immunological dialogue between the host and its microbiota is critical to maintaining health. The weakening of the organism occurring with age, its greater dependence on the external life conditions, make old age the period of the greatest morbidity. In the context of a progressive increase in life expectancy, more and more attention is being paid to the possibility of influencing human health through personalized nutritional and therapeutic strategies aimed at modifying the intestinal microbiota, which include the use of pro- and prebiotics.

The aim of this work is to study the effect of the VedaBiotic preparation, which is an original complex of probiotics (freeze-dried biomass of live active bifidobacteria, lactobacilli, *Streptococcus thermophilus*), prebiotics (microcrystalline cellulose, lactulose) and vitamin C, on the cellular immune response and functional activity of immunocytes in age-dependent mammals (male mice at the age of 10 months). It was found that in age-dependent mammals, a course administration of the drug leads to the stimulation of the proliferative activity of immunocytes and the cellular immune response, also including the case of the induced immunosuppression (when the delayed-type hypersensitivity reaction increased to the level observed in intact animals of similar age). The VedaBiotic also has a modulating effect on the cytokines production, causing a decrease in the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IFN- γ , and an increase in the anti-inflammatory cytokine IL-10.

Thus, the VedaBiotic preparation has a favorable immunomodulatory effect and can be used as a nutritional supplement — as a source of probiotic microorganisms — to reduce the negative side effects of cytostatic treatment, as well as by elderly persons to improve the quality of life and to prevent the development of age-associated pathology.

Keywords: aging, probiotics, immune response, immunocytes, cytokines.

ВВЕДЕНИЕ

Микробиота кишечника человека является эволюционно сложившейся совокупностью микроорганизмов, существующей как сбалансированная микроэкологическая система, в которой симбиотная микрофлора находится в динамическом равновесии, формирует микробные ассоциации, занимающие в ней определенную экологическую нишу. Кишечная микробиота относится к существенным факторам, влияющим на многие аспекты физиологии организма и выполняющим важнейшие функции в сохранении здоровья человека, включая метаболизм нутриентов, поддержание физиологического гомеостаза, резистентности к инфекционному воздействию посредством тесной взаимосвязи с клетками организма хозяина [1–3]. Поддержание этого равновесия позволяет индуцировать защитные реакции на патогены и использовать регуляторные пути, участвующие в устойчивой толерантности к безвредным антигенам.

Микробиота и иммунная система организма хозяина тесно связаны между собой. Микробиота играет фундаментальную роль в индукции, образовании и функционировании иммунной системы хозяина. В свою очередь, иммунная система хозяина вырабатывает множество средств, позволяющих поддерживать свои симбиотические отношения с микробиотой [4]. Функции кишечной микрофлоры по отношению к макроорганизму реализуются как локально, так и на системном уровне, при этом различные виды бактерий вносят свой вклад в это влияние, модулируют иммунную систему кишечника хозяина, оказывая противовоспалительные и провоспалительные эф-

INTRODUCTION

The human intestinal microbiota is an evolutionarily formed set of microorganisms that exists as a balanced microecological system, in which the symbiotic microflora stays in dynamic equilibrium, forms microbial associations that occupy a certain ecological niche in it. The gut microbiota is one of the essential factors that affect many aspects of human physiology and perform essential functions in human health protection, including nutrient metabolism, maintaining physiological homeostasis, and resistance to infections through close interconnection with the cells of the host organism [1–3]. Maintaining this balance makes it possible to induce protective responses to pathogens and to use regulatory pathways involved in sustained tolerance to harmless antigens.

The microbiota and the host's body immune system are closely related. The microbiota plays a fundamental role in the induction, formation and functioning of the host's immune system. In turn, the host's immune system produces a variety of agents that allow it to maintain its symbiotic relationship with the microbiota [4]. The functions of the intestinal microflora in relation to the macroorganism are realized both locally and at the systemic level, while various types of bacteria contribute to this effect, modulate the immune system of the host's intestine, providing anti-inflammatory and pro-inflammatory effects. Such an effect, on the one hand, prevents the development of a strong immune response to the antigens of the symbiotic microflora, and on the other hand, provides a rapid immune response when pathogenic bacteria appear.

фекты. Такое воздействие, с одной стороны, препятствует развитию сильной иммунной реакции на антигены симбиотической микрофлоры, а с другой — обеспечивает быстрый иммунный ответ при появлении патогенных бактерий.

В настоящее время кишечную микрофлору рассматривают как один из «органов метаболизма», обеспечивающего многие физиологические функции, а девиации в ее составе сопровождают различные патологические процессы [3]. Гомеостатический иммунологический «диалог» между хозяином и его микрофлорой является критически важным для поддержания здоровья. Нарушение реципрокного равновесия между микрофлорой и организмом хозяина в настоящее время является важным предметом исследования в различных областях медицины при изучении патогенеза многих заболеваний, включая аутоиммунные, аллергические, онкологические заболевания, болезни обмена веществ, а также возраст-ассоциированную патологию [5–7]. При старении в организме равномерно развиваются изменения во всех физиологических системах с приспособлением к его уменьшенным возможностям. Ослабление организма в период старости, большая зависимость его от внешних условий жизни — все это, даже при наилучшем соблюдении правил гигиены, делает старость периодом наибольшей заболеваемости. В течение последних десятилетий одновременно с ростом знаний о роли и значении кишечной микрофлоры значительно возрос интерес к пробиотикам. В условиях прогрессирующего увеличения продолжительности жизни все большее внимание привлекает возможность влияния на здоровье человека с помощью персонифицированных пищевых и терапевтических стратегий, направленных на модифицирование кишечной микрофлоры, к которым относят использование пробиотиков и пребиотиков [3]. Оригинальный препарат на основе пробиотиков «ВедаБиотик» (ВБ), в соответствии с инструкцией производителя, после курсового приема подавляет рост и развитие патогенных микроорганизмов в кишечнике, восстанавливает микрофлору других органов и систем, углеводный и жировой обмен, способствует снижению сахара и холестерина в крови, избыточной массы тела, повышает неспецифическую резистентность организма. Указанные свойства ВБ предполагают перспективность использования препарата для улучшения качества жизни и профилактики развития возраст-ассоциированной патологии, в связи с чем определенный интерес представляет исследование

At present, the intestinal microbiota is considered as one of the “metabolic organs” providing many physiological functions, and deviations in its composition accompany various pathological processes [3]. The homeostatic immunological dialogue between the host and its microbiota is critical to maintenance of health. Disturbance of reciprocal balance between the microbiota and the host organism is currently an important subject of research in various fields of medicine in the study of the pathogenesis of many diseases, including autoimmune, allergic, oncological, metabolic diseases, as well as age-associated pathology [5–7]. With aging, changes develop uniformly in all physiological systems of the human body with adaptation to its reduced capabilities. The weakening of the body during old age, its great dependence on the external conditions of life — all this, even with the best observance of the rules of hygiene, makes old age the period of greatest morbidity. During the last decades, along with the growth of knowledge about the role and significance of the gut microbiota, interest in probiotics has increased significantly. In the context of a progressive increase in life expectancy, more and more attention is being paid to the possibility of influencing human health through personalized nutritional and therapeutic strategies aimed at modifying the intestinal microbiota, which include the use of probiotics and prebiotics [3]. The original drug based on probiotics, VedaBiotic (VB), in accordance with the manufacturer’s instructions, after a course of supplementation suppresses the growth and spread of pathogenic microorganisms in the intestine, restores the microflora of other organs and systems, carbohydrate and fat metabolism, contributes to the decrease in blood sugar and cholesterol, overweight, and boosts the nonspecific resistance of the body. The indicated properties of VB suggest that the preparation is promising to be useful for the enhancement of the quality of life and prevention of the age-associated pathology, therefore, it is of certain interest to study the effect of VB on the functional activity of the immune system and its cellular elements during aging.

AIM OF THE RESEARCH

To study the effect of VB on the cell-mediated immune response and the functional activity of immunocompetent cells in aged mammals.

MATERIALS AND METHODS

The research used the original complex preparation of a new generation VedaBiotic based on probiotics and developed by Vector-BiAlgam JSC (Koltsovo

влияния ВБ на функциональную активность иммунной системы и ее клеточных элементов при старении организма.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить влияние ВБ на клеточный иммунный ответ и функциональную активность иммунокомпетентных клеток у возрастных млекопитающих.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследованиях был использован оригинальный комплексный препарат нового поколения на основе пробиотиков «ВедаБиотик», разработанный АО «Вектор-БиАльгам» (р.п. Кольцово, Новосибирская обл.) и ООО «ВедаГенетика» (г. Новосибирск). В состав препарата входят 11 пробиотиков (бифидобактерии и лактобактерии, молочнокислый стрептококк) в титре 4.6×10^9 КОЕ/г, а также 3 пребиотика: аскорбиновая кислота, лактулоза и микрокристаллическая целлюлоза (свидетельство о госрегистрации RU.77.99.88.003.R.000658.03.20 от 06.03.2020).

Исследования проводили на здоровых мышах (CBAx57Bl/6)F1, самцах 10-месячного возраста, массой 45–50 г, полученных из питомника НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга Томского национального исследовательского медицинского центра РАН (г. Томск). Животные содержались в условиях вивария ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» в клетках по 5–10 особей в каждой, на стандартном рационе питания, при естественном световом режиме, свободном доступе к воде и пище. Экспериментальные исследования проводились в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986), «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» согласно приказу Министерства здравоохранения РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики» и «Руководству по экспериментальному (доклиническому) исследованию новых фармакологических веществ» (Москва, 2005).

Учитывая наличие в популяции мышей (CBAx57Bl/6)F1 самцов с активным и пассивным типами поведения, представители которых характеризуются определенными структурно-функциональными особенностями иммунокомпетентных клеток и различным изменением функциональной активности клеточного звена иммун-

settlement, Novosibirsk Region) and VedaGenetika LLC (Novosibirsk). The preparation contains 11 probiotics (bifidobacteria and lactobacilli, lactic acid streptococcus) in a titer of 4.6×10^9 CFU/g, as well as 3 prebiotics: ascorbic acid, lactulose and microcrystalline cellulose (certificate of state registration RU.77.99.88.003.R.000658.03.20 dated 06.03.2020).

The studies were carried out on healthy male mice (CBAx57Bl/6) F1, 10 months of age, weighing 45–50 g, obtained from the nursery of the Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine (Tomsk). The animals were kept in the vivarium of the Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology in cages of 5–10 individuals each, on a standard diet, under natural light conditions, and free access to water and food. Experimental studies were carried out in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986), Rules for Conducting Work with the Use of Experimental Animals in accordance with the order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 267 of June 19, 2003, On Approval of the Rules of Laboratory Practice and Guidelines for Experimental (Preclinical) Study of New Pharmacological Substances (Moscow, 2005).

Considering the presence of males with active and passive types of behavior in the population of mice (CBAx57Bl/6)F1, whose representatives are notable for certain structural and functional characteristics of immunocytes and various changes in the functional activity of the cellular link of the immune system after antigenic exposure [8, 9], with the aim of forming homogeneous experimental groups of animals, the type of behavior of all mice was determined in the Open Field test. According to the test results, only individuals with an average type of behavior were included in the study.

The VB suspension was forcibly injected to the animals at a basis of 80 mg/kg/day intragastrically, for 14 days (experimental group). The control group of animals in the same volume and regimen was injected with the solvent — drinking water (negative control). A group of whole mice of the same age was also used as a positive control. As a comparison group, mice with induced immunosuppression were used, which were injected with cyclophosphan (CP) (N-bis- (b-chloroethyl)-N-O-trimethylene phosphoric acid diamide ester) (Baxter Oncology GmbH, Germany), once intraperitoneally, in 0.5 ml

ной системы после антигенного воздействия [8, 9], с целью формирования однородных экспериментальных групп животных тип поведения всех мышей был определен в тесте «Открытое поле». По результатам тестирования в исследование были включены только особи со средним типом поведения.

Суспензию ВБ принудительно вводили животным из расчета 80 мг/кг интрагастрально, ежедневно, в течение 14 сут (экспериментальная группа). Контрольной группе животных в аналогичном объеме и режиме вводили растворитель — питьевую воду (негативный контроль). В качестве позитивного контроля использовали также группу интактных мышей аналогичного возраста. В качестве группы сравнения использовали мышей с индуцированной иммуносупрессией, которым вводили циклофосфана (ЦФ) (N-бис-(b-хлорэтил)-N-O-триметиленовый эфир диамида фосфорной кислоты) (Baxter Oncology, GmbH, Germany), внутривенно однократно, в 0.5 мл 0.9% NaCl на 14-е сутки после начала введения ВБ, в дозе 250 мг/кг, определенной в серии предварительных экспериментов.

На 15-е сутки часть животных выводили из эксперимента декапитированием, в стерильных условиях забирали селезенку для получения суспензии спленоцитов с последующим исследованием *in vitro* пролиферативной активности клеток селезенки и продукции основных про- и противовоспалительных цитокинов. Оставшиеся животные были подвержены иммунизации T-зависимым антигеном для оценки интенсивности клеточного иммунного ответа *in vivo*.

Для исследования пролиферативной активности спленоциты выделяли центрифугированием суспензии клеток селезенки в градиенте плотности фиколла 1.078 г/см³ (Lymphocyte Separation Medium, MP Biomedicals GmbH, Germany) при 1500 об./мин в течение 40 мин. Спленоциты, собранные из интерфазы, трехкратно отмывали в среде RPMI-1640 («Вектор-БиАльгам», р.п. Кольцово) и осаждали центрифугированием. Затем клетки в полной культуральной среде, состоящей из RPMI-1640, 5% инаktivированной эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM L-глутамина, 10 mM HEPES-буфера, 5×10^{-5} M 2-меркаптоэтанола (Sigma, USA) и 80 мкг/мл гентамицина, вносили в объеме 50 мкл в 96-луночные круглодонные планшеты (Linbro, USA) в концентрации 10^5 спленоцитов на лунку. В качестве митогенов для индукции поликлональной активации клеток использовались конкавалин А (Кона) (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden) и липополисахарид

of 0.9% NaCl on the 14th day after the start of injection of VB, at a dose of 250 mg/kg, determined in a series of preliminary experiments.

On the 15th day, some of the animals were removed from the experiment by decapitation, the spleen was taken under sterile conditions to obtain a suspension of splenocytes, with subsequent *in vitro* study of the proliferative activity of spleen cells and the production of basic pro- and anti-inflammatory cytokines. The rest of animals were undergone to T-dependent antigen immunization to assess the intensity of the cellular immune response *in vivo*.

For studying the proliferative activity, splenocytes were isolated by centrifugation of a spleen cell suspension in a ficoll density gradient of 1.078 g/cm³ (Lymphocyte Separation Medium, MP Biomedicals GmbH, Germany) at 1500 rpm for 40 min. The interphase splenocytes were washed three times in RPMI-1640 medium (Vector-BiAlgam JSC, Koltsovo settlement) and precipitated by centrifugation. Then the cells in the complete culture medium consisting of RPMI-1640, 5% inactivated fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES-buffer, 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol (Sigma, USA) and 80 µg/ml of gentamicin was introduced in the volume of 50 µl into 96-well round-bottom plates (Linbro, USA) at a concentration of 10^5 splenocytes per well. Concanavalin A (ConA) (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden) and lipopolysaccharide (LPS) *E. coli* 0111: B4 (Sigma, USA) were used as mitogens for the induction of polyclonal cell activation, which were added to the cell suspension at suboptimal concentrations (determined in the series of preliminary experiments and were 3 and 5 µg/ml respectively) in amounts of 50 µl and/or culture medium to a total volume of 150 µl per well. Cells were cultured in a CO₂-incubator at +37°C in an atmosphere containing 5% CO₂ for 72 h. The proliferative activity of splenocytes was determined using a vital dye (CFSE) on a flow cytometer. Data are presented as a percentage relative to spontaneous cell proliferation of the corresponding group.

Cytokine levels were determined in splenocyte culture supernatant samples. For this, splenocytes were cultured at a concentration of 2×10^6 /ml in a volume of 2 ml in 24-well plates for immunoassay (Linbro, USA) in complete culture medium containing RPMI-1640, 10% inactivated fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES buffer and 80 µg/ml gentamicin, for 24 h to study the production of IL-1β and TNF-α; within 48 h — to study

(ЛПС) *E. coli* 0111:B4 (Sigma, USA), которые добавляли к суспензии клеток в субоптимальных концентрациях (определялись в серии предварительных экспериментов и составляли соответственно 3 и 5 мкг/мл) по 50 мкл и/или культуральную среду до полного объема 150 мкл на лунку. Культивирование клеток проводили в CO₂-инкубаторе при +37 °C в атмосфере, содержащей 5% CO₂, в течение 72 ч. Пролиферативную активность спленоцитов определяли при помощи витального красителя (CFSE), на проточном цитофлуориметре. Данные представляли в процентах относительно спонтанной пролиферации клеток соответствующей группы.

Уровни цитокинов определяли в образцах культуральных супернатантов спленоцитов. Для этого спленоциты культивировали в концентрации 2×10^6 /мл в объеме 2 мл в 24-луночных планшетах для иммунологических исследований (Linbro, USA) в полной культуральной среде, содержащей RPMI-1640, 10% инактивированную эмбриональную телячью сыворотку, 2 mM L-глутамин, 10 mM HEPES-буфера и 80 мкг/мл гентамицина, в течение 24 ч для исследования продукции ИЛ-1 β и ФНО- α ; в течение 48 ч — для исследования продукции ИЛ-10 и ИЛ-6 и в течение 72 ч — для оценки продукции спленоцитами ИФН- γ . Для исследования митоген-стимулированной продукции цитокинов в культуральную среду добавляли ЛПС *E. coli* 011:B4 для ИЛ-1 β , ФНО- α и ИЛ-6 и КонА — для ИФН- γ и ИЛ-10 в концентрациях, стимулирующих субоптимальную продукцию каждого из цитокинов, определенную в серии предварительных экспериментов. По окончании культивирования клеточную суспензию собирали, клетки осаждали центрифугированием, а культуральный супернатант использовали для исследования. Определение уровней цитокинов в исследуемых образцах проводилось методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-систем фирмы Invitrogen (Austria), согласно прилагаемой инструкции. Оптическую плотность исследуемых образцов измеряли при помощи спектрофотометра с вертикальным прохождением света Anthos 2020 (Anthos Labtec Instruments GmbH, Austria) при длине волны 450 нм. Количественное содержание цитокинов выражали в пг/мл.

Интенсивность клеточного иммунного ответа оценивали *in vivo* по выраженности реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Для этого мышей иммунизировали — внутрибрюшинно вводили эритроциты барана (0.5% — 0.5 мл). Разрешающую дозу указанного

the production of IL-10 and IL-6 and within 72 h — to assess the production of IFN- γ by splenocytes. To study mitogen-stimulated cytokine production, *E. coli* 011:B4 LPS was added to the culture medium for IL-1 β , TNF- α and IL-6 and KonA — for IFN- γ and IL-10 at concentrations that stimulate suboptimal production of each of the cytokines determined in a series of preliminary experiments. At the end of the cell culture process, the cell suspension was harvested, the cells were precipitated by centrifugation, and the culture supernatant was used for the research. Determination of the cytokine levels in the test samples was carried out by the method of enzyme-linked immunosorbent assay using test systems from Invitrogen (Austria), according to the attached instruction manual. The optical density of the samples under study was measured using an Anthos 2020 vertical light transmission spectrophotometer (Anthos Labtec Instruments GmbH, Austria) at a wavelength of 450 nm. The quantitative content of cytokines was expressed in pg/ml.

The intensity of the cellular immune response was assessed *in vivo* by the severity of the delayed-type hypersensitivity reaction (DTH). For this, the mice were immunized with the sheep erythrocytes (0.5% — 0.5 ml) injected intraperitoneally. A resolving dose of the specified antigen (50% — 0.05 ml) was injected under the plantar aponeurosis of the hind foot after 96 h. The formation of the DTH reaction was assessed 24 h after the injection of the challenging dose by the degree of paw swelling (change in its thickness compared to the positive control hind paw of the same animal, into which the RPMI-1640 medium was introduced). The reaction index (RI) was determined for each mouse by the formula $RI = (R_{ex} - R_c) / R_c$, where R_{ex} — the reaction in the experimental group, R_c — the reaction in the control group, and was expressed as a percentage [10].

For statistical processing of the actual material, statistical analysis methods were used with STATISTICA 10 software packages for Windows (StatSoft Inc., USA). When analyzing quantitative data, the normal distribution of actual data was checked using the Shapiro-Wilk test. When making comparisons of independent samples in the case of normal distribution and equal variances in groups, Student's *t*-test was used; if the distribution deviates from the normal, the Mann-Whitney test was used; measures of central tendency and dispersion are described by median (*Me*), lower (*Q1*) and upper (*Q3*) quartiles. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$.

антигена (50% — 0.05 мл) вводили под апоневроз задней стопы через 96 ч. Формирование реакции ГЗТ оценивали через 24 ч после инъекции разрезающей дозы по степени опухания лапы (изменение ее толщины по сравнению с позитивно-контрольной задней лапой того же животного, в которую была введена среда RPMI-1640). Индекс реакции (ИР) определяли для каждой мыши по формуле $ИР = (P_o - P_k) / P_k$, где P_o — реакция в опытной группе; P_k — реакция в группе контроля, и выражали в процентах [10].

Для проведения статистической обработки фактического материала применяли методы статистического анализа с использованием программных пакетов STATISTICA 10 для Windows (StatSoft Inc., USA). При анализе количественных данных проверку на нормальность распределения фактических данных проводили с помощью критерия Шапиро — Уилка. При проведении сравнений независимых выборок в случае нормального распределения и равных дисперсий в группах применяли *t*-критерий Стьюдента; при отклонении распределения от нормального — критерий Манна — Уитни; меры центральной тенденции и рассеяния описаны медианой (*Me*), нижним (*Q1*) и верхним (*Q3*) квартилями. Различия считали значимыми при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При старении эффективность функционирования иммунной системы, заключающаяся в поддержании постоянства антигенного состава организма, уменьшается. Это приводит к ослаблению контроля за внутренней средой организма, иммунологической реактивности и исчезновению толерантности к антигенам собственных органов и тканей и, как следствие, появлению характерных для старения иммунопатологических синдромов: иммунодефицита и аутоагрессии. Во всех этих случаях происходит снижение активности иммунного ответа, как клеточного, так и гуморального, с падением эффекта иммунизации, титров антител в крови ниже защитного уровня, уменьшение эффективности клеточных иммунных реакций. Следствием этого является повышенный уровень заболеваемости, склонность к хронической патологии и онкопатологии, преобладание деструктивных процессов [11]. Сочетанное действие бифидо- и лактобактерий в составе мультисинбиотика ВБ, в соответствии с инструкцией производителя, способствует восстановлению и поддержанию собственной микрофлоры кишечника, вытесняя условно-патогенные и патогенные бактерии, лактулоза обеспечивает питатель-

RESULTS AND DISCUSSION

With aging, the effectiveness of the immune system functioning consisting in maintenance of the constancy of the antigenic composition of the body decreases. This leads to a weakening of control over the internal environment of the body, immunological reactivity and the losing of tolerance to the antigens of its own organs and tissues and, as a consequence, the appearance of immunopathological syndromes characteristic of aging: immunodeficiency and autoaggression. In all these cases, there is a decrease in the activity of the immune response, both cellular and humoral, with a drop in the effect of immunization, antibody titers in the blood below the protective level, and a decrease in the efficiency of cellular immune response. The consequence of this is an increased morbidity rate, a tendency to chronic pathology and oncopathology, the predominance of destructive processes [11]. The combined action of bifidobacteria and lactobacilli in the VB composition, in accordance with the manufacturer's instructions, contributes to restoration and maintenance of its own intestinal microflora, dislodges opportunistic and pathogenic bacteria; lactulose provides a nutrient medium for these probiotics when they enter the intestine, and microcellulose effectively entraps products of bacterial decay, eliminating them from the body.

The *in vivo* study of the intensity of the cellular immune response in aged experimental animals, which, similarly to humans, are characterized by a reduced response to immunization [8, 12–15], revealed that after a course of the VB, the intensity of the DTH reaction in 10-month-old mice exceeded that of a control group of the same age intact animals (Table 1).

One of the possible mechanisms stimulating the cellular immune response to the VB in aged animals, may be due to the influence of the probiotic microorganisms, included in the preparation, on the extrathymic generation of T-cells in the lymphoid tissue, associated with the intestine [16]. The administration of CP, as expected, caused immunosuppression, showing a decrease in the intensity of the DTH reaction; while the stimulating cell-mediated immune response effect of the VB was also recorded in the setting of CP-induced immunosuppression: an enhancement of this reaction reached the level corresponding to that of the intact animals of a similar age (see Table 1), which indicates the leveling of the CP-induced suppression of the cellular immune response under conditions of the prior VB administration.

ную среду для указанных пробиотиков при их попадании в кишечник, а микроцеллюлоза эффективно сорбирует продукты бактериального распада, выводя их из организма.

При исследовании интенсивности клеточного иммунного ответа *in vivo* у возрастных экспериментальных животных, которые, аналогично человеку, характеризуются сниженным ответом на иммунизацию [8, 12–15], выявлено, что после курсового введения ВБ интенсивность реакции ГЗТ у мышей 10-месячного возраста превышала такую по сравнению с контрольной группой интактных животных аналогичного возраста (табл. 1).

Одним из возможных механизмов стимулирующего клеточный иммунный ответ эффекта ВБ у возрастных особей может быть влияние входящих в состав препарата пробиотических микроорганизмов на экстрактимическую генерацию Т-клеток в лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником [16]. Введение ЦФ, как и ожидалось, вызывало иммуносупрессию, выразившуюся в снижении интенсивности реакции ГЗТ, при этом стимулирующий клеточный иммунный ответ эффект ВБ регистрировался также и на фоне ЦФ-индуцированной иммуносупрессии: повышение данной реакции наблюдалось до уровня, соответствующего таковому у интактных животных аналогичного возраста (см. табл. 1), что свидетельствует о нивелировании ЦФ-индуцируемой супрессии клеточного иммунного ответа на фоне введения ВБ.

Как известно, у человека и животных подавление иммунитета с возрастом не связано со снижением абсолютного количества иммунокомпетент-

It is known, that in humans and animals the suppression of immunity with age is not associated with a decrease in the absolute number of immunocytes, which is supported by a homeostatic multi-component mechanism, but depends on changes in their functional activity [15–18]. Study of the functional activity of immunocytes of aged animals *in vitro* after a course of the VB revealed the stimulation of the proliferative activity of splenocytes in response to T- and B-cell mitogens (see Table 1). As you see from Table 1, the course of the VB also prevents the CP-induced decrease in the proliferative activity of spleen cells. VB stimulation of the proliferative activity of immunocytes is also one of the mechanisms of the above demonstrated effect of this probiotic preparation in stimulating the cellular immune response. The leveling of CP-induced suppression of the cellular immune response and the proliferative activity of splenocytes in case of prior VB administration established in the present study, makes it possible to use this probiotic preparation during cytostatic therapy in oncopathology to reduce the negative side effect in the form of immunosuppression.

The functional activity of immunocytes of aged animals after a course of the VB was also assessed by the production of pro- and anti-inflammatory cytokines. It was found that in aged mice, the VB reduces the mitogen-stimulated production of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IFN- γ by splenocytes, while not significantly affecting the spontaneous production of these cytokines. In animals which were exposed to CP, causing immunosup-

Таблица 1. Интенсивность реакции ГЗТ и пролиферативная активность клеток селезенки возрастных мышей (CBAx57Bl/6)F1 после курсового введения препарата «ВедаБиотик», %

Table 1. The intensity of the DTH reaction and the proliferative activity of spleen cells in aged mice (CBAx57Bl/6)F1 after a course of the VedaBiotic preparation, %

Группы животных Animal groups	Индекс реакции ГЗТ (Me (25 %; 75 %)) Index of DTH reaction (Me (25%; 75%))	Пролиферативная активность спленоцитов Splenocyte proliferative activity	
		КонА-стимулированная пролиферация ConA-stimulated proliferation	ЛПС-стимулированная пролиферация LPS-stimulated proliferation
1. Интактные / Intact	21.2 (17.6; 28.9)	149	161
2. Вода / Water	37.5 (20.0; 55.0)	150	160
3. ЦФ / CP	1.25 (0.0; 2.5)**	70*	56*
4. «ВедаБиотик» / VedaBiotic	28.9 (25.0; 36.0)*	210*	240*
5. ЦФ, «ВедаБиотик» / CP, VedaBiotic	20.0 (2.5; 21.0)*	127*	117*

Примечание. В каждой группе — от 12 до 15 животных.

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ по сравнению с группами контроля 1 и 2; * $p < 0.05$ по сравнению с группой 3.
Note. Each group had from 12 to 15 animals.

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ compared to the control groups 1 and 2; * $p < 0.05$ compared to group 3.

ных клеток, которое поддерживается гомеостатическим многокомпонентным механизмом, но зависит от изменения их функциональной активности [15–18]. При исследовании функциональной активности иммунокомпетентных клеток возрастных животных *in vitro* после курсового введения ВБ выявлена стимуляция пролиферативной активности спленоцитов в ответ на Т- и В-клеточные митогены (см. табл. 1). Как видно из результатов, представленных в табл. 1, курсовое введение ВБ также предотвращает ЦФ-индуцированное снижение пролиферативной активности клеток селезенки. Стимуляция ВБ пролиферативной активности иммунокомпетентных клеток также является одним из механизмов продемонстрированного выше эффекта данного пробиотического препарата в отношении стимуляции клеточного иммунного ответа. Установленное в настоящем исследовании нивелирование ЦФ-индуцируемой супрессии клеточного иммунного ответа и пролиферативной активности спленоцитов на фоне введения ВБ обуславливает возможность использования данного пробиотического препарата при проведении цитостатической терапии при онкопатологии для снижения негативного побочного эффекта в виде иммуносупрессии.

Функциональная активность иммунокомпетентных клеток возрастных животных после курсового введения ВБ оценивалась также по продукции про- и противовоспалительных цитокинов. Установлено, что у возрастных мышей ВБ снижает митоген-стимулированную продукцию спленоцитами провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β и ИФН- γ , при этом существенно не влияя на спонтанную продукцию указанных цитокинов. У животных, подвергнутых воздействию ЦФ, вызывающего иммуносупрессию, как и ожидалось, регистрировалось подавление продукции всех исследуемых цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО- α ИФН- γ , ИЛ-10), при этом наблюдалось повышение митоген-стимулированной продукции ИЛ-6 практически до уровня, наблюдаемого у интактных животных аналогичного возраста (табл. 2). Повышение продукции этого цитокина, возможно, является одним из механизмов, посредством которых ВБ предотвращал вызываемое ЦФ ингибирование пролиферативной активности спленоцитов. ВБ приводил также к повышению спонтанной и митоген-стимулированной продукции клетками селезенки противовоспалительного цитокина ИЛ-10 у интактных животных, не изменяя таковую после введения ЦФ (см. табл. 2).

Согласно современным представлениям регуляция цитокинового каскада тесно связана с

pression, as expected, a suppression of the production of all studied cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α IFN- γ , IL-10) was recorded, while an increase in the mitogen-stimulated production of IL-6 was noted practically at the level observed in intact animals of a similar age (Table 2). An increase in the production of this cytokine is possibly one of the mechanisms by which the VB prevented CP-inhibition of the proliferative activity of splenocytes. In intact animals the VB also led to an increase in the spontaneous and mitogen-stimulated production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 by spleen cells, without changing it after CP administration (see Table 2).

According to modern views, the regulation of the cytokine cascade is closely related to the state of the intestinal microbiota, with its qualitative and quantitative changes, which, in particular, determine the nature of systemic chronic low-grade inflammation (SCLI) that is usual for the elderly [2]. The SCLI is characterized by formation of relatively compensated balance between the action of the damaging factor and the systemic inflammatory reaction, on the one hand, and the buffer systems of anti-inflammatory resistance, on the other. It is considered that in age-associated pathology the SCLI is that link between insulin resistance, disorders of carbohydrate and lipid metabolism, obesity, atherosclerosis, metabolic syndrome. At the same time, it was found that some bacteria of the intestinal microbiota are able to prevent the SCLI development by suppressing microorganisms that trigger inflammatory reactions, improving the barrier function of the mucous membrane of the gastrointestinal tract, or directly affecting the inflammatory response cascade through the production of metabolites such as short-chain fatty acids, which play a great role in the immune system. Short-chain fatty acids bind to the GPR43 protein, which is involved in the regulation of the activity of the immune system and inflammation, providing intercellular communication in the immune system necessary for the normal resolution of the inflammation process [19].

Thus, the anti-inflammatory effect of butyric acid is well studied, and is realized mainly due to a decrease in the activity of histone acetylase and suppression of the activation of the associated nuclear transcription factor kappa B (NF- κ B) of colon epithelial cells. Butyrate inhibits the activity of the NF- κ B factor, which controls the expression of immune response genes and is responsible for the pro-

Таблица 2. Продукция цитокинов (пг/мл) клетками селезенки возрастных мышей (СВАхС57Bl/6)F1 после курсового введения препарата «ВедаБиотик» (Ме (25 %; 75 %))**Table 2.** Cytokine production (pg/ml) by spleen cells of aged mice (CBAxС57Bl/6)F1 after the course of the VedaBiotic preparation (Ме (25%; 75%))

Группы животных Animal groups	ИЛ-1 β / IL-1 β		ИЛ-6 / IL-6		ИЛ-10 / IL-10		ИФН- γ / IFN- γ		ФНО- α / TNF- α	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
1. Интактные Intact	3.1 (2.27; 3.58)	6.74 (5.74; 7.65)	32.4 (25.1; 41.8)	111.92 (85.1; 156.3)	24.1 (18.5; 27.6)	195.17 (152.3; 258.9)	6.42 (4.21; 9.14)	64.47 (38.7; 74.95)	20.09 (16.1; 28.7)	31.00 (22.5; 41.4)
2. Вода / Water	3.24 (2.65; 3.91)	6.84 (5.48; 8.17)	30.6 (22.7; 41.8)	111.94 (64.5; 153.2)	22.19 (16.1; 32.5)	201.3 (164.9; 251.3)	6.42 (4.14; 7.85)	64.77 (50.3; 77.1)	22.43 (17.24; 29.76)	32.74 (23.8; 42.6)
3. ЦФ / CP	1.09 (0.76; 1.38)*	2.89 (1.27; 4.1)*	10.1 (7.11; 13.56)*	40.73 (32.9; 52.3)*	12.8 (9.5; 14.3)*	98.7 (68.7; 129.4)*	4.51 (3.08; 5.9)*	45.04 (34.6; 59.2)*	14.81 (10.4; 19.8)*	21.64 (17.5; 29.6)*
5. «ВедаБиотик» VedaBiotic	3.0 (2.2; 4.5)	3.37 (2.8; 5.3)*	33.6 (25.3; 45.7)	132.11 (99.1; 164.7)	42.68 (34.6; 53.8)*	298.3 (201.6; 365.2)*	6.14 (4.3; 8.1)	34.77 (26.4; 43.8)*	19.23 (11.6; 28.3)	30.61 (19.3; 44.6)
7. ЦФ, «ВедаБиотик» CP, VedaBiotic	1.22 (0.8; 1.5)	1.24 (0.9; 1.5)	14.2 (9.7; 18.3)	94.23 (71.3; 128.9)**	13.9 (9.5; 18.1)	107.45 (76.9; 145.2)	6.14 (4.14; 8.1)	46.14 (33.7; 56.3)	27.15 (19.7; 32.1)	31.52 (23.6; 40.3)

Примечание. 1 — спонтанная продукция цитокина; 2 — митоген-стимулированная продукция цитокина. В каждой группе — 6 животных.

* $p < 0.05$ по сравнению с группой 1; ** $p < 0.05$ по сравнению с группой 3.

Note. 1 — spontaneous cytokine production; 2 — mitogen-stimulated cytokine production. Each group has 6 animals.

* $p < 0.05$ as compared to group 1; ** $p < 0.05$ as compared to group 3.

состоянием микробиоты кишечника, с ее качественными и количественными изменениями, которые, в частности, обуславливают характер системного низкоградуированного хронического воспаления (СНХВ), свойственного для пожилого возраста [2]. При СНХВ происходит формирование относительно компенсированного равновесия между действием повреждающего фактора и системной воспалительной реакцией — с одной стороны и буферными системами противовоспалительной резистентности — с другой. Считается, что при возраст-ассоциированной патологии именно СНХВ является связующим звеном между инсулинорезистентностью, нарушениями углеводного и липидного обменов, ожирением, атеросклерозом, метаболическим синдромом. При этом установлено, что некоторые бактерии кишечной микробиоты способны препятствовать развитию СНХВ посредством подавления микроорганизмов, запускающих воспалительные реакции, улучшения барьерной функции слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта либо непосредственного воздействия на каскад воспалительной реакции путем продукции таких метаболитов, как короткоцепочечные жирные кислоты, играющие огромную роль в работе иммунной системы. Короткоцепочечные жирные кислоты связываются с белком GPR43, который участвует в регуляции активности иммунной системы и вос-

duction of cytokines, which leads to a decrease in the secretion of proinflammatory cytokines [20, 21]. The relationship between the state of the intestinal microbiota and changes in the levels of serum amyloid A3 (SAA3) which is an essential factor in the development of SCLI has been described [22]. The relationship between the composition of the microbiota and the number of T-regulatory cells (Treg) that perform suppressive functions was proved. In particular, Treg prevent autoimmune disorders, control the immune response against viruses, parasites, bacteria and fungi, prevent pathological immune responses to host's own microflora, and control antitumor immunity [23–25]. Treg express by CD4+ and CD25+ receptors, a transcription factor FoxP3 capable of inhibiting NFAT transcription factors (nuclear factor of activated T-lymphocytes) and NF- κ B, which is one of the mechanisms of inhibiting the synthesis of proinflammatory cytokines and suppressing the inflammatory process [26]. In connection with the mentioned above, the modulating effect of the VB on the production of cytokines by immunocytes, which causes a decrease in the level of proinflammatory cytokines IL-1 β and IFN- γ and an increase in the level of anti-inflammatory cytokine IL-10, can be interpreted as a positive effect of the preparation aimed at reducing SCLI.

паления, обеспечивая межклеточную коммуникацию в иммунной системе, необходимую для нормального разрешения процесса воспаления [19].

Так, хорошо изучен противовоспалительный эффект масляной кислоты, реализуемый в основном за счет снижения активности гистоновой ацетилазы и ингибирования активации связанного с ней ядерного фактора транскрипции каппа В (NF-κB) эпителиоцитов толстой кишки. Бутират подавляет активность фактора NF-κB, который контролирует экспрессию генов иммунного ответа и отвечает за продукцию цитокинов, что приводит к снижению секреции провоспалительных цитокинов [20, 21]. Описана взаимосвязь состояния микробиоты кишечника с изменениями уровней сывороточного амилоида А3 (SAA3), являющегося существенным фактором в развитии СНХВ [22]. Доказана также взаимосвязь состава микробиоты с количеством Т-регуляторных клеток (Treg), осуществляющих супрессорные функции. В частности, Treg предотвращают аутоиммунные расстройства, контролируют иммунный ответ против вирусов, паразитов, бактерий и грибов, предотвращают патологические иммунные реакции на собственную микрофлору и контролируют противоопухолевый иммунитет [23–25]. Treg экспрессируют рецепторы CD4+ и CD25+, транскрипционный фактор FoxP3, способный ингибировать факторы транскрипции NFAT (ядерный фактор активированных Т-лимфоцитов) и NF-κB, что является одним из механизмов ингибирования синтеза провоспалительных цитокинов и подавления воспалительного процесса [26]. В связи с вышеизложенным модулирующее действие ВБ на продукцию иммунокомпетентными клетками цитокинов, вызывающее снижение уровня провоспалительных цитокинов ИЛ-1β и ИФН-γ и повышение уровня противовоспалительного цитокина ИЛ-10, можно трактовать как положительный эффект препарата, направленный на снижение СНХВ.

Доказанное влияние микробиоты кишечника на иммунную адаптацию и становление толерантности организма к факторам внешней среды позволило использовать микроорганизмы — симбионты человека для профилактики и лечения целого ряда заболеваний [27]. Целесообразность использования пробиотиков для модуляции иммунных реакций человека не вызывает сомнений в силу неуклонно расширяющейся доказательной базы, касающейся их безопасности и иммунокорригирующего влияния. Установленные механизмы молекулярного действия, данные рандомизированных исследований и метаанализов, а так-

The proven influence of the intestinal microbiota on immune adaptation and the development of the organism tolerance to environmental factors made it possible to use microorganisms — human symbionts for the prevention and treatment of a number of diseases [27]. The feasibility of using probiotics to modulate human immune responses is beyond doubt due to the steadily expanding evidence base regarding their safety and immune correcting effect. The revealed mechanisms of molecular action, data from randomized studies and meta-analyses, as well as vast experience in the practical use of probiotic preparation prove their effectiveness for the prevention and reduction of the severity of a number of human diseases mediated or accompanied with immune imbalance.

CONCLUSION

When performing a study on the immune modulating properties of the probiotic preparation, VedaBiotic in aged experimental animals, the following was found:

1. A course of supplementation with the preparation stimulates the cellular immune response.
2. In CP-induced immunosuppression, this preparation gives even a stronger effect, stimulating the immune response, and up-regulating the DTH reaction to the level observed in intact animals of a similar age.
3. The VedaBiotic stimulates the proliferative activity of immune competent cells, including the case with the CP-induced immunosuppression.
4. The VedaBiotic has a modulating effect on the production of cytokines by immunocytes, causing a decrease in the level of proinflammatory cytokines IL-1β and IFN-γ, and an increase in the level of anti-inflammatory cytokine IL-10.

Thus, the VedaBiotic has a positive immune modulating effect and can be used as a nutritional supplement — a source of probiotic microorganisms — to reduce the negative side effects of cytostatic therapy, as well as to improve the quality of life of elderly people and prevent the development of age-associated pathology.

Funding. This research was funded by the budgetary funds of the Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (Novosibirsk) and funds of VedaGenetika LLC (Novosibirsk) on the basis of an agreement on scientific and practical cooperation dated February 3, 2020.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

же огромный опыт практического использования пробиотических препаратов доказывают их эффективность для профилактики и снижения тяжести целого ряда заболеваний человека, опосредованных или сопровождающихся иммунным дисбалансом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При проведении исследования иммуномодулирующих свойств пробиотического препарата «ВедаБиотик» у возрастных экспериментальных животных было установлено следующее:

1. Курсовое введение препарата стимулирует клеточный иммунный ответ.

2. При ЦФ-индуцированной иммуносупрессии данный препарат оказывает еще более сильный эффект, стимулирующий иммунный ответ, повышая выраженность реакции ГЗТ до уровня, наблюдаемого у интактных животных аналогичного возраста.

3. Препарат «ВедаБиотик» стимулирует пролиферативную активность иммунокомпетентных клеток, в том числе и на фоне ЦФ-индуцированной иммуносупрессии.

4. Препарат «ВедаБиотик» оказывает модулирующее действие на продукцию цитокинов им-

мунокомпетентными клетками, вызывая снижение уровня провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β и ИФН- γ и повышение уровня противовоспалительного цитокина ИЛ-10.

Таким образом, препарат «ВедаБиотик» оказывает позитивный иммуномодулирующий эффект и может быть использован в качестве биологически активной добавки к пище — источника пробиотических микроорганизмов — для снижения негативных побочных эффектов цитостатической терапии, а также лицами пожилого возраста для улучшения качества жизни и профилактики развития возраст-ассоциированной патологии.

Финансирование. Данная работа финансировалась за счет бюджетных средств ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (Новосибирск) и средств ООО «ВедаГенетика» (Новосибирск) на основании договора о научно-практическом сотрудничестве от 03.02. 2020.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Landman C., Quévrain E. Gut microbiota: Description, role and pathophysiological implications. *Rev. Med. Interne*. 2016. Vol. 37 (6). P. 418–423. doi: 10.1016/j.revmed.2015.12.012.
2. Каштанова Д.А., Егшатын Л.В., Ткачева О.Н. Участие микробиоты кишечника человека в процессах хронического системного воспаления // *Клин. микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2015. Т. 17, № 4. С. 310–317.
3. Никонова Е.Л., Попова Е.Н. Микробиота. М., 2019. 256 с.
4. Belkaid Y., Harrison O. J. Homeostatic immunity and the microbiota. *Immunity*. 2017. Vol. 46 (4). P. 562–576. doi: 10.1016/j.immuni.2017.04.008.
5. Lin L., Zhang J. Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases // *BMC Immunology*. 2017. Vol. 18: 2. doi: 10.1186/s12865-016-0187-3.
6. Agace W.W., McCoy K.D. Regionalized development and maintenance of the intestinal adaptive immune landscape // *Immunity*. 2017. Vol. 46 (4). P. 532–548. doi: 10.1016/j.immuni.2017.04.004.
7. Багиров Н.С., Петухов И.Н., Дмитриев Н.В., Григорьевская З.В. Микробиом и рак: есть ли связь? Обзор литературы // *Злокачественные опухоли*. 2018. Т. 8, № 3s1. С. 22–26. doi: 10.18027/2224-5057-2018-8-3s1-22-26.
8. Маркова Е.В. Иммунная система и высшая нервная деятельность. Механизмы нейроиммунных взаимодействий в реализации и регуляции поведенческих реакций. Saarbrücken, 2012. 258 с.

REFERENCES

1. Landman C., Quévrain E. (2016). Gut microbiota: Description, role and pathophysiological implications. *Rev. Med. Interne*, 37 (6), 418–423. doi: 10.1016/j.revmed.2015.12.012.
2. Kashtanova D.A., Egshatyan L.V., Tkacheva O.N. (2015). The involvement of human gut microbiota in chronic systemic inflammation. *Clin. Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 17 (4), 310–317.
3. Nikonova E.L., Popova E.N. (2019). *Microbiota*. Moscow, 256 p. In Russ.
4. Belkaid Y., Harrison O. J. (2017). Homeostatic immunity and the microbiota. *Immunity*, 46 (4), 562–576. doi: 10.1016/j.immuni.2017.04.008.
5. Lin L., Zhang J. (2017). Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. *BMC Immunology*, 18: 2. doi: 10.1186/s12865-016-0187-3.
6. Agace W.W., McCoy K.D. (2017). Regionalized development and maintenance of the intestinal adaptive immune landscape. *Immunity*, 46 (4), 532–548. doi: 10.1016/j.immuni.2017.04.004.
7. Bagirov N.S., Petukhov I.N., Dmitriev N.V., Grigoryevskaya Z.V. (2018). The microbiome and cancer: is there a connection? A literature review. *Malignant Tumors*, 8 (3s1), 22–26. doi: 10.18027/2224-5057-2018-8-3s1-22-26. In Russ.
8. Markova E.V. (2012). *Immune System and Higher Nervous Activity. Mechanisms of Neuroimmune Interactions in the Implementation and Regulation of Behavioral Responses*. Saarbrücken, 258 p. In Russ.

9. Маркова Е.В., Княжева М.А., Рюмина Т.В., Козлов В.А. Особенности функционирования клеток иммунной системы у особей с агрессивно- и депрессивноподобными типами поведения // В мире научных открытий. 2014. Т. 8, № 56. С. 131–147.
10. Yoshikai Y., Miake S., Matsumoto T., Nomoto K., Takeya K. Effect of stimulation and blockade of mononuclear phagocyte system on the delayed footpad reaction to SRBC in mice // *Immunology*. 1979. Vol. 38 (3). P. 577–583.
11. Сергеева Е.В. Состояние иммунитета у лиц пожилого возраста // *Экология человека*. 2010. № 5. С. 55–58.
12. Markova E.V., Obukhova L.A., Kolosova N.G. Activity of cell immune response and open field behavior in Wistar and OXYS rats // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2003. Vol. 136 (4). P. 377–379.
13. Markova E.V., Obukhova L.A., Kolosova N.G. Parameters of cell immune response in Wistar and OXYS rats and their behavior in the open field test // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2003. Vol. 136 (6). P. 588–590.
14. Crooke S.N., Ovsyannikova I.G., Poland G.A., Kennedy R.B. Immunosenescence and human vaccine immune responses // *Immun. Ageing*. 2019. Vol. 16: 25. doi: 10.1186/s12979-019-0164-9.
15. Goronzy J.J., Weyand C.M. Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines // *Nat. Immunol.* 2013. Vol. 14 (5). P. 428–436. doi: 10.1038/ni.2588.
16. Воронцова З.А., Никитюк Д.Б., Кудаева Э.Ф. Кишечно-ассоциированная лимфоидная ткань как информационно корректирующая система экстремальных состояний (краткий обзор литературы) // *Вестн. новых мед. технологий. Электрон. изд.* 2016. № 4. doi: 10.12737/21854.
17. Cicin-Sain L., Messaoud I., Park B. et al. Dramatic increase in naive T-cell turnover is linked to loss of naive T cells from old primates // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. Vol. 104. P. 19960–19965. doi: 10.1073/pnas.0705905104.
18. Tsukamoto H., Clise-Dwyer K., Huston G.E. et al. Age-associated increase in lifespan of naive CD4 T-cells contributes to T-cell homeostasis but facilitates development of functional defects // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. Vol. 106 (43). P. 18333–18338. doi: 10.1073/pnas.0910139106.
19. Maslowski K.M., Vieira A.T., Ng A. et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43 // *Nature*. 2009. Vol. 461. P. 1282–1286.
20. Meijer K., de Vos P., Priebe M.G. Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. 2010. Vol. 13 (6). P. 715–721. doi: 10.1097/MCO.0b013e32833eebe5.
21. Hamer H.M., Jonkers D., Venema K. et al. Review article: the role of butyrate on colonic function // *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2008. Vol. 27. P. 104–119. doi: 10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x
22. Faty A., Ferré P., Commans S. The acute phase protein serum amyloid A induces lipolysis and inflammation in human adipocytes through distinct pathways // *PLoS One*. 2012. Vol. 7 (4). P. e34031. doi: 10.1371/journal.pone.0034031.
9. Markova E.V., Knyazheva M.A., Rumina T.V., Kozlov V.A. (2014). Immune cells functioning features in individuals with aggressive- and depressive-like behaviors. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 8 (56), 131–147. In Russ.
10. Yoshikai Y., Miake S., Matsumoto T., Nomoto K., Takeya K. (1979). Effect of stimulation and blockade of mononuclear phagocyte system on the delayed footpad reaction to SRBC in mice. *Immunology*, 38 (3), 577–583.
11. Sergeeva E.V. (2010). The status of immunity of elderly people. *Human Ecology*, 5, 55–58.
12. Markova E.V., Obukhova L.A., Kolosova N.G. (2003). Activity of cell immune response and open field behavior in Wistar and OXYS rats. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 136 (4), 377–379.
13. Markova E.V., Obukhova L.A., Kolosova N.G. (2003). Parameters of cell immune response in Wistar and OXYS rats and their behavior in the open field test. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 136 (6), 588–590.
14. Crooke S.N., Ovsyannikova I.G., Poland G.A., Kennedy R.B. (2019). Immunosenescence and human vaccine immune responses. *Immun. Ageing*, 16: 25. doi: 10.1186/s12979-019-0164-9.
15. Goronzy J.J., Weyand C.M. (2013). Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines. *Nat. Immunol.*, 14 (5), 428–436. doi: 10.1038/ni.2588.
16. Vorontsova Z.A., Nikityuk D.B., Kudaeva E.F. (2016). Gut associated lymphoid tissue as information and corrective system of extreme conditions (brief literature report). *Journal of New Medical Technologies, eEdition*, 4. doi: 10.12737/21854.
17. Cicin-Sain L., Messaoud I., Park B. et al. (2007). Dramatic increase in naive T cell turnover is linked to loss of naive T cells from old primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 19960–19965. doi: 10.1073/pnas.0705905104.
18. Tsukamoto H., Clise-Dwyer K., Huston G.E. et al. (2009). Age-associated increase in lifespan of naive CD4 T cells contributes to T-cell homeostasis but facilitates development of functional defects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106 (43), 18333–18338. doi: 10.1073/pnas.0910139106.
19. Maslowski K.M., Vieira A.T., Ng A. et al. (2009). Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*, 461, 1282–1286.
20. Meijer K., de Vos P., Priebe M.G. (2010). Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 13 (6), 715–721. doi: 10.1097/MCO.0b013e32833eebe5.
21. Hamer H.M., Jonkers D., Venema K. et al. (2008). Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 27, 104–119. doi: 10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x
22. Faty A., Ferré P., Commans S. (2012). The acute phase protein serum amyloid A induces lipolysis and inflammation in human adipocytes through distinct pathways. *PLoS One*, 7 (4), e34031. doi: 10.1371/journal.pone.0034031.
23. Piccirillo C.A., Shevach E.M. (2004). Naturally-occurring CD4+CD25+ immunoregulatory T-cells:

23. Piccirillo C.A., Shevach E.M. Naturally-occurring CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T-cells: central players in the arena of peripheral tolerance // *Semin. Immunol.* 2004. Vol. 16 (2). P. 81–88.
24. Pronio A., Montesani C., Butteroni C. et al. Probiotic administration in patients with ileal pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis is associated with expansion of mucosal regulatory cells // *Inflamm. Bowel. Dis.* 2008. Vol. 14. P. 662–668.
25. Елисеева Д.Д., Завалишин И.А., Караулов А.В., Быковская С.Н. Роль регуляторных Т-клеток в развитии аутоиммунных нарушений при рассеянном склерозе // *Вестн. РАМН.* 2012. Т. 3. С. 68–74.
26. Bettelli E., Dastrange M., Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. Vol. 102. P. 5138–5143.
27. Шпагина Л.А., Герасименко О.Н., Горобей А.М. и др. Роль мультисинбиотика в комплексном лечении геронтологических пациентов // *Сиб. мед. вестн.* 2020. № 3. С. 50–54.
- central players in the arena of peripheral tolerance. *Semin. Immunol.*, 16 (2), 81–88.
24. Pronio A., Montesani C., Butteroni C. et al. (2008). Probiotic administration in patients with ileal pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis is associated with expansion of mucosal regulatory cells. *Inflamm. Bowel. Dis.*, 14, 662–668.
25. Eliseeva D.D., Zavalishin I.A., Karaulov A.V., Bykovskaya S.N. (2012). The role of regulatory T-cells in the development of autoimmune process in multiple sclerosis. *Annals of the Russ. Academy of Medical Sciences*, 3, 68–74.
26. Bettelli E., Dastrange M., Oukka M. (2005). Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 102, 5138–5143.
27. Shpagina L.A., Gerasimenko O.N., Gorobey A.M. et al. (2020). The role of multisymbiotics in the comprehensive treatment of older patients. *Siberian Medical Bulletin*, 3, 50–54.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Маркова Евгения Валерьевна — д-р мед. наук, профессор, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (Новосибирск).

Сорокин Олег Викторович — канд. мед. наук, генеральный директор ООО «ВедаГенетика» (Новосибирск).

Гольдина Ирина Александровна — научный сотрудник лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (Новосибирск).

Савкин Иван Владимирович — научный сотрудник лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (Новосибирск).

Княжева Мария Александровна — младший научный сотрудник лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (Новосибирск).

Серенко Евгений Владимирович — аспирант лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (Новосибирск).

Бакулин Константин Александрович — канд. мед. наук, проректор по воспитательной работе ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Молокеев Алексей Владимирович — д-р биол. наук, директор по науке АО «Вектор-БиАльгам» (р.п. Кольцово, Новосибирская область).

Образец цитирования: Маркова Е.В., Сорокин О.В., Гольдина И.А., Савкин И.В., Княжева М.А., Серенко Е.В., Бакулин К.А., Молокеев А.В. Иммуномодулирующие свойства пробиотического препарата «ВедаБиотик» при старении // *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2021. № 1. С. 41–54.

ABOUT THE AUTHORS

Markova Evgeniya Valeryevna — Dr. Sci. (Med.), Professor, Chief Researcher, Head, Laboratory of Neuroimmunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (Novosibirsk).

Sorokin Oleg Viktorovich — Cand. Sci. (Med.), Director-General, VedaGenetika LLC (Novosibirsk).

Goldina Irina Aleksandrovna — Researcher, Laboratory of Neuroimmunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (Novosibirsk).

Savkin Ivan Vladimirovich — Researcher, Laboratory of Neuroimmunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (Novosibirsk).

Knyazheva Maria Aleksandrovna — Junior Researcher, Laboratory of Neuroimmunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (Novosibirsk).

Serenko Evgeniy Vladimirovich — Post-graduate Student, Laboratory of Neuroimmunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (Novosibirsk).

Bakulin Konstantin Aleksandrovich — Cand. Sci. (Med.), Vice-Rector for Pedagogical Work, Novosibirsk State Medical University.

Molokeev Aleksey Vladimirovich — Dr. Sci. (Bio.), Director for Science, Vector-BiAlgam JSC (Koltsovo settlement, Novosibirsk Region).

Citation example: Markova E.V., Sorokin O.V., Goldina I.A., Savkin I.V., Knyazheva M.A., Serenko E.V., Bakulin K.A., Molokeev A.V. (2021). Immunomodulating properties of the probiotic preparation, VedaBiotic in aging. *Journal of Siberian Medical Sciences*, 1, 41–54.

Разработка вольтамперометрической методики количественного определения бендазола гидрохлорида

Жеребцова Е.Ю., Терентьева С.В., Ивановская Е.А., Шинко Т.Г.

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России

Development of the voltammetric method for the quantitative determination of bendazole hydrochloride

Zherebtsova E.Yu., Terentyeva S.V., Ivanovskaya E.A., Shinko T.G.

Novosibirsk State Medical University

АННОТАЦИЯ

В связи с широкой областью применения бендазола гидрохлорида в медицине и его использованием в составе комбинированных лекарственных препаратов требуется оценка эффективности полученных лекарственных форм и определение фармакокинетических параметров. Для этого необходимо получение данных о концентрации исследуемого препарата в биологических жидкостях. Цель настоящего исследования — разработка вольтамперометрической методики количественного определения бендазола гидрохлорида. В ходе исследования экспериментально установлены оптимальные условия электролиза: потенциал -1.8 В, время 15 с, скорость развертки потенциала 50 мВ/с. Оптимальное значение pH для электролиза бендазола гидрохлорида 6–7. Предлагаемая методика валидирована по тестам: специфичности и линейности, предела обнаружения; определена аналитическая область методики, ее прецизионность. Таким образом, разработанная методика может применяться для количественного определения бендазола гидрохлорида в фармацевтических субстанциях.

Ключевые слова: вольтамперометрия, бендазола гидрохлорид, электролиз, электрод, валидация.

ABSTRACT

In connection with the wide field of application of bendazole hydrochloride in medicine and its use as a part of combined drugs, an assessment of the effectiveness of the novel dosage forms and the determination of pharmacokinetic parameters are required. For this purpose, it is necessary to obtain data on the concentration of the studied drug in biological fluids. The aim of this research is to develop a voltammetric method for the bendazole hydrochloride quantification. In the course of the study, the optimal electrolysis conditions were established: potential was -1.8 V, time 15 s, and potential sweep rate 50 mV/s. The optimum pH value for electrolysis of bendazole hydrochloride is 6–7. The proposed method is validated by tests: specificity and linearity, detection limit; the range of the procedure and its analytical precision were determined. Thus, the developed method can be used for the quantification of bendazole hydrochloride in pharmaceutical substances.

Keywords: voltammetry, bendazole hydrochloride, electrolysis, electrode, validation.

ВВЕДЕНИЕ

Бендазола гидрохлорид, лекарственное средство синтетического происхождения, является одной из немногих успешных российских разработок, присутствующих на фармацевтическом

INTRODUCTION

Bendazole hydrochloride, a synthetic medicinal product, is one of the few successful Russian developments that has been presented on the pharmaceutical market for over 65 years. It has shown

Поступила 29.10.2020
Принята 15.11.2020

Автор, ответственный за переписку
Жеребцова Евгения Юрьевна: ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. 630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52.
E-mail: iphruy@mail.ru

Received 29.10.2020
Accepted 15.11.2020

Corresponding author
Zherebtsova Evgeniya Yurievna: Novosibirsk State Medical University, 52, Krasny Prospect, Novosibirsk, 630091, Russia.
E-mail: iphruy@mail.ru

рынке уже более 65 лет. Он зарекомендовал себя как эффективный и безопасный лекарственный препарат [1]. Первоначально предназначенный для лечения повреждений периферических нервов, бендазола гидрохлорид получил признание также в качестве спазмолитического, гипотензивного, иммуностимулирующего и адаптогенного средства [2–4].

В связи с широкой областью применения бендазола гидрохлорида в медицине и его использованием в составе комбинированных лекарственных препаратов требуется оценка эффективности полученных лекарственных форм и определение фармакокинетических параметров. Для этого необходимы данные о концентрации исследуемого препарата в биологических жидкостях [5].

Определение бендазола гидрохлорида проводят несколькими методами. Широко представлены титриметрические методы количественного определения (неводное титрование, аргентометрия, ацидиметрия, алкалиметрия), основным недостатком которых состоит в том, что они неприменимы для биологических жидкостей ввиду недостаточного предела обнаружения [6]. Известны спектрофотометрические способы определения бендазола гидрохлорида с применением 0.1 М раствора кислоты хлористоводородной [7]. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) также применяется для определения дибазола. Метод предполагает использование не только хлорной кислоты, но и ацетонитрила в качестве элюента [8].

Интерес представляет метод вольтамперометрии, главными преимуществами которого являются дешевизна приборной базы и расходных материалов в сочетании с селективностью и пределом обнаружения, сопоставимыми с ВЭЖХ [9, 10].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка вольтамперометрической методики количественного определения бендазола гидрохлорида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования для подбора оптимальных условий электролиза использовали субстанцию бендазола [2-(Фенилметил)-1Н-бензимидазола гидрохлорид], молярной массой 244.73 г/моль, с содержанием действующего вещества не менее 99.0 % (АО «Усолье-Сибирский химфармзавод»). Экспериментальные данные получены на полуавтоматическом анализаторе ТА-2 (ООО «НПП «Томьаналит», г. Томск). В работе использовали стеклоуглеродный электрод в

себе быть эффективным и безопасным препаратом [1]. Первоначально предназначенный для лечения повреждений периферических нервов, бендазола гидрохлорид получил признание также в качестве спазмолитического, гипотензивного, иммуностимулирующего и адаптогенного средства [2–4].

В связи с широкой областью применения бендазола гидрохлорида в медицине и его использованием в составе комбинированных лекарственных препаратов требуется оценка эффективности полученных лекарственных форм и определение фармакокинетических параметров. Для этого необходимы данные о концентрации исследуемого препарата в биологических жидкостях [5].

Определение бендазола гидрохлорида проводят несколькими методами. Широко представлены титриметрические методы количественного определения (неводное титрование, аргентометрия, ацидиметрия, алкалиметрия), основным недостатком которых состоит в том, что они неприменимы для биологических жидкостей ввиду недостаточного предела обнаружения [6]. Известны спектрофотометрические способы определения бендазола гидрохлорида с применением 0.1 М раствора кислоты хлористоводородной [7]. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) также применяется для определения дибазола. Метод предполагает использование не только хлорной кислоты, но и ацетонитрила в качестве элюента [8].

Интерес представляет метод вольтамперометрии, главными преимуществами которого являются дешевизна приборной базы и расходных материалов в сочетании с селективностью и пределом обнаружения, сопоставимыми с ВЭЖХ [9, 10].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка вольтамперометрической методики количественного определения бендазола гидрохлорида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования для подбора оптимальных условий электролиза использовали субстанцию бендазола [2-(Фенилметил)-1Н-бензимидазола гидрохлорид], с молярной массой 244.73 г/моль, с содержанием действующего вещества не менее 99.0% (Усолье-Сибирский химфармзавод ЗАО, Россия) в качестве объекта исследования для выбора оптимальных условий электролиза. Экспериментальные данные получены на полупавтоматическом анализаторе ТА-2 (ООО «НПП «Томьаналит», г. Томск). В работе использовали стеклоуглеродный электрод в

Для количественного определения аналита в стандартизованных тестовых растворах, стандарт

качестве индикаторного и хлорсеребряный (Ag/AgCl) как электрод сравнения. Источником информации служили поляризационные кривые.

Для количественного определения анализируемого вещества в модельных растворах использовали метод стандартных добавок, согласно которому концентрация определяемого вещества рассчитывается по формуле

$$C_x = \left[\frac{C_{st} \cdot V_{доб}}{(V_0 + V_{доб})} \cdot \frac{I_x}{(I_{sum} - I_x)} \right],$$

где C_x — концентрация определяемого вещества, г/мл;

C_{st} — концентрация стандартного раствора, г/мл;

$V_{доб}$ — объем добавки стандартного раствора, мл;

V_0 — объем раствора в ячейке, мл;

I_x — величина сигнала определяемого вещества, мкА;

I_{sum} — величина аналитического сигнала добавки стандартного раствора, мкА.

Каждое из приведенных цифровых значений является средним из трех измерений. Статистическую обработку полученных данных выполняли согласно ОФС 1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов количественного анализа» [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Принимая во внимание литературные данные об электрохимической активности различных функциональных групп, мы предположили, что имидазольное кольцо в структуре молекулы бендазола гидрохлорида наиболее электрохимически активно. Учитывая, что имидазольное кольцо содержит два атома азота, каждый из которых имеет свободную пару электронов, мы предпочли вариант катодной вольтамперометрии. Оптимальным электродом был признан стеклоуглеродный, так как только на нем был выявлен сигнал бендазола (рис. 1).

В качестве фонового электролита выбрали раствор калия хлорида, который обеспечивал широкую область, хорошую электропроводность и необходимую площадь для обработки сигнала, был прост в приготовлении, так как является однокомпонентным, кроме того, имел продолжительный срок годности. Оптимальная концентрация фонового электролита составила 0.01 моль/л. В более концентрированных растворах не наблюдали прироста от добавки при наличии большого остаточного тока, тогда как разбавление приводило к снижению прецизионности. Выбранная же

addition method was used, according to which the concentration of the analyte is calculated by the formula

$$C_x = \left[\frac{C_{st} \cdot V_{add}}{(V_0 + V_{add})} \cdot \frac{I_x}{(I_{sum} - I_x)} \right],$$

where C_x is the concentration of the analyte, g/ml;

C_{st} is the concentration of the standardized solution, g/ml;

V_0 is the volume of solution in the cell, ml;

V_{add} is the volume of the standard solution added, ml;

I_x is the value of the analyte signal, μA ;

I_{sum} is the value of the analytical signal of a standardized solution's additon, μA .

Each of the given numeric values is the average of three measurements. Statistical processing of the obtained data was carried out according to general Pharmacopoeia monograph 1.1.0013.15 “Statistical processing of the results of quantitative analysis” [11].

RESULTS AND DISCUSSION

Taking into account the literature data on the electrochemical activity of various functional groups, we assumed that the imidazole ring in the structure of the bendazole hydrochloride molecule is the most electrochemically active. Considering that the imidazole ring contains two nitrogen atoms, each having a free pair of electrons, we preferred the option of cathodic voltammetry. The glassy carbon electrode was found to be the optimal one since the bendazole signal was detected only on it (Fig. 1).

We chose a potassium chloride solution as the background electrolyte which provided a wide range, the high electrical conductivity and the required area for signal processing, was easy to prepare being one-component, in addition, it had a long shelf life. The optimal concentration of the background electrolyte was 0.01 mol/l. In more concentrated solutions, no gain from the addition was observed in the presence of a large residual current, while dilution led to a decrease in precision. The chosen concentration provided the minimum residual current and the maximum value of the analytical signal.

When determining the optimal pH value of electrolysis, we found that a pronounced and reproducible signal of bendazole hydrochloride is

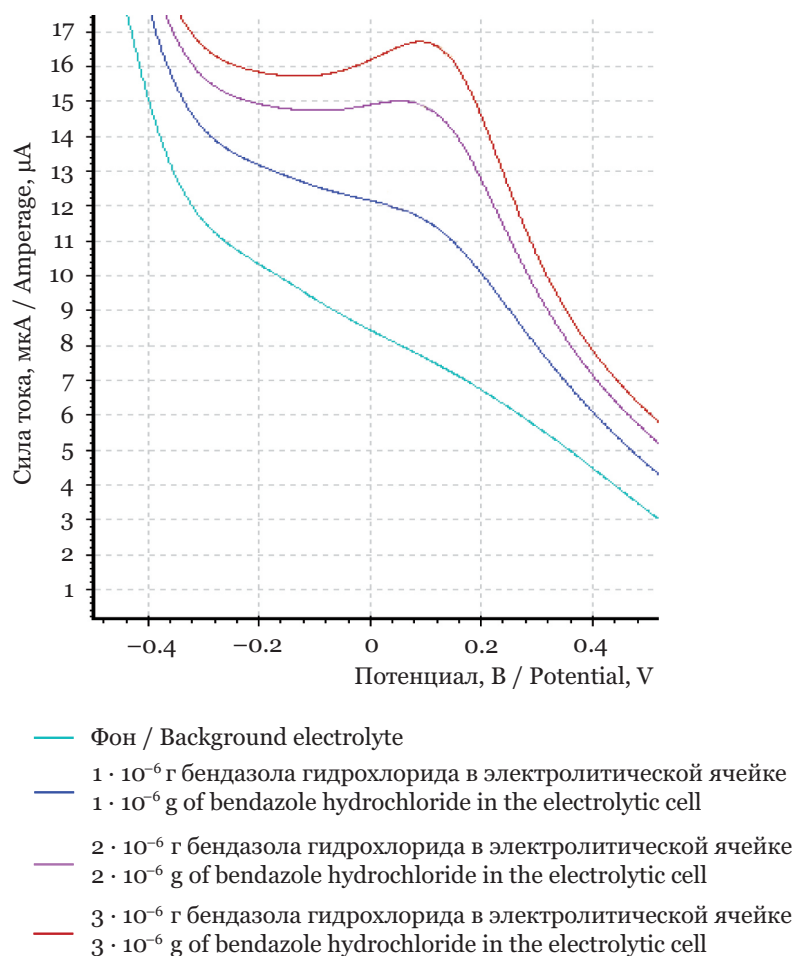


Рис. 1. Вольтамперограмма для раствора стандартного образца бендазола гидрохлорида в концентрации 0.1 мг/л при подобранных условиях (индикаторный электрод — стеклоуглеродный; фоновый электролит — раствор калия хлорида в концентрации 0.01 моль/л)

Fig. 1. Voltammogram for a standardized sample of bendazole hydrochloride solution at a concentration of 0.1 mg/l under selected conditions (indicator electrode is glassy carbon; background electrolyte is a potassium chloride solution at a concentration of 0.01 mol/l)

концентрация обеспечивала минимальный остаточный ток и максимальную величину аналитического сигнала.

При определении оптимального значения pH электролиза установлено, что выраженный и воспроизводимый сигнал бендазола гидрохлорида наблюдается при pH 6–7, тогда как в кислой и щелочной средах при подобранных условиях аналитический сигнал значительно снижался. Таким образом, пришли к заключению о целесообразности использования фонового электролита без добавления буферных растворов при pH 6–7.

Экспериментальным путем установили и другие условия электролиза бендазола гидрохлорида. Оптимальное значение потенциала электролиза составило -1.8 В (рис. 2), смещение которого в более положительную или более отрицательную область приводило к уменьшению величины регистрируемого тока.

observed at pH 6–7, while in acidic and alkaline media under the selected conditions, the analytical signal significantly decreased. Thus, we concluded that it is advisable to use a background electrolyte without adding buffer solutions at pH 6–7.

Other conditions for electrolysis of bendazole hydrochloride were also established experimentally. The optimum value of the electrolysis potential was -1.8 V (Fig. 2), the shift of which to a more positive or more negative area led to a decrease in the value of the recorded current.

The electrolysis time was 15 s since a decrease in this indicator led to a linear decrease of the analytical signal. With an increase in the electrolysis time for more than 15 s, the saturation of the deposit on the electrode occurred, and the analytical signal of bendazole also linearly decreased (Fig. 3).

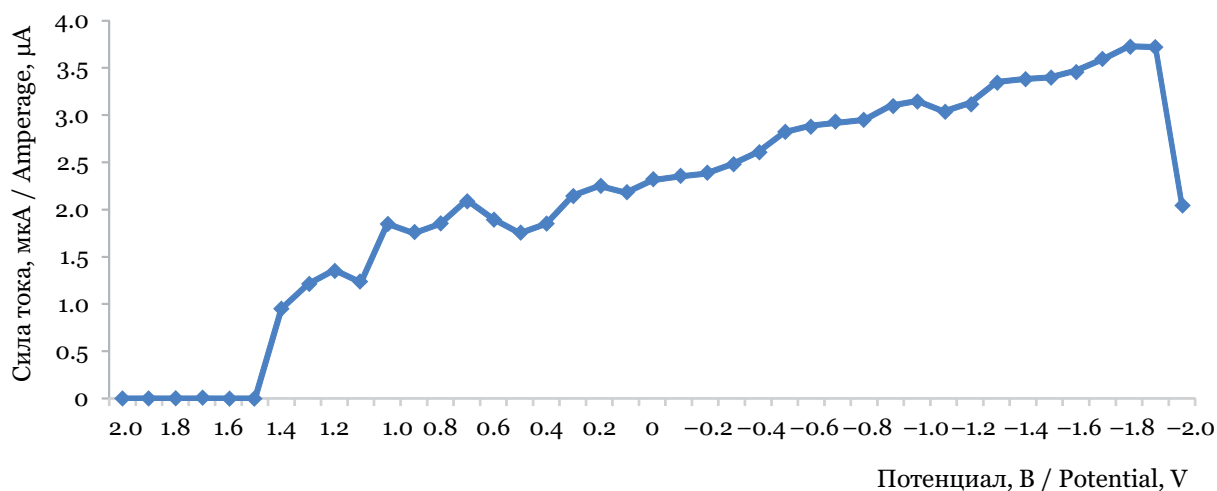


Рис. 2. График зависимости высоты аналитического сигнала бендазола гидрохлорида от потенциала накопления (концентрация раствора стандартного образца бендазола гидрохлорида в электролитической ячейке $1.0 \cdot 10^{-5}$ г/л)
Fig. 2. Dependency graph of the height of the bendazole hydrochloride's analytical signal on the accumulation potential (the concentration of a standard sample solution of bendazole hydrochloride in the electrolytic cell is $1.0 \cdot 10^{-5}$ g/l)

Время электролиза составило 15 с, поскольку уменьшение данного показателя приводило к линейному снижению аналитического сигнала. При увеличении времени электролиза более 15 с происходило насыщение осадка на электроде, и аналитический сигнал бендазола также линейно снижался (рис. 3).

Для определения оптимальной скорости развертки потенциала использовали значения данного параметра в диапазоне от 10 до 150 мВ/с. Высота сигнала возрастала пропорционально увеличению скорости развертки до 50 мВ/с, достигая при этом максимальных значений величины ре-

To determine the optimal potential sweep rate, we used the values of this parameter in the range 10 to 150 мВ/с. The signal height grew up in proportion to the increase in the sweep rate to 50 мВ/с, reaching the maximum values of the recorded current, however, with a further increase in the sweep rate, a noticeable decrease occurred, which negatively affected the detection sensitivity of the test substance (Fig. 4).

Thus, it was possible to reveal the optimal parameters of the electrolysis of bendazole hydrochloride for its quantitative determination. Further, the statistical processing of the obtained results was carried out.

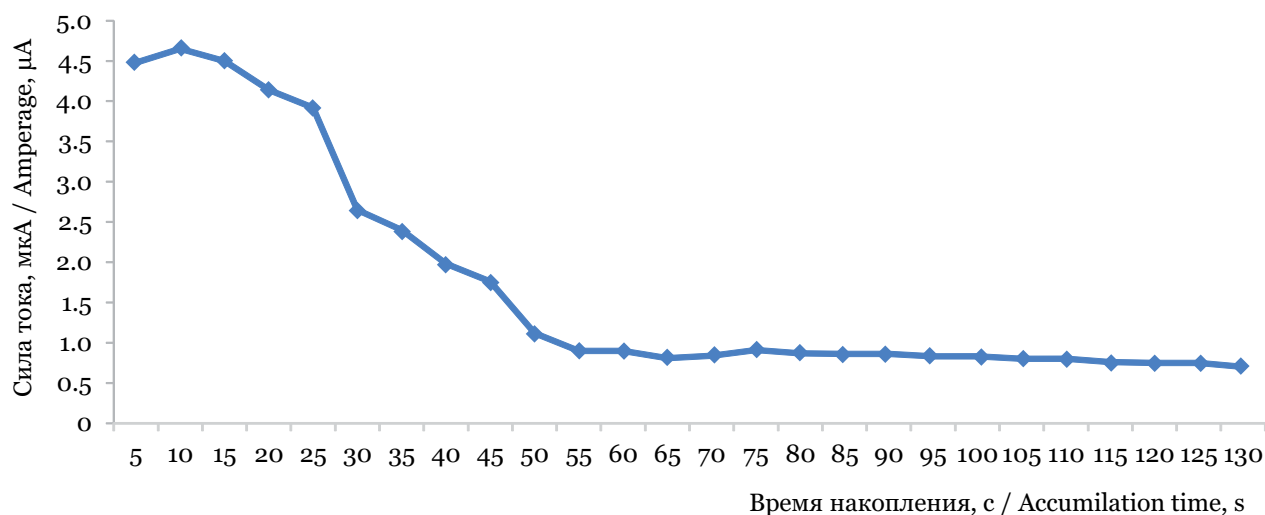


Рис. 3. График зависимости высоты аналитического сигнала бендазола гидрохлорида от времени электролиза (концентрация раствора стандартного образца бендазола гидрохлорида в электролитической ячейке $1.0 \cdot 10^{-5}$ г/л)
Fig. 3. Dependency graph of the height of the bendazole hydrochloride's analytical signal on the time of electrolysis (the concentration of a standard sample solution of bendazole hydrochloride in the electrolytic cell is $1.0 \cdot 10^{-5}$ g/l)

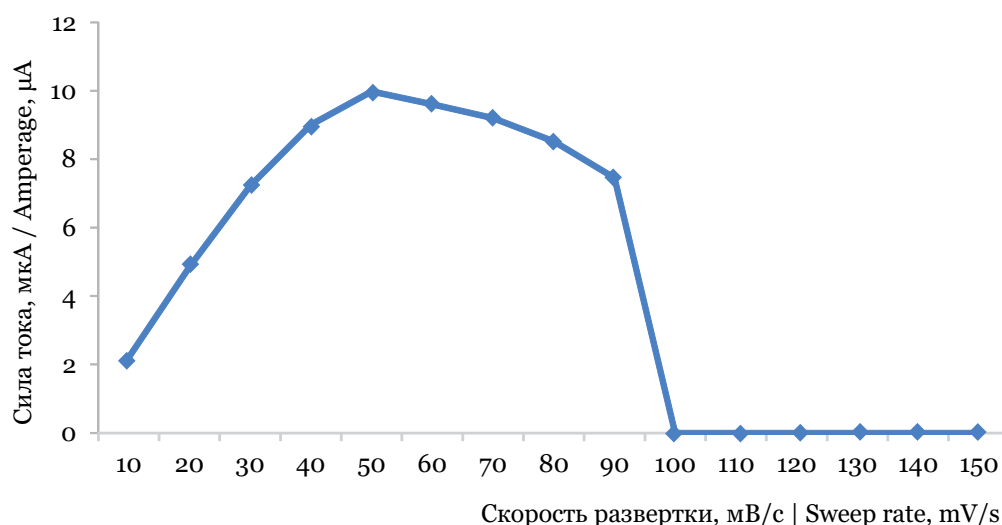


Рис. 4. График зависимости высоты аналитического сигнала бендазола гидрохлорида от скорости развертки (концентрация раствора стандартного образца бендазола гидрохлорида в электролитической ячейке $1.0 \cdot 10^{-5}$ г/л)

Fig. 4. Dependency graph of the height of the bendazole hydrochloride's analytical signal on the sweep rate (the concentration of a standard sample solution of bendazole hydrochloride in the electrolytic cell $1.0 \cdot 10^{-5}$ g/l)

гистрируемого тока, однако при дальнейшем увеличении скорости развертки происходило заметное снижение, что отрицательным образом сказывалось на чувствительности определения исследуемого вещества (рис. 4).

Таким образом, удалось установить оптимальные параметры электролиза бендазола гидрохлорида для его количественного определения. Далее полученные результаты подвергли статистической обработке.

Линейность методики в аналитической области проверяли экспериментально графическим и расчетным способом.

Графический способ заключался в измерении высоты аналитического сигнала вещества при добавлении равных объемов раствора стандартного образца определенной концентрации в электролитическую ячейку (рис. 5). Полученные результаты наглядно продемонстрировали наличие прямолинейной зависимости между концентрацией бендазола гидрохлорида в электролитической ячейке и регистрируемой силой тока.

Расчетный способ оценки линейности применили для десяти проб с различными количествами определяемого вещества. Для этого готовили десять растворов непосредственно из субстанции бендазола гидрохлорида в мерных колбах объемом 100 мл, после чего выполняли количественное определение испытуемого образца в полученных растворах в предлагаемых условиях с помощью вольтамперометрической методики (табл. 1). Коэффициент корреляции составил 0.997, что подтверждает линейный характер ко-

The linearity of the methodology in the range was determined experimentally by graphic and calculation methods.

The graphical method consisted in measuring the height of the analytical signal of a substance when adding equal volumes of a standardized sample solution of a certain concentration into an electrolytic cell (Fig. 5). The results obtained clearly demonstrated the presence of a linear correlation between the concentration of bendazole hydrochloride in the electrolytic cell and the recorded amperage.

The calculation method for evaluating linearity was used for ten samples with different amounts of the analyte. For this, ten solutions were prepared directly from the substance of bendazole hydrochloride in 100 ml volumetric flasks, after which the quantification of the test sample in the obtained solutions was carried out under the proposed conditions using a voltammetric technique (Table 1). The correlation coefficient was 0.997, which confirms the linear nature of the quantitative determination of bendazole hydrochloride using the proposed method in the range from 1 to 10 mg. The free term (a) tends to zero, therefore, the results are not burdened with a systematic error.

To determine the limit of detection, samples were tested with various known amounts (concentrations) of the analyte, and the minimum value was detected, at which the result of the analysis could be assessed visually [11]. This value was an estimate of the detection limit (Fig. 6). The detection limit for bendazole hydrochloride was $1 \cdot 10^{-9}$ g/ml.

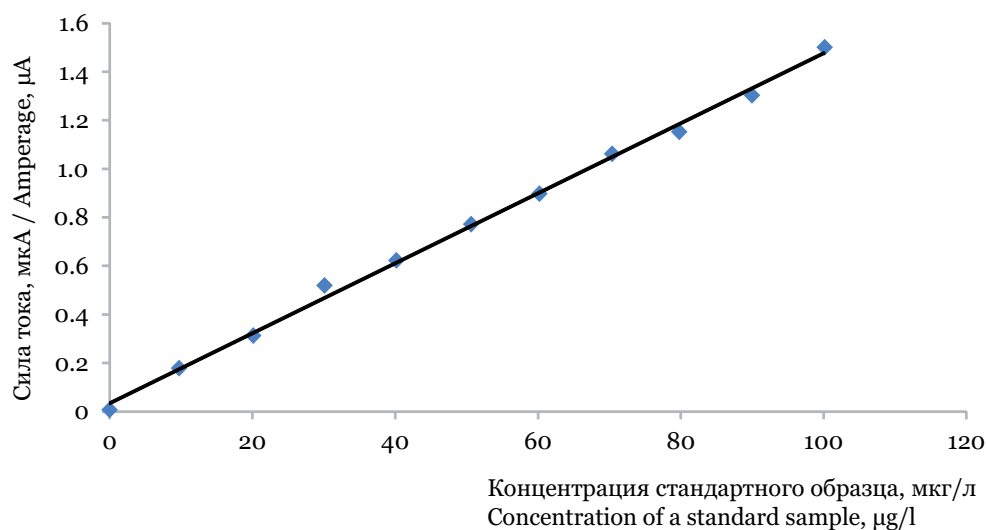


Рис. 5. График зависимости силы тока от концентрации стандартного образца в электролитической ячейке при подобранных условиях (концентрация добавляемого раствора 100 мкг/л)

Fig. 5. Dependency graph of the amperage on the concentration of a standard sample in the electrolytic cell under the selected conditions (the concentration of the added solution is 100 µg/l)

личественного определения бендазола гидрохлорида с помощью предлагаемой методики в диапазоне от 1 до 10 мг. Свободный член (a) стремится к нулю, следовательно, результаты не отягощены систематической ошибкой.

Для определения предела обнаружения проводили испытания образцов с различными известными количествами (концентрациями) определяемого вещества и устанавливали минимальное значение, при котором результат анализа мо-

The precision of the method was evaluated for 90 samples in three series of concentrations — 0.993, 0.0993, 0.00993 mg/l, 30 samples for each. For this, 10 ml of a potassium chloride solution at a concentration of 0.01 mol/l was placed in a 20 ml quartz beaker. The electrolysis was carried out under the following conditions: potential was -1.8 V, time 15 s. A voltammogram was recorded at a constant current form a potential sweep at a rate of 50 mV/s.

Таблица 1. Расчет и статистическая оценка параметров линейной зависимости количества бендазола гидрохлорида по тесту «введено-найдено»

Table 1. Calculation and statistical evaluation of the parameters of the linear dependence of the bendazole hydrochloride amount according to the spike recovery test

№ п/п No.	Навеска бендазола гидрохлорида, взятая для приготовления модельной смеси, мг (x) Weight of bendazole hydrochloride for the preparation of a standardized test mixture, mg (x)	Результаты определения количественного содержания, мг (y) Results of quantitative determination, mg (y)	Расчет основных статистических параметров [11] Calculation of basic statistics parameters [11]
1	1.0	1.2	$x = 5.5; y = 5.62; f = 8;$
2	2.0	2.3	$b = 0.995; a = 0.147;$
3	3.0	2.8	$t [(p; f) \text{ при } / \text{ at } p = 95 \%] = 2.23;$
4	4.0	4.2	$\Delta b = 0.056; \Delta a = 0.347;$
5	5.0	5.1	$S_o^2 = 5.175 \cdot 10^{-2}; r = 0.997$
6	6.0	5.9	$Sx (\text{при } / \text{ at } n_j = 1, y_j = y) = 0.164;$
7	7.0	7.3	$\Delta x = 0.365; \frac{\Delta x \cdot 100}{\bar{x}} = 6.64$
8	8.0	8.2	
9	9.0	9.4	
10	10.0	9.8	
Σ	55.0	56.2	

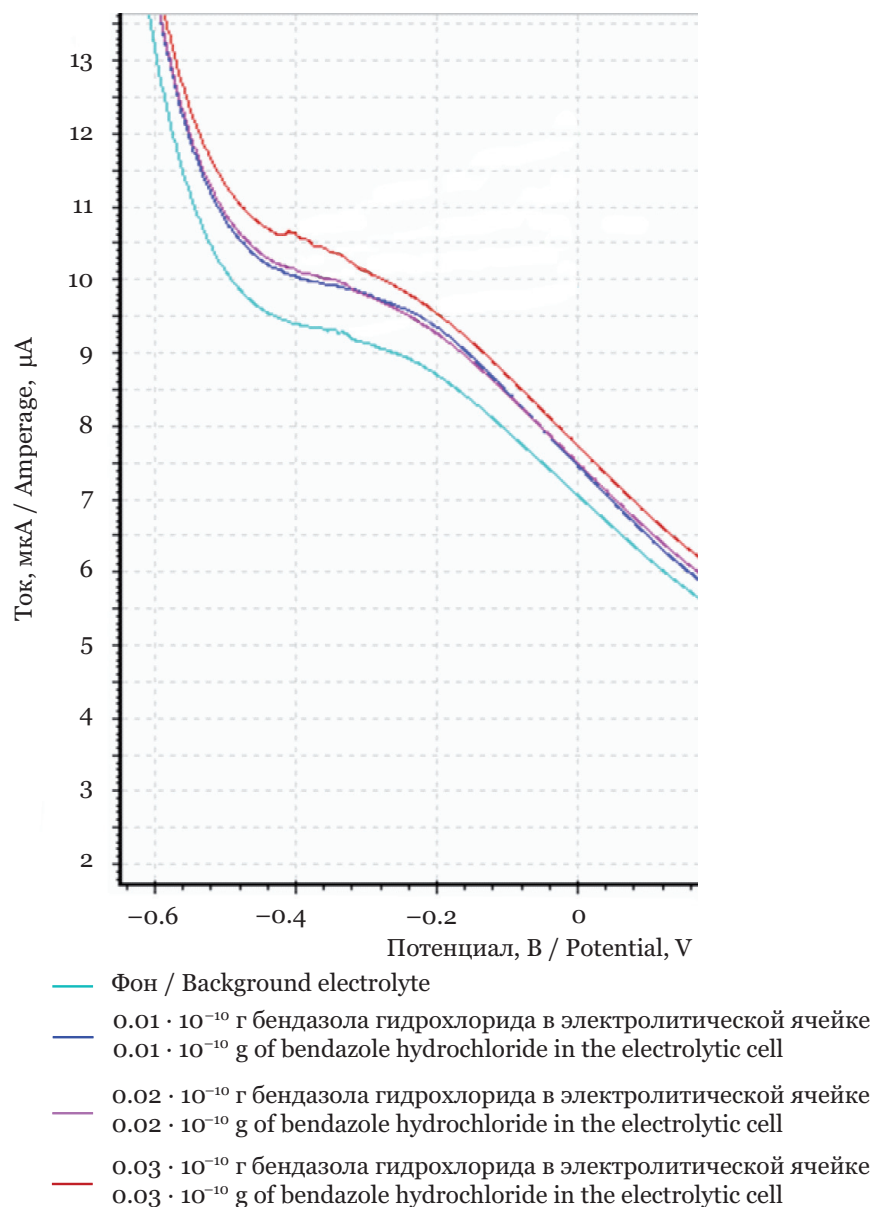


Рис. 6. Вольтамперограмма для раствора стандартного образца бендазола гидрохлорида в концентрации $1 \cdot 10^{-9}$ г/мл при подобранных условиях (индикаторный электрод — стеклоуглеродный; фоновый электролит — раствор калия хлорида в концентрации 0.01 моль/л)

Fig. 6. Voltammogram for a standardized sample solution of bendazole hydrochloride at a concentration of $1 \cdot 10^{-9}$ g/ml under selected conditions (indicator electrode is glassy carbon; background electrolyte is a potassium chloride solution at a concentration of 0.01 mol/l)

жет быть оценен визуально [11]. Это значение являлось оценкой предела обнаружения (рис. 6). Предел обнаружения бендазола гидрохлорида составил $1 \cdot 10^{-9}$ г/мл.

Прецизионность методики оценили для 90 проб в трех сериях концентрации — 0.993, 0.0993, 0.00993 мг/л, по 30 проб для каждой. Для этого в кварцевый стаканчик емкостью 20 мл помещали 10 мл раствора калия хлорида в концентрации 0.01 моль/л. Проводили электролиз при следующих условиях: потенциал -1.8 В, время 15 с. Ре-

Statistical processing of the results was carried out (Table 2) [11].

The calculated Student's coefficients for three series of concentrations do not exceed the table value, which indicates the absence of the method bias and the suitability of this method for the quantification of bendazole hydrochloride.

CONCLUSION

In the course of the development of a method for the voltammetric determination of bendazole

Таблица 2. Метрологические характеристики разработанной методики количественного определения бендазола гидрохлорида (число степеней свободы $f = 19$; доверительная вероятность $p = 95\%$; значение t -критерия Стьюдента — 2.09)

Table 2. Metrological characteristics of the developed method for the bendazole hydrochloride quantification (number of degrees of freedom $f = 19$; confidence interval $p = 95\%$; Student's t -test value — 2.09)

Истинное значение измеряемой величины (мг/л) μ True value of the measured and (mg/l) μ	Среднее выборочное $\bar{x}$ Sample mean value $\bar{x}$	Дисперсия S^2 The variance S^2	Стандартное отклонение S Standard deviation S	Полуширина доверительного интервала Δx Half-width of the confidence interval Δx	Относительная погрешность, % Relative error, %		Коэффициент Стьюдента, полученный расчетным путем $t_{\text{выч}}$ Student's coefficient obtained by calculation T_{calc}
					отдельной варианты ε of individual variance ε	среднего результата $\bar{\varepsilon}$ of mean $\bar{\varepsilon}$	
0.993	$9.927 \cdot 10^{-1}$	$3.226 \cdot 10^{-7}$	$5.679 \cdot 10^{-4}$	$1.187 \cdot 10^{-3}$	1.19	0.27	1.93
0.0993	$9.929 \cdot 10^{-2}$	$7.116 \cdot 10^{-10}$	$2.668 \cdot 10^{-5}$	$5.575 \cdot 10^{-5}$	0.56	0.12	2.01
0.00993	$9.928 \cdot 10^{-3}$	$1.169 \cdot 10^{-11}$	$3.419 \cdot 10^{-6}$	$7.147 \cdot 10^{-6}$	0.72	0.16	0.67

гистрировали вольтамперограмму при постоянной токовой форме развертки потенциала со скоростью 50 мВ/с.

Полученные результаты подвергли статистической обработке (табл. 2) [11].

Рассчитанные коэффициенты Стьюдента для трех серий концентраций не превышают табличное значение, что говорит об отсутствии систематической ошибки метода и пригодности данного метода для количественного определения бендазола гидрохлорида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе разработки методики вольтамперометрического определения бендазола гидрохлорида в модельных растворах экспериментально установлены оптимальные условия электролиза: потенциал -1.8 В, время 15 с, скорость развертки 50 мВ/с. В качестве фоновое электролита был выбран раствор калия хлорида с концентрацией 0.01 моль/л. Оптимальное значение pH для электролиза бендазола гидрохлорида составило 6–7. Предлагаемая методика валидирована по тестам: специфичности и линейности, предела обнаружения; определена аналитическая область методики, ее прецизионность. Таким образом, раз-

работанная методика может использоваться для количественного определения бендазола гидрохлорида в фармацевтических субстанциях.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

работанная методика может использоваться для количественного определения бендазола гидрохлорида в фармацевтических субстанциях.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рамш С.М. История создания отечественного лекарственного препарата Дибазол // Истор.-биол. исследования. 2011. Т. 3, № 4. С. 36–59.
2. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2005. 439 с.
3. Аносов Н.Н. Прозерин, эзерин, дибазол и их применение в невропатологии. Л.: Медгиз. Ленинград. отд-е, 1956. 196 с.

REFERENCES

1. Ramsh S.M. (2011). A history of the drug Dibazole. *Studies in the History of Biology*, 3 (4), 36–59.
2. Mashkovsky M.D. (2005). *Medicines*. Moscow: Novaya Volna, 439 p. In Russ.
3. Anosov N.N. (1956). *Proserin, Eserin, Dibazol and their Use in Neuropathology*. Leningrad: Medgiz, 196 p. In Russ.
4. Laurence D.R., Bennett P.N. (1991). *Clinical Pharmacology*: in 2 vol./ed. V.I. Metelitz (A.Ya. Ivleva,

4. Лоуренс Д.Р., Бенитт П.Н. Клиническая фармакология: в 2 т. / под ред. В.И. Метелицы; пер. с англ. А.Я. Ивлевой, М.Н. Преображенской. М.: Медицина, 1991. Т. 2. 656 с.
5. Белоусов Ю.Б., Гуревич К.Г. Клиническая фармакокинетика. Практика дозирования лекарств: Спец. выпуск серии «Рациональная фармакотерапия». М.: Литтерра, 2005. 288 с.
6. Беликов В.Г. Фармацевтическая химия: Учеб. для вузов. Пятигорск, 2003. Ч. 2: Специальная фармацевтическая химия. 720 с.
7. Осипова А.В., Котлова Л.И., Цокова Т.Н. Применение метода производной УФ-спектрофотометрии для анализа папаверина и дибазола в смеси // Фармацевтический кластер как интеграция науки, образования и производства: тезисы докл. 5-й Междунар. науч.-практ. телеконф. (Белгород, 17 апр. 2015 г.). Белгород, 2015. С. 111–114.
8. Иноземцев П.О., Илларионова Е.А. Высокоэффективная жидкостная хроматография в анализе таблеток «Дибазол» // Вопр. естествознания. 2014. № 3 (4). С. 13–19.
9. Салихжданова Р.М.-Ф. Вольтамперометрия в анализе и исследовании органических соединений // Журн. аналитич. химии. 1992. № 6. С. 136–139.
10. Hodges J., Ray F. Polarography and trace element analysis // Chemistry in Australia. 2012. No. 10. P. 397–412.
11. Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. 14-е изд. М., 2018. Т. 1. 1814 с.
- M.N. Preobrazhenskaya, Trans.). Moscow: Medicine, 2, 656 p.
5. Belousov Yu.B., Gurevich K.G. (2005). *Clinical Pharmacokinetics. Drug Dispensing Practice*. Moscow: Litterra, 288 p. In Russ.
6. Belikov V.G. (2003). *Pharmaceutical Chemistry: Textbook for Universities*. Pyatigorsk, Pt 2: Special pharmaceutical chemistry, 720 p. In Russ.
7. Osipova A.V., Kotlova L.I., Tsokova T.N. (2015). Application of the method of derivative UV spectrophotometry for analysis of papaverine and dibazol in a mixture (pp. 111–114). Pharmaceutical cluster as the integration of science, education and production: abstracts of reports, 5th Int. scientific-practical teleconference. 17th April, Belgorod, Russia. In Russ.
8. Inozemtsev P.O., Illarionova E.A. (2014). High-performance liquid chromatography of Dibazol tablets. *Issues of Natural Sciences*, 3 (4), 13–19. In Russ.
9. Salikhzhdanova R.M. (1992). Voltammetry in the analysis and study of organic compounds. *Journal of Analytical Chemistry*, 6, 136–139. In Russ.
10. Hodges J., Ray F. (2012). Polarography and trace element analysis. *Chemistry in Australia*, 10, 397–412.
11. *State Pharmacopoeia of the Russian Federation*. (2018). Ministry of Health of the Russian Federation. 14th ed. Moscow, 1814 p. In Russ.

ABOUT THE AUTHORS

Zherebtsova Evgeniya Yurievna — Senior Lecturer, Department of Pharmaceutical Chemistry, Novosibirsk State Medical University.

Terentyeva Svetlana Vladimirovna — Dr. Sci. (Pharmaceut.), Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry, Novosibirsk State Medical University.

Ivanovskaya Elena Alekseevna — Dr. Sci. (Pharmaceut.), Professor, Head, Department of Pharmaceutical Chemistry, Novosibirsk State Medical University.

Shinko Tatyana Gennadyevna — Post-graduate Student, Department of Pharmaceutical Chemistry, Novosibirsk State Medical University.

Citation example: Zherebtsova E.Yu., Terentyeva S.V., Ivanovskaya E.A., Shinko T.G. (2021). Development of the voltammetric method for the quantitative determination of bendazole hydrochloride. *Journal of Siberian Medical Sciences*, 1, 55–64.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Жеребцова Евгения Юрьевна — старший преподаватель кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Терентьева Светлана Владимировна — д-р фармацевт. наук, профессор кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Ивановская Елена Алексеевна — д-р фармацевт. наук, профессор, заведующий кафедрой фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Шинко Татьяна Геннадьевна — аспирант кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Образец цитирования: Жеребцова Е.Ю., Терентьева С.В., Ивановская Е.А., Шинко Т.Г. Разработка вольтамперометрической методики количественного определения бендазола гидрохлорида // Journal of Siberian Medical Sciences. 2021. № 1. С. 55–64.

Оценка деструктивного влияния санитарно-гигиенической обработки на укупорочные резиновые пробки с использованием метода определения краевого угла смачивания поверхности

Хусаинов А.Д.¹, Егорова С.Н.², Хасанова А.Д.¹, Симонова Н.Н.¹

¹ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет»

²ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Институт фармации

Assessment of the destructive influence of sanitary cleansing on pharmaceutical rubber stoppers using a method of measuring the contact angle

Khusainov A.D.¹, Egorova S.N.², Khasanova A.D.¹, Simonova N.N.¹

¹Kazan National Research Technological University

²Kazan State Medical University, Institute of Pharmacy

АННОТАЦИЯ

Впервые проведены экспериментальные исследования влияния санитарно-гигиенической обработки на состояние поверхности пробок резиновых медицинских на основе бутиловых и галобутиловых каучуков с использованием метода определения краевого угла смачивания.

Установлено, что санитарно-гигиеническая обработка пробок, проводимая перед укупоркой стерильных форм лекарственных средств (ЛС), включающая предстерилизационную очистку пробок (2-кратное кипячение в течение 30 мин в 1% растворе тринатрийфосфата или едкого натра и однократное кипячение в 0.1% растворе соляной кислоты в течение 30 мин) и последующую стерилизацию в автоклаве при $t = 130^\circ\text{C}$, давлении $p = 0.2$ МПа в течение 60 мин, действует деструктивно на состояние их поверхности и сопровождается уменьшением краевого угла смачивания (увеличением гидрофильности поверхности пробок), что приводит к значительному вымыванию компонентов резиновых пробок и загрязнению ими растворов ЛС.

Определение краевого угла смачивания позволяет воспроизводимым инструментальным методом выявить и количественно оценить процессы деструкции поверхности резиновых пробок, используемых для укупорки стерильных растворов ЛС. Данный показатель может быть использован для оценки влияния фармацевтико-технологических факторов (санитарно-гигиенической обработки, стерилизации, контакта с растворами ЛС и др.) на состояние поверхности резиновых пробок, для контроля деструктивной устойчивости укупорочных средств и прогнозирования содержания посторонних примесей в стерильных растворах ЛС.

Ключевые слова: краевой угол смачивания, резиновые пробки.

ABSTRACT

For the first time, experimental studies of the influence of sanitary cleansing on the surface of pharmaceutical rubber (butyl- and halobutyl-based) stoppers were carried out by measuring the contact angle.

It was found that the sanitary cleansing of stoppers, carried out before the closure of sterile dosage forms of medicinal products (MP), including pre-sterilization cleaning of the stoppers (2-fold boiling for 30 min in 1% solution of trisodium phosphate or sodium hydroxide and a single boiling in 0.1% solution of hydrochloric acid for 30 min) and subsequent ster-

Поступила 13.10.2020
Принята 15.11.2020

Автор, ответственный за переписку
Егорова Светлана Николаевна: ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Институт фармации, 420012, г. Казань, ул. Бутлерова, 49.
E-mail: Svetlana.egorova@kazangmu.ru

Received 13.10.2020
Accepted 15.11.2020

Corresponding author
Egorova Svetlana Nikolayevna: Kazan State Medical University, Institute of Pharmacy, 49, Butlerova str., Kazan, 420012, Russia.
E-mail: Svetlana.egorova@kazangmu.ru

ilization in an autoclave at $t = 130^{\circ}\text{C}$, pressure $p = 0.2 \text{ MPa}$ for 60 min acts destructively on their surface and is accompanied by a decrease of the contact angle (an increase in the hydrophilicity of the stoppers' surface), which leads to significant leaching of the components of rubber stoppers and their contamination of drug solutions.

Determination of the contact angle allows by reproducible instrumental method to identify and quantify the destruction processes of the surface of rubber stoppers used for closing of sterile solutions of MP. This indicator can be used to assess the influence of pharmaceutical and technological factors (sanitary cleansing, sterilization, contact with drug solutions, etc.) on the rubber stoppers surface, to control the corrosive resistance of closures and to predict the amount of impurities in sterile solutions of MP.

Keywords: contact angle, rubber stoppers.

ВВЕДЕНИЕ

Резиновые медицинские пробки используются для укупорки флаконов стерильных лекарственных форм (ирригационных и инъекционных растворов, глазных капель, лиофилизированных порошков антибиотиков и др.) в промышленном производстве и аптечном изготовлении лекарственных средств (ЛС) более 70 лет, однако до настоящего времени отсутствуют данные о влиянии методов санитарно-гигиенической обработки на состояние поверхности пробки, контактирующей с ЛС.

Для производства резиновых пробок используются различные виды каучука: бутилкаучук (БК), хлорбутилкаучук (ХБК), бромбутилкаучук (ББК) и др. В состав резиновых смесей, кроме каучука, входят также различные вспомогательные вещества: наполнители (мел CaCO_3 , литопон $\text{ZnS} + \text{BaSO}_4$, тальк $\text{Mg}_3\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$, каолин $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, аэросил SiO_2), антиоксиданты, пластификаторы, антирады (повышающие стойкость к воздействию ионизирующих излучений), антиозонанты и др. [1], которые находятся в диспергированном состоянии в полимерной основе и практически не вступают с ней во взаимодействие [2], однако могут загрязнять инъекционные растворы и другие ЛС ионами металлов (Fe, Cu, Ti, K, Na, Hg, Cd, Pb), а также Mn и As. Источником миграции серосодержащих соединений из пробок в ЛС являются вулканизующие группы [3]. Для вулканизации резиновых смесей на основе БК используют полимерную серу (S_8), а для ускорения процесса вулканизации — тетраметилтиурамдисульфид (тиурам Д), который полностью претерпевает превращения с образованием более токсичных и канцерогенных веществ: сероуглерода (CS_2), сероокиси углерода (COS), диметилдитиокарбамата цинка $[(\text{CH}_3)_2\text{NCS}_2]_2\text{Zn}$, тетраметилтиомочевина ($\text{C}_3\text{H}_6\text{NS}$) [4, 5].

В производстве импортных пробок на основе бутилкаучука используются более токсичные вулканизующие компоненты, обладающие канцерогенными свойствами: меркаптобензотиа-

INTRODUCTION

Pharmaceutical rubber stoppers are used for closing vials of sterile dosage forms (irrigation and injection solutions, eye drops, lyophilized antibiotic powders, etc.) in industrial and pharmacy production of medicinal products (MP) for more than 70 years, but there is still no data on the influence of the sanitary cleansing methods on the state of the stoppers' surface that is in contact with the MP.

To produce rubber stoppers, various types of rubber are used: butyl rubber (BR), chlorobutyl rubber (ChBR), bromobutyl rubber (BBR), etc. The composition of rubber compounds, in addition to rubber, also includes different excipients: fillers (chalk CaCO_3 , lithopone $\text{ZnS} + \text{BaSO}_4$, talc $\text{Mg}_3\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$, kaolin $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, aerosil SiO_2), antioxidants, plasticizers, antirads (increasing resistance to ionizing radiation), antiozonants, etc. [1]. They are dispersed in a polymer base and practically do not interact with it [2], however, they can contaminate injectable solutions and other MP with metal ions (Fe, Cu, Ti, K, Na, Hg, Cd, Pb), as well as Mn and As. The source of migration of sulfur-containing compounds from stoppers into MP are vulcanizing groups [3]. The polymer sulfur (S_8) is used for vulcanization of butyl rubber compounds, and to accelerate the vulcanization process, tetramethyl thiuram disulfide (thiuram D) is used, which completely transforms with the formation of more toxic and carcinogenic substances: carbon disulfide (CS_2), carbon oxysulfide (COS), dimethyl dithiocarbamate zinc $[(\text{CH}_3)_2\text{NCS}_2]_2\text{Zn}$, tetramethyl thiourea ($\text{C}_3\text{H}_6\text{NS}$) [4, 5].

In foreign-made butyl rubber stoppers, more toxic carcinogenic vulcanizing components such as mercaptobenzothiazole (captax), N-ethylamine (diazaminobenzene), N,N-dithiomorpholine are used [6]. It is also known that butyl rubber and halobutyl rubbers are not resistant to detergents [7].

Manufacturing of stoppers and their sanitary cleansing before MP closing (cleaning by boiling

зол (каптакс), N-этиламин (диазоаминобензол), N,N-дитиоморфолин [6]. Известно, что бутылка-учук и гало-бутылкачуки нестойки к моющим средствам [7].

Изготовление пробок и санитарно-гигиеническая обработка перед укупоркой ЛС (мойка кипячением в щелочных и кислых средствах и стерилизация насыщенным паром в автоклавах [8, 9]) сопровождаются термоокислительной и термодеструктивной деструкцией состава резины, вследствие чего пробки могут стать источником загрязнения ЛС за счет миграции ингредиентов резиновой смеси, продуктов деструкции, растворимых и летучих органических соединений.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение влияния предстерилизационной очистки и стерилизации острым насыщенным паром в автоклавах на состояние поверхности пробок резиновых медицинских.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве критерия оценки деструкции пробок был выбран показатель — краевой угол смачивания Θ , определяемый по наклону поверхности капли жидкости к смоченной части поверхности твердого тела [10]. Значение угла Θ является количественной характеристикой гидрофильности / гидрофобности поверхности исследуемых образцов резин, используемых в производстве пробок фармацевтического назначения для укупорки лекарственных препаратов парентерального введения [11]. Считается, что жидкость смачивает поверхность твердого тела, если краевой угол смачивания меньше 90° , и не смачивает, если величина краевого угла смачивания больше 90° [12].

Эффективное влияние на смачивание оказывают состав резиновых смесей, температура, влажность, моющие средства, в особенности — поверхностно-активные вещества (ПАВ) [10]. При добавлении ПАВ в водные растворы краевые углы капель на гидрофобных поверхностях уменьшаются и наблюдается переход от несмачивания к смачиванию. Для укупорочных пробок, контактирующих длительное время с ЛС, стабильность показателя «краевой угол смачивания», характеризующего изменения микрорельефа и гидрофильности/гидрофобности поверхности пробки и устойчивость резин к деструкции во время санитарно-гигиенической обработки пробок, стерилизации и хранения ЛС, имеет важное значение.

Метод атомно-эмиссионной спектроскопии позволяет проводить элементный анализ ионов металлов и неметаллов в присутствии растворен-

in alkaline and acidic agents and sterilization with saturated steam in autoclaves [8, 9]) are accompanied by thermo-oxidative and thermo-hydrolytic decomposition of the rubber, as a result of which stoppers can become a source of contamination of MP due to the migration of rubber compound ingredients, degradation products, soluble and volatile organic compounds.

AIM OF THE RESEARCH

To study the influence of pre-sterilization cleaning and sterilization with superheated steam in autoclaves on the surface state of pharmaceutical rubber stoppers.

MATERIALS AND METHODS

To assess the destruction of stoppers, as a criterion, we used the contact angle Θ , determined by the slope of the drop surface to the wetted part of the solid surface [10]. The value of the angle Θ is a quantitative characteristic of the hydrophilicity/hydrophobicity of the rubber samples' surface used in the production of pharmaceutical stoppers for closing drugs for parenteral administration [11]. It is considered that a liquid wets the surface of a solid if the contact angle is less than 90° , and does not wet if the value of the contact angle is greater than 90° [12].

The composition of rubber compounds, temperature, humidity, detergents, especially surface active agents (SAA), have a significant impact on wetting [10]. When surface-active agents are added to aqueous solutions, the contact angles of drops on hydrophobic surfaces decrease and a transition from non-wetting to wetting occurs. For stoppers that contact with a MP for a long time, the stability of the contact angle is an indicator of great importance, characterizing changes in the microrelief and hydrophilicity/hydrophobicity of the stoppers' surface and the rubber corrosion resistance during sanitary cleansing of stoppers, sterilization and storage of drugs.

The atomic emission spectroscopy makes it possible to carry out elemental analysis of metal and non-metal ions in the presence of organic substances dissolved in water, as well as to determine the total content of polymer sulfur in the form of bivalent (S_2) from sulfur-containing organic and organometallic compounds and silicon, passing into aqueous extracts from rubber stoppers. It should be borne in mind that only elemental analysis of metal and non-metal cations is performed by the atom-

ных органических веществ в воде, а также определять общее содержание полимерной серы в виде двухвалентой (S_2) из серосодержащих органических и металлоорганических соединений и кремния, переходящих в водные вытяжки из резиновых пробок. При этом следует учитывать, что методом атомно-эмиссионной спектроскопии производится только элементный анализ катионов металлов и неметаллов, а общее количество соединений, содержащих эти элементы, значительно больше.

Определение динамического краевого угла смачивания Θ проводили на тензиометре DCAT 21 (Германия). В данном тензиометре использован метод Вашбурна, основанный на измерении прироста массы смачивающей жидкости на исследуемом образце, удерживаемой его пористой поверхностью после погружения в жидкость в результате капиллярных явлений и адсорбции жидкости. При исследовании краевого угла смачивания использовали «Поролукс» — стандартную жидкость с известной плотностью, вязкостью и поверхностным натяжением и дистиллированную воду. Результаты исследований динамического краевого угла смачивания формировались с использованием программного обеспечения тензиометра DCAT 21.

Объектами исследований были модельные пластины, изготовленные прессованием [13] на основе резиновых смесей марок 27-599/3Б (100 % ХБК), 52-369/1 (80 % БК + 20 % ХБК), 52-599/1 (100 % БК), толщиной 2 мм в исходном состоянии, прошедшие санитарно-гигиеническую обработку (предстерилизационную очистку и стерилизацию).

Приготовление моющих средств для обработки пластин проводилось в соответствии с требованиями [8, 9]. Предстерилизационная очистка модельных пластин состояла из их обработки двукратным кипячением в 1% растворе тринатрийфосфата в течение 30 мин и однократным кипячением в 0.1% растворе соляной кислоты в течение 30 мин. С целью максимального сохранения вымываемых веществ (для исключения потерь при промывке) при количественном определении катионов металлов и неметаллов ополаскивание модельных пластин до нейтрального pH после обработки в каждом моющем растворе не проводилось.

Стерилизацию модельных пластин осуществляли в стеклянных колбах, укуренных алюминиевой фольгой «под обвязку», в дистиллированной воде в соотношении пластина/вода 1 г : 10 мл. Одновременно с образцами пластин в автоклаве

ic emission spectrometry, and the total quantity of compounds containing these elements is much higher.

The dynamic contact angle Θ was measured using a DCAT 21 tensiometer (Germany). This tensiometer is based on the Washbourne method that evaluates the increase in the mass of a wetting fluid on a test sample held by its porous surface after immersion in a liquid, as a result of capillary phenomena and liquid adsorption. When studying the contact angle, we used “Porolux” — a standard liquid with a known density, viscosity and surface tension, and distilled water. The results of studies of the dynamic contact angle were summarized using the software of the DCAT 21 tensiometer.

The objects of studies were test plates made by pressing [13] and based on rubber compounds of 27-599/3B (100% ChBR), 52-369/1 (80% BR + 20% ChBR), 52-599/1 (100% BR) grades, 2 mm thick in its original state. These plates underwent sanitary cleansing (pre-sterilization cleaning and sterilization).

The preparation of detergents for treating the plates was carried out under the requirements [8, 9]. The pre-sterilization cleaning of the test plates consisted of their double boiling in 1% trisodium phosphate solution for 30 min and once boiling in 0.1% hydrochloric acid solution for 30 min. To maximize the preservation of eluted substances (to avoid losses in washing) during the quantitative determination of metal and non-metal cations, we did not rinse the test plates to neutral pH after treatment in each detergent solution.

Sterilization of test plates was carried out in glass flasks, closed with an aluminium foil strapping, in distilled water at a plate/water ratio of 1 g : 10 ml. Simultaneously with the samples of the plates, an equal amount of distilled water was sterilized in an autoclave (control). The plates were sterilized in an autoclave at $t = 130^\circ\text{C}$, pressure $p = 0.2$ MPa for 60 min. This mode of sterilization is mainly used for rubber stoppers 4C, which are used to close liquid forms of MP, and is recommended for comparative experimental studies [8, 14]. After sterilization, the plates were removed from the flask, rinsed with distilled water until reaching neutral pH, placed again in a flask with distilled water (1 : 10) and sterilized in the autoclave in the mode used for sterilizing liquid MP — for 30 min at $t = 120^\circ\text{C}$, $p = 0.11$ MPa.

After sterilization, the aqueous extracts were poured into clean flasks and studied for the content

стерилизовали равное количество дистиллированной воды (контроль). Стерилизацию пластин проводили в автоклаве при $t = 130^\circ\text{C}$, давлении $p = 0.2$ МПа в течение 60 мин. Данный режим стерилизации используется в основном для пробок 4Ц, которыми укупоривают жидкие формы ЛС, и рекомендован для сравнительных экспериментальных исследований [8, 14]. После стерилизации пластины вынимали из колбы, ополаскивали дистиллированной водой до нейтрального значения pH, вновь помещали в колбу с дистиллированной водой (1 : 10) и стерилизовали в автоклаве в режиме, применяемом при стерилизации жидких ЛС — в течение 30 мин при $t = 120^\circ\text{C}$, $p = 0.11$ МПа.

Водные вытяжки после стерилизации сливали в чистые колбы и исследовали на содержание катионов металлоорганических и металло-неорганических соединений с использованием атомно-эмиссионного спектрометра iCAP 6300 Duo (США) по методике [15]. Параллельно исследовали водные вытяжки, полученные из модельных пластин, не прошедших предстерилизационную очистку и простерилизованных в автоклаве в течение 30 мин при $t = 120^\circ\text{C}$, $p = 0.11$ МПа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 представлены результаты определения динамического краевого угла смачивания Θ исследуемых образцов модельных резиновых пластин в исходном состоянии и прошедших санитарно-гигиеническую обработку (предстерилизационную очистку и стерилизацию в автоклаве в течение 60 мин).

Установлено, что в результате санитарно-гигиенической обработки модельных резиновых пластин происходит снижение краевого угла смачивания, свидетельствующее о деструкции их поверхности. Наибольшее изменение краевого угла смачивания — на 21.85° — отмечено для резиновых пластин на основе бутилкаучука.

Полученные результаты, свидетельствующие о деструкции поверхности пробок, позволя-

ют катионов органометаллических и неорганометаллических соединений с использованием iCAP 6300 Duo атомно-эмиссионного спектрометра (США) согласно процедуре [15]. Одновременно, мы изучали водные экстракты, полученные из тестовых пластин, которые не подвергались предстерилизационной очистке и стерилизации в автоклаве в течение 30 мин при $t = 120^\circ\text{C}$, $p = 0.11$ МПа.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the results of measuring the dynamic contact angle Θ for the test rubber plates at the baseline and after sanitary cleansing (pre-sterilization cleansing and sterilization in the autoclave for 60 min).

It was established that the sanitary cleansing of test rubber plates results in the contact angle decrease, which indicates the destruction of their surface. The maximum change in the contact angle — by 21.85° — was for butyl rubber plates.

The results obtained that indicate the destruction of the stopper surface, allow us by changes in the values of the contact angle to assess the influence of sanitary cleansing on the microrelief and hydrophilicity of the stopper surface. The data on the change in the dynamic contact angle after sanitary cleansing of the test rubber plates were compared with the results of the analysis of the content of migrating substances in aqueous extracts obtained from autoclaving of the studied plates, by metal and non-metal cations with the atomic emission spectroscopy (Table 2).

The data in Table 2 indicate that the sanitary cleansing of stoppers (the test plates), designed to ensure the microbiological and chemical purity of sterilized solutions of MP, does not provide the purity of the solutions with respect to the content of metal and non-metal cations, and in some cases even increases the migration of cations from the surface of the stoppers. So, from the test plates of

Таблица 1. Значения динамического угла смачивания
Table 1. Dynamic contact angle values

Материал пластины (марка резиновой смеси) Plate material (rubber compound grade)	Угол смачивания Θ , град.* / Contact angle Θ , deg.*		Снижение угла смачивания Θ , град. Decrease in contact angle Θ , deg.
	Исходные пластины Baseline plates	Стерильные пластины Sterile plates	
27-599/3Б 27-599/3В	109.77 ± 0.17	99.57 ± 0.13	10.50
52-369/1	110.53 ± 0.04	95.64 ± 0.10	14.89
52-599/1	110.73 ± 0.18	88.88 ± 0.94	21.85

* Всего было 3 повторности испытаний.
There were 3 replicates of the tests in total.

ют по изменениям значений краевого угла смачивания оценить влияние санитарно-гигиенической обработки на изменение микрорельефа и гидрофильности поверхности пробок. Данные по изменению динамического краевого угла смачивания после санитарно-гигиенической обработки модельных резиновых пластин были сопоставлены с результатами анализа содержания мигрирующих веществ водных вытяжек, полученных после автоклавирования исследуемых пластин, по катионам металлов и неметаллов методом атомно-эмиссионной спектроскопии (табл. 2).

Данные табл. 2 свидетельствуют о том, что санитарно-гигиеническая обработка пробок (модельных пластин), предназначенная для обеспечения микробиологической и химической чистоты стерилизуемых растворов ЛС, не обеспечивает чистоты растворов в отношении содержания катионов металлов и неметаллов, а в ряде случаев даже увеличивает миграцию катионов с поверхности пробок. Так, из модельных пластин марки резиновой смеси 27-599/3Б на основе ХБК существенно увеличивается переход в раствор катионов алюминия, железа, марганца; из резиновой смеси марки 52-369/1 (80 % БК + 20 % ХБК) более интенсивно вымываются катионы железа, марганца, никеля, цинка, а из пластин на основе резиновой смеси 52-599/1 (100 % БК) усиливается миграция катионов никеля и цинка.

the 27-599/3B ChBR-based rubber compound, the migration of cations of aluminium, iron, manganese into the solution increases significantly; cations of iron, manganese, nickel, zinc are leached more intensively from the 52-369/1 (80% BR + 20% ChBR) rubber compound, and the increased migration of nickel and zinc cations — from the plates made of the 52-599/1 (100% BR) rubber compound.

The data obtained confirm that the sanitary cleansing which is used for the preparation of stoppers before closing the MP has a destructive influence both on the surface of the plates, and the plates as a whole, which is accompanied by a significant leaching of the rubber ingredients into aqueous sterile solutions. This also makes it necessary to control the amount of rubber ingredients in sterile solutions of MP closed with rubber stoppers.

CONCLUSION

The technique used for the first time for measuring the dynamic contact angle Θ makes it possible to reveal and quantify the destruction processes of the rubber stoppers' surface that contacts with sterile forms of MP with a reproducible instrumental method.

This method can be used to assess the influence of pharmaceutical and technological factors (sanitary cleansing, sterilization, contact with solutions of MP, etc.) on the surface state of rubber stop-

Таблица 2. Содержание химических элементов в исследуемых образцах (мг/л, $\pm 10\%$)

Table 2. The content of chemical elements in the test samples (mg / l, $\pm 10\%$)

Марка резиновой смеси Rubber compound grade	Al	As	B	Ca	Cd	Cr	Cu	Fe	K	Li	Mg	Mn	Na	Ni	P	S	Si	Sr	Zn
27-599/3Б:																			
27-599/3Б:																			
СГО не проводилась without SC	0.002	—	0.061	0.881	—	—	—	—	0.026	—	0.086	0.001	0.215	—	—	0.503	1.18	0.006	1.150
СГО проводилась with SC	0.004	—	0.041	0.815	—	—	—	0.001	0.020	—	0.090	0.006	0.232	—	—	0.339	0.75	0.007	0.462
52-369/1:																			
СГО не проводилась without SC	0.031	—	0.382	1.86	—	—	—	—	0.043	—	0.613	0.001	0.701	—	—	4.62	3.44	0.011	0.313
СГО проводилась with SC	0.012	—	0.121	1.84	—	—	—	0.001	0.044	—	0.449	0.002	0.512	0.002	—	1.60	1.59	0.013	0.542
52-599/1:																			
СГО не проводилась without SC	0.050	—	0.649	2.69	—	—	—	0.006	0.069	—	0.154	0.002	0.739	—	—	3.12	5.52	0.012	0.220
СГО проводилась with SC	0.022	—	0.273	2.74	—	—	—	0.001	0.046	—	0.161	0.001	0.445	0.013	—	2.71	2.36	0.013	0.604

Примечание. СГО — санитарно-гигиеническая обработка.

Note. SC — sanitary cleansing.

Полученные данные подтверждают, что санитарно-гигиеническая обработка, которая используется для подготовки пробок перед укупоркой стерильных ЛС, оказывает деструктивное действие как на поверхность пластин, так и на пластины в целом, что сопровождается значительным вымыванием ингредиентов резин в водные стерильные растворы. Это обуславливает также необходимость контроля содержания ингредиентов резин в стерильных растворах ЛС, укупоренных резиновыми пробками.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые использованная методика определения динамического краевого угла смачивания Θ позволяет воспроизводимым инструментальным методом выявить и количественно оценить процессы деструкции, влияющие на состояние поверхности резиновых пробок, контактируемой со стерильными формами ЛС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рецептура и свойства резин для изделий медицинского назначения: Каталог-справочник / Р.А. Вышегородская и др. М.: ЦНИИТЭнефтехим, 1985. 560 с.
2. Гигиеническая оценка резиновых изделий и исходного сырья для их изготовления / Шумская Н.И., Проворов В.Н., Емельянова Л.В. М.: ЦНИИТЭнефтехим, 1981. 67 с.
3. Блох Г.А. Органические ускорители вулканизации каучуков. Л.: Химия. Ленингр. отд-е, 1972. 559 с.
4. Аверко-Антонович Л.А., Аверко-Антонович Ю.О., Давлетбаева И.М., Кирпичников П.А. Химия и технология синтетического каучука. М.: Химия. КолосС, 2008. 357 с.
5. Кирпичников П.А., Береснев В.В., Попова Л.М. Альбом технологических схем основных производств промышленности синтетического каучука. М.: Химия, 1986. 225 с.
6. Симонова Н.Н. и др. Качественная и количественная оценка веществ, мигрирующих из фармацевтических пробок на основе бутилкаучуков в инфузионные лекарственные препараты // Полимеры в медицине и здравоохранении: Междунар. науч. школа. Казань: Изд-во КНИТУ, 2013. С. 45–48.
7. Rupp F., Scheideler L., Geis-Gerstorfer J. Influence of heterogeneous surfaces on contact angle hysteresis: Dynamic contact angle analysis in material research // Chem. Ing. Tech. 2001. Vol. 73 (12). P. 1629–1635.
8. МУ 42-51-21-93. Подготовка резиновых пробок: Метод. указания. М., 1993. 2 с.
9. Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения. Методы, средства и режимы. ОСТ 42-21-2-85. М., 1985. 25 с.
10. Дулина О.А., Свиридова Е.И., Буканов А.М. Некоторые особенности смачивания резин водой // Тонкие химические технологии. 2009. Т. 4, № 5. С. 85–86.

pers, control the corrosion resistance of closures, and also to predict the amount of impurities in sterile solutions of MP.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Данный метод может быть использован для оценки влияния фармацевтико-технологических факторов (санитарно-гигиенической обработки, стерилизации, контакта с растворами ЛС и др.) на состояние поверхности резиновых пробок, контроля деструктивной устойчивости укупорочных средств, а также для прогнозирования содержания посторонних примесей в стерильных растворах ЛС.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

REFERENCES

1. Vyshegorodskaya R.A. et al. (1985). *Formulation and Properties of Rubbers for Medical Products: Dictionary-guide*. Moscow, 560 p. In Russ.
2. Shumskaya N.I., Provorov V.N., Emelyanova L.V. (1981). *Sanitary Assessment of Rubber Products and Raw Materials for Their Manufacture*. Moscow, 67 p. In Russ.
3. Bloch G.A. (1972). *Organic Accelerators of Rubber Vulcanization*. Leningrad: Chemistry, 559 p. In Russ.
4. Averko-Antonovich L.A., Averko-Antonovich Yu.O., Davletbaeva I.M., Kirpichnikov P.A. (2008). *Chemistry and Technology of Synthetic Rubber*. Moscow, 357 p. In Russ.
5. Kirpichnikov P.A., Beresnev V.V., Popova L.M. (1986). *An Album of Technological Schemes of the Main Production Facilities of the Synthetic Rubber Industry*. Moscow, 225 p. In Russ.
6. Simonova N.N. et al. (2013). Qualitative and quantitative assessment of substances migrating from pharmaceutical butyl rubber stoppers into infusion drugs (pp. 45–48). In *Polymers in Medicine and Health Care: Intern. scientific school*. Kazan. In Russ.
7. Rupp F., Scheideler L., Geis-Gerstorfer J. (2001). Influence of heterogeneous surfaces on contact angle hysteresis: Dynamic contact angle analysis in material research. *Chem. Ing. Tech.*, 73 (12), 1629–1635.
8. МУ 42-51-21-93 (1993). *Preparation of Rubber Stoppers: Guidelines*. Moscow, 2 p. In Russ.
9. *Sterilization and Disinfection of Medical Devices. Methods, Means and Modes*. OST 42-21-2-85. Moscow, 25 p. In Russ.
10. Dulina O.A., Sviridova E.I., Bukanov A.M. (2009). Some features of wetting of rubber with water. *Journal Fine Chemical Technologies*, 4 (5), 85–86. In Russ.

11. ГОСТ ISO/TS 10993-19-2011. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 19. Исследования физико-химических, морфологических и топографических свойств материалов. М.: Стандартинформ, 2013. 38 с.
12. Скопинцев И.В., Божко Г.В., Носков С.А., Нечаев В.М. Определение краевого угла смачивания опрыскателей градирни из полимерных композиционных материалов // Вестн. Тамбовского гос. тех. ун-та. 2017. Т. 23, № 4. С. 665–671. doi: 10.17277/vestnik.2017.04.pp.665-671.
13. ГОСТ ISO 23529-2013. Резина. Общие методы приготовления и кондиционирования образцов для определения физических свойств. М.: Стандартинформ, 2014. 14 с.
14. ГОСТ ISO 10993-12-2015. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 12. Приготовление проб и контрольные образцы. М.: Стандартинформ, 2015. 19 с.
15. ГОСТ Р 57165-2016 (ИСО 11885:2007). Вода. Определение содержания элементов методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой. М.: Стандартинформ, 2016. 31 с.
11. GOST ISO / TS 10993-19-2011. *Medical Products. Assessment of the Biological Action of Medical Devices. Pt 19. Investigations of Physical, Chemical, Morphological and Topographic Properties of Materials* (2013). Moscow, 38 p. In Russ.
12. Skopintsev I.V., Bozhko G.V., Noskov S.A., Nechaev V.M. (2017). Determination of the wetting angle of sprinklers for cooling towers made of composite materials. *Transaction of Tambov State Technical University*, 23 (4), 665–671. doi: 10.17277 / vestnik.2017.04.
13. GOST ISO 23529-2013. *Rubber. General Methods of Preparation and Conditioning of Samples for the Determination of Physical Properties* (2014). Moscow, 14 p. In Russ.
14. GOST ISO 10993-12-2015. *Medical Products. Assessment of the Biological Action of Medical Devices. Pt 12. Preparation of Samples and Control Samples*. (2015). Moscow, 19 p. In Russ.
15. GOST R 57165-2016 (ISO 11885: 2007). *Water. Determination of Element Content by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry* (2016). Moscow, 31 p. In Russ.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Хусаинов Альфред Данилович — канд. техн. наук, доцент кафедры химии и технологии переработки эластомеров ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет».

Егорова Светлана Николаевна — д-р фармацевт. наук, профессор, заместитель директора Института фармации по образовательной деятельности ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Хасанова Алсу Даниловна — аспирант кафедры химии и технологии переработки эластомеров ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет».

Симонова Надежда Николаевна — старший научный сотрудник кафедры химии и технологии переработки эластомеров ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет».

Образец цитирования: Хусаинов А.Д., Егорова С.Н., Хасанова А.Д., Симонова Н.Н. Оценка деструктивного влияния санитарно-гигиенической обработки на укупорочные резиновые пробки с использованием метода определения краевого угла смачивания поверхности // Journal of Siberian Medical Sciences. 2021. № 1. С. 65–72.

ABOUT THE AUTHORS

Khusainov Alfred Danilovich — Cand. Sci. (Techn.), Associate Professor, Department of Chemistry and Elastomer Processing Technology, Kazan National Research Technological University.

Egorova Svetlana Nikolayevna — Dr. Sci. (Pharmaceut.), Professor, Deputy Director for Educational Activities, Institute of Pharmacy, Kazan State Medical University.

Khasanova Alsu Danilovna — Post-graduate Student, Department of Chemistry and Technology of Elastomer Processing, Kazan National Research Technological University.

Simonova Nadezhda Nikolayevna — Senior Researcher, Department of Chemistry and Elastomer Processing Technology, Kazan National Research Technological University.

Citation example: Khusainov A.D., Egorova S.N., Khasanova A.D., Simonova N.N. (2021). Assessment of the destructive influence of sanitary cleansing on pharmaceutical rubber stoppers using a method of measuring the contact angle. *Journal of Siberian Medical Sciences*, 1, 65–72.

Сравнение методик количественного определения фармацевтической субстанции висмута субсалицилата методами УФ-спектрофотометрии и инверсионной вольтамперометрии

Визер А.А., Ивановская Е.А., Лигостаев А.В.

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России

The comparison of methods for the quantification of the pharmaceutical substance bismuth subsalicylate by UV-spectrophotometry and stripping voltammetry

Vizer A.A., Ivanovskaya E.A., Ligostaev A.V.

Novosibirsk State Medical University

АННОТАЦИЯ

Представлены результаты сравнительного исследования методик количественного определения активной фармацевтической субстанции (АФС) висмута субсалицилата методами УФ-спектрофотометрии и инверсионной вольтамперометрии (ИВА). Проведена частичная валидация сравниваемых методик по следующим характеристикам: линейность, предел обнаружения, предел количественного определения, правильность. В ходе оценки линейности установлены значения коэффициента корреляции методик — 0.9987 для УФ-спектрофотометрии и 0.9982 для ИВА. Предел обнаружения и предел количественного определения при УФ-спектрофотометрии равнялись 2.35 и 7.12 мкг/мл соответственно, при ИВА — 1.16 и 3.52 мкг соответственно. Правильность определялась по свободному члену уравнения линейности, который был равен 3.34 % от значения середины интервала при анализе методом УФ-спектрофотометрии и 1.93 % — методом ИВА.

Таким образом, обе методики могут использоваться для количественного определения АФС висмута субсалицилата, однако, в связи с тем, что в данном случае преимущественно определяется содержание висмута, метод ИВА является более предпочтительным, так как позволяет анализировать именно эту часть молекулы.

Ключевые слова: количественное определение, висмута субсалицилат, УФ-спектрофотометрия, инверсионная вольтамперометрия.

ABSTRACT

The results of a comparative study of methods for the quantitative determination of the active pharmaceutical substance (APS) bismuth subsalicylate by UV-spectrophotometry and stripping voltammetry (SV) are presented. Partial validation of the compared methods was carried out according to the following characteristics: linearity, detection limit, limit of quantification, accuracy. In the course of linearity assessment, the values of the correlation coefficient of the methods were established — 0.9987 for UV-spectrophotometry and 0.9982 for SV. The detection limit and the limit of quantification for UV-spectrophotometry were 2.35 and 7.12 µg/ml respectively, for SV — 1.16 and 3.52 µg respectively. The accuracy was determined by the constant term of the linearity equation, which was 3.34% of the interval's middle value when analyzed by UV-spectrophotometry and 1.93% by SV.

Thus, both methods can be used for the quantitative determination of the APS of bismuth subsalicylate; however, due to the fact that the content of bismuth is mainly determined in this case, the SV method is more preferable since it allows analyzing this particular part of the molecule.

Keywords: quantification, bismuth subsalicylate, UV-spectrophotometry, stripping voltammetry.

Поступила 19.11.2020
Принята 15.12.2020

Автор, ответственный за переписку
Визер Анна Александровна: ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. 630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52.
E-mail: annawieser@mail.ru

Received 19.11.2020
Accepted 15.12.2020

Corresponding author
Vizer Anna Aleksandrovna: Novosibirsk State Medical University, 52, Krasny Prospect, Novosibirsk, 630091, Russia.
E-mail: annawieser@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Активная фармацевтическая субстанция (АФС) висмута субсалицилат активно используется в медицине с начала XX в. как средство при различных нарушениях функций желудочно-кишечного тракта [1, 2]. В ведущих фармакопеях мира присутствуют частные статьи как отдельно по субстанции, так и по различным лекарственным препаратам висмута субсалицилата с описанием показателей контроля качества и норм в отношении этих показателей [3, 4]. Одним из наиболее важных этапов фармацевтического анализа является количественное определение. Результаты количественного определения фармацевтической субстанции напрямую влияют на производство лекарственных препаратов, так как при введении в состав лекарственного препарата АФС становится действующим веществом. Кроме того, достоверная методика количественного определения позволяет проводить фармацевтическую разработку, валидацию процесса производства, исследования стабильности субстанции с определением оптимальных условий хранения и другие исследовательские работы при подготовке к фармацевтическому производству. При разработке методики важно учитывать и сопутствующие факторы — простоту и скорость выполнения, финансовую и физическую доступность оборудования, реактивов и расходных материалов, так как она предназначена для рутинного проведения анализа в условиях промышленного производства.

В частных статьях по АФС висмута субсалицилат присутствуют методики количественного определения методами титриметрии и спектрофотометрии [3, 4]. Несмотря на то, что эти методики воспроизводимы, у них есть ряд ограничений, обусловленных физико-химическими свойствами данного соединения. Висмута субсалицилат, практически не растворимый в воде и этиловом спирте, растворяется в минеральных кислотах с разложением [3]. Поэтому для перевода вещества в растворенное состояние требуются крайне жесткие условия, такие как сжигание в муфельной печи или нагревание с растворами сильных кислот, что значительно затрудняет пробоподготовку и не позволяет использовать фармакопейные методики для экспресс-анализа.

В настоящем исследовании рассмотрены две методики количественного определения висмута субсалицилата с применением методов УФ-спектрофотометрии и инверсионной вольтамперометрии. Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой области спектра — это фарма-

INTRODUCTION

The active pharmaceutical substance (APS) bismuth subsalicylate has been actively used in medicine since the beginning of the 20th century as a remedy for various disorders of the gastrointestinal tract [1, 2]. In the leading pharmacopoeias of the world, there are individual monographs both for the separate substance and for various medicinal preparations of bismuth subsalicylate with a description of quality control indicators and standards for these indicators [3, 4]. One of the most important stage of pharmaceutical analysis is quantification. Results of the quantitative assay of a pharmaceutical substance directly affect the manufacture of medicinal preparations since, when introduced into the formulation composition, the APS becomes an active ingredient. In addition, a reliable quantification technique allows to perform pharmaceutical development, production process validation, substance stability studies with determination of optimal storage conditions and other research work in preparation for pharmaceutical production. When developing a method, it is important to take into account the accompanying factors — simplicity and speed of execution, financial and physical availability of equipment, reagents and supplies since it is intended for the routine analysis under industrial manufacturing conditions.

In individual monographs on the APS bismuth subsalicylate, there are such quantitative techniques as titrimetry and spectrophotometry [3, 4]. Despite the fact that these techniques are reproducible, they have a number of limitations due to the physical and chemical properties of this compound. Bismuth subsalicylate, practically insoluble in water and ethyl alcohol, dissolves in mineral acids with degradation [3]. Therefore, to transfer a substance to a dissolved state, extremely harsh conditions are required, such as combustion in a muffle furnace or heating with solutions of strong acids, which complicates sample preparation significantly and does not allow for the pharmacopoeial methods of express analysis.

This study considers two methods for the quantitative determination of bismuth subsalicylate using UV-spectrophotometry and stripping voltammetry (SV). UV-visible spectrophotometry is a pharmacopoeial method that is widely used in the analysis of drugs and allows to identify and quantify many organic and inorganic compounds. Stripping voltammetry is an electrochemical method based on the plating of the analyte on the electrode,

копейный метод, получивший широкое применение в анализе лекарственных средств и позволяющий проводить анализ подлинности и определять количество многих органических и неорганических соединений. Инверсионная вольтамперометрия (ИВА) — электрохимический метод, основанный на концентрировании определяемого вещества на электроде с последующим его растворением и регистрацией тока растворения. Несмотря на то, что инверсионная вольтамперометрия не является фармакопейным методом, она часто применяется для анализа пищевых продуктов, почвы, сточных вод и т.д. Наличие в структуре катиона висмута позволяет предположить, что этот метод может успешно применяться для количественного определения субстанции при подборе оптимальных условий анализа.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнение методик количественного определения АФС висмута субсалицилат методами УФ-спектрофотометрии и инверсионной вольтамперометрии посредством проведения частичной валидации для дальнейшего использования в оценке нового лекарственного средства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследований применялась субстанция висмута субсалицилата производства ФГБУН Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН (Новосибирск, номер серии 000001).

Анализ методом инверсионной вольтамперометрии осуществлялся на электрохимическом анализаторе ТА-4 (ООО «НПП «Томьаналит», г. Томск) с использованием программного обеспечения VALabTX, поставляемого в комплекте. Измерения проводились в двухэлектродной ячейке, в качестве рабочего электрода использовался ртутный пленочный электрод (амальгамный), в качестве электрода сравнения — хлорсеребряный.

Спектры поглощения и значения оптической плотности получены на однолучевом автоматизированном спектрофотометре СФ-56 (ООО «ОКБ Спектр», г. Санкт-Петербург) при длине волны максимума поглощения $\lambda = 312$ нм. Методика спектрофотометрического анализа является адаптацией методики, предложенной N.S. Shinde et al. [5], с изменением условий приготовления растворов.

Все применяемые реактивы имели квалификацию «химически чистые» (х.ч.) или «чистые для анализа» (ч.д.а.). В качестве растворителя для приготовления раствора висмута субсалици-

followed by its dissolution and registration of the dissolution current. Although stripping voltammetry is not a pharmacopoeial method, it is often used to analyze food, soil, wastewater, etc. The presence of a bismuth cation in the structure suggests that this method can be successfully used for the quantitative determination of a substance when choosing the optimal analysis conditions.

AIM OF THE RESEARCH

Comparison of methods for the quantification of the APS bismuth subsalicylate by UV-spectrophotometry and stripping voltammetry by means of partial validation for further use in the evaluation of a new medicinal product.

MATERIALS AND METHODS

As an object of research, we used a bismuth subsalicylate substance produced by the Institute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry (Novosibirsk, batch number 000001).

The analysis was carried out on a TA-4 electrochemical analyzer (Tomanalyt LLC, Tomsk) using the VALabTx software supplied with the kit. The measurements were carried out in a two-electrode cell, a mercury film (amalgam) electrode was used as a working electrode, and a silver chloride electrode — as a reference one.

Absorption spectra and optical density values were obtained on a single-beam automated SF-56 spectrophotometer (OKB Spectr LLC, Saint-Petersburg) at the maximum absorption wavelength $\lambda = 312$ nm. The spectrophotometric analysis technique is an adaptation of the technique proposed by N.S. Shinde et al. [5], with a change in the conditions for the preparation of solutions.

All reagents used had the qualification “chemically pure” (purissimum) or “pure for analysis” (pro analysi). An aqueous solution containing 0.2 M nitric acid and 0.2 M sodium nitrate was used as a solvent for preparing a solution of bismuth subsalicylate and the main supporting electrolyte. For spectrophotometric analysis, the solutions were prepared in a 0.5 M hydrochloric acid solution; the same solution was used as a compensating solution.

Within the framework of the study, a partial validation of analytical procedures was carried out in accordance with the General Pharmacopoeia Monograph (GPM) 1.1.0012.15, Validation of Analytical Procedures, according to the following characteristics: linearity, detection limit, limit of quantification, accuracy [5].

лата и основного фонового электролита применялся водный раствор, содержащий 0.2 М азотной кислоты и 0.2 М натрия нитрата. Для спектрофотометрического анализа растворы были приготовлены в растворе хлористоводородной кислоты 0.5 М, этот же раствор использовался в качестве компенсирующего.

В рамках исследования проводилась частичная валидация аналитических методик в соответствии с общей фармакопейной статьей (ОФС) 1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» по следующим характеристикам: линейность, предел обнаружения, предел количественного определения, правильность [5].

Линейность оценивалась на основании результатов анализа серий растворов. Были построены графики зависимости аналитического сигнала (оптическая плотность, высота пика) от концентрации раствора, определены значения коэффициента корреляции r по методу наименьших квадратов ($r \geq 0.99$).

Предел обнаружения (ПО) и предел количественного определения (ПКО) были рассчитаны по величине стандартного отклонения сигнала и угловому коэффициенту графика линейной зависимости (калибровочного графика) по уравнениям (1) и (2):

$$\text{ПО} = \frac{3.3 \cdot S}{b}; \quad (1)$$

$$\text{ПКО} = \frac{10 \cdot S}{b}, \quad (2)$$

где S — стандартное отклонение аналитического сигнала;

b — коэффициент чувствительности, представляющий собой отношение аналитического сигнала к определяемой величине (тангенс угла наклона калибровочной кривой).

Для оценки правильности применялся подход, основанный на оценке результатов изучения линейности валидируемой методики — если свободный член уравнения статистически достоверно не отличается от нуля, то использование методики обеспечивает получение результатов без систематической ошибки. Был выбран критерий, по которому уровень значимости был равен 5 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Линейность. Калибровочные графики, полученные для растворов висмута субсалицилата при использовании методов спектрофотометрии

Linearity was assessed based on the results of analysis of a series of solutions. The graphs of the dependence of the analytical signal (optical density, peak height) on the concentration of the solution were constructed, and the values of the correlation coefficient r were determined using the least squares method ($r \geq 0.99$).

The detection limit (DL) and limit of quantification (LoQ) were calculated from the signal standard deviation and the slope of the linear dependence (calibration curve) using equations (1) and (2):

$$\text{DL} = \frac{3.3 \cdot S}{b}; \quad (1)$$

$$\text{LoQ} = \frac{10 \cdot S}{b}, \quad (2)$$

where S — the standard deviation of the analytical signal;

b — the sensitivity coefficient, which is the ratio of the analytical signal to the determined value (the slope of the calibration curve).

To assess the accuracy, an approach was used based on the statistical evaluation of the results of studying the linearity of the validated method — if the constant term of the equation does not differ significantly from zero, then the use of the method provides results without bias. The criterion was chosen according to which the level of significance was equal to 5%.

RESULTS AND DISCUSSION

Linearity. Calibration curves obtained for bismuth subsalicylate solutions using spectrophotometry and stripping voltammetry are shown on Fig. 1 and 2. The results of statistical processing are presented in Table 1 and 2. The values of the correlation coefficient r obtained using the methods of spectrophotometry and stripping voltammetry were 0.9987 and 0.9982 respectively. In both cases, the result of linearity determination met the requirements of the General Pharmacopoeia Monograph ($|r| \geq 0.99$). The linearity for both methods was calculated within the optimum operating range of the devices, the optical density values did not exceed 1.0, and the peak height — 3.5 μA . For this reason, as well as due to the peculiarities of the measurement, characteristic of each method (with UV-spectrophotometry, the optical density of the solution in the cuvette is measured; with stripping

и инверсионной вольтамперометрии, представлены на рис. 1 и 2. Результаты статистической обработки представлены в табл. 1 и 2. Значения коэффициента корреляции r , полученные при использовании методов спектрофотометрии и инверсионной вольтамперометрии, составили 0.9987 и 0.9982 соответственно. В обоих случаях результат определения линейности соответствовал требованиям общей фармакопейной статьи ($|r| \geq 0.99$). Линейность для обеих методик рассчитана в диапазоне оптимального функционирования приборов, значения оптической плотности не превышали 1.0, высоты пика — 3.5 мкА. По этой причине, а также из-за особенностей проведения измерения, характерных для каждого метода (при УФ-спектрофотометрии измеряется оптическая плотность раствора, находящегося в кювете; при инверсионной вольтамперометрии — высота пика растворения на электроде в среде электролита, испытуемый раствор вносится в электрохимическую ячейку аликвотами) исследованные диапазоны отличаются по величинам и единицам измерения.

Предел обнаружения и предел количественного определения методики анализа методом спектрофотометрии составили 2.35 и 7.12 мкг/мл соответственно, методом инверсионной вольтамперометрии — 1.16 и 3.52 мкг соответственно (см. табл. 1 и 2).

Правильность обеих методик количественного определения установлена в соответствии с пунктом «в» ОФС «Валидация аналитических методик». Отклонение свободного члена уравнения от нуля составило 3.34 % при использова-

вольтамперометрии, the height of the dissolution peak at the electrode in the electrolyte medium, the test solution is introduced into the electrochemical cell by aliquots), the studied ranges differ in values and units of measurement.

The detection limit and the limit of quantification of the analytical procedures by method of spectrophotometry were 2.35 and 7.12 $\mu\text{g/ml}$ respectively, by stripping voltammetry — 1.16 and 3.52 μg respectively (see Tables 1 and 2).

The accuracy of both methods of quantitative determination was established in accordance with the paragraph *b* of the General Pharmacopoeia Monograph, Validation of Analytical Procedures. The deviation of the constant term of the equation from zero was 3.34% when using the spectrophotometry, and 1.93% — stripping voltammetry, which corresponds to the chosen criterion of 5%.

When evaluating the considered validation characteristics of the two compared methods, satisfactory results were obtained, which makes it possible to use both methods for the quantitative determination of the APS bismuth subsalicylate. But at the same time, it is necessary to note some features of both methods. Spectrophotometry is based on measuring the absorption of light of a certain wavelength by a substance; in this case, the absorption maximum of bismuth subsalicylate is in the ultraviolet region ($\lambda = 312 \text{ nm}$). This indicates the absorption of the organic part of the subsalicylate bismuth molecule which has a complex structure, has not yet been studied precisely [7]. In addition, the standard for the assay of bismuth subsalicylate is usually based on the determination of the bismuth ion, therefore,

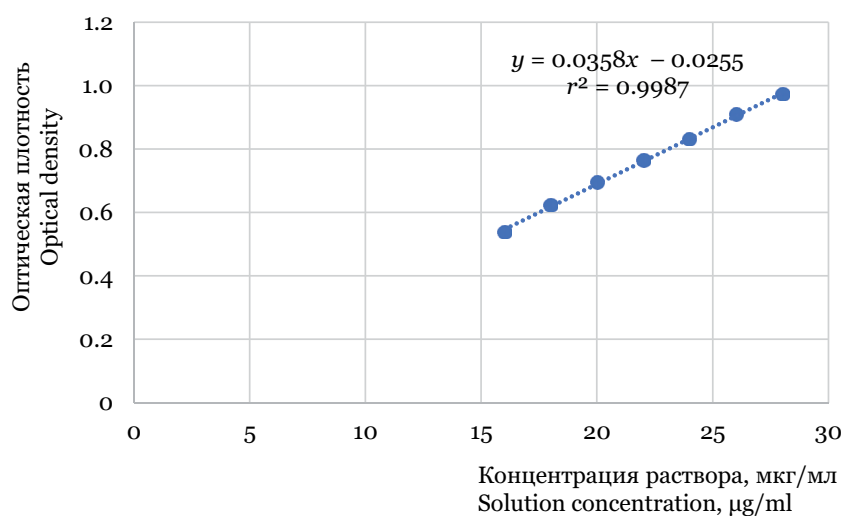


Рис. 1. График линейной зависимости оптической плотности от концентрации раствора висмута субсалицилата
Fig. 1. Graph of the linear dependence of optical density on the concentration of a solution of bismuth subsalicylate

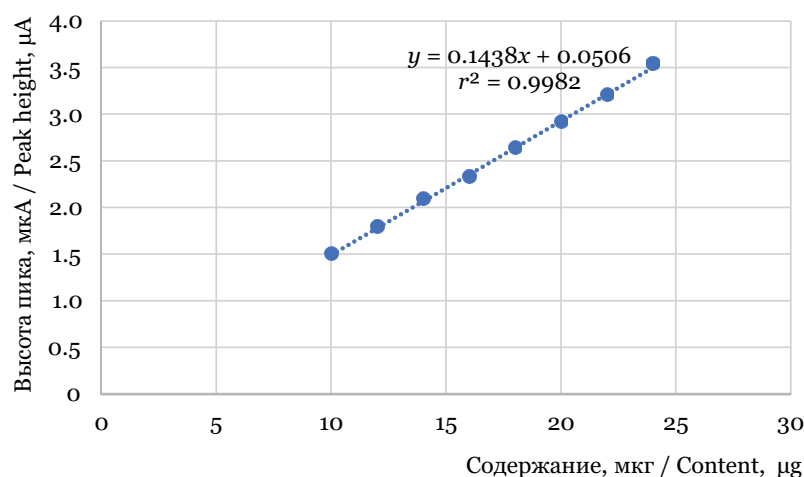


Рис. 2. График линейной зависимости высоты пика от содержания висмута субсалицилата в ячейке
Fig. 2. Graph of the linear dependence of the peak height on the content of bismuth subsalicylate in the cell

нии метода спектрофотометрии и 1.93 % — метода инверсионной вольтамперометрии, что соответствует выбранному критерию 5 %.

При оценке рассматриваемых валидационных характеристик двух сравниваемых методик были получены удовлетворительные результаты, что позволяет использовать обе методики для количественного определения АФС висмута субсалицилата. Но при этом необходимо отметить некоторые особенности обоих методов. Спектрофотометрия основана на измерении поглощения веществом света определенной длины волны, в данном случае максимум поглощения висмута субсалицилата находится в ультрафиолетовой области ($\lambda = 312$ нм). Это указывает на поглощение органической части молекулы висмута субсалицилата, которая имеет сложную структуру, точно до сих пор не изученную [7]. Кроме

the analytical procedures by spectrophotometry in the ultraviolet region, may not meet all the requirements, despite the great advantages.

When analyzed by stripping voltammetry, the analytical signal arises from redox reactions on the electrode surface. Metal ions enter into such interactions, that is widely used in their determination in various media, therefore, in quantitative analysis of bismuth subsalicylate in a substance, it is the current of bismuth dissolution that is measured. This fact, in combination with other advantages of the technique (simplicity of implementation, the possibility of modifying the analysis to select optimal conditions and simultaneous determination of several analytes in the sample) distinguishes it as the most effective for the quantification of the active pharmaceutical substance bismuth subsalicylate.

Таблица 1. Результаты частичной валидации методики количественного определения АФС висмута субсалицилата методом спектрофотометрии

Table 1. Results of the partial validation of the quantitative analysis of the APS bismuth subsalicylate by spectrophotometry

Концентрация раствора, мкг/мл Solution concentration, μg/ml	Оптическая плотность Optical density	Коэффициент корреляции Correlation coefficient	ПО, мкг/мл DL, μg/ml	ПКО, мкг/мл LoQ, μg/ml	Правильность, % Accuracy, %
16	0.539	0.9987	2.35	7.12	3.34
18	0.624				
20	0.695				
22	0.764				
24	0.825				
26	0.903				
28	0.977				

Таблица 2. Результаты частичной валидации методики количественного определения АФС висмута субсалицилата методом инверсионной вольтамперометрии**Table 2.** Results of the partial validation of the quantitative analysis of APS bismuth subsalicylate by stripping voltammetry

Внесенное количество висмута субсалицилата, мкг Introduced amount of bismuth subsalicylate, µg	Высота пика, мкА Peak height, µA	Коэффициент корреляции Correlation coefficient	ПО, мкг DL, µg	ПКО, мкг LoQ, µg	Правильность, % Accuracy, %
10	1.510	0.9982	1.16	3.52	1.93
12	1.764				
14	2.098				
16	2.308				
18	2.619				
20	2.926				
22	3.191				
24	3.542				
26	4.174				

того, норма количественного определения висмута субсалицилата обычно основана на определении именно иона висмута, поэтому методика анализа методом спектрофотометрии в ультрафиолетовой области, несмотря на большие преимущества, может не отвечать всем предъявляемым требованиям.

При анализе методом инверсионной вольтамперометрии аналитический сигнал возникает за счет окислительно-восстановительных реакций на поверхности электрода. В подобные взаимодействия вступают ионы металлов, что широко применяется при их определении в различных средах, поэтому при количественном определении висмута субсалицилата в субстанции измеряется именно ток растворения висмута. Этот факт, в совокупности с другими преимуществами методики (простота выполнения, возможность модификации анализа для подбора оптимальных условий и одновременного исследования нескольких анализируемых веществ в пробе) выделяет ее как наиболее эффективную для количественного определения активной фармацевтической субстанции висмута субсалицилата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное сравнительное исследование двух методик количественного определения АФС

CONCLUSION

The comparative study of two methods for the quantitative determination of the APS bismuth subsalicylate by UV-spectrophotometry and stripping voltammetry allows us to draw the following conclusions:

1. Both methods can be used for quantification the APS.
2. Stripping voltammetry is more preferable since in the quantitative determination of bismuth it allows to analyze precisely this part of the molecule.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

висмута субсалицилата методами УФ-спектрофотометрии и инверсионной вольтамперометрии позволяет сделать следующие выводы:

1. Обе методики могут быть использованы для количественного определения данной АФС.
2. Метод инверсионной вольтамперометрии более предпочтителен, поскольку при количественном определении висмута позволяет анализировать именно эту часть молекулы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bierer D.W. Bismuth subsalicylate: history, chemistry, and safety // *Rev. Infect. Dis.* 1998. Vol. 12 (1). P. S3–S8.

REFERENCES

1. Bierer D.W. (1998). Bismuth subsalicylate: history, chemistry, and safety. *Rev. Infect. Dis.*, 12 (1), S3–S8.

- McQuaid K.R. Drugs used in the treatment of gastrointestinal diseases (Ch. 62) // B.G. Katzung, A.J. Trevor. Basic and Clinical Pharmacology. 13th ed. San Francisco, McGraw-Hill/Medical, 2014.
- Bismuth subsalicylate 1495 (01/2008) // European Pharmacopoeia 9.0. Strasbourg: Directorate for the Quality of Medicines and Health Care, Council of Europe. 2016. Vol. 2. P. 1854.
- The United States Pharmacopeia 41. The National Formulary 36. Rockville (MD), 2018. Vol. 1. P. 536–539.
- Shinde N.S., Mahajan H.A., Kashid L.M., Mokashi S., Kolhe K.G. Assessment of electro-analytical behaviour and method validation of bismuth subsalicylate in pharmaceutical formulation by differential pulse polarography // J. Chemist. Chem. Sci. 2017. Vol. 7 (10). P. 752–762.
- Государственная фармакопея Российской Федерации. 14-е изд. М., 2018.
- Vania A., Hardeman A., Halasz I. et al. Mechano-synthesis of the metallodrug bismuth subsalicylate from Bi_2O_3 and structure of bismuth salicylate without auxiliary organic ligands // Angew. Chem. Int. Ed. 2011. Vol. 50. P. 7858–7861.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Визер Анна Александровна — аспирант кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Ивановская Елена Алексеевна — д-р фармацевт. наук, профессор, заведующий кафедрой фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Лигостаев Александр Валерьевич — канд. фармацевт. наук, доцент кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Образец цитирования: Визер А.А., Ивановская Е.А., Лигостаев А.В. Сравнение методик количественного определения фармацевтической субстанции висмута субсалицилата методами УФ-спектрофотометрии и инверсионной вольтамперометрии // Journal of Siberian Medical Sciences. 2021. № 1. С. 73–80.

- McQuaid K.R. (2014). Drugs used in the treatment of gastrointestinal diseases (Ch. 62). In Katzung B.G., Trevor A.J. (eds.). *Basic and Clinical Pharmacology*. 13th ed. San Francisco, McGraw-Hill Medical.
- Bismuth subsalicylate 1495 (01/2008) (2016). In *European Pharmacopoeia* 9.0. Strasbourg: Directorate for the Quality of Medicines and Health Care, Council of Europe. 2, p. 1854.
- The United States Pharmacopeia 41. The National Formulary 36* (2018). Rockville (MD), 1, pp. 536–539.
- Shinde N.S., Mahajan H.A., Kashid L.M., Mokashi S., Kolhe K.G. (2017). Assessment of electro-analytical behaviour and method validation of bismuth subsalicylate in pharmaceutical formulation by differential pulse polarography. *J. Chemist. Chem. Sci.*, 7 (10), 752–762.
- State Pharmacopoeia of the Russian Federation*. 14th ed. (2018). Moscow. In Russ.
- Vania A., Hardeman A., Halasz I. et al. (2011). Mechano-synthesis of the metallodrug bismuth subsalicylate from Bi_2O_3 and structure of bismuth salicylate without auxiliary organic ligands. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50, 7858–7861.

ABOUT THE AUTHORS

Vizer Anna Aleksandrona — Post-graduate Student, Department of Pharmaceutical Chemistry, Novosibirsk State Medical University.

Ivanovskaya Elena Alekseyevna — Dr. Sci. (Pharmaceut.), Professor, Head, Department of Pharmaceutical Chemistry, Novosibirsk State Medical University.

Ligostaev Aleksandr Valeryevich — Cand. Sci. (Pharmaceut.), Associate Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry, Novosibirsk State Medical University.

Citation example: Vizer A.A., Ivanovskaya E.A., Ligostaev A.V. (2021). The comparison of methods for the quantification of the pharmaceutical substance bismuth subsalicylate by UV-spectrophotometry and stripping voltammetry. *Journal of Siberian Medical Sciences*, 1, 73–80.

Фармакоэпидемиологический анализ применения антимикробных препаратов при заболеваниях нижних дыхательных путей в пульмонологическом отделении многопрофильного стационара Республики Таджикистан

Саидова М.Н.¹, Пулотзода И.П.², Сангинова Н.С.³

¹Таджикский национальный университет (г. Душанбе, Республика Таджикистан)

²Главное управление службы государственного надзора здравоохранения и социальной защиты населения по Согдийской области (г. Худжанд, Республика Таджикистан)

³Медицинский колледж (г. Гулистан, Республика Таджикистан)

Pharmacoepidemiological analysis of the use of antimicrobial drugs for diseases of the lower respiratory tract in the pulmonary department of a multifield hospital of the Republic of Tajikistan

Saidova M.N.¹, Pulotzoda I.P.², Sanginova N.S.³

¹Tajik National University (Dyushambe, Republic of Tajikistan)

²Main Department of the Service of the State Supervision of Healthcare and Social Protection of the Population in the Sughd Region (Khojend, Republic of Tajikistan)

³Medical College (Gulistan, Republic of Tajikistan)

АННОТАЦИЯ

Ц е л ь . Оценка применения антимикробных препаратов (АМП) в пульмонологическом отделении многопрофильного стационара (МПФС) Республики Таджикистан.

М а т е р и а л ы и м е т о д ы . Проведен ретроспективный анализ врачебных назначений у пациентов, проходивших лечение в пульмонологическом отделении Согдийской областной клинической больницы (г. Худжанд, Республика Таджикистан) в 2011–2018 гг. Оценивали использование АМП в совокупности, по группам в соответствии с индексом АТС/DDD ВОЗ: пенициллины, цефалоспорины, аминогликозиды, фторхинолоны, тетрациклины, другие антибиотики, а также отдельно по международным непатентованным наименованиям лекарственных средств (ЛС). В качестве единицы измерения использовалось количество граммов активного вещества, с последующим расчетом показателей «DDD/100 койко-дней» и «процент от общей DDD».

Р е з у л ь т а т ы . Выявлены существенные изменения структуры АМП, применяемых для стартовой антибактериальной терапии инфекций дыхательных путей за исследуемый период. Отмечена выраженная тенденция к снижению использования АМП пенициллинового ряда и макролидов, с переходом на монотерапию цефалоспорины 3-го поколения (цефтриаксон) и частично фторхинолонами.

З а к л ю ч е н и е . Мониторинг применения АМП в отделениях стационара с использованием АТС/DDD-методологии позволяет принимать стратегические решения относительно тактики антибактериальной терапии, определять направление административных мер и в дальнейшем улучшить ассортимент антибактериальных препаратов с введением в практику современных эффективных ЛС.

Ключевые слова: фармакоэпидемиологический анализ, DDD-анализ, пульмонологическое отделение, многопрофильный стационар, антимикробные препараты.

Поступила 28.08.2020
Принята 15.09.2020

Автор, ответственный за переписку
Саидова Мухаббат Нарзуллоевна: Таджикский национальный университет, 734025, г. Душанбе, просп. Рудаки, 17.
E-mail: narzullo@mail.ru

Received 28.08.2020
Accepted 15.09.2020

Corresponding author
Saidova Mukhabbat Narzulloevna: Tajik National University, 17, Rudaki Prospect, Dyushanbe, 734025, Republic of Tajikistan.
E-mail: narzullo@mail.ru

ABSTRACT

Aim. Assessment of the use of antimicrobial drugs (AD) in the pulmonary department of a multifield hospital (MH), the Republic of Tajikistan.

Materials and methods. A retrospective analysis of medical prescriptions of patients who were treated in the pulmonary department of the Sughd Regional Clinical Hospital (city of Khojend, the Republic of Tajikistan) in 2011–2018 was carried out. The use of AD was evaluated in total, by groups in accordance with the WHO ATC/DDD index: penicillins, cephalosporins, aminoglycosides, fluoroquinolones, tetracyclines, and other antibiotics, as well as separately by international nonproprietary names of drugs. The measurable unit was the number of grams of an active substance, followed by the calculation of the indicators DDD/100 bed-days and percentage of total DDD.

Results. Significant changes in the structure of AD used for the initial antibacterial therapy of respiratory tract infections during the study period were revealed. There is a marked tendency to reduce the use of AD of the penicillin family and macrolides, with the transition to monotherapy with cephalosporins of the 3rd generation (ceftriaxone) and partially with fluoroquinolones.

Conclusion. Monitoring the use of AD in hospital departments on basis of the ATC/DDD methodology allows to make strategic decisions regarding the tactics of antibacterial therapy, determine the orientation of administrative measures and improve the range of antibacterial agents with the introduction of the modern effective drugs into practice in the future.

Keywords: pharmacoepidemiological analysis, DDD analysis, pulmonary department, multifield hospital, antimicrobial drugs.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день антимикробные препараты (АМП) относятся к числу наиболее востребованных лекарственных средств в клинической практике. При этом важно отметить, что препараты данной группы назначаются и используются как на амбулаторном, так и на стационарном этапе лечения, что и повышает опасность необоснованного и нерационального их применения [1–3]. Как известно, чрезмерное и неконтролируемое применение АМП при инфекционных заболеваниях существенно снижает эффективность проводимой фармакотерапии, повышает риск развития нежелательных реакций, увеличивает стоимость лечения и, что особенно важно, способствует росту и распространению антибиотикорезистентности [2].

В настоящее время по данным ВОЗ около 50 % всех назначений лекарственных средств являются нерациональными, при этом для АМП этот показатель достигает 80 % [4]. По данным Министерства здравоохранения РФ в России 20–75 % случаев использования АМП считаются нерациональными [3, 5]. Эти цифры свидетельствуют о том, что в мировой медицинской практике существует ряд проблем, связанных с назначением АМП. Первые результаты масштабного европейского проекта European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC) показали, что сегодня скорость адаптации микроорганизмов к АМП значительно превышает эффективность борьбы с ними, что может вновь сделать человечество беззащитным перед инфекциями, погрузив его в постантибиотическую эру. Подтверждением этих опасений является тот факт, что в по-

INTRODUCTION

Nowadays, antimicrobial drugs (AD) are among the most popular medicines in clinical practice. At the same time, it is important to note that drugs of this group are prescribed and used both at the outpatient and inpatient stages of treatment, which increases the risk of unjustified and irrational use of them [1–3]. As it is known, excessive and uncontrolled use of AD in infectious diseases significantly reduces the effectiveness of pharmacotherapy, increases both the risk of adverse reactions and the cost of treatment and, most importantly, contributes to the growth and spread of antibiotic resistance [2].

Currently, according to WHO, about 50% of all drug prescriptions are irrational, while for AD this indicator reaches 80% [4]. According to the Ministry of Health of the Russian Federation, in Russia, 20–75% of cases of AD use are considered irrational [3, 5]. These figures indicate that there are a number of problems associated with the prescription of AD in the world medical practice. The first results of the large-scale European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC) project showed that today the rate of microorganisms' adaptation to AD significantly exceeds the effectiveness of controlling them, which can once again make humanity defenseless against infections, plunging it into a post-antibiotic era. Confirmation of these concerns is the fact that in recent decades, when the acquired bacterial resistance increased, an extremely limited number of novel AD have entered clinical practice, which is largely due to a decrease in the research activity of pharmaceutical companies in this direction [1, 4].

следние десятилетия на фоне роста приобретенной бактериальной резистентности в клиническую практику поступило крайне ограниченное количество новых АМП, что во многом связано со снижением научно-исследовательской активности фармацевтических компаний в этом направлении [1, 4].

В Республике Таджикистан к мировым проблемам добавляются местные негативные особенности применения антибактериальных препаратов: в настоящее время АМП свободно продаются в аптеках, несмотря на законодательно установленный их рецептурный отпуск; не существует системы надзора за устойчивостью возбудителей к АМП; во многих лечебно-профилактических учреждениях (ЛПУ) отсутствует лабораторная база для исследования чувствительности возбудителя к антибиотикам. Именно поэтому существует практика назначения на первом этапе лечения АМП с широким спектром действия, что создает предпосылки для формирования резистентной микрофлоры и снижает эффективность проводимой фармакотерапии в последующем [3, 5].

Исходя из сложившейся ситуации весьма актуальным для Республики Таджикистан является анализ динамики использования АМП и определения основных закономерностей их назначения как на уровне страны, так и на локальном уровне отдельно взятого ЛПУ. Анализ назначений АМП на уровне отделений стационара выявляет проблемы, связанные с их чрезмерным или, напротив, недостаточным использованием. Кроме того, в условиях постоянного роста цен на медико-фармацевтические услуги, неустойчивой социально-экономической ситуации и тотального недофинансирования системы здравоохранения приоритетной задачей является обеспечение качества фармацевтической помощи как с точки зрения ее эффективности и безопасности, так и рациональности расходов. В Республике Таджикистан подобные исследования малочисленны, а информация о потреблении АМП на уровне республики, регионов и отдельных стационаров носит отрывочный и разрозненный характер.

Именно поэтому фармакоэпидемиологическая и фармакоэкономическая оценка реального состояния потребления АМП в Республике Таджикистан является актуальной и своевременной.

Одним из методов фармакоэпидемиологического анализа является АТC/DDD-методология, позволяющая получать количественные данные о потреблении АМП и сопоставлять их между различными отделениями, ЛПУ, регионами, страна-

In the Republic of Tajikistan, local negative aspects of the use of antibacterial agents are added to the world problems: currently, AD are freely sold in pharmacies, despite the legally established prescription release; there is no system for monitoring the resistance of pathogens to AD; in many health care facilities (HCF), there are no laboratory facilities for pathogen's antibiotic susceptibility testing. Therefore, there is a practice of prescribing of broad-spectrum AD at the first stage of treatment, which creates prerequisites for the formation of resistant microflora and reduces the effectiveness of pharmacotherapy afterwards [3, 5].

Based on the current situation, it is very relevant for the Republic of Tajikistan to analyze the dynamics of the use of AD and determine the main patterns of their administration both at the country level and at the local level of a HCF. Analysis of AD prescriptions at the level of hospital departments reveals problems associated with their excessive or, on the contrary, insufficient use. In addition, in the context of the constant increase in prices for medical and pharmaceutical services, the unstable socio-economic situation and the total underfunding of the health system, the priority task is to ensure the quality of pharmaceutical care, both in terms of its effectiveness and safety, and the expenditure rationality. In the Republic of Tajikistan, such studies are not numerous, and information on the consumption of AD at the level of the republic, regions and individual hospitals is fragmentary and miscellaneous.

Therefore, the pharmacoepidemiological and pharmaco-economical assessment of the real state of AD consumption in the Republic of Tajikistan is relevant and timely.

One of the methods of pharmacoepidemiological analysis is the ATC/DDD methodology, which allows us to obtain quantitative data on AD consumption and compare them between different departments, HCFs, regions, and countries. It is the ATC/DDD methodology that is the international standard for research on the use of drugs since 1996 [2, 6]. The DDD (Defined Daily Dose) is the average defined dose of drug for an adult weighing 70 kg, calculated by the WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology [2, 7]. The DDD analysis is a method of evaluating the rationality of drug prescribing, which gives an overall picture of drug consumption and allows making appropriate management decisions [6, 8]. The DDD monitoring of AD makes it possible to obtain real data on their

ми. Именно АТС/DDD-методология с 1996 г. является международным стандартом исследований по применению ЛС [2, 6]. DDD (Defined Daily Dose) — это средняя установленная доза ЛС для взрослого человека массой 70 кг, рассчитываемая Центром ВОЗ по методологии лекарственной статистики [2, 7]. DDD-анализ является методом экспертизы рациональности назначения ЛС, который дает общую картину лекарственного потребления и позволяет принимать соответствующие управленческие решения [6, 8]. Проведение DDD-мониторинга АМП дает возможность получать реальные данные об их применении и оценивать тенденции использования этой группы препаратов в отдельно взятом стационаре или его подразделении в какой-либо временной период [2, 7, 9].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка использования АМП в пульмонологическом отделении многопрофильного стационара (МПФС) Республики Таджикистан с помощью DDD-методологии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на базе пульмонологического отделения Согдийской областной клинической больницы (г. Худжанд, Республика Таджикистан). Проведен анализ врачебных назначений у пациентов, получавших лечение в данном отделении. Нозологическая структура случаев госпитализации в отделение, требующих проведения антибактериальной терапии, включала внебольничную пневмонию и обострение хронических обструктивных заболеваний легких. Исследование проводилось в динамике, в течение 2011–2018 гг. Оценивали использование АМП в совокупности, по группам в соответствии с индексом АТС/DDD ВОЗ [9]: пенициллины, цефалоспорины, аминогликозиды, фторхинолоны, тетрациклины, другие антибиотики, а также отдельно по международным непатентованным наименованиям ЛС. В качестве единицы измерения использовалось количество граммов активного вещества, с последующим расчетом показателей «DDD/100 койко-дней» и «процент от общей DDD». Для учета результатов исследования, расчетов описательной статистики, построения диаграмм использовали программные ресурсы пакета Microsoft Office Excel, 2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный DDD-анализ показал, что в целом применение АМП в данном пульмонологиче-

use and evaluate trends in the use of this group of drugs in a particular hospital or its unit in any time period [2, 7, 9].

AIM OF THE RESEARCH

Assessment of the use of AD in the pulmonary department of a multifield hospital (MH) of the Republic of Tajikistan using the DDD methodology.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted on the basis of the pulmonary department of the Sughd Regional Clinical Hospital (city of Khojend, the Republic of Tajikistan). The analysis of medical prescriptions in patients treated in this department was carried out. The nosologic structure of cases of hospitalization in the department requiring antibacterial therapy included community-acquired pneumonia and exacerbation of chronic obstructive pulmonary diseases. The study was conducted in dynamics, during 2011–2018. The use of AD was evaluated in the aggregate, by group, in accordance with the WHO ATC/DDD index [9]: penicillins, cephalosporins, aminoglycosides, fluoroquinolones, tetracyclines, and other antibiotics, as well as separately by international nonproprietary names of drugs. The measurable unit was the number of grams of the active substance, followed by the calculation of the indicators DDD/100 bed-days and percentage of total DDD. To account the results of the study, calculate descriptive statistics, and plot diagrams, the software resources of the Microsoft Office Excel, 2007 package were used.

RESULTS AND DISCUSSION

The DDD analysis showed that in general, the use of AD in this pulmonary department increased significantly from 2011 to 2018, and in the period of 2016–2018 was in the range of 19.75–21.56 DDD/100 bed-days, while in the previous five years this indicator was only 0.67–1.9 DDD/100 bed-days. In addition, the structure of the use of AD in the pulmonary department of the MH has changed significantly (see Table 1).

Thus, if in 2011 cephalosporins and fluoroquinolones and, to a much lesser extent, penicillins were the basis of antimicrobial therapy for respiratory tract infections (RTI), then in 2015–2018 the vast majority of prescriptions were for AD from the cephalosporin group. It should also be noted that in recent years, the range of AD used for the treatment of RTI has expanded significantly, primarily due to

ском отделении с 2011 по 2018 г. существенно увеличилось и в период 2016–2018 гг. находилось в пределах 19.75–21.56 DDD/100 койко-дней, в то время как в предыдущие пять лет этот показатель составлял лишь 0.67–1.9 DDD/100 койко-дней. Кроме того, существенно изменилась структура применения АМП в пульмонологическом отделении МПФС (табл. 1).

Так, если в 2011 г. основу антимикробной терапии инфекций дыхательных путей (ИДП) составляли цефалоспорины и фторхинолоны и в значительно меньшей степени пенициллины, то в 2015–2018 гг. подавляющее большинство назначений относится к АМП из группы цефалоспоринов. Следует также отметить, что в последние годы существенно расширился спектр АМП, применяемых для лечения ИДП, в первую очередь за счет включения в схемы фармакотерапии заболеваний нижних дыхательных путей макролидов и аминогликозидов.

Как видно из рис. 1, за весь анализируемый период наиболее назначаемыми препаратами были АМП из группы цефалоспоринов, процент от общей DDD которых находился в пределах 57.7–93.8. Достаточно востребованными при лечении ИДП были АМП из группы фторхинолонов, которые занимают второе место по применению в МПФС (6.9–38.6 % от общей DDD). При этом отмечается стабильно высокий интерес к препаратам данного класса в 2015–2018 гг.: в этот период их применение выросло в 5.6 раза. Достаточно стабильно назначались АМП из группы аминогликозидов, удельный вес которых в структуре АМП, используемых при лечении ИДП, в различные годы составляет 3.15–26.4 % от общей DDD. Следует отметить нерегулярное, спорадичное применение АМП из группы пенициллинов и макролидов. Данный факт требует углубленного анализа с точки зрения рациональности фар-

the inclusion of the macrolides and the aminoglycosides in the pharmacotherapy regimens for lower respiratory tract diseases.

As can be seen from Fig. 1, for the entire analyzed period, the most prescribed drugs were the AD from the cephalosporin family, the percentage of total DDD was in the range of 57.7–93.8. AD from the fluoroquinolones family were quite popular in the treatment of RTI, and occupy the second place in the use of MH (6.9–38.6% of the total DDD). At the same time, there was a consistently high interest in drugs of this class in 2015–2018: during this period, their use increased by 5.6 times. AD from the aminoglycosides family were quite steadily prescribed, the proportion of which in the structure of AD used in the treatment of RTI in various years was 3.15–26.4% of the total DDD. It should be noted the irregular, sporadic use of AD from the penicillin and macrolide families. This fact requires an in-depth analysis from the point of view of the pharmacotherapy rationality, taking into account the fact that the drugs of these groups are considered in international guidelines as first-line AD for the treatment of infectious diseases of the lower respiratory tract. According to these recommendations, the initial antibacterial therapy of pneumonia should be carried out using AD from the penicillin or macrolide families (if atypical flora is suspected) or protected penicillins or cephalosporins of the 3rd generation, as the frontline drugs for severe RTI [10].

It is necessary to note a fairly high interest in the pulmonary department of the MH to AD from the aminoglycoside family (6.17–26.4% of the total DDD) (see Fig. 1). Given that AD of this family are not the frontline drugs for RTI, this choice cannot be considered rational. It should be considered

Таблица 1. Динамика применения антимикробных препаратов (DDD/100 койко-дней) в пульмонологическом отделении многопрофильного стационара

Table 1. Dynamics of the use of AD (DDD/100 bed-days) in the pulmonology department of the multifield hospital

Группа препаратов / Drug group	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Пенициллины / Penicillins	0.07	0.16	—	—	—	—	—	0.26
Цефалоспорины / Cephalosporins	1.09	0.50	0.55	0.76	2.39	16.54	12.61	4.13
Аминогликозиды / Aminoglycosides	—	0.28	—	0.05	0.90	0.68	1.42	0.50
Фторхинолоны / Fluoroquinolones	0.73	0.073	0.13	—	0.52	3.03	4.81	3.20
Линкосамиды / Lincosamides	—	0.034	—	—	—	—	—	—
Макролиды / Macrolides	—	0.011	—	—	0.053	1.31	0.91	0.31
В целом по группе АМП In general in AD groups	1.9	1.06	0.68	0.81	3.86	21.56	19.75	8.4

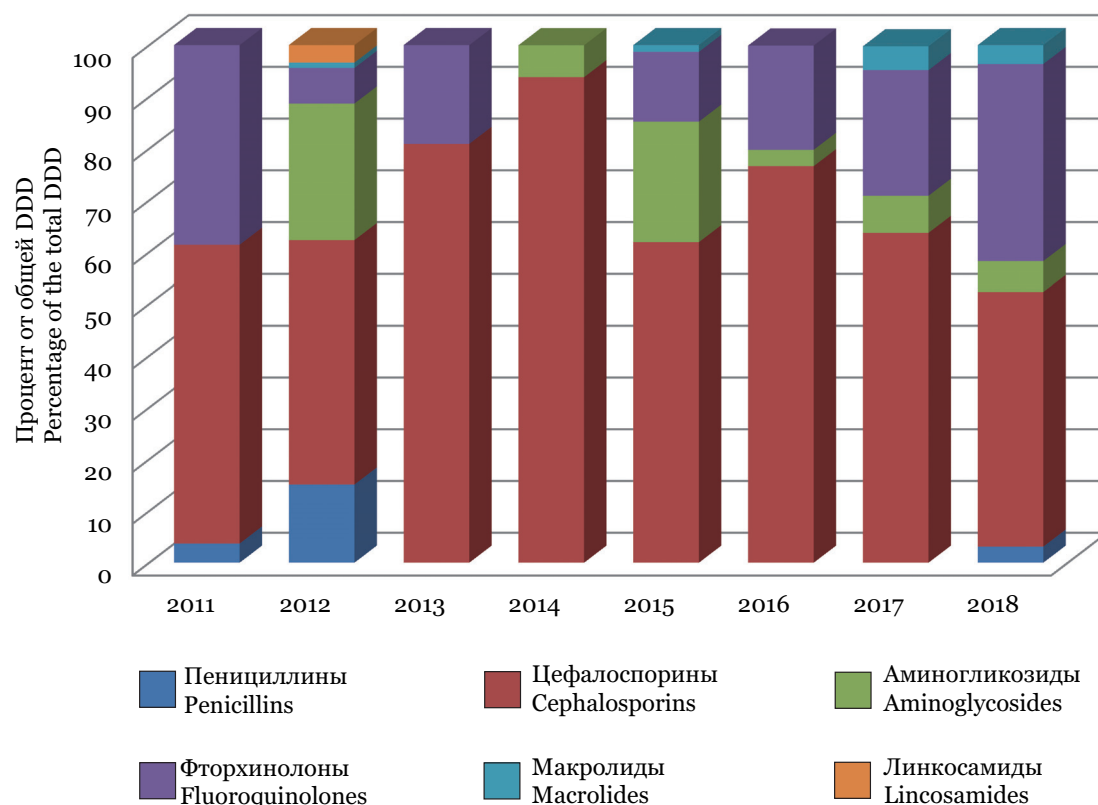


Рис. 1. DDD-анализ групп антимикробных препаратов, применяемых в пульмонологическом отделении МПФС в 2011–2018 гг.

Fig. 1. DDD analysis of AD families used in the pulmonary department of the multifield hospital in 2011–2018

макотерапии, учитывая тот факт, что препараты указанных групп в международных рекомендациях рассматриваются в качестве стартовых АМП для лечения заболеваний нижних дыхательных путей инфекционного генеза. Согласно указанным рекомендациям, стартовая антибактериальная терапия пневмонии должна проводиться с использованием АМП из группы пенициллинов или макролидов (при подозрении на атипичную флору) или защищенными пенициллинами или цефалоспорины 3-го поколения, как препаратами выбора при тяжелых ИДП [10].

Необходимо отметить достаточно высокий интерес в пульмонологическом отделении МПФС к АМП из группы аминогликозидов (6.17–26.4 % от общей DDD) (см. рис. 1). Учитывая, что АМП данной группы не являются препаратами выбора при ИДП, данный выбор нельзя считать рациональным. Позитивным следует считать то, что удельный вес препаратов данного класса (процент от общей DDD) в структуре примененных АМП за анализируемый период снизился почти в 5 раз, однако по количеству DDD интерес к препаратам данного класса остается примерно на одинаковом уровне (см. табл. 1).

positive that the proportion of drugs of this class (a percentage of the total DDD) in the structure of AD used for the analyzed period decreased by almost 5 times, but in terms of the amount of DDD, the interest in drugs of this class remains approximately at the same level (see Table 1).

In the course of further analysis of the AD prescription, it was found (Fig. 2) that an increase in the use of cephalosporin antibiotics over the specified period of time was primarily due to cephalosporins of the 3rd generation, namely ceftriaxone. Thus, in 2011, the proportion of ceftriaxone was 16.44% of the total DDD, and by 2016 this indicator had increased almost 4.3 times (Fig. 2).

In the future, the analyzed indicator tends to a decrease, but remains at a fairly high level. In other words, an increase in the use of the cephalosporins during the study period was solely due to the 3rd generation cephalosporin — ceftriaxone, the proportion of which in the overall structure of AD use in 2016 was 70.25% of the total DDD. Interest in the first-generation cephalosporin, cefazolin, by 2016 was almost lost (1.75% of the total DDD), with a slight trend towards an increase in this indicator

В ходе дальнейшего анализа применения АМП было установлено (рис. 2), что увеличение использования цефалоспориновых антибиотиков за указанный период времени произошло в первую очередь за счет цефалоспоринов 3-го поколения, а именно цефтриаксона. Так, в 2011 г. доля цефтриаксона составляла 16.44 % от общей DDD, а уже к 2016 г. этот показатель увеличился практически в 4.3 раза (см. рис. 2).

В дальнейшем анализируемый показатель имеет тенденцию к снижению, однако остается на достаточно высоком уровне. Иными словами, рост использования цефалоспоринов за исследуемый период произошел исключительно за счет цефалоспоринов 3-го поколения — цефтриаксона, удельный вес которого в общей структуре применения АМП в 2016 г. составил 70.25 % от общей DDD. Интерес к цефалоспоринов первого поколения цефазолину до 2016 г. был практически утра-

in 2018. At the same time, there was an uneven use of cefepime in different years, more often sporadic. Only in 2014–2015, its proportion in the structure of drugs for the treatment of RTI was quite high, which may be due to the peculiarities of the drug procurement in the MH and the distribution of AD by departments.

The frequency analysis of the prescription of fluoroquinolone family antibacterial agents, which are quite often used for the treatment of RTI, showed that in all follow-up periods, drugs from this family occupied the second place among all AD used for the treatment of RTI. There is a clear decrease in interest in the representative of this family ofloxacin over the analyzed period. So, if in 2011, 2013 the percentage of the total DDD of ofloxacin was 38.36–18.56, then in 2016–2018 this indicator was in the range of 2.42–4.34% of the total DDD. At the same time,

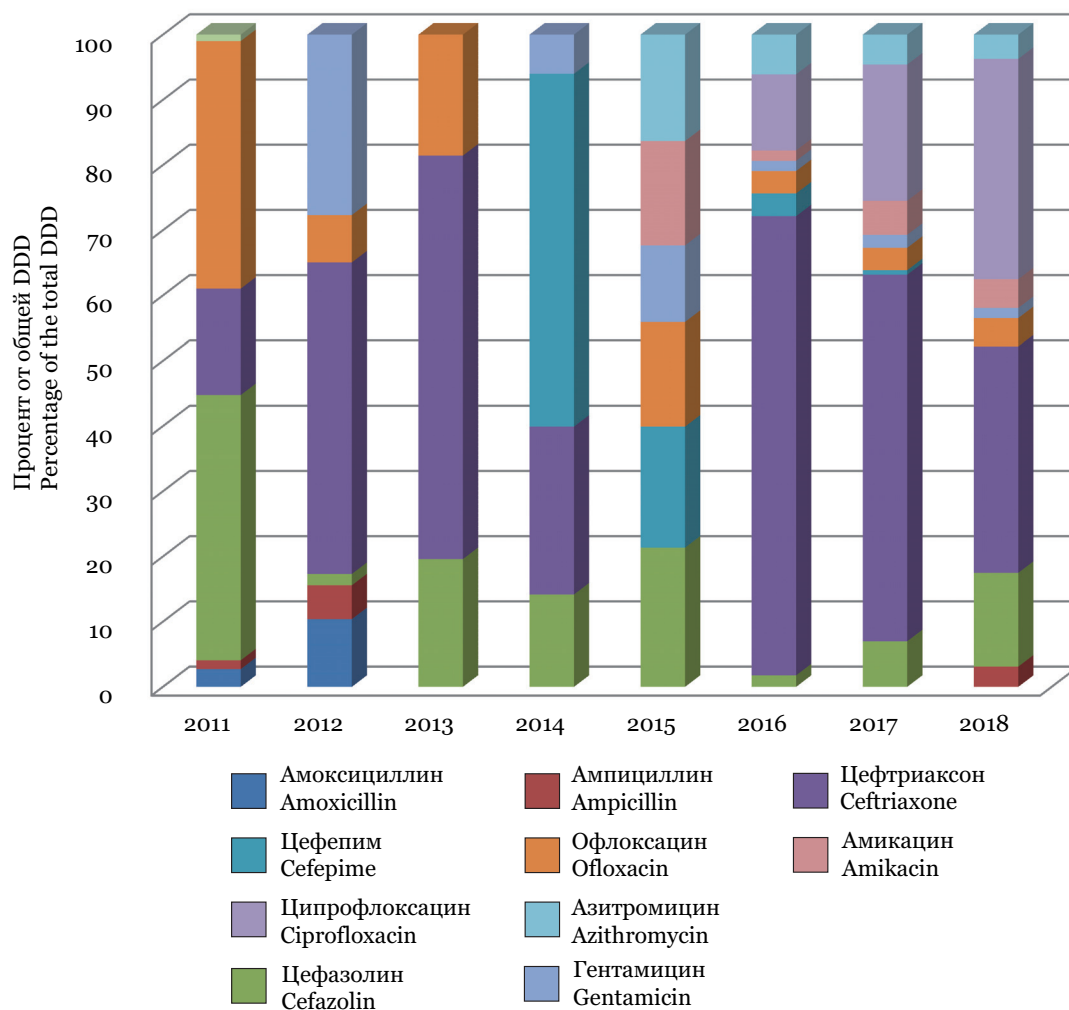


Рис. 2. DDD-анализ применения антимикробных препаратов в пульмонологическом отделении МПФС в 2011–2018 гг.

Fig. 2. DDD analysis of the use of AD in the pulmonary department of the multifield hospital in 2011–2018

чен (1.75 % от общей DDD) с незначительной динамикой к увеличению данного показателя в 2018 г. В то же время наблюдалось неравномерное использование цефепима в различные годы, чаще спорадическое. Лишь в 2014–2015 гг. доля данного препарата в структуре ЛС для лечения ИДП была достаточно высокой, что может быть обусловлено особенностями закупки ЛС в МПФС и распределением их по отделениям.

Частотный анализ применения антибактериальных препаратов из группы фторхинолонов, которые достаточно часто используются для лечения ИДП, показал, что во все периоды наблюдения препараты данной группы занимали второе место среди всех АМП, используемых для лечения ИДП. Четко прослеживается снижение интереса к представителю данного класса офлоксацину за анализируемый период. Так, если в 2011, 2013 гг. процент от общей DDD офлоксацина составлял 38.36–18.56, то в 2016–2018 гг. этот показатель находился в пределах 2.42–4.34 % от общей DDD. При этом ципрофлоксацин применялся лишь в 2016–2018 гг. (11.65–33.81 % от общей DDD). Другие АМП из данной группы в пульмонологическом отделении не применялись. Похожая картина отмечалась и при анализе уровня применения АМП данной группы по количеству DDD/100 койко-дней (рис. 3, 4). Выявлена выраженная тенденция к существенному снижению использования офлоксацина и переходу к фарма-

ципрофлоксацин was used only in 2016–2018 (11.65–33.81% of the total DDD). Other AD from this family were not used in the pulmonary department. A similar pattern was observed when analyzing the level of AD administration in this family by the DDD/100 bed-days parameter (Fig. 3, 4). There is a pronounced tendency to significantly reduce the use of ofloxacin and switch to pharmacotherapy with ciprofloxacin. The data obtained require careful analysis, taking into account the fact that the causative agents of respiratory infections are not very sensitive to drugs of this family, with the exception of the so-called respiratory fluoroquinolones.

The study showed that since 2015, there has been a tendency to a decrease in interest in antibiotics from the aminoglycosides family. During 2011–2014, of the drugs of this family, just gentamicin was used. And only since 2015, in the clinical practice of the pulmonary department, the use of a new generation aminoglycoside – amikacin (4.40–11.98% of the total DDD) was noted. At the same time, the value of the DDD/100 bed-days indicator of amikacin in the specified period was 0.52–0.37 (see Fig. 3, 4). The stable and rather high interest in the AD of this family, amikacin in particular, can be explained only in terms of the results of the antibiotic susceptibility tests since this family of drugs is not included in any of the lists of guidelines on the empirical antimicrobial therapy of RTI.

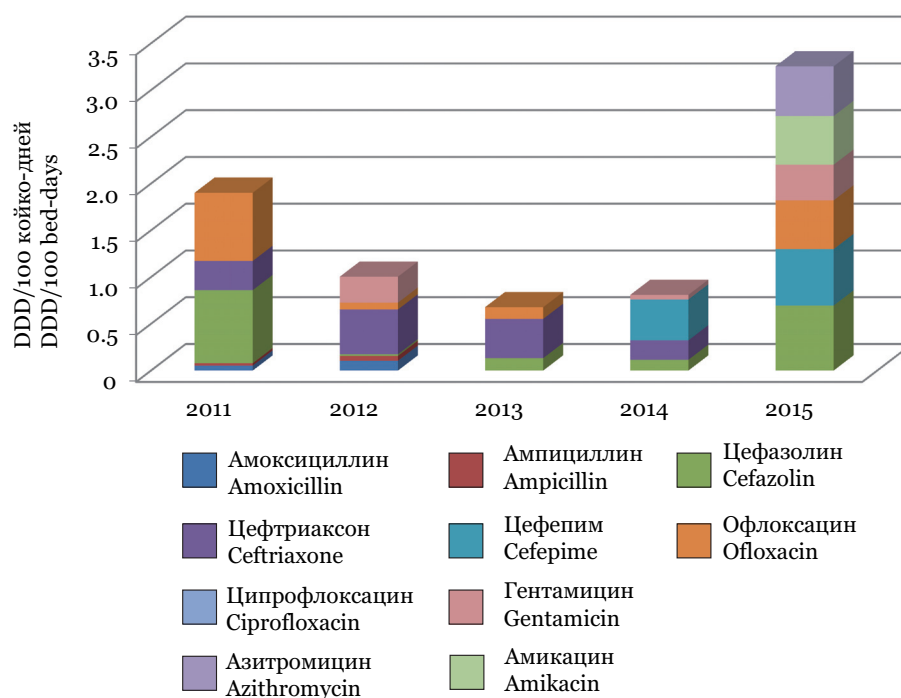


Рис. 3. Динамика применения антимикробных препаратов в пульмонологическом отделении МПФС в 2011–2015 гг.
Fig. 3. Dynamics of the use of AD in the pulmonary department of the multifield hospital in 2011–2015

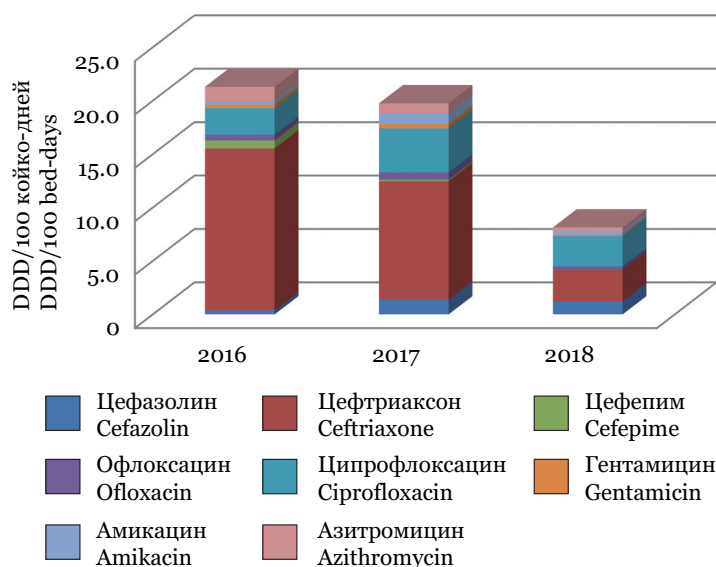


Рис. 4. Динамика применения антимикробных препаратов в пульмонологическом отделении МПФС в 2016–2018 гг.
Fig. 4. Dynamics of the use of AD in the pulmonary department of the multifield hospital in 2016–2018

котерапии ципрофлоксацином. Полученные данные требуют тщательного анализа, учитывая тот факт, что возбудители респираторных инфекций малочувствительны к препаратам данной группы, за исключением так называемых респираторных фторхинолонов.

Исследование показало, что с 2015 г. отмечается тенденция к снижению интереса к антибиотикам из группы аминогликозидов. В течение 2011–2014 гг. из препаратов данной группы использовался лишь гентамицин. И только с 2015 г. в клинической практике врачей пульмонологического отделения отмечено применение аминогликозида нового поколения — амикацина (4.40–11.98 % от общей DDD). При этом значение показателя «DDD/100 койко-дней» амикацина в указанный период составляло 0.52–0.37 (см. рис. 3, 4). Стабильный и достаточно высокий интерес к АМП данной группы, в частности к амикацину, может быть объяснен только с точки зрения результатов теста на чувствительность микрофлоры к АМП, так как данная группа ЛС не входит ни в один из перечней рекомендаций по эмпирической антимикробной терапии ИДП.

Аминогликозиды имеют сравнительно узкий спектр действия, направленный в основном на грамотрицательную флору, анаэробов, стафилококков и т.д. Как правило, они мало активны в отношении пневмококков, гемофильной палочки и внутриклеточных возбудителей, т.е. в отношении наиболее частых возбудителей ИДП. Целесообразность использования этих препаратов возникает только при тяжелом течении заболевания

The aminoglycosides have a relatively narrow spectrum of action, aimed mainly at gram-negative flora, anaerobes, staphylococci, etc. As a rule, they are not very active against pneumococci, *Hemophilus bacillus* and intracellular pathogens, i.e., in relation to the most common pathogens of RTI. The expediency of using these drugs arises only in the severe course of the disease or in the presence of concomitant diseases and risk factors that worsen the prognosis of the disease or are associated with gram-negative microflora and anaerobes [10].

Noteworthy is the low interest in AD from the penicillin family, the proportion of which in the structure of AD consumption in the pulmonary department was 1.37–9.9% of the total DDD (see Fig. 1). We would like to note the unreasonably rare use of drugs of this group as an initial therapy for RTI. Taking into account the available data and international guidelines for the treatment of RTI, today it is penicillins, in particular amoxicillin, that are recognized as the most effective drugs for the initial empirical antibacterial therapy of the bronchopulmonary system diseases in which *S. pneumoniae* is the most frequent and significant pathogen with high susceptibility to AD from the penicillin family [11]. This trend is typical for most European countries, where the proportion of the inhibitor-protected penicillins in the total structure of penicillins consumption exceeded 50% [5]. The data obtained require an analysis of the situation in the Republic of Tajikistan, taking into account the regional features of the susceptibility of microflora to AD.

или при наличии сопутствующих заболеваний и факторов риска, которые ухудшают прогноз заболевания или ассоциируются с граммотрицательной микрофлорой и анаэробами [10].

Обращает на себя внимание низкий интерес к АМП из группы пенициллинов, доля которых в структуре потребления АМП в пульмонологическом отделении составляла 1.37–9.9 % от общей DDD (см. рис. 1). Хотелось бы отметить необоснованно редкое использование препаратов данной группы в качестве стартовой терапии ИДП. Учитывая имеющиеся данные и международные рекомендации по лечению ИДП, сегодня именно пенициллины, в частности амоксициллин, признаны наиболее эффективными препаратами для стартовой эмпирической антибактериальной терапии заболеваний бронхолегочной системы, при которых *S. pneumoniae* является наиболее частым и значимым этиопатогеном с высокой чувствительностью к АМП из группы пенициллина [11]. Такая тенденция характерна для большинства европейских стран, где удельный вес ингибиторозащищенных пенициллинов в общей структуре потребления данной группы АМП превышал 50 % [5]. Полученные данные требуют анализа ситуации, сложившейся в Республике Таджикистан с учетом региональных особенностей чувствительности микрофлоры к АМП.

Таким образом, полученные данные еще раз подтверждают существенное изменение подходов к стартовой антибактериальной терапии ИДП в фармакотерапии ИДП в Республике Таджикистан, с преимущественным использованием цефалоспоринов 3-го поколения, а именно цефтриаксона.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

DDD-анализ применения антимикробных препаратов в пульмонологическом отделении многопрофильного стационара Республики Таджикистан показал существенные изменения структуры потребления антимикробных препаратов, используемых для стартовой антибактериальной терапии инфекций дыхательных путей в период 2011–2018 гг. Выявлена выраженная тенденция к снижению применения антимикробных препаратов пенициллинового ряда и макро-

Thus, the data obtained once again confirm a significant change in the approaches to the initial antibacterial therapy of RTI in the Republic of Tajikistan, with the predominant use of cephalosporins of the 3rd generation, namely ceftriaxone.

CONCLUSION

The DDD analysis of the use of AD in the pulmonary department of the multifield hospital in the Republic of Tajikistan showed significant changes in the structure of the AD consumption used for the initial antibacterial therapy of respiratory tract infections in the period 2011–2018. There is a clear trend towards a decrease in the use of antimicrobial agents of the penicillin and macrolide families, with the transition to monotherapy with cephalosporins of 3rd generation (ceftriaxone) and partially with fluoroquinolones.

Monitoring the use of AD in the departments of the MH using the ATC/DDD methodology allows to make strategic decisions regarding the tactics of antibacterial therapy, determine the direction of administrative measures and further improve the range of antibacterial agents with the introduction of modern effective drugs into practice.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

лидов, с переходом на монотерапию цефалоспоринов 3-го поколения (цефтриаксон) и частично фторхинолонами.

Мониторинг применения антимикробных препаратов в отделениях МПФС с использованием ATC/DDD-методологии позволяет принимать стратегические решения относительно тактики антибактериальной терапии, определять направление административных мер и в дальнейшем улучшить ассортимент антибактериальных препаратов с введением в практику современных эффективных ЛС.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Coenen S., Gielen B., Blommaert A. et al. Appropriate international measures for outpatient antibiotic prescribing and consumption: recommendations from a national data comparison of different measures // *J. Antimicrob. Chemother.* 2014. Vol. 69 (2). P. 529–534.
2. Bagger K., Sternhagen Nielsen A.B., Siersma V., Bjertrum L. (2015). Inappropriate antibiotic prescribing and

REFERENCES

1. Coenen S., Gielen B., Blommaert A. et al. (2014). Appropriate international measures for outpatient antibiotic prescribing and consumption: recommendations from a national data comparison of different measures. *J. Antimicrob. Chemother.*, 69 (2), 529–534.
2. Bagger K., Sternhagen Nielsen A.B., Siersma V., Bjertrum L. (2015). Inappropriate antibiotic prescribing

- demand for antibiotics in patients with upper respiratory tract infections is hardly different in female versus male patients as seen in primary care // *Eur. J. Gen. Pract.* 2015. Vol. 21 (2). P. 118–123.
3. Llor C., Monedero M.J., García G. et al. Interventions to improve adherence to first-line antibiotics in respiratory tract infections. The impact depends on the intensity of the intervention // *Eur. J. Gen. Pract.* 2014. Vol. 21 (1). P. 12–18.
 4. Laxminarayan R., Duse A., Wattal C. et al. Antibiotic resistance — the need for global solutions // *Lancet Infect. Dis.* 2013. Vol. 13 (12). P. 1057–1098.
 5. Лысенко Г.В. Применение антибактериальных средств при внебольничной пневмонии. От обзора литературы к собственным данным // *Вестн. совр. клин. медицины.* 2014. Т. 7, вып. 4. С. 53–56.
 6. Чеберда А.Е. Исследования потребления лекарственных средств // *Качественная клин. практика.* 2017. № 1. С. 42–45.
 7. Рачина С.А., Козлов Р.С., Белькова Ю.А. Фармакоэпидемиология: от теоретических основ к практическому применению // *Фармакоэкономика.* 2014. Т. 7, № 1. С. 33–39.
 8. Bell B.G., Schellevis F., Stobberingh E., Goossens H., Pringle M. A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance // *BMC Infect. Dis.* 2014. Vol. 14. Art. number: 13 (2014).
 9. Guidelines for ATC classification and DDD assignment. URL: http://www.whocc.no/atc_ddd_index_and_guidelines/guidelines/. Дата обращения: 15.01.2021.
 10. Программа СКАТ (Стратегия Контроля Антимикробной Терапии) при оказании стационарной медицинской помощи: Российские клинические рекомендации / под ред. С.В. Яковлева, Н.И. Брико, С.В. Сидоренко, Д.Н. Проценко. М.: Перо, 2018. 156 с.
 11. Harbarth S., Balkhy H.H., Goossens H. et al. Antimicrobial resistance: one world, one fight // *Antimicrob. Res. Infect. Control.* 2015. Vol. 4. Art. number: 49 (2015).
- and demand for antibiotics in patients with upper respiratory tract infections is hardly different in female versus male patients as seen in primary care. *Eur. J. Gen. Pract.*, 21 (2), 118–123.
3. Llor C., Monedero M.J., García G. et al. (2014). Interventions to improve adherence to first-line antibiotics in respiratory tract infections. The impact depends on the intensity of the intervention. *Eur. J. Gen. Pract.*, 21 (1), 12–18.
 4. Laxminarayan R., Duse A., Wattal C. et al. (2013). Antibiotic resistance — the need for global solutions. *Lancet Infect. Dis.*, 13 (12), 1057–1098.
 5. Lysenko G.V. (2014). Practice of antibacterial treatment for community-acquired pneumonia. From the literature review to own data. *Bulletin of Contemporary Clinical Medicine*, 7 (4), 53–56.
 6. Cheberda A.E. (2017). Drug utilization research. *Good Clinical Practice*, 1, 42–45.
 7. Rachina S.A., Kozlov R.S., Belkova Yu.A. (2014). Pharmacoepidemiology: from theory to practice. *Pharmakoeconomika: Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoepidemiology*, 7 (1), 33–39. In Russ.
 8. Bell B.G., Schellevis F., Stobberingh E., Goossens H., Pringle M. (2014). A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. *BMC Infect. Dis.*, 14: 13 (2014).
 9. Guidelines for ATC classification and DDD assignment. Retrieved on January 15, 2021 from http://www.whocc.no/atc_ddd_index_and_guidelines/guidelines/.
 10. Yakovleva S.V., Briko N.I., Sidorenko S.V., Protsenko D.N. (eds.) (2018). *Antimicrobial Stewardship Strategy (AMS strategy): The Clinical Guidelines*. Moscow, 156 p. In Russ.
 11. Harbarth S., Balkhy H.H., Goossens H. et al. (2015). Antimicrobial resistance: one world, one fight. *Antimicrob. Res. Infect. Control*, 4: 49 (2015).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Саидова Мухаббат Нарзуллоевна — канд. фармацевт. наук, доцент, заведующий кафедрой фармации Таджикского национального университета (г. Душанбе, Республика Таджикистан).

Пулотзода Илхом Пулот — руководитель Главного управления службы государственного надзора здравоохранения и социальной защиты населения по Согдийской области (г. Худжанд, Республика Таджикистан).

Сангинова Нелюфар Сомиевна — ассистент кафедры фармации медицинского колледжа г. Гулистан (Республика Таджикистан).

Образец цитирования: Саидова М.Н., Пулотзода И.П., Сангинова Н.С. Фармакоэпидемиологический анализ применения антимикробных препаратов при заболеваниях нижних дыхательных путей в пульмонологическом отделении многопрофильного стационара Республики Таджикистан // *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2021. № 1. С. 81–91.

ABOUT THE AUTHORS

Saidova Mukhabbat Narzulloyevna — Cand. Sci. (Pharmaceut.), Head, Department of Pharmacy, Tajik National University (Dyushambe, Republic of Tajikistan).

Pulotzoda Ilkhom Pulot — Head, Main Department of the Service of the State Supervision of the HealthCare and Social Protection of the Population in the Sughd Region (Khojend, Republic of Tajikistan).

Sanginova Nelufar Somiyevna — Assistant, Department of Pharmacy, Medical College (Gulistan, Republic of Tajikistan).

Citation example: Saidova M.N., Pulotzoda I.P., Sanginova N.S. (2021). Pharmacoepidemiological analysis of the use of antimicrobial drugs for diseases of the lower respiratory tract in the pulmonary department of a multifield hospital of the Republic of Tajikistan. *Journal of Siberian Medical Sciences*, 1, 81–91.

Новые аспекты этиологии и патогенеза ВИЧ-инфекции (обзор литературы)

Капустин Д.В.¹, Ульянова Я.С.², Карпович Г.С.¹, Краснова Е.И.¹, Кузнецова В.Г.¹, Извекова И.Я.¹

¹ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России

²ГБУЗ НСО «Городская инфекционная клиническая больница № 1» (Новосибирск)

New aspects of the etiology and pathogenesis of HIV infection (literature review)

Kapustin D.V.¹, Ul'yanova Ya.S.², Karpovich G.S.¹, Krasnova E.I.¹, Kuznetsova V.G.¹, Izvekova I.Ya.¹

¹Novosibirsk State Medical University

²City Infectious Clinical Hospital No. 1 (Novosibirsk)

АННОТАЦИЯ

В обзоре даны современные представления об этиологии и патогенезе ВИЧ-инфекции, освещаются вопросы иммунного ответа при данном заболевании, а также проблемы резистентности ВИЧ к современным лекарственным препаратам.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, СПИД, инфекционные болезни, резистентность ВИЧ, иммунопатогенез ВИЧ.

ABSTRACT

The paper presents the review on current ideas about the etiology and pathogenesis of HIV infection. It highlights the issues of the immune response in this disease, as well as the problems of HIV resistance to modern drugs.

Keywords: HIV infection, AIDS, infectious diseases, HIV resistance, HIV immunopathogenesis.

ВИЧ-инфекция является актуальной проблемой здравоохранения во многих странах мира. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) на начало 2019 г. в мире насчитывалось примерно 37.9 млн чел. с ВИЧ-инфекцией. К одним из самых пораженных регионов относятся страны Африканского континента (25.7 млн чел.) [1]. На начало 2019 г. от ВИЧ-инфекции и ее осложнений по всему миру скончалось более 32 млн чел. [2]. В Российской Федерации, по состоянию на 31 декабря 2019 г., проживает 1 068 839 чел. с лабораторно подтвержденным диагнозом «ВИЧ-инфекция» [3]. За 2019 г. в РФ выявлено 94 668 новых случаев ВИЧ-инфекции. Показатель заболеваемости со-

HIV infection is an urgent health care problem in many countries around the world. According to the World Health Organization (WHO), about 37.9 million people were suffering from HIV infection around the world at the beginning of 2019. Among the most affected regions are the countries of the African continent (25.7 million people) [1]. By the beginning of 2019, more than 32 million people have died from HIV infection and its complications around the worldwide [2]. As of December 31, 2019, 1 068 839 people in the Russian Federation were living with a laboratory-confirmed HIV infection [3]. In 2019, 94 668 new HIV cases were reported in the Russian Federation. The incidence rate was 64.5 per 100 000 people. The highest level of prev-

Поступила 03.08.2020
Принята 20.09.2020

Автор, ответственный за переписку
Капустин Дмитрий Вячеславович: ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. 630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52.
E-mail: gekso8@mail.ru

Received 03.08.2020
Accepted 20.09.2020

Corresponding author
Kapustin Dmitriy Vyacheslavovich: Novosibirsk State Medical University, 52, Krasny Prospect, Novosibirsk, 630091, Russia.
E-mail: gekso8@mail.ru

ставил 64.5 на 100 тыс. населения. Наиболее высокий уровень пораженности наблюдается среди социально-активных граждан в возрастной группе от 30 до 44 лет. В 2019 г. на долю полового гетеросексуального контакта пришлось 62.7 % случаев инфицирования ВИЧ, что свидетельствует о выходе эпидемии за пределы уязвимых групп населения.

На сегодняшний день с помощью антиретровирусных препаратов, направленных на ингибирование различных ферментов, участвующих в патогенезе ВИЧ, удается обеспечить эффективное подавление репликации ВИЧ и улучшение состояния больных, но вирусу удается быстро адаптироваться к действию лекарственных препаратов. Генетическая изменчивость вируса существенно снижает эффективность антиретровирусных препаратов и затрудняет разработку профилактических средств (вакцин) [4]. Наиболее распространенными причинами вариабельности вируса иммунодефицита человека являются: изменение фермента обратной транскриптазы, протеазы и интегразы ВИЧ [5]; быстрая вирусная репликация, в результате которой образуется большое количество вирионов в день у инфицированного человека [6]; возникновение процессов рекомбинации между двумя или более различными штаммами вируса ВИЧ внутри одного и того же инфицированного индивидуума.

Постоянное совершенствование знаний о структуре, изменчивости и репликации ВИЧ имеет важное значение для уточнения вирусологических и иммунологических механизмов патогенеза ВИЧ-инфекции. Полученные сведения могут быть использованы для усовершенствования и разработки новых методов терапии и профилактики ВИЧ-инфекции.

Этиология ВИЧ-инфекции. В 1983 г. в лабораториях Л. Монтанье (Франция) и Р. Галло (США) от больных СПИД был выделен новый ретровирус, названный соответственно HTLV-III и LAV. С июля 1986 г. он носит название HIV/ВИЧ (Human Immunodeficiency Virus/вирус иммунодефицита человека) [7].

В настоящее время различают два типа вируса иммунодефицита человека: ВИЧ-1 и ВИЧ-2, которые отличаются по своим антигенным свойствам и структурной организации. ВИЧ-1 является основным возбудителем заболевания во всем мире, в то время как распространенность ВИЧ-2 ограничена некоторыми регионами Западной и Центральной Африки. ВИЧ относится к подсемейству лентивирусов семейства ретровирусов. Особенностью ретровирусов является способность осуществлять

аленце is observed among 30–44 year-old citizens who are leading an active social life. Heterosexual contact accounted for 62.7% of HIV cases in 2019. It indicates that the epidemic has moved beyond the vulnerable groups of population.

To date, with the help of antiretroviral drugs aimed at inhibiting various enzymes involved in the pathogenesis of HIV, it is possible to effectively suppress HIV replication and improve the condition of patients, but the virus manages to quickly adapt to the action of drugs. Genetic variability of the virus significantly reduces the effectiveness of antiretroviral medications and complicates the development of preventive measures (vaccines) [4]. The most common reasons for the variability of the human immunodeficiency virus are the following: the change of reverse transcriptase, protease and integrase HIV enzymes [5]; the rapid viral replication resulting in daily formation of a large number of virions in an infected person [6]; emergence of recombination processes between two or more different HIV strains in the same infected individual.

Continuous improvement of knowledge about the structure, variability and replication of HIV is important to clarify the virological and immunological mechanisms in the pathogenesis of HIV infection. The findings can be used to improve and develop new methods of treatment and prevention of HIV infection.

Etiology of HIV infection. In 1983, a new retrovirus was isolated from patients with AIDS at L. Montagnier (France) and R. Gallo (USA) laboratories, and named HTLV-III and LAV respectively. Since July, 1986, this name has been known as HIV (Human Immunodeficiency Virus) [7].

Today, 2 types of human immunodeficiency virus are distinguished: HIV-1 and HIV-2 that are different in their antigenic properties and the structural organization. HIV-1 is the main causative agent of the disease around the world while the HIV-2 prevalence is restricted to some regions of the Western and Central Africa. HIV belongs to the *Lentivirinae* subfamily within the *Retroviridae* family. Retroviruses are characterized by their ability to perform the reaction of matrix synthesis in the reverse direction from ribonucleic acid (RNA) to deoxyribonucleic acid (DNA) [8]. The genome of retrovirus consists of two identical copies of single-stranded RNA molecules that encode 12 proteins and enzymes [8]. The main HIV RNA structural proteins are: Gag (group-specific antigen), Pol (polymerase), Env (envelope). HIV-1 and

реакцию матричного синтеза в обратном направлении от рибонуклеиновой кислоты (РНК) к дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК) [8]. Геном ретровируса состоит из двух идентичных копий одноцепочечных молекул РНК, которые кодируют 12 белков и ферменты [8]. Основными структурными белками РНК ВИЧ являются: Gag (group-specific antigen), Pol (polymerase), Env (envelope). Вирусы ВИЧ-1 и ВИЧ-2 различаются по организации своего генома, но основная структура (т.е. наличие трех структурных генов, Gag, Pol и Env) одинакова для всех вирусов [9].

В настоящее время в мире все чаще появляются данные о различных мутациях в генетической структуре ВИЧ, которые приводят к повышению вирулентности, более быстрому прогрессированию заболевания и неэффективности антиретровирусной терапии.

J.Y. Wang et al. в 2018 г. описали появление нового циркулирующего рекомбинантного штамма ВИЧ-1 CRF65 в Цзиле (Китай). Вирус CRF65 отличался от всех известных подтипов и создавал отдельную ветвь на филогенетическом дереве [10]. Также в Китае в 2017 г. описано появление еще двух новых рекомбинантных штаммов ВИЧ — CRF87_cpx и CRF88_BC [11].

Французскими учеными из Национального центра исследований ВИЧ-инфекции в 2018 г. описана более тяжелая клиническая картина течения ВИЧ-инфекции у пациентов, инфицированных рекомбинантными штаммами [12].

S. Ogawa et al. сообщают о рекомбинантном штамме ВИЧ-1 CRF01_AE (*gag* p17), сходным с CRF69_01B. Данный штамм характеризуется высокой лекарственной устойчивостью, в особенности к ингибиторам обратной транскриптазы и протеазы ВИЧ [13].

В исследовании Я.С. Ульяновой и соавт., посвященном острой ВИЧ-инфекции на территории Новосибирской области, установлено, что у пациентов, инфицированных новым рекомбинантным штаммом ВИЧ-1 CRF63_02A, заболевание протекает с большей длительностью лихорадки и генерализованным поражением лимфатических узлов по сравнению с субтипом А ВИЧ-1 [14].

Мутации в генетической структуре ВИЧ свидетельствуют о высокой вариативности вируса и способности к быстрому формированию резистентности к лекарственным препаратам, что требует их детального изучения и разработки новых методов лечения ВИЧ-инфекции.

Патогенез ВИЧ-инфекции. Прогрессирование ВИЧ-инфекции от стадии инкубации до

HIV-2 viruses differ in the organization of the genome, but the basic structure (i.e. presence of three structural genes, Gag, Pol and Env) is identical to all viruses [9].

Nowadays, the findings in various mutations in HIV genetic structure leading to increased virulence, faster progression of the disease and inefficiency of antiretroviral therapy are appearing in the world with increasing frequency.

In 2018, J.Y. Wang et al. described the emergence of a new HIV-1 circulating recombinant HIV-1 CRF65 strain in Jilin (China). CRF65 virus differed from the all known subtypes and has created a separate branch on the phylogenetic tree [10]. Also in China in 2017, the emergence of two more new recombinant HIV strains, CRF87_cpx and CRF88_BC was described [11].

In 2018, the French scientists from the French National Reference Centre for HIV described more severe clinical course of HIV infection in patients with recombinant strains [12].

S. Ogawa et al. reported a recombinant strain of HIV-1 CRF01_AE (*gag* p17), similar to CRF69_01B. This strain is characterized by high drug resistance, in particular to inhibitors of reverse transcriptase and HIV protease [13].

The research of Ya.S. Ul'yanova et al. devoted to an acute HIV infection in the Novosibirsk Region established, that in patients infected with the new recombinant strain of HIV-1 CRF63_02A, the disease proceeds with the longer duration of fever and generalized damage of lymph nodes compared with HIV-1 subtype A [14].

Mutations in genetic structure of HIV show high variability of virus and ability to rapid development of drug resistance, which requires their detailed study and development of new methods of treating HIV infection.

Pathogenesis of HIV infection. The HIV infection progression from incubation period to profound immunodeficiency is a consequence of the pathogenesis and immune response of the patient's body to a virus.

HIV cannot survive outside bloodstream or lymphatic system. Besides, the virus is easily inactivated with common detergents and disinfectants. HIV transmission strongly depends on biological properties of virus isolate, its concentration in the infected liquid of the body and, finally, the susceptibility of the host [15].

In case of contamination as a result of heterosexual intercourse being the most common

глубокого иммунодефицита является следствием патогенеза ВИЧ-инфекции и иммунного ответа организма пациента на вирус.

ВИЧ не способен выжить вне кровотока или лимфатической системы. Кроме того, вирус легко инактивируется при воздействии обычных моющих и дезинфицирующих средств. Передача ВИЧ сильно зависит от биологических свойств изолята вируса, его концентрации в инфицированной жидкости организма и, наконец, восприимчивости хозяина [15].

В случае инфицирования в результате гетеросексуального полового акта, который является наиболее распространенным путем передачи инфекции во всем мире, слизистая оболочка шейки матки является первой инфицируемой тканью [16]. Здесь дендритные клетки и CD4+ лимфоциты могут быть инфицированы через рецепторзависимые механизмы и позволяют вирусу распространяться в регионарные лимфатические узлы, а затем в кровоток. Репликация вируса в лимфатической ткани инфицированных слизистых оболочек и регионарных лимфатических узлов происходит уже на ранних стадиях инфекции [17]. В частности, вирусные частицы могут быть обнаружены в дендритных клетках, макрофагах и активированных CD4+ Т-клетках, которые являются основными мишенями инфекции. Инфицированные клетки могут подвергаться лизису или служить постоянными «резервуарами» вируса, формируя так называемые депо вируса [18, 19]. С. Wallet et al. в своем исследовании обнаружили ВИЧ в микроглиальных клетках и макрофагах центральной нервной системы у умершего пациента, который длительно получал антиретровирусную терапию и имел неопределяемый уровень вирусной нагрузки (РНК ВИЧ) [20]. Это представляет собой большое препятствие для полной элиминации вируса из организма, поскольку позволяет ВИЧ постоянно персистировать в организме человека, даже несмотря на высокоэффективную антиретровирусную терапию.

Через 10–12 дней после заражения РНК вируса обнаруживается в крови методом полимеразной цепной реакции [21, 22]. Показатель вiremии РНК ВИЧ быстро повышается до пикового уровня более 100 млн копий, что примерно соответствует фазе сероконверсии антител [23, 24].

Высокий уровень вiremии, как правило, носит временный характер, поскольку в результате иммунного ответа генерируются вируснейтрализующие антитела, которые подавляют репликацию вируса. В течение последующих недель уровень вирусной нагрузки снижается на не-

route of HIV transmission worldwide, the cervical mucous membrane is the first to be infected [16]. Here, dendritic cells and CD4+ lymphocytes can be infected via receptor-dependent mechanisms and allow a virus to invade into regional lymph nodes, and then into bloodstream. Virus replication in the lymphatic tissue of the infected mucous membranes and regional lymph nodes already occurs at the early stages of the infection [17]. In particular, viral particles can be detected in dendritic cells, macrophages and activated CD4+ T-cells which are the main targets of infection. The infected cells can undergo lysis or serve as permanent reservoirs of the virus, forming the so-called virus depots [18, 19]. C. Wallet et al. in their study have found HIV in microglial cells and macrophages of the central nervous system in a deceased patient who had been receiving long-term antiretroviral therapy and had an undetectable viral load (HIV RNA) [20]. This is a big obstacle for the full elimination of the virus from the human body as it enables HIV to persist in the organism constantly, even despite the highly effective antiretroviral therapy.

In 10–12 days after contamination, the viral RNA is detected in the blood by polymerase chain reaction method [21, 22]. The indicator of HIV viremia quickly rises to a peak level of more than 100 million copies, which approximately corresponds to the stage of antibody seroconversion [23, 24].

As a result of the immune response, the high-level viremia is temporary as a rule, due to the formation of neutralizing antibodies which suppress virus replication. Within the next weeks, the level of viral load decreases by several digits until it reaches a lower steady-state level or falls below the detection threshold [25].

Several factors related to the innate and acquired antiviral immunity can influence virus replication and an establishment of “stabilization” phase of viral load. However, the role of the virus-specific cell-mediated immune response, in particular, the specific cytotoxic activity of CD8+ T-cells, seems to be key in the initial control of virus replication at this stage of the infection, before the appearance of virus-neutralizing antibodies [26, 27]. In some patients, in the presence of congenital immunopathology or hematologic diseases, the viral load stabilization phase is absent, and HIV infection proceeds without the formation of specific antibodies. So, A.M. Spivak et al. describe several cases of seronegative HIV infection lasting for several years in

сколько порядков, пока не достигнет более низкого устойчивого уровня или не упадет ниже уровня обнаружения [25].

Несколько факторов, связанных с врожденным и приобретенным противовирусным иммунитетом, могут влиять на репликацию вируса и установление фазы «стабилизации» вирусной нагрузки. Однако роль вируспецифического клеточно-опосредованного иммунного ответа, в частности специфической цитотоксической активности CD8⁺ Т-клеток, по-видимому, является ключевой в первоначальном контроле репродукции вируса на этой стадии инфекции, до появления вирус-нейтрализующих антител [26, 27]. У некоторых пациентов, при наличии врожденной иммунопатологии или гематологических заболеваний, фаза «стабилизации» вирусной нагрузки отсутствует, а ВИЧ-инфекция протекает без образования специфических антител. Так, А.М. Spivak et al. описывают несколько случаев течения серонегативной ВИЧ-инфекции на протяжении нескольких лет у пациентов с миеломной болезнью, хроническим лимфолейкозом, миелодиспластическим синдромом [28].

Фаза острой ВИЧ-инфекции протекает от нескольких дней до нескольких недель после заражения ВИЧ у большинства инфицированных людей. Основными симптомами являются: высокая лихорадка, макулопапулезная сыпь, стоматит, лимфаденопатия, артралгия, фарингит, недомогание, потеря веса и миалгия [14, 29].

По результатам многочисленных исследований установлено, что прогрессирование ВИЧ-инфекции до стадии СПИДа значительно быстрее наступает у пациентов с тяжелым течением острой ВИЧ-инфекции [30, 31]. Клинические проявления острой ВИЧ-инфекции в среднем длятся от 7 до 18 дней и редко превышают 21 день. Во время острой ВИЧ-инфекции количество CD4⁺ Т-клеток резко снижается, что связано с высоким уровнем вiremии до начала противовирусного иммунного ответа [14, 29, 32]. После выработки специфических вирус-нейтрализующих антител уровень вирусной нагрузки снижается и пул CD4⁺ Т-клеток восстанавливается. Восстановление пула CD4⁺ лимфоцитов происходит до уровня ниже, чем до инфицирования ВИЧ, что связано с персистенцией вируса. Кроме того, вирус индуцирует дисфункцию CD4⁺ Т-клеток и других клеток иммунной системы [33, 34].

Через несколько недель после развития острой стадии ВИЧ-инфекции большинство инфицированных вступают в латентную стадию, особенностями которой являются отсутствие кли-

patients with myeloma, chronic lymphoid leukosis, myelodysplastic syndrome [28].

The phase of acute HIV infection proceeds from several days to several weeks after HIV contamination in most infected persons. The main symptoms are: high fever, maculopapular rash, stomatitis, lymphadenopathy, arthralgia, pharyngitis, malaise, weight loss and myalgia [14, 29].

According to the results of numerous studies, the progression of HIV infection to the AIDS stage is much faster in patients with a severe course of acute HIV infection [30, 31]. On average, clinical manifestations of acute HIV infection last from 7 to 18 days and rarely exceed 21 days. During acute HIV infection, the number of CD4⁺ T-cells decreases abruptly, being associated with a high level of viremia before the onset of the antiviral immune response [14, 29, 32]. After the production of specific virus-neutralizing antibodies, the level of viral load decreases and the CD4⁺ T-cell pool is restored. The restoration of the CD4⁺ lymphocyte pool occurs to a level lower than before HIV infection, which is associated with the virus persistence. Besides, the virus induces dysfunction of CD4⁺ T-cells and other cells of the immune system [33, 34].

A few weeks after the development of the acute stage of HIV infection, most of those infected enter the latency stage, featuring in the absence of clinical manifestations and low viral load. This is explained by the antiviral action from both innate and adaptive immune responses [35]. In particular, antibodies bind to HIV antigens specifically, causing neutralization of the virus [36] or promoting elimination of the infected cells by a mechanism known as antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC) mediated by T-lymphocytes and natural killer cells [34, 37]. Besides, HIV-specific T-cells recognize viral antigens on the surface of the infected cells and contribute to their elimination by the antigen-specific cytotoxic mechanisms [38, 39]. During the whole asymptomatic stage, HIV is continuously replicating, counteracting antiviral immunity and promoting a state of systemic chronic inflammation.

There are several reasons for antiviral immunity to be unable to ensure complete HIV elimination. Among them, the most significant is the persistence of the integrated virus in lymphoid depots. The low expression of viral antigens and the high frequency of mutations in the virus genome contribute to the formation of immune tolerance.

нических проявлений и низкий уровень вирусной нагрузки. Это обусловлено противовирусным действием, оказываемым как врожденными, так и адаптивными иммунными реакциями [35]. В частности, антитела специфически связываются с антигенами ВИЧ, вызывая нейтрализацию вируса [36] или способствуя элиминации инфицированных клеток с помощью механизма, известного как антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC — antibody-dependent cell cytotoxicity), опосредованная Т-лимфоцитами и естественными киллерными клетками [34, 37]. Кроме того, ВИЧ-специфические Т-лимфоциты распознают вирусные антигены на поверхности инфицированных клеток и способствуют их элиминации антигенспецифическими цитотоксическими механизмами [38, 39]. Всю бессимптомную фазу ВИЧ непрерывно размножается, противодействуя противовирусному иммунитету и вызывая состояние хронического системного воспаления.

Существует несколько причин, по которым противовирусный иммунитет не способен обеспечить полную элиминацию ВИЧ. Среди них наиболее значимой является персистенция интегрированного вируса в лимфоидных «депо». Низкая экспрессия вирусных антигенов и высокая частота мутаций в геноме вируса способствуют формированию иммунологической «толерантности». Таким образом, репликация вируса продолжается в лимфоидном «депо», с эпизодами транзиторных пиков виремии (вирусной нагрузки), поддерживая тем самым системное хроническое воспаление, истощая резервы иммунной системы [18, 20].

У некоторых ВИЧ-инфицированных пациентов уровень вирусной нагрузки остается неопределяемым без применения антиретровирусной терапии в течение многих лет, что свидетельствует об эффективном иммунном ответе [40, 41]. В исследовании N.Y. Gebara et al. описано несколько пациентов с неопределяемым уровнем вирусной нагрузки в течение 5 и более лет после инфицирования ВИЧ [42].

В латентной стадии ВИЧ-инфекции уровень CD4+ лимфоцитов постепенно снижается и развивается их дисфункция [35]. Прогрессирование заболевания характеризуется разрушением структуры лимфоидной ткани, что является следствием репликации вируса и хронической активации клеток иммунной системы. Это приводит к увеличению проникновения вируса в окружающие CD4+ Т-клетки и способствует дальнейшему распространению ВИЧ. Эта стадия ВИЧ-инфекции ассоциируется с обширной репродукцией вируса в слизистой оболочке кишечника и

Thus, the virus continues to replicate in the lymphoid depot with episodes of transient peaks of viremia (viral load), maintaining chronic systemic inflammation, exhausting the immune system [18, 20].

In some HIV-infected patients, the level of viral load remains undetectable without antiretroviral therapy for many years, indicating the effective immune response [40, 41]. In the study of N.Y. Gebara et al., several patients with undetectable level of viral load within 5 years or more after contamination with HIV are described [42].

At the latent stage of HIV infection, the level of CD4+ lymphocytes gradually decreases and their dysfunction develops [35]. The disease progression is characterized by an impairment of lymphoid tissue structure, being the consequence of viral replication and chronic activation of immune system cells. This results in increased penetration of the virus into surrounding CD4+ T-cells and promotes the further HIV propagation. This HIV stage is associated with extensive virus reproduction in the intestinal mucosa and submucosa, as well as in draining lymph nodes with local depletion of the CD4+ T-cell pool [43, 44].

Further progression of the disease depends on the ability of the infected human body to restrain viral replication and restore the pool of CD4+ lymphocytes. With a progressive increasing in viral load, further immune system destruction occurs, and the number of CD4+ T-cells continues to decline to less than 200 cells and lower. A critical reduction of CD4+ lymphocytes leads to the development of opportunistic infections: bacterial, viral, fungal and parasitic, as well as contributes to the emergence of tumor and its progression, indicating to a serious immune system disorder [45, 46]. The most widespread AIDS-defining opportunistic infections are caused by *Pneumocystis carinii*, *Candida albicans*, cytomegalovirus, herpes zoster or enteropathic parasites (*Cryptosporidium* and *Giardia*, *Isospora belli* spp.), and can be characterized by the development of severe forms against the pronounced immunodeficiency, and lead to serious life-threatening complications [46].

The stage of secondary diseases is usually characterized by diffuse edema of lymph nodes, pronounced weight loss, fever and respiratory and gastrointestinal symptoms. Progressive encephalopathy caused by HIV or other opportunistic infections is also associated with an increased risk of mortality. Neoplastic diseases such as Kaposi's

подслизистой оболочке, а также в дренирующих лимфатических узлах с локальным истощением пула CD4+ Т-клеток [43, 44].

Дальнейшее прогрессирование заболевания зависит от способности инфицированного организма сдерживать репликацию вируса и восстанавливать пул CD4+ лимфоцитов. При прогрессирующем нарастании вирусной нагрузки происходит дальнейшее разрушение иммунной системы, и количество CD4+ Т-клеток продолжает снижаться до уровня менее 200 клеток и ниже. Критическое снижение уровня CD4+ лимфоцитов приводит к развитию оппортунистических инфекций: бактериальных, вирусных, грибковых и паразитарных, а также способствует возникновению и прогрессированию опухолевых заболеваний, что свидетельствует о серьезном нарушении в функционировании иммунной системы [45, 46]. Наиболее распространенные оппортунистические инфекции, определяющие стадию СПИДа, вызываются *Pneumocystis carinii*, *Candida albicans*, цитомегаловирусом, опоясывающим герпесом или энтеропатическими паразитами (виды *Cryptosporidium* и *Giardia*, *Isospora belli*), которые могут характеризоваться развитием тяжелых форм на фоне глубокого иммунодефицита и приводить к серьезным жизнеугрожающим осложнениям [46].

Стадия вторичных заболеваний обычно характеризуется диффузным отеком лимфатических узлов, выраженным снижением массы тела, лихорадкой и респираторными и желудочно-кишечными симптомами. Прогрессирующая энцефалопатия, вызванная ВИЧ или другими оппортунистическими инфекциями, также связана с повышенным риском смертности. Неопластические заболевания, такие как саркома Капоши и лимфомы, чаще всего возникают вследствие глубокого иммунодефицита [47].

Резистентность ВИЧ к лекарственным препаратам. С помощью современных антиретровирусных препаратов, направленных на ингибирование различных ферментов вируса, удается быстро подавить репликацию ВИЧ и улучшить состояние пациентов, но сложная структурная организация вируса позволяет ему быстро адаптироваться к действию лекарственных препаратов. В последние десять лет отмечается рост устойчивости ВИЧ к химиопрепаратам.

Передача устойчивых к лекарственным препаратам штаммов ВИЧ-1 пациентам, ранее не получавшим антиретровирусную терапию, приводит к неэффективности первой линии терапии и

sarcoma and lymphomas develop most often due to advanced immunodeficiency [47].

HIV drug resistance. With the help of modern antiretroviral drugs aimed at inhibiting various viral enzymes it is possible to quickly suppress HIV replication and improve the condition of patients, but the complex structural organization of the virus allows it to adapt to the effects of drugs quickly. HIV resistance to chemotherapy has increased over the past decade.

Transmission of drug-resistant strains of HIV-1 in patients naïve to the antiretroviral drugs leads to ineffectiveness of the first-line therapy and the disease progression [48, 49]. According to the WHO, in the countries of Western Europe and the USA, the level of primary resistance makes 12–23% (the USA — 19–23%, France and the UK — 14%, the Netherlands — 13%, Spain — 12%) [50].

According to the Federal Scientific and Methodological Center for the Prevention and Control of AIDS, in the Russian Federation in 2019, the prevalence of HIV-1 drug resistance in patients naïve to the antiretroviral drugs in the Far East Federal District was 7.6%, in the Siberian — 7.0%, in the Ural — 1.7%, in the North-West — 3.9%, in the Central — 5.7%, in the Volga — 2.8%, in the South — 5.1%. Among the most common mutations resistant to drugs from the class of protease inhibitors are M46I/L, I58V; to nucleoside reverse transcriptase inhibitors — M184V/I, M41L; to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors — K103N, G190S, K103S [51].

Since 2009, in the world there has been an increase in detection of multidrug resistant strains [52, 53], which are characterized by the lack of complete virological response to almost all modern antiretroviral drugs.

Features of immunopathology and cellular metabolism in HIV infection. Cells of the immune system exist in two functional states: dormancy and activation. Their metabolism is closely related to their activation, and therefore to their functions. Recognition of an antigen induces activation and proliferation of T-lymphocytes and leads to changes in cellular metabolism. For example, HIV-induced changes in metabolism of immune cells contribute to immune activation, maintenance of chronic systemic inflammation, and depletion of the CD4+ lymphocyte pool. The study of C.S. Palmer et al. described pathological changes of metabolism in immune cells in HIV infection,

прогрессированию заболевания [48, 49]. По данным ВОЗ в странах Западной Европы и США уровень первичной резистентности составляет 12–23 % (США — 19–23 %, Франция и Великобритания — 14 %, Нидерланды — 13 %, Испания — 12 %) [50].

По данным Федерального научно-методического центра по профилактике и борьбе со СПИД в Российской Федерации в 2019 г. распространенность лекарственной устойчивости ВИЧ-1 у пациентов без опыта приема антиретровирусных препаратов в Дальневосточном федеральном округе составила 7.6 %, в Сибирском — 7.0 %, Уральском — 1.7 %, Северо-Западном — 3.9 %, Центральном — 5.7 %, Приволжском — 2.8 %, Южном — 5.1 %. Среди наиболее часто встречающихся мутаций, устойчивых к препаратам из класса ингибиторов протеазы — M46I/L, I58V; к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы — M184V/I, M41L; к ненуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы — K103N, G190S, K103S [51].

С 2009 г. в мире отмечается рост выявления штаммов с множественной лекарственной устойчивостью [52, 53], которые характеризуются отсутствием полного вирусологического ответа практически на все современные антиретровирусные препараты.

Особенности иммунопатологии и клеточного метаболизма при ВИЧ-инфекции. Клетки иммунной системы пребывают в двух функциональных состояниях: покоя и активации. Их метаболизм тесно связан с их активацией, а следовательно — функциями. Распознавание антигена индуцирует активацию и пролиферацию Т-лимфоцитов и приводит к изменениям в клеточном метаболизме. Например, вызванные ВИЧ изменения в метаболизме иммунных клеток способствуют активации иммунитета, поддержке хронического системного воспаления и истощению пула CD4+ лимфоцитов. В исследовании C.S. Palmer et al. описаны патологические изменения метаболизма в клетках иммунной системы на фоне ВИЧ-инфекции, которые приводят к их дисфункции с последующим формированием глубокого иммунодефицита [17].

Патогенез ВИЧ-инфекции тесно связан с повышенным уровнем IL-7 в плазме крови [54]. В большинстве случаев ВИЧ инфицирует активированные, а не находящиеся в состоянии покоя CD4+ лимфоциты, что указывает на важную роль изменения клеточного метаболизма в патогенезе ВИЧ-инфекции [55]. В 2012 г. S. Loisel-Meyer et al. первыми установили роль транспортера глюкозы Glut1 в регуляции проникновения ВИЧ в CD4+

which lead to their dysfunction and subsequent severe immunodeficiency [17].

The pathogenesis of HIV infection is closely related to the increased levels of IL-7 in human blood plasma [54]. In most cases, HIV infects activated rather than resting CD4+ lymphocytes, which indicates an important role of changes in cellular metabolism in the pathogenesis of HIV infection [55]. In 2012, S. Loisel-Meyer et al. were the first to establish the role of Glut1-mediated glucose transport in the regulation of HIV penetration into CD4+ cells and thymocytes [56]. Subsequently, Glut1 was revealed to be an important metabolic marker of the activation of HIV+ effector CD4+ lymphocytes and monocytes, the level of which was increased in HIV patients [17]. T-cell function is closely related to the cellular metabolism [57]. Immune cells use two main pathways of energy production: glycolysis and oxidative phosphorylation. Metabolic transition from the resting state to the activation is mediated, in particular, by an increase in Glut1 expression [17].

High glucose metabolic activity correlates with depletion of the CD4+ lymphocyte pool, and increased glycolytic activity is associated with T-cell activation in HIV-infected individuals, as the study of J.A. Hollenbaugh et al. has confirmed [58]. It has been experimentally found that inhibition of glycolysis reduces the viral load [56].

Glut1 is the main transporter of glucose to macrophages. As a result of HIV infection, macrophages are transformed. These macrophages are characterized by increased Glut1 expression and glycolytic metabolism contributing to the high production of proinflammatory mediators, including IL-6, TNF, IL-1 [59].

Further study of the pathogenesis of HIV-infection, in particular immunometabolism of cells, is important for the development of new etiotropic therapy methods. Despite the fact that the current antiretroviral therapy significantly reduces the level of viral load and slows down the progressive decreasing of the CD4+ lymphocyte pool, the permanent activation of T-cells and the maintenance of chronic inflammation contributes to the further exhaustion of the immune system. Thus, the development of drugs that block T-cell hyperactivation (in particular, associated with Glut1) is a promising research method.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

клетки и тимокиты [56]. Впоследствии показано, что Glut1 является важным метаболическим маркером активации ВИЧ+ «эффекторных» CD4+ лимфоцитов и моноцитов, уровень которого повышен у ВИЧ-инфицированных пациентов [17]. Функция Т-клеток тесно связана с клеточным метаболизмом [57]. Иммунные клетки используют два основных пути выработки энергии: гликолиз и окислительное фосфорилирование. Метаболический переход из «спокойного» состояния в фазу активации опосредован, в частности, увеличением экспрессии Glut1 [17].

Высокая метаболическая активность глюкозы коррелирует с истощением пула CD4+ лимфоцитов, а повышенная гликолитическая активность связана с активацией Т-клеток у ВИЧ-инфицированных, что подтверждено в исследовании J.A. Hollenbaugh et al. [58]. Экспериментально установлено, что ингибирование гликолиза снижает вирусную нагрузку [56].

Glut1 является основным переносчиком глюкозы в макрофаги. В результате ВИЧ-инфицирования происходит трансформация ма-

крофагов. Данные макрофаги характеризуются повышенной экспрессией Glut1 и гликолитическим метаболизмом, способствующими высокой продукции провоспалительных медиаторов, включая IL-6, TNF, IL-1 [59].

Дальнейшее изучение патогенеза ВИЧ-инфекции, в частности метаболизма иммунных клеток, имеет важное значение для разработки новых этиотропных методов лечения. Несмотря на то, что применение современной антиретровирусной терапии значительно снижает уровень вирусной нагрузки и замедляет прогрессивное снижение пула CD4+ лимфоцитов, постоянная активация Т-клеток и поддержание хронического воспаления способствует дальнейшему истощению иммунной системы. Таким образом, разработка препаратов, блокирующих гиперактивацию Т-клеток (в частности, связанную с Glut1), является перспективным методом исследования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. World Health Organization. HIV/AIDS. URL: <https://www.who.int/health-topics/hiv-aids/>. Дата обращения: 09.11.2020.
2. World Health Organization. HIV/AIDS. Key facts. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>. Дата обращения: 09.11.2020.
3. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году: Государственный доклад. URL: <https://www.rosпотребнадзор.ru/iblock/8e4/gosdoklad-2a-2019-seb-29-05.pdf>. Дата обращения: 09.11.2020.
4. Fanale-Belasio E., Raimondo M., Suligoi B., Buttò S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview // *Ann. Ist. Super Sanita*. 2010. Vol. 46 (1). P. 5–14. doi: 10.4415/ANN_10_01_02.
5. Sarafianos S.G., Marchand B., Das K. et al. Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition // *J. Mol. Biol.* 2009. Vol. 385. P. 693–713.
6. Ho D.D. Perspectives series: host/pathogen interactions. Dynamics of HIV-1 replication in vivo // *J. Clin. Invest.* 1997. Vol. 99. P. 2565–2567.
7. Gurgo C., Robert-Guroff M., Gallo R.C. An overview of the human T-lymphotropic retroviruses and the role of HTLV-III/LAV in AIDS // *Antibiot. Chemother.* 1987. Vol. 38. P. 1–12. doi: 10.1159/000414214.
8. Luciw P.A. Human immunodeficiency virus and their replication // D.M. Knipe, P.M. Howley (ed.). *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. P. 1881–1952.
9. Lucas S.B., Hounnou A., Peacock C. et al. The mortality and pathology of HIV infection in a West African city // *AIDS*. 1993. Vol. 7. P. 1569–1579.

REFERENCES

1. World Health Organization. HIV/AIDS (2020). Retrieved on November 9, 2020 from URL: <https://www.who.int/health-topics/hiv-aids/>.
2. World Health Organization. HIV/AIDS. Key facts (2020). Retrieved on November 9, 2020 from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>.
3. About the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2019. State report. Retrieved on November 9, 2020 from <https://www.rosпотребнадзор.ru/iblock/8e4/gosdoklad-2a-2019-seb-29-05.pdf>. In Russ.
4. Fanale-Belasio E., Raimondo M., Suligoi B., Buttò S. (2010). HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann. Ist. Super Sanita*, 46 (1), 5–14. doi: 10.4415/ANN_10_01_02.
5. Sarafianos S.G., Marchand B., Das K. et al. (2009). Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition. *J. Mol. Biol.*, 385, 693–713.
6. Ho D.D. (1997). Perspectives series: host/pathogen interactions. Dynamics of HIV-1 replication in vivo. *J. Clin. Invest.*, 99, 2565–2567.
7. Gurgo C., Robert-Guroff M., Gallo R.C. (1987). An overview of the human T-lymphotropic retroviruses and the role of HTLV-III/LAV in AIDS. *Antibiot. Chemother.*, 3, 1–12. doi: 10.1159/000414214.
8. Luciw P.A. (1996). Human immunodeficiency virus and their replication (pp. 1881–1952). In D.M. Knipe, P.M. Howley (eds.). *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996.
9. Lucas S.B., Hounnou A., Peacock C. et al. (1993). The mortality and pathology of HIV infection in a West African city. *AIDS*, 7, 1569–1579.

10. Wang J.Y., Chen X.H., Shao B. et al. Identification of a new HIV-1 circulating recombinant form CRF65_cpx strain in Jilin, China // *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2018. Vol. 34 (8). P. 709–713. doi: 10.1089/AID.2018.0086.
11. Hu Y., Wan Z., Zhou Y.H. et al. Identification of two new HIV-1 circulating recombinant forms (CRF87_cpx and CRF88_BC) from reported unique recombinant forms in Asia // *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2017. Vol. 33 (4). P. 353–358. doi: 10.1089/aid.2016.0252.
12. De Oliveira F., Cappy P., Lemée V. et al. Detection of numerous HIV-1/MO recombinants in France // *AIDS*. 2018. Vol. 32 (10). P. 1289–1299. doi: 10.1097/QAD.0000000000001814.
13. Ogawa S., Hachiya A., Hosaka M. et al. A novel drug-resistant HIV-1 circulating recombinant form CRF76_01B identified by near full-length genome analysis // *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2016. Vol. 32 (3). P. 284–289. doi: 10.1089/AID.2015.0304.
14. Ульянова Я.С., Гашникова Н.М., Ивлев В.В. и др. Клинико-лабораторная характеристика острой ВИЧ-инфекции у взрослых в Новосибирской области // *Журн. инфектологии*. 2019. Т. 11, № 2. С. 40–44. doi: org/10.22625/2072-6732-2019-11-2-40-44.
15. Suligoi B., Raimondo M., Fanale-Belasio E., Buttò S. The epidemic of HIV infection and AIDS, promotion of testing, and innovative strategies // *Ann. Ist. Super Sanita*. 2010. Vol. 46. P. 15–23.
16. Azevedo-Pereira J.M., Santos-Costa Q. HIV interaction with human host: HIV-2 as a model of a less virulent infection // *AIDS Rev*. 2016. Vol. 18 (1). P. 44–53.
17. Palmer C.S., Henstridge D.C., Yu D. et al. Emerging role and characterization of immunometabolism: Relevance to HIV pathogenesis, serious non-AIDS events, and a cure // *J. Immunol*. 2016. Vol. 196 (11). P. 4437–4444. doi: 10.4049/jimmunol.1600120.
18. Pedro K.D., Henderson A.J., Agosto L.M. Mechanisms of HIV-1 cell-to-cell transmission and the establishment of the latent reservoir // *Virus Res*. 2019. Vol. 265. P. 115–121. doi: 10.1016/j.virusres.2019.03.014.
19. Bruel T., Schwartz O. Markers of the HIV-1 reservoir: facts and controversies // *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2018. Vol. 13 (5). P. 383–388. doi: 10.1097/COH.0000000000000482.
20. Wallet C., De Rovere M., Van Assche J. et al. Microglial cells: The main HIV-1 reservoir in the brain // *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2019. Vol. 9. P. 362. doi: 10.3389/fcimb.2019.00362.
21. Yamazaki S., Kondo M., Sudo K. et al. Qualitative real-time PCR assay for HIV-1 and HIV-2 RNA // *Jpn. J. Infect. Dis*. 2016. Vol. 69 (5). P. 367–372. doi: 10.7883/yoken.JJID.2015.309.
22. Hecht F.M., Busch M.P., Rawal B. et al. Use of laboratory tests and clinical symptoms for identification of primary HIV infection // *AIDS*. 2002. Vol. 16. P. 1119–1129.
23. Fiebig E.W., Wright D.J., Rawal B.D. et al. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection // *AIDS*. 2003. Vol. 17. P. 1871–1879.
24. Conway J.M., Perelson A.S. Residual viremia in treated HIV+ individuals // *PLoS Comput. Biol*. 2016. Vol. 12 (1). e1004677. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004677.
10. Wang J.Y., Chen X.H., Shao B. et al. (2018). Identification of a new HIV-1 circulating recombinant form CRF65_cpx strain in Jilin, China. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 34 (8), 709–713. doi: 10.1089/AID.2018.0086.
11. Hu Y., Wan Z., Zhou Y.H. et al. (2017). Identification of two new HIV-1 circulating recombinant forms (CRF87_cpx and CRF88_BC) from reported unique recombinant forms in Asia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 33 (4), 353–358. doi: 10.1089/aid.2016.0252.
12. De Oliveira F., Cappy P., Lemée V. et al. (2018). Detection of numerous HIV-1/MO recombinants in France. *AIDS*, 32 (10), 1289–1299. doi: 10.1097/QAD.0000000000001814.
13. Ogawa S., Hachiya A., Hosaka M. et al. (2016). A novel drug-resistant HIV-1 circulating recombinant form CRF76_01B identified by near full-length genome analysis. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 32 (3), 284–289. doi: 10.1089/AID.2015.0304.
14. Ulyanova Y.S., Gashnikova N.M., Ivlev V.V. et al. (2019). Clinical and laboratory characteristic of acute HIV-infection in adult residents of Novosibirsk Region. *Journal Infectology*, 11 (2), 40–44. doi: org/10.22625/2072-6732-2019-11-2-40-44.
15. Suligoi B., Raimondo M., Fanale-Belasio E., Buttò S. (2010). The epidemic of HIV infection and AIDS, promotion of testing, and innovative strategies. *Ann. Ist. Super Sanita*, 46, 15–23.
16. Azevedo-Pereira J.M., Santos-Costa Q. (2016). HIV interaction with human host: HIV-2 as a model of a less virulent infection. *AIDS Rev.*, 18 (1), 44–53.
17. Palmer C.S., Henstridge D.C., Yu D. et al. (2016). Emerging role and characterization of immunometabolism: Relevance to HIV pathogenesis, serious non-aids events, and a cure. *J. Immunol.*, 196 (11), 4437–4444. doi: 10.4049/jimmunol.1600120.
18. Pedro K.D., Henderson A.J., Agosto L.M. (2019). Mechanisms of HIV-1 cell-to-cell transmission and the establishment of the latent reservoir. *Virus Res.*, 265, 115–121. doi: 10.1016/j.virusres.2019.03.014.
19. Bruel T., Schwartz O. (2018). Markers of the HIV-1 reservoir: facts and controversies. *Curr. Opin. HIV AIDS*, 13 (5), 383–388. doi: 10.1097/COH.0000000000000482.
20. Wallet C., De Rovere M., Van Assche J. et al. (2019). Microglial cells: The main HIV-1 reservoir in the brain. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 9, 362. doi: 10.3389/fcimb.2019.00362.
21. Yamazaki S., Kondo M., Sudo K. et al. (2016). Qualitative real-time PCR assay for HIV-1 and HIV-2 RNA. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 69 (5), 367–372. doi: 10.7883/yoken.JJID.2015.309.
22. Hecht F.M., Busch M.P., Rawal B. et al. (2002). Use of laboratory tests and clinical symptoms for identification of primary HIV infection. *AIDS*, 16, 1119–1129.
23. Fiebig E.W., Wright D.J., Rawal B.D. et al. (2003). Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS*, 17, 1871–1879.
24. Conway J.M., Perelson A.S. (2016). Residual viremia in treated HIV+ individuals. *PLoS Comput. Biol.*, 12 (1), e1004677. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004677.

25. Robb M.L., Eller L.A., Kibuuka H. et al. Prospective study of acute HIV-1 infection in adults in East Africa and Thailand // *N. Engl. J. Med.* 2016. Vol. 374 (22). P. 2120–2130. doi: 10.1056/NEJMoa1508952.
26. McBrien J.B., Kumar N.A., Silvestri G. Mechanisms of CD8+ T cell-mediated suppression of HIV/SIV replication // *Eur. J. Immunol.* 2018. Vol. 48 (6). P. 898–914. doi: 10.1002/eji.201747172.
27. Allen T.M., O'Connor D.H., Jing P. et al. Tat-specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia // *Nature*. 2000. Vol. 407. P. 386–390.
28. Spivak A.M., Sydnor E.R., Blankson J.N., Gallant J.E. Seronegative HIV-1 infection: a review of the literature // *AIDS*. 2010. Vol. 24 (10). P. 1407–1414. doi: 10.1097/QAD.0b013e32833ac65c.
29. Newton P.J. HIV in acute care // *Acute Med.* 2018. Vol. 17 (2). P. 61.
30. Schuster C., Mayer F.J., Wohlfahrt C. et al. Acute HIV infection results in subclinical inflammatory cardiomyopathy // *J. Infect. Dis.* 2018. Vol. 218 (3). P. 466–470. doi: 10.1093/infdis/jiy183.
31. Keet I.P., Krijnen P., Koot M. et al. Predictors of rapid progression to AIDS in HIV-1 seroconverters // *AIDS*. 1993. Vol. 7. P. 51–57.
32. Gupta K.K. Acute immunosuppression with HIV seroconversion // *N. Engl. J. Med.* 1993. Vol. 328. P. 288–289.
33. Lange C.G., Lederman M.M., Medvik K. et al. CD4+ T-cell count and numbers of CD28+ CD4+ T-cells predict functional responses to immunizations in chronic HIV-1 infection // *AIDS*. 2003. Vol. 17. P. 2015–2023.
34. Bui V.C., Nguyen T.H. Insights into the interaction of CD4 with anti-CD4 antibodies // *Immunobiology*. 2017. Vol. 222 (2). P. 148–154. doi: 10.1016/j.imbio.2016.10.010.
35. Ford E.S., Puroh C.E., Sereti I. Immunopathogenesis of asymptomatic chronic HIV infection: the calm before the storm // *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2009. Vol. 4. P. 206–214.
36. Porichis F., Hart M.G., Massa A. et al. Immune checkpoint blockade restores HIV-specific CD4 T cell help for NK cells // *J. Immunol.* 2018. Vol. 201 (3). P. 971–981. doi: 10.4049/jimmunol.1701551.
37. Chung A., Rollman E., Johansson S., Kent S.J., Stratov I. The utility of ADCC responses in HIV infection // *Curr. HIV Res.* 2008. Vol. 6. P. 515–519.
38. Bangham C.R. CTL quality and the control of human retroviral infections // *Eur. J. Immunol.* 2009. Vol. 39. P. 1700–1712.
39. Boelen L., Debebe B., Silveira M. et al. Inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptors strengthen CD8+ T cell-mediated control of HIV-1, HCV, and HTLV-1 // *Sci. Immunol.* 2018. Vol. 3 (29): eaao2892. doi: 10.1126/sciimmunol.aao2892.
40. Baker B.M., Block B.L., Rothchild A.C., Walker B.D. Elite control of HIV infection: implications for vaccine design // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2009. Vol. 9. P. 55–69.
41. Saksena N.K., Rodes B., Wang B., Soriano V. Elite HIV controllers: myth or reality? // *AIDS Rev.* 2007. Vol. 9. P. 195–207.
42. Gebara N.Y., El Kamari V., Rizk N. HIV-1 elite controllers: an immunovirological review and clinical perspectives // *J. Virus Erad.* 2019. Vol. 5 (3). P. 163–166.
25. Robb M.L., Eller L.A., Kibuuka H. et al. (2016). Prospective study of acute HIV-1 infection in adults in East Africa and Thailand. *N. Engl. J. Med.*, 374 (22), 2120–2130. doi: 10.1056/NEJMoa1508952.
26. McBrien J.B., Kumar N.A., Silvestri G. (2018). Mechanisms of CD8+ T cell-mediated suppression of HIV/SIV replication. *Eur. J. Immunol.*, 48 (6), 898–914. doi: 10.1002/eji.201747172.
27. Allen T.M., O'Connor D.H., Jing P. et al. (2000). Tat-specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia. *Nature*, 407, 386–390.
28. Spivak A.M., Sydnor E.R., Blankson J.N., Gallant J.E. (2010). Seronegative HIV-1 infection: a review of the literature. *AIDS*, 24 (10), 1407–1414. doi: 10.1097/QAD.0b013e32833ac65c.
29. Newton P.J. (2018). HIV in acute care. *Acute Med.*, 17 (2), 61.
30. Schuster C., Mayer F.J., Wohlfahrt C. et al. (2018). Acute HIV infection results in subclinical inflammatory cardiomyopathy. *J. Infect. Dis.*, 218 (3), 466–470. doi: 10.1093/infdis/jiy183.
31. Keet I.P., Krijnen P., Koot M. et al. (1993). Predictors of rapid progression to AIDS in HIV-1 seroconverters. *AIDS*, 7, 51–57.
32. Gupta K.K. (1993). Acute immunosuppression with HIV seroconversion. *N. Engl. J. Med.*, 328, 288–289.
33. Lange C.G., Lederman M.M., Medvik K. et al. (2003). CD4+ T-cell count and numbers of CD28+ CD4+ T-cells predict functional responses to immunizations in chronic HIV-1 infection. *AIDS*, 17, 2015–2023.
34. Bui V.C., Nguyen T.H. (2017). Insights into the interaction of CD4 with anti-CD4 antibodies. *Immunobiology*, 222 (2), 148–154. doi: 10.1016/j.imbio.2016.10.010.
35. Ford E.S., Puroh C.E., Sereti I. (2009). Immunopathogenesis of asymptomatic chronic HIV infection: the calm before the storm. *Curr. Opin. HIV AIDS*, 4, 206–214.
36. Porichis F., Hart M.G., Massa A. et al. (2018). Immune checkpoint blockade restores HIV-specific CD4 T cell help for NK cells. *J. Immunol.*, 201 (3), 971–981. doi: 10.4049/jimmunol.1701551.
37. Chung A., Rollman E., Johansson S., Kent S.J., Stratov I. (2008). The utility of ADCC responses in HIV infection. *Curr. HIV Res.*, 6, 515–519.
38. Bangham C.R. (2009). CTL quality and the control of human retroviral infections. *Eur. J. Immunol.*, 39, 1700–1712.
39. Boelen L., Debebe B., Silveira M. et al. (2018). Inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptors strengthen CD8+ T cell-mediated control of HIV-1, HCV, and HTLV-1. *Sci. Immunol.*, 3 (29). eaao2892. doi: 10.1126/sciimmunol.aao2892.
40. Baker B.M., Block B.L., Rothchild A.C., Walker B.D. (2009). Elite control of HIV infection: implications for vaccine design. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 9, 55–69.
41. Saksena N.K., Rodes B., Wang B., Soriano V. (2007). Elite HIV controllers: myth or reality? *AIDS Rev.*, 9, 195–207.
42. Gebara N.Y., El Kamari V., Rizk N. (2019). HIV-1 elite controllers: an immunovirological review and clinical perspectives. *J. Virus Erad.*, 5 (3), 163–166.

43. Mehandru S., Poles M.A., Tenner-Racz K. et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract // *J. Exp. Med.* 2004. Vol. 200. P. 761–770.
44. Feria M.G., Taborda N.A., Hernandez J.C., Rugeles M.T. Effects of prebiotics and probiotics on gastrointestinal tract lymphoid tissue in HIV infected patients // *Rev. Med. Chil.* 2017. Vol. 145 (2). P. 219–229. doi: 10.4067/S0034-98872017000200010.
45. Brooks J.T., Kaplan J.E., Holmes K.K. et al. HIV-associated opportunistic infections — going, going, but not gone: the continued need for prevention and treatment guidelines // *Clin. Infect. Dis.* 2009. Vol. 48. P. 609–611.
46. Reid E., Suneja G., Ambinder R.F. et al. Cancer in people living with HIV, version 1.2018, NCCN Clinical Practice Guidelines in oncology // *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 2018. Vol. 16 (8). P. 986–1017. doi: 10.6004/jnccn.2018.0066.
47. Clifford G.M., Franceschi S. Cancer risk in HIV-infected persons: influence of CD4(+) count // *Future Oncol.* 2009. Vol. 5. P. 669–678.
48. Parikh U.M., McCormick K., van Zyl G., Mellors J.W. Future technologies for monitoring HIV drug resistance and cure // *Curr. Opin. HIV AIDS.* 2017. Vol. 12 (2). P. 182–189. doi: 10.1097/COH.0000000000000344.
49. Alteri C., Svicher V., Gori C. et al. Characterization of the patterns of drug-resistance mutations in newly diagnosed HIV-1 infected patients naïve to the antiretroviral drugs // *BMC Infect. Dis.* 2009. Vol. 9. P. 111. doi: 10.1186/1471-2334-9-111.
50. World Health Organization. HIV/AIDS. HIV drug resistance report 2017. URL: <https://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/hivdr-report-2017/en/>. Дата обращения: 10.11.2020.
51. Российская база данных устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам. URL: www.hivresist.ru. Дата обращения: 10.11.2020.
52. Naziri H., Baesi K., Moradi A. et al. Antiretroviral drug resistance mutations in naïve and experienced patients in Shiraz, Iran, 2014 // *Arch. Virol.* 2016. Vol. 161 (9). P. 2503–2509. doi: 10.1007/s00705-016-2955-z.
53. Liu Z., Yedidi R.S., Wang Y. et al. Insights into the mechanism of drug resistance: X-ray structure analysis of multi-drug resistant HIV-1 protease ritonavir complex // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. Vol. 431 (2). P. 232–238. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.127.
54. Napolitano L.A., Grant R.M., Deeks S.G. et al. Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis // *Nat. Med.* 2001. Vol. 7. P. 73–79.
55. Hegedus A., Kavanagh Williamson M., Huthoff H. HIV-1 pathogenicity and virion production are dependent on the metabolic phenotype of activated CD4+ T-cells // *Retrovirology.* 2014. Vol. 11. P. 98.
56. Loisel-Meyer S., Swainson L., Craveiro M. et al. Glut1-mediated glucose transport regulates HIV infection // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. Vol. 109. P. 2549–2554.
57. Pearce E.L., Poffenberger M.C., Chang C.-H., Jones R.G. Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function // *Science.* 2013. Vol. 342. P. 1242454.
43. Mehandru S., Poles M.A., Tenner-Racz K. et al. (2004). Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.*, 200, 761–770.
44. Feria M.G., Taborda N.A., Hernandez J.C., Rugeles M.T. (2017). Effects of prebiotics and probiotics on gastrointestinal tract lymphoid tissue in HIV infected patients. *Rev. Med. Chil.*, 145 (2), 219–229. doi: 10.4067/S0034-98872017000200010.
45. Brooks J.T., Kaplan J.E., Holmes K.K. et al. (2009). HIV-associated opportunistic infections — going, going, but not gone: the continued need for prevention and treatment guidelines. *Clin. Infect. Dis.*, 48, 609–611.
46. Reid E., Suneja G., Ambinder R.F. et al. (2018). Cancer in people living with HIV, version 1.2018, NCCN Clinical Practice Guidelines in oncology. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.*, 16 (8), 986–1017. doi: 10.6004/jnccn.2018.0066.
47. Clifford G.M., Franceschi S. (2009). Cancer risk in HIV-infected persons: influence of CD4(+) count. *Future Oncol.*, 5, 669–678.
48. Parikh U.M., McCormick K., van Zyl G., Mellors J.W. (2017). Future technologies for monitoring HIV drug resistance and cure. *Curr. Opin. HIV AIDS*, 12 (2), 182–189. doi: 10.1097/COH.0000000000000344.
49. Alteri C., Svicher V., Gori C. et al. (2009). Characterization of the patterns of drug-resistance mutations in newly diagnosed HIV-1 infected patients naïve to the antiretroviral drugs. *BMC Infect. Dis.*, 9, 111. doi: 10.1186/1471-2334-9-111.
50. World Health Organization. HIV/AIDS. HIV drug resistance report 2017. Retrieved on November 10, 2020 from <https://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/hivdr-report-2017/en/>.
51. Russian database of HIV resistance to antiretroviral drugs. Retrieved on November 10, 2020 from www.hivresist.ru. In Russ.
52. Naziri H., Baesi K., Moradi A. et al. (2016). Antiretroviral drug resistance mutations in naïve and experienced patients in Shiraz, Iran, 2014. *Arch. Virol.*, 161 (9), 2503–2509. doi: 10.1007/s00705-016-2955-z.
53. Liu Z., Yedidi R.S., Wang Y. et al. (2013). Insights into the mechanism of drug resistance: X-ray structure analysis of multi-drug resistant HIV-1 protease ritonavir complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 431 (2), 232–238. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.127.
54. Napolitano L.A., Grant R.M., Deeks S.G. et al. (2001). Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. *Nat. Med.*, 7, 73–79.
55. Hegedus A., Kavanagh Williamson M., Huthoff H. (2014). HIV-1 pathogenicity and virion production are dependent on the metabolic phenotype of activated CD4+ T-cells. *Retrovirology*, 11, 98.
56. Loisel-Meyer S., Swainson L., Craveiro M. et al. (2012). Glut1-mediated glucose transport regulates HIV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, 2549–2554.
57. Pearce E.L., Poffenberger M.C., Chang C.-H., Jones R.G. (2013). Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science*, 342, 1242454.

58. Hollenbaugh J.A., Munger J., Kim B. Metabolite profiles of human immunodeficiency virus infected CD4+ T cells and macrophages using LC-MS/MS analysis // *Virology*. 2011. Vol. 415. P. 153–159.
59. Freerman A.J., Johnson A.R., Sacks G.N. et al. Metabolic reprogramming of macrophages: glucose transporter 1 (GLUT1)-mediated glucose metabolism drives a proinflammatory phenotype // *J. Biol. Chem.* 2014. Vol. 289. P. 7884–7896.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Капустин Дмитрий Вячеславович — канд. мед. наук, ассистент кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Ульянова Яна Савельевна — врач-инфекционист, заместитель главного врача ГБУЗ НСО «Городская инфекционная клиническая больница № 1» (Новосибирск).

Карпович Глеб Сергеевич — ассистент кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Краснова Елена Игоревна — д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Кузнецова Вера Гавриловна — д-р мед. наук, профессор кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Извекова Ирина Яковлевна — д-р мед. наук, профессор кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Образец цитирования: Капустин Д.В., Ульянова Я.С., Карпович Г.С., Краснова Е.И., Кузнецова В.Г., Извекова И.Я. Новые аспекты этиологии и патогенеза ВИЧ-инфекции (обзор литературы) // *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2021. № 1. С. 92–104.

58. Hollenbaugh J.A., Munger J., Kim B. (2011). Metabolite profiles of human immunodeficiency virus infected CD4+ T-cells and macrophages using LC-MS/MS analysis. *Virology*, 415, 153–159.
59. Freerman A.J., Johnson A.R., Sacks G.N. et al. (2014). Metabolic reprogramming of macrophages: glucose transporter 1 (GLUT1)-mediated glucose metabolism drives a proinflammatory phenotype. *J. Biol. Chem.*, 289, 7884–7896.

ABOUT THE AUTHORS

Kapustin Dmitry Vyacheslavovich — Cand. Sci. (Med.), Teaching Assistant, Infectious Diseases Department, Novosibirsk State Medical University.

Ulyanova Yana Savelyevna — Infectious Disease Physician, Deputy Chief Physician, City Infectious Clinical Hospital No. 1.

Karpovich Gleb Sergeyevich — Teaching Assistant, Infectious Diseases Department, Novosibirsk State Medical University.

Krasnova Elena Igorevna — Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Infectious Diseases Department, Novosibirsk State Medical University.

Kuznetsova Vera Gavriilovna — Dr. Sci. (Med.), Professor, Infectious Diseases Department, Novosibirsk State Medical University.

Izvekova Irina Yakovlevna — Dr. Sci. (Med.), Professor, Infectious Diseases Department, Novosibirsk State Medical University.

Citation example: Kapustin D.V., Ulyanova Ya.S., Karpovich G.S., Krasnova E.I., Kuznetsova V.G., Izvekova I.Ya. (2021). New aspects of the etiology and pathogenesis of HIV infection (literature review). *Journal of Siberian Medical Sciences*, 1, 92–104.

ТРЕБОВАНИЯ К ПРЕДОСТАВЛЕНИЮ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ В JOURNAL OF SIBERIAN MEDICAL SCIENCES

В Journal of Siberian Medical Sciences (далее — JSMS) публикуются научные обзоры и статьи по медицинским наукам, подготовленные по материалам оригинальных научных исследований. JSMS выходит 4 раза в год.

Требования, предъявляемые к публикациям в JSMS, сформулированы с учетом требований, предъявляемых к рецензируемым научным изданиям, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук.

Статьи, отправленные авторами в другие издания и/или напечатанные ранее в них, к опубликованию не принимаются.

При описании научно-исследовательских клинических работ с привлечением человека в качестве объекта исследования авторы должны указать, соответствовали ли они международным и российским законодательным актам о юридических и этических принципах медико-биологических исследований такого рода. Не допускается использование фамилий, инициалов больных и номеров историй болезни. При описании экспериментов на животных необходимо указать, соответствовало ли содержание и использование лабораторных животных правилам, принятым в учреждении, рекомендациям национального совета по исследованиям, национальным законам.

Авторские права соблюдаются в соответствии с Гражданским кодексом Российской Федерации (ч. 4) и другими действующими нормативными документами. Авторы несут полную ответственность за содержание статей.

В редакцию JSMS авторы должны предоставить:

1) *электронную версию статьи*, подготовленную в соответствии с требованиями к оформлению статей, изложенными ниже;

2) *оригинал статьи* в печатном виде с указанием города, даты, фамилии с подписью каждого автора (на последней странице), визой «В печать» и подписью (на первой странице) заведующего кафедрой или иного должностного лица организации, на базе которой выполнено исследование.

Авторы предоставляют статьи в редакцию лично или по почте;

3) *согласие* на публикацию статьи в JSMS и обработку персональных данных авторов (заполняется каждым автором) (см. на сайте НГМУ: www.ngmu.ru/cozo/mos);

4) для сотрудников ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России (далее — НГМУ) — *экспертное заключение* отдела координации федеральных программ, конкурсных проектов и инновационного развития управления по науке, инновациям и информатизации НГМУ (см. www.ngmu.ru); для сторонних авторов — *направление на опубликование* на фирменном бланке организации, на базе которой выполнено оригинальное научное исследование, за подписью ответственного должностного лица.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ РУКОПИСЕЙ

1. Текст статьи набирается в текстовом редакторе Microsoft Word, Open Office и др., все поля 2 см, шрифт Times New Roman, кегль 12, межстрочный интервал 1,5. Текст статьи необходимо направить в редакцию JSMS в виде отдельного файла с указанием ФИО первого автора — Иванов И.И. текст.doc. Допускается отправка файлов в форматах doc, docx.

2. ФИО авторов набирается строчными буквами курсивом на русском языке. Инициалы помещаются перед фамилией автора. Порядок, в котором будут указаны авторы, определяется их совместным решением.

3. Город и название мест работы авторов оформляются строчными буквами курсивом на русском языке.

4. Статья должна содержать аннотацию на русском языке. В аннотации должны быть изложены цели исследования, основные процедуры, результаты оригинальных исследований и выводы. Под аннотацией помещается подзаголовок «Ключевые слова», после него до 10 ключевых слов или коротких фраз, которые будут способствовать правильному индексированию статьи в поисковых системах и системах цитирования. Аннотацию необходимо направить в редакцию JSMS вместе с текстом статьи в виде отдельного файла с указанием ФИО первого автора — Иванов И.И. аннотация.doc. Также предоставляются сведения о каждом из авторов: фами-

лия, имя, отчество (полностью на русском языке и в транслитерации), ученые звания и ученая степень, должность, место работы, рабочий телефон и адрес электронной почты (e-mail). Сведения необходимы для обработки публикаций в базе данных Российского индекса научного цитирования и других системах цитирования. Аннотация, ключевые слова, информация об авторах и название учреждений должны быть также предоставлены на английском языке.

5. Таблицы помещаются в текст статьи. Таблицы должны быть пронумерованы последовательно в соответствии с порядком, в котором они упоминаются в тексте (например, табл. 1, табл. 2 и т. д.).

6. Рисунки вставляются в текст статьи, а также предоставляются в виде отдельных пронумерованных файлов формата .jpg или .gif с разрешением не менее 300 dpi. Рисунки должны быть контрастными и четкими, буквы, цифры и символы на них должны быть различимы. Рисунками считаются графики, рентгенограммы, фотографии или любые другие графические объекты. Фотографии людей не должны быть узнаваемыми, либо к ним должно быть приложено письменное разрешение на их публикацию. Рисунки должны быть пронумерованы последовательно в соответствии с порядком, в котором они впервые упоминаются в тексте — рис. 1, рис. 2 и т. д. Подписи размещаются в тексте под рисунками. В подписях к микрофотографиям указывается степень увеличения и способ окраски.

7. В тексте статьи используются следующие заголовки: введение, цель исследования, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, список литературы.

8. Используются только стандартные общепринятые сокращения (аббревиатуры). Не применяются сокращения в названии статьи. Полный термин, вместо которого вводится сокращение, должен предшествовать первому использованию этого сокращения в тексте.

9. Обязательно наличие списка литературы. Библиографические ссылки в тексте статьи даются арабскими цифрами в квадратных скобках, в полном соответствии с нумерацией списка литературы. Ссылки в тексте статьи должны даваться последовательно по возрастанию: [1]...[2]...[3]... и т. д. Развернутое описание источника в списке литературы предоставляется по ГОСТ 7.0.5-2008. Список литературы должен содержать публикации за последние 5 лет. В списке литературы все информационные источники перечисляются в порядке их цитирования.

10. Редакция JSMS берет на себя присвоение каждой публикуемой статье номера УДК и осуществление полного перевода статьи на английский язык.

11. Статьи, не соответствующие указанным редакцией требованиям, к опубликованию не принимаются.

ПОРЯДОК РЕЦЕНЗИРОВАНИЯ РУКОПИСЕЙ, ПРИНИМАЕМЫХ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ

1. Рукописи статей, поступивших в редакцию, направляются для рецензирования членам редакционного совета с целью их экспертной оценки на предмет соответствия требованиям JSMS и Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки РФ.

Рецензенты уведомляются о том, что в целях обеспечения авторских и других неимущественных прав присланные рукописи не подлежат разглашению, копированию, распространению. Рецензирование проводится анонимно.

При отказе в направлении на рецензирование представленной автором рукописи редакция направляет автору мотивированный ответ в электронном виде.

Редакция журнала по письменному запросу направляет авторам рецензии на поступившие материалы в электронном виде. Авторы обязаны учесть замечания рецензентов и внести в статью соответствующие исправления или предоставить мотивированный ответ о несогласии с замечаниями рецензента.

Редакционная коллегия принимает решение о возможности публикации статьи или отклоняет её по результатам рецензирования.

Рецензии хранятся в редакции журнала в течение 5 лет с момента публикации.

2. Редакцией не допускаются к публикации:

— статьи, тематика которых не соответствует научному направлению журнала;

— статьи, авторы которых отказываются от технической доработки статей;

— статьи, авторы которых не внесли конструктивные замечания рецензента в текст статьи и не предоставили мотивированный ответ о несогласии с замечаниями рецензента.

В случае отклонения статьи редакция направляет автору мотивированный отказ. Редакция JSMS не хранит рукописи, не принятые к печати. Рукописи, принятые к публикации, не возвращаются.

Регистрационное свидетельство ПИ № ФС 77-72398 выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций
28 февраля 2018 г.

Journal of Siberian Medical Sciences является преемником журнала «Медицина и образование в Сибири», который был включен ВАК Минобрнауки России в Перечень рецензируемых научных изданий

Территория распространения: РФ, страны СНГ, зарубежные страны
При перепечатке материалов из журнала Journal of Siberian Medical Sciences ссылка на источник — обязательна
Ответственность за достоверность сведений в рекламе несет рекламодатель

Электронная версия (аннотированное содержание) доступна по адресам:
<http://jsms.ngmu.ru>
<https://elibrary.ru>

Выпускающий редактор: *В.Г. Кузнецова, Н.А. Лазарева*
Корректура: *Е.В. Егоров*
Компьютерная верстка и дизайн: *О.В. Пустынникова, И.А. Тимошенко*
Дизайн обложки: *Ю.В. Студеникина*
Ответственный за перевод: *Т.Ф. Извекова*

Подписано в печать 29.03.2021. Формат 60 × 84/8
Бумага Color Copy. Гарнитура Georgia.
Усл. печ. л. 12,96. Тираж 1000 экз. Изд. 36 с.

Оригинал-макет изготовлен Издательско-полиграфическим центром НГМУ
г. Новосибирск, ул. Залесского, 4
E-mail: sibmedizdat@mail.ru
Тел.: (383) 225-24-29

Отпечатано в типографии Издательско-полиграфического центра НГМУ
г. Новосибирск, ул. Залесского, 4
Тел.: (383) 225-24-29

ISSN 2542-1174



9 772542 117003