СОДЕРЖАНИЕ

Том 61, номер 6, 2021

Методология научного поиска	
Критерии причинности в медико-биологических дисциплинах: история, сущность и радиационный аспект. Сообщение 3, ч. 2: Последние четыре критерия Хилла: использование и ограничения	
А. Н. Котеров	563
Клеточная радиобиология	
Выживаемость и генетическая нестабильность дрожжевых клеток разного генотипа после воздействия УФ-света	
Е. С. Евстратова, В. Г. Королев, В. Г. Петин, М. С. Толкаева	607
Радиационная биохимия	
Адаптационная пластичность креатинкиназы мозга и печени крыс при воздействии общего рентгеновского излучения	
Л. С. Нерсесова, М. С. Петросян, С. С. Гаспарян, М. Г. Газарянц, Ж. И. Акопян	615
Радиобиологические основы лучевой терапии опухолей	
Оценка влияния радиомодификатора беталейкина на рост облученной перевивной карциномы Льюиса у мышей	
Л. М. Рождественский, А. А. Липенгольц, Н. И. Лисина, К. Ю. Романова	625
Модификация радиационных эффектов	
Противолучевые эффекты Т1082 — фосфата 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевины, в сравнении с его аналогом Т1023	
М.В.Филимонова, Л.И.Шевченко, В.М.Макарчук, А.С.Сабурова, О.В.Солдатова, А.А.Шитова, А.О.Косаченко, В.А.Рыбачук, В.О.Сабуров, А.С.Филимонов	632
Противолучевые свойства индралина и Эссенциале Н при раздельном и сочетанном применении в условиях фракционированного γ-облучения	
М. В. Васин, И. Б. Ушаков, Ю. Н. Чернов, Л. А. Семенова, Р. В. Афанасьев	645
Радиоэкология	
Радиоэкологическое обоснование контрольных уровней содержания ¹³⁷ Cs в кормах сельскохозяйственных животных	
С. В. Фесенко, Н. Н. Исамов, П. В. Прудников, Е. С. Емлютина	652
К вопросу об оценке соблюдения квоты на облучение населения от газоаэрозольных выбросов АЭС	
С. И. Спиридонов, Р. А. Микаилова, В. Э. Нуштаева	664
Хроника	
Памяти Виктора Алексеевича Бударкова	671

Contents

Vol. 61, No. 6, 2021

563
607
615
625
632
645
652
664
671

МЕТОДОЛОГИЯ НАУЧНОГО ПОИСКА

УДК :167:61:573.01:616.036.22

КРИТЕРИИ ПРИЧИННОСТИ В МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ДИСЦИПЛИНАХ: ИСТОРИЯ, СУЩНОСТЬ И РАДИАЦИОННЫЙ АСПЕКТ. СООБЩЕНИЕ 3, Ч. 2: ПОСЛЕДНИЕ ЧЕТЫРЕ КРИТЕРИЯ ХИЛЛА: ИСПОЛЬЗОВАНИЕ И ОГРАНИЧЕНИЯ#

© 2021 г. А. Н. Котеров^{1,*}

 1 Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия

*E-mail: govorilga@inbox.ru

Поступила в редакцию 23.12.2020 г. После доработки 18.02.2021 г. Принята к публикации 24.02.2021 г.

Сообщение 3 посвящено истории, сути и ограничениям эпидемиологических критериев причинности ("критерии Хилла"). На материале из оригинальных публикаций ведущих исследователей причинности (А.В. Hill, М.W. Susser, К. Rothman и др.; 1950-е гг. — 2019 г.), из десятков современных пособий по эпидемиологии и канцерогенезу, из документов международных и имеющих международный авторитет организаций (НКДАР ООН, BEIR, USEPA, IARC и пр.), а также из множества прочих источников, в части 2 сообщения рассмотрены последние четыре критерия Хилла: биологическое правдоподобие, согласованность с текущими фактами и теоретическими знаниями, эксперимент и аналогия. Изложены теоретические и практические аспекты для каждого критерия: история появления, терминология, философская и эпидемиологическая суть, применимость в различных дисциплинах и ограничения. Приведены фактические примеры в рамках каждого из критериев, включая данные из радиационной эпидемиологии и радиационной медицины.

Ключевые слова: критерии причинности, критерии Хилла, биологическое правдоподобие, согласованность с текущими фактами и теоретическими знаниями, эксперимент, аналогия

DOI: 10.31857/S0869803121060060

ВВЕДЕНИЕ

Состоящее из двух частей третье (предпоследнее) сообщение цикла посвящено сути и ограничениям критериев причинности ("критерии Хилла" [1]). Если первые два сообщения [2, 3] могут быть названы вводными (второе – в том числе в историческом плане), то третье нацелено на конкретику и должно отразить все положения в рамках критериев, необходимые для методологии установления причинности эффектов от воздействий. Два предыдущих сообщения в рамках цикла [2, 3], равно как представлявшиеся необходимыми пять наших публикаций-преамбул к сообщениям 3 и 4 (по критериям "Сила связи" [4, 5], "Временная зависимость" [6], "Биологическое правдоподобие" [7] и "Эксперимент контрафактический" [8]) детализированы настолько, насколько это было возможно (т.е. введен весь имевшийся на тему материал, даже косвенный).

Сообщения 3 выполнить в подобной форме было нереально. Поэтому материал как в части 1, так и в представленной части 2, изложен, по возможности, в относительно сжатой форме, с максимальным использованием ссылок на предыдущие работы [2-8] (хотя информация с момента опубликования последних здесь несколько дополнена). Но тематический охват, как можно надеяться, от этого не пострадал. В то же время объем материала не позволил выполнить Сообщение 3 в виде единой, даже сильно сжатой, версии. В части 1 Сообщения 3 [9] были рассмотрены первые пять критериев Хилла: сила связи, постоянство ассоциации, специфичность, временная зависимость и биологический градиент (зависимость "доза-эффект"). Цель части 2 Сообщения 3 развернутое изложение материала по оставшимся четырем критериям Хилла в различных аспектах. Рассмотрены биологическое правдоподобие; согласованность с текущими фактами и теоретическими знаниями; эксперимент и аналогия.

[#] Публикуется в авторской редакции.

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ПРАВДОПОДОБИЕ (BIOLOGICAL PLAUSIBILITY) [7]

Подробно этот критерий, с иллюстрациями в том числе из дисциплин радиационного профиля, рассмотрен в нашем обзоре [7].

История критерия "Biological plausibility".
Перекрывание смыслов с критерием
"Coherence" [7]

Впервые подходящий пункт появляется в 1950-е — начале 1960-х годов (Wynder E.L., 1956; Lilienfeld A.M., 1957 (введен термин); Lilienfeld A.M., 1959; Sartwell P.E., 1960 [7]). В Сообщении Главного врача США о последствиях курения от 1964 г. [10] данный пункт был заменен критерием "Coherence" — согласованностью с известными фактами из природной истории и биологии заболевания.

В 1965 г. А.В. Hill [1] добавил к "Biological plausibility", вероятно, из работ Lilienfeld А.М., 1957; 1959 [7], пункт "Coherence", вероятно, из Сообщения о последствиях курения от 1964 г. [10]. При этом первый критерий у Хилла получил несколько иной смысл, а именно собственно правдоподобие зависимости в широком биологическом плане.

M.W. Susser, по крайней мере с 1977 г. [11], развивал критерий "Coherence", включающий "Биологическое правдоподобие".

Далее критерий "Coherence" в ряде источников был вытеснен критерием "Biological plausibility". Отметим к тому же, что смысл "Биологического правдоподобия" порой совпадает с тем, что понимают ныне и под критерием "Эксперимент" [12, 13] (см. ниже).

В модифицированных для экоэпидемиологии критериях Хилла "Biological plausibility" и "Coherence" заменены на "Biological concordance" ("Биологическая согласованность") [13].

Сущность критерия — интеграция данных из различных дисциплин [7]

Тема внедрения в эпидемиологические доказательства данных из биологии, медицины ("биомедицинские знания"), токсикологии, фармакологии, экологии и иных дисциплин, равно как и обратный подход, — поверка биологических фактов эпидемиологическими закономерностями, весьма широка:

"Эпидемиология, молекулярная патология (в том числе химия, биохимия, молекулярная биология, молекулярная вирусология, молекулярная генетика, эпигенетика, геномика, протеомика и другие молекулярные подходы), а также эксперименты на животных и клетках *in vitro*, должны рассматриваться как важная интеграция доказательств в определение канцерогенных эффектов для человека" (Институт рака США, 2012) [14] (оригинал цитаты см. в [7]).

Приведенные перечни показывают, что данные из почти любой сферы медико-биологических и молекулярно-клеточных дисциплин могут внести важный вклад в поиск доказательств для эпидемиологических изысканий какой угодно практической значимости. Это, ясно, придает практическую значимость и самим исследованиям любой кажущейся фундаментальности и теоретичности.

Суть критерия [7]:

- Соответствие общенаучным знаниям (научные факты и законы, которые имеют отношение к предполагаемой причинно-следственной связи; научное правдоподобие ассоциации).
- Поддержка лабораторными экспериментами *in vitro* и на животных.
- Наличие биологических и социальных моделей, механизмов, объясняющих связь. Рассматриваются на разных уровнях биологической и социальной организации, от молекулярно-клеточного до популяционного (например, на уровне поведенческих реакций, способствующих канцерогенности фактора "социальное").

Биологическое правдоподобие отражает согласование/несогласование теории, объясняющей, как или почему воздействие вызывает заболевание, с другими известными механизмами причинности этого заболевания. Например, показано ли, что агент или метаболит вообще достигает целевого органа? (см. в [7]).

Три уровня достижения биологического правдо-подобия по D.L. Weed. Названы в Weed D.L., Hursting S.D., 1998 [15] (см. также в Weed D.L., 2004 [16] и в [7]):

- 1) Когда для ассоциации можно предположить разумный механизм, но никаких биологических доказательств не существует.
- 2) Когда к механизму можно добавить факты из области молекулярной биологии и молекулярной эпидемиологии (дополним: в том числе данные о "cyppoгатных endpoints", т.е. биомаркерах).
- 3) Если имеются доказательства того, как причинный фактор влияет на известный механизм патологии. Это наиболее строгий из трех подходов к биологическому правдоподобию. В Weed D.L., 2000 [17] указано, что, хотя трудно предложить эмпирическое правило для определения биологического правдоподобия, тем не менее, если представляющий интерес фактор является ключевым в биологическом механизме или на его проводящих путях (раthways), то более вероятно, что зависимость будет причинной. Механизмы или пути демонстрируются с помощью лабораторных экспериментов и молекулярной эпидемиологии [17].

В конечном счете степень достижения биологического правдоподобия — вопрос суждения: достаточно ли собрано свидетельств, чтобы исклю-

чить альтернативные объяснения ("Bec свидетельств"; "Weight of Evidence"; WoE) [7].

Четыре уровня достижения биологического правдоподобия по М. W. Susser. Изложены в работах [18, 19] (1986). Критерий отражает ранее существовавшие теорию и знания ("Coherence"), и трактуется широко, включая следующие элементы согласованности: 1) с теоретическим правдоподобием (названо также в [20]), 2) с фактами, 3) с биологическими знаниями (т.е. "Биологическое правдоподобие") и 4) со статистическими закономерностями, включающими зависимость "доза—эффект" (см. также ниже; подробнее весь комплекс критериев М.W. Susser запланировано рассмотреть в Сообщении 4).

Согласно философу науки J. Worrall (Великобритания), рассмотревшему в 2002—2011 гг. принципы доказательной медицины и рандомизированных контролируемых испытаний (RCT), при исследуемом вмешательстве существует много возможных альтернативных причинных факторов, но "базовые знания" ("background knowledge") свидетельствуют, какие из них являются правдоподобными [21—23].

Как указано для "Биологического правдоподобия" в пособии Власов В.В., 2006 [24]: «Фактически этот признак — вариант признака "объяснимость связи"».

Важность интеграции данных эпидемиологии с биологией и другими дисциплинами на многих цитатах из весомых источников была отражена нами в обзоре [7]. Основанный на совокупности данных из разных дисциплин систематический подход называют "Байесовским анализом" (или "Байесовским мета-анализом" = Confidence Profile Method = Bayesian method). Он опирается на вес свидетельств (доказательств), а не на одно конкретное исследование, следуя тем же принципам, что и принятие решений по Байесу [7].

Интеграция данных для доказательства причинности касается и дисциплин радиационного профиля (ссылки и оригиналы цитат см. в [7]):

"Эксперты по радиационной защите, как законодатели, так и практикующие специалисты, поддерживают понимание нынешних знаний в области радиобиологии и эпидемиологии, чтобы подкреплять соответствующие решения" (2009).

"Когда эпидемиология достигает своих пределов, она зовет радиобиологию на помощь!" (2000).

"Тандем радиационной эпидемиологии и радиобиологии для практики радиационной защиты" (2010).

"Интеграция фундаментальной радиобиологии и эпидемиологических исследований: почему и как". "Большое значение придается использованию основных данных радиобиологии при разработке [методов] оценки радиационного риска" (2015).

Наш анализ распространенности "Biological plausibility" среди критериев Хилла в тех исследованиях, где они использовались как метод доказательности (35 публикаций за 2013—2019 гг.), показал, что критерий по встречаемости находится на четвертом месте.

Неабсолютность критерия: что биологически правдоподобно— зависит от текущих биологических знаний [7]

Это заключение есть в Hill A.B., 1965 [1], но появилось ранее в работах Lilienfeld A.M., 1957; 1959 и затем развивалось в Sartwell P.E., 1960 (цитаты см. в [7]). В [7] нами со ссылками были приведены соответствующие исторические примеры, которые упоминаются в обзорах и пособиях по эпидемиологии. Ниже к перечню из [7] добавлены дополнительные сведения [25, 26]:

- John Graunt, 1662 г.: факторы риска чумы в Лондоне. Все четыре совета (избегать "зараженного воздуха, привезенного судами в порту", скученности, контакта с животными и больными) оказались конструктивными, несмотря на отсутствие каких-либо биологических теорий.
- Percival Pott, 1776 г.: учащение рака мошонки у английских трубочистов. Выявлено за 150 лет до начала исследований химических канцерогенов.
- Domenico Rigoni-Stern, 1842 г.: заметил по статистическим данным для Вероны, что смертность от рака шейки матки была более характерна для замужних, чем для одиноких женщин, что указывало на влияние сексуальной или репродуктивной активности. Истинная причина (папилловирус; HPV) была открыта, однако, только в 1980-х гг., в связи с развитием метода ДНК-гибридизации.
- William Farr, 1848—1849 гг.: выявление обратной ассоциации между высотой проживания выше уровня моря и смертностью от холеры в Лондоне. Факт соответствовал теории "миазмов" и был истолкован как правдоподобный. Позже обнаружилось, что и согласно микробной теории ситуация оказалась такой же.
- John Snow, 1849—1854 гг.: идентификация в Лондоне связи между загрязнением питьевой воды и заболеваемостью холерой. Гипотеза шла вразрез с принятой тогда теорией "миазмов". Когда появилась микробная теория, то связь стала научно обоснованной.
- В Париже в 1840-х гг. терапия на основе гомеопатии уменьшала смертности при некоторых патологиях намного успешнее, чем очистительные и рвотные средства, традиционно применяемые здесь аллопатами [26].
- David W. Cheever (США), 1861 г.: предупреждая об опасности "бессмысленных корреляций", указывал, что было бы смешно приписывать тиф, которым заразился некто, проведя ночь

на эмигрантском судне, паразитам на телах больных. Это просто совпадение.

- Датчанин Johannes Fibiger получил Нобелевскую премию в 1927 г. за исследование, свидетельствующее, что нематода *Spiroptera carcinoma* вызывает рак желудка у крыс. Позднее данный вывод был отвергнут, хотя эта работа и сыграла свою роль в развитии экспериментальных исследований рака [25].
- На заре изучения СПИДа его причины связали с употреблением гомосексуалистами амилнитритов ("попперсов" стимуляторы). При этом относительный риск (RR) составил очень высокую величину —12.3 [27].

Эволюционировали понятия о биологическом правдоподобии и в области радиационной эпидемиологии, и радиобиологии. В [7] было представлено развитие мировых норм радиационной безопасности (НРБ) по материалам из [28]. Допустимая доза уменьшилась на два порядка за менее чем 70 лет (с 1560 мЗв/год в 1925 г. до 10—20 мЗв/год в 1990-х гг.) Пока господствовала концепция пороговой безвредности излучения, представления о его эффектах носили, на современный взгляд, анекдотичный характер [7]:

- Рентгенологи времен Первой мировой войны просвечивали грудную клетку пациента, стоя прямо за его спиной и держа рентгеновскую пленку в руках.
- 226 Rа и 228 Rа вводили в питьевую воду, в кремы и различный парфюм, в ректальные свечи, зубную пасту, шоколадки, капли для глаз, детские книжки и пр.
- Известен ряд детских игр-конструкторов начала 1950-х гг. для "собирания" игрушечных атомных электростанций и т.п. Среди них можно назвать "Gilbert U-238 Atomic Energy Lab", в коробку с которой входили емкости с четырьмя типами урановых руд, равно как с 210 Pb, 106 Ru, 65 Zn и 210 Po [29].
- Наглядна также эволюция представлений о наследственных генетических изменениях у людей (т.е. о дефектах, патологиях и отклонениях у необлученных детей облученных родителей). Исходя из данных для дрозофилы и мышей ожидалось появление массы радиационных мутантов у людей, как результата испытания ядерного оружия, радиоактивного загрязнения окружающей среды, использования излучения в медицине и пр. Это отразилось на СМИ, кино и фантастической литературе 1960—1970-х гг., а также на оценках дозы, удваивающей частоту мутаций у человека (первоначально была порядка 30–100 мГр). Оказалось, однако, что реально выявить наследственные генетические эффекты у человека невозможно, настолько мал даже теоретический прирост к естественному мутационному фону при любых сколь-либо правдоподобных дозах, не устраняю-

щих фертильность [30-37]. Хотя на уровне микросателлитных полиморфизмов, генных экзонов и гетероплазмии мтДНК такая возможность для больших доз $(2-3 \Gamma p)$ облучения за короткий срок до зачатия, судя по всему, в отечественных исследованиях показана [38, 39]1 (список примечаний идет после основного текста). С другой стороны, в пилотных исследованиях группы А.В. Рубановича (Kuzmina N.S. et al., 2014; 2016 [40, 41]) не было выявлено трансгенерационной передачи даже эпигенетических изменений (гиперметилирования СрG-островков в промоторах ряда генов) потомкам ликвидаторов аварии на Чернобыльской АЭС и работников ядерной индустрии, что укладывается в общую картину. При этом для самого родительского контингента, включая еще и работников ПО "Маяк", зависимые от радиационного воздействия и от возраста названные эпигенетические изменения выявлялись отчетливо $[40-42]^2$.

Таким образом, влияние временной конъюнктуры на биологическое правдоподобие налицо для многих дисциплин.

Неабсолютность критерия: реальные, но неправдоподобные ассоциации; правдоподобные, но не реальные ассоциации [7]

Ранее нами приводились примеры эффектов конфаундеров [2, 4], случайностей и обратной причинности [6] в формировании ложных ассоциаций. Это — примеры первой части заголовка: ассоциации как бы есть, но их биологическое (а иной раз и логическое) правдоподобие отсутствует, вплоть до абсурда.

В [7] были добавлены еще факты по теме, которые ниже несколько расширены:

- Талидомид не являлся тератогеном для большинства экспериментальных животных, но в 40% случаев был тератогеном при приеме его беременными, обусловливая тяжелые патологии новорожденных.
- Применявшаяся в 1942—1954 гг. оксигенация недоношенных детей (кислородная терапия) приводила к слепоте из-за ретролентальной фиброплазии (разрастание соединительной ткани под хрусталиком). Было ослеплено порядка 10000 детей. Эпидемиологические доказательства причинности получили с трудом, причем в опытах на животных эффект выявлен не был.
- Поскольку противоаритмические средства при инфаркте миокарда нормализуют ритм сердечных сокращений, было рекомендовано их профилактическое применение. RCT показали, однако, что смертность у пациентов, получавших антиаритмические средства, весьма повышена по сравнению со смертностью у получавших плацебо [24, 43—46]³. Первоначально испытание было разработано как одностороннее, т.е. его идеология предполагала, что препарат может быть толь-

ко полезным или нейтральным, поскольку кардиологи не могли и представить себе вред [43, 45]. На пике использования в конце 1980-х гг. противоаритмические препараты вызывали, по оценке [46], около 50000 смертей ежегодно в одних только США, что сравнимо с числом погибших во Вьетнамской войне [24, 43].

- Гормон-замещающая терапия в период постменопаузы в ранних обсервационных исследованиях оказалась связанной со снижением смертности от кардиоваскулярных патологий, что и представлялось правдоподобным. Но первое же RCT от 1998 г. не подтвердило эффекты, равно как и последующие испытания (2002— 2012 гг.). Более того, было обнаружено учащение риска коронарных заболеваний, инсультов, тромбозов, легочной эмболии и рака молочной железы, так что одно из RCT пришлось остановить досрочно [7, 24, 47-49]. Тем не менее истина лежит между экспериментом и эпидемиологией: было обнаружено, что положительные эффекты превалируют над отрицательными для возраста 50-60 лет, в то время как при более старшем возрасте значимы, в основном, неблагоприятные последствия (подробнее см. в [7]).
- Рекомендация доктора Б.М. Спока (В.М. Spock) класть младенцев спать ничком для снижения риска синдрома внезапной детской смерти основана на правдоподобном объяснении, что это предохранит от удушения рвотой. Оказалось, однако, что смертность в положении на спине была вдвое ниже по сравнению с другими позами.
- Два RCT 1990-х гг. продемонстрировали, что β-каротин увеличивает смертность от рака легкого у курильщиков, хотя это противоречило всей совокупности предыдущих эпидемиологических и биологических данных.
- Странным выглядит отсутствие связи между психоэмоциональным стрессом (в том числе тяжелым смертью детей и близких), включая депрессии, и увеличением риска рака различных типов. И это притом, что эффект представляется биологически правдоподобным: психоэмоциональный стресс вызывает и депрессию иммунной системы, и гормональные (нейроэндокринные) сдвиги, и окислительный стресс, который приводит к повреждениям ДНК и к цитогенетическим нарушениям.
- Неясен механизм анестезирующего эффекта иглоукалывания, равно как действия гомеопатии. Многие исследователи считают их биологически неправдоподобными.

Критика критерия [7]

Подробно критику критериев причинности намечено рассмотреть в Сообщении 4, здесь же — только пересказ изложенного в предыдущем обзоре [7].

Конкретно "Биологическое правдоподобие" и сам принцип индуктивного подхода к доказательности в эпидемиологии с помощью критериев причинности критиковался рядом авторов. А. R. Feinstein (США) отмечал в 1979 г., что требование "Биологического правдоподобия" (в форме "Coherent plausibility") предусматривает биологическую логику, основанную на парадигматической приемлемости, но не на строгих доказательствах. Автор приходит к выводу об отсутствии научных соображений и стандартов науки при применении критериев причинности [7].

Одни из наиболее известных современных эпидемиологов, К.J. Rothman и S. Greenland (США), полностью отрицают индуктивный подход и, судя по всем признакам, вероятностную причинность, сводя все к конечному многофакторному анализу (как минимум, с 1986 г.) [2, 3, 7, 8, 50, 51]. Критерий "Биологическое правдоподобие", по мнению этих авторов, и необъективен, и неабсолютен, поскольку часто основан не на логике или данных, а только на предыдущих убеждениях. Попытки путем байесовского подхода количественно оценить по шкале от 0 до 1 вероятность того, что основано на прежних убеждениях, а что - на новых гипотезах, демонстрируют, согласно К.J. Rothman и S. Greenland, догматизм или следование текущей публичной моде. Это приводит к необъективности при оценке гипотезы [7, 50]. Ни байесовский [7, 50] и никакой иной [51] подходы не могут превратить правдоподобие в объективный причинный критерий. Использование указанного критерия при оценке новой гипотезы может быть только в отрицательном смысле: "для того, чтобы указать на трудность его применения" [7, 50, 51].

В 1996 г. В.G. Charlton (Англия), рассуждая о мультидисциплинарном и междисциплинарном подходах в эпидемиологии, отмечал их мозаичность. Каждый элемент мозаики, состоящий из конкретных данных, может быть оценен на научную валидность, но метод, которым эти элементы связаны-склеены, не является научным, потому что комбинация доказательств от разных дисциплин не может быть самостоятельной научной дисциплиной. Если пробелы в доказательствах для одной дисциплины заменяются или обходятся с помощью данных из другой дисциплины и наоборот, то получается, что совмещается малосовместимое. Действительно, поскольку интегрируются данные, полученные путем ряда "несоизмеримых" (или качественно различных) подходов, методологий и способов доказательности, то эпидемиология должна положиться на суждение (judgment), на "здравый смысл" в большей степени, чем другие науки [7].

Среди известных нам критиков еще следует назвать К.J. Goodman и С.V. Phillips (Канада). В статье от 2005 г. этих исследователей сказано,

что не ясно, как количественно оценить степень важности каждого критерия, не говоря уже о том, чтобы обобщить такой подход в суждение о причинности [52]. Критерий "Биологическое правдоподобие" К.Ј. Goodman (с иным соавтором) рассматривает совместно с "Coherence" и "Analogy" [53].

Важным утверждением К.Ј. Goodman и С.V. Phillips от 2005 г. (в 2004 г. сходные построения были высказаны G.В. Gori [54]) является некая квинтэссенция всей критики комплекса критериев: декларируется, что успешность их применения никогда не была проверена на практике путем сравнения с другими подходами [52]. Но статьи [52, 54] были опубликованы в первой половине 2000-х гг., а в 2009 г. нидерландские исследователи предложили методологию взвешивания критериев и проверили валидность ее использования для известных канцерогенов, причем успешно [55] (подробнее запланировано рассмотреть в Сообщении 4).

Вывод о значимости и необходимости критерия

Как было видно выше, критерий "Биологическое правдоподобие" не абсолютен. Формально — ни необходим, несмотря на всю его значимость, ни достаточен, несмотря на его роль в комплексе правил причинности для агентств по охране окружающей среды (например, US Environmental Protection Agency, аббревиатуры US EPA или USEPA), токсикологии (например, Международная программа по химической безопасности ВОЗ; IPCS) и МАИР (Международное агентство по изучению рака; IARC) [7].

Особенно этот момент важен для медицины, причем истоки уходят еще в "Предписания" Гиппократа: "В медицинской практике нужно уделять внимание в первую очередь не правдоподобным теориям, но опыту в сочетании с разумом" [56] (цитировано по [57]). И уже в наше время: "Лекарство, про которое известно, что оно работает, хотя никто не знает почему, предпочтительнее, чем лекарство, которое имеет поддержку в теории, но без подтверждения на практике" $[58]^4$. Использование в медицине подходов, основанных только на теоретических основаниях без подтверждения на опыте, является "результатом необоснованной практики", поскольку "многие подходы, которые в теории должны быть очень эффективными, на практике оказываются совершенно бесполезными" [58]⁵. В качестве примера еще в 1961 г. приводилась идея о том, что грубая или тяжелая (strong) пиша спровоцирует желудок, пораженный язвой [58], но, наверное, каждый может сам вспомнить массу таких "медицинских" предписаний.

В пособии по теории RCT однозначно сказано, что применение таких испытаний, являясь внедрением научного метода в медицину, "не основано на какой-либо теории о том, как могут работать методы лечения" $[59]^6$.

Для доказательной медицины и клинической практики "Вопрос не в том, "должно ли это работать?", а в том, "работает ли это?" (даже если мы не знаем, почему)" [58]⁷.

И все же без соблюдения биологического правдоподобия, без биологического механизма, любое доказательство причинности, как в эпидемиологии, так и в доказательной медицине, выглядит и неполным, и ущербным. Это понимали еще в 19 в. (см. в $[7]^8$). Как сказано в Terris M., 1993 [60] (курсив наш. – A.K.): "[Нельзя] пренебрегать тем фактом, что эпидемиология является биологической наукой, связанной с болезнями людей"9.

СОГЛАСОВАННОСТЬ С ТЕКУЩИМИ ФАКТАМИ И ТЕОРЕТИЧЕСКИМИ ЗНАНИЯМИ ("COHERENCE")

Перекрывание смысла "Coherence" с другими критериями

Впервые термин, как указывалось выше, появился в Сообщении Главного врача США о последствиях курения от 1964 г. [10] (соответствующий раздел в документе — плод творчества R.A. Stallones от 1963 г. (США); см. в [3]). Критерий означал согласованность с известными фактами природной истории и биологии заболевания. Этот пункт почти буквально совпадал с "Biological plausibility", предложенным ранее Lilienfeld A.M., 1957; 1959 [3].

А.В. Hill в 1965 г. ввел в свой список оба названных пункта [1], что внесло некоторую путаницу. Действительно, для критерия "Coherence" по смыслу находились аналогии с "Consistency" [61–63], "Biological gradient" (зависимость "доза—эффект") [64], "Biological plausibility" (иногда вплоть до замены последним) [11, 12, 14, 17–19, 53, 61, 62, 64–68], "Experiment" [12, 13] и "Analogy" [53, 64, 66]. Все это, как предполагается в [64], различные типы "согласованности".

В критериях Хилла для экоэпидемиологии "Biological plausibility" и "Coherence", как уже говорилось, были заменены на "Biological concordance" ("Биологическая согласованность") [13].

К.Ј. Rothman и S. Greenland во втором издании "Modern Epidemiology" (1998) [69], рассматривая критерии "Coherence", "Plausibility" и "Analogy", находили, что, в связи с трудностями отличия их смыслов, они используются, по существу, как одна идея: причинная связь не должна нарушать известные научные принципы и должна согласовываться с экспериментально выявленными биологическими механизмами и другими уместными данными, такими, например, как экологические типы патологий. Это положение из [69] не раз разбиралось другими авторами [66, 70, 71]. Хотя в третьем издании названого пособия (Rothman K.J.

et al., 2008) [51] подобного объединения критериев мы уже не находим.

В результате перекрывания смыслов в ряде публикаций из списка критериев Хилла "Coherence" был просто выпущен [20, 24, 67, 72—75] (и др.). С другой стороны, в работах М.W. Susser "Coherence" в широком смысле заменил "Biological plausibility" [11, 18, 19]. Обо всем этом мы уже говорили ранее.

В не раз рассматривавшемся в части 1 настоящего сообщения [9] исследовании Weed D.L., Gorelic L.S., 1996 [76] (часто цитируется и иными авторами, в том числе в объемных пособиях по эпидемиологии, канцерогенезу и др. [53, 68, 77]) было обнаружено, что среди 14 обзоров по критериям причинности пункт "Coherence" назывался всего в двух. Наш упомянутый выше анализ распространенности "Coherence" среди критериев Хилла в тех исследованиях, где они использовались как метод доказательности (2013—2019 гг.), тоже показал, что встречаемость критерия наименьшая (вместе с "Analogy").

Однако исходная мысль Хилла [1] вполне разграничивала концептуальные смыслы "Coherence" и иных критериев.

Специфичность понятия "Coherence" сравнительно с "Biological plausibility"

Многие авторы так и не смогли отделить специфический смысл критерия "Coherence", отличающий его от других сходных положений. Согласно [70], различия в определении Хиллом терминов "plausibility" (правдоподобие) и "coherence" (согласованность) представляются трудноуловимыми (subtle). Но различия все же находятся, причем концептуальные, хотя и похожие, порой, на схоластику [70]:

- "Правдоподобие" есть позитивное понятие ассоциация должна *соответствовать* независимому (substantive) знанию, а "согласованность" вербализуется негативно как ассоциация, *не конфликтующая* с накопленными знаниями.
- "Правдоподобие" как бы спрашивает: "Можно ли вообразить механизм, который, если бы он работал, то привел бы к результатам, аналогичным полученным?" То есть возможна и противоположная ситуация, когда механизм не подтвердил бы теорию. Напротив, "согласованность" спрашивает: "Если принять за основу, что установленная теория верна (обратная ситуация заведомо не допускается), то вписались бы наблюдаемые результаты в эту теорию?".
- "Согласованность" отклоняет наблюдаемый результат как непричинный, если он противоречит преобладающей теории, а правдоподобие оставляет исследователя с большим количеством свобод, исходя из которых определенная часть независимого знания может дать возможность оценки и противоположных результатов.

Коротко говоря [71]: согласно критерию "Биологическое правдоподобие" зависимость должна быть биологически вероятна. Согласно критерию "Согласованность" — зависимость не должна входить в противоречие с известными фактами биологии болезни.

В рамках Международной программы по химической безопасности (ВОЗ) [78]¹⁰ отмечается, во-первых, что следует рассмотреть, согласуется ли способ действия фактора с тем, что известно о канцерогенезе в целом ("Биологическое правдоподобие") и, во-вторых, что известно конкретно о факторе ("Согласованность" — "Coherence"). "Соherence" касается связи постулируемого способа действия с наблюдениями по более широкой базе данных (например, связь способа действия агента при индукции опухолей с таковой для других конечных событий — endpoints) [79].

Примеры отличий в смыслах "Biological plausibility" и "Coherence". Эпидемиология и радиационная эпидемиология

Приведенные выше рассуждения носят теоретический характер и на деле различия между двумя названными критериями используются редко. Тем не менее то, что Хилл в свой список включил оба критерия, представляется оправданным, возможно, свидетельствуя, скажем пафосно, о глубине профессионального мышления этого автора. Последнее начинаешь понимать, только ознакомившись со многими аспектами материала по причинности эффектов и с фактами из разных областей. А ряд авторов, в том числе западных пособий, до этого понимания, вероятно, так и не дошли ("согласованность" = "правдоподобие")¹¹.

На двух уже приведенных фактах представим соответствующие иллюстрации.

1. Вспомним про отсутствие связи между психоэмоциональным стрессом (в том числе тяжелым - смертью детей и близких), включая депрессии, и увеличением риска рака различных типов (миниобзор см. в нашей работе [7]). Выполняется ли здесь критерий "Биологическое правдоподобие", есть ли механизм? Если предположить реальность эффекта, то вполне: психоэмоциональный стресс вызывает, как уже говорилось, и депрессию иммунной системы, и гормональные (нейроэндокринные) сдвиги, и окислительный стресс, приводящий к повреждениям ДНК и цитогенетическим нарушениям. Более того, такой стресс способен индуцировать/модулировать раки у экспериментальных животных, правда, вкупе с канцерогеном (стресс + нитрозамин на крыс [80]). Но имеем ли мы здесь выполнение критерия "Согласованность" [с текущими фактами и теоретическими знаниями]? Вряд ли получится для фактов: множество эпидемиологических исследований по всему миру так и не смогли уверенно продемонстрировать эффект. А теории, ко-

2021

торая бы объясняла, почему факты получить не удается, и вовсе, по-видимому, нет.

2. Вновь рассмотрим ситуацию с наследственными генетическими эффектами облучения у человека. Вот некто продекларировал, скажем, что выявил "радиационно-обусловленное" учащение нарушений, аномалий и патологий у необлученного потомства пострадавших в результате аварии на Чернобыльской АЭС, АЭС "Фукусима-1" и т.п. (примеры авторов для первой аварии см. в наших обзорах [31, 33]). Выполняется ли здесь критерий "Биологическое правдоподобие", есть ли биологический механизм? Есть правдоподобие: в опытах на различных видах животных доказано существование эффекта, хотя и при облучении родителей только в дозах свыше малых (более 100 мГр) [30, 34, 35]. Механизм тоже имеется: продемонстрировано увеличение уровня повреждений ДНК, трансгенерационных мутаций и конкретно выхода аномального потомства [30–37]. Хотя второе и третье обнаружено только у животных [34-37] (за исключением упомянутых выше российских данных по передающимся потомству тонким внутригенным изменениям для контингента ПО "Маяк" [38, 39]; см. прим. 1), критерию "Биологическое правдоподобие", как его понимал Хилл [1], это все же удовлетворяет. Но есть ли здесь соответствие критерию "Согласованность"? Нет, поскольку ранее на ряде масштабных когорт (потомки пострадавших от атомных бомбардировок, подвергавшихся радиотерапии, работников ядерных производств и пр.) никаких ощутимых эффектов (кроме изменения соотношения полов) обнаружено не было [30, 34–37]. Более того, существует и теория, почему у людей, в отличие от животных, выявить трансгенерационные эффекты не удается: генетические аномалии элиминируются на ранних стадиях развития in utero ("недиагностированная беременность"), ускользая от анализа [32, 34-37, 81].

Четыре уровня согласованности (=правдоподобия различных типов) по M.W. Susser

Эти положения были кратко перечислены выше. Материал изложен в работах М.W. Susser 1986 г. [18, 19]. Критерий, отражая ранее существовавшие теорию и знания, включает следующие элементы согласованности [18, 19]¹²:

- 1) С теорией. Данные должны быть правдоподобными с позиции существующей теории. Если полученный результат неправдоподобен, сначала следует рассмотреть отказ от него. Но если он все же сохраняется и при дальнейших исследованиях, необходимо найти другое объяснение, и тогда уже сама теория должна быть пересмотрена либо заменена. В этом пункте и утверждение, и его фальсификация имеют равный вес [18, 19].
- 2) С фактами. При переходе к имеющимся фактам совместимость с ними полученного ре-

- зультата должна подтверждаться. При этом отсутствие фактического соответствия имеет больший вес [можно как бы отбросить гипотезу], чем таковое соответствие или же теоретическое неправдоподобие. Но не всегда легко провести четкую грань между тем, что является существующим фактом, и тем, что существует в рамках предыдущей теории, поскольку для проверки согласованности может потребоваться степень дедукции в обоих случаях. Например, в сообщении от 1961 г. указывалось, что при синдроме Дауна воздействие стресса во время беременности наблюдалось с более высокой частотой, чем при других исходах беременностей. Однако предлагаемое причинное объяснение должно быть отвергнуто исходя из существующих знаний о временном порядке. Фактов и теории органогенеза достаточно, чтобы сделать вывод, что синдром должен был возникнуть до всяких стрессов [18, 19]. Аналогичным образом, утверждение, что частота врожденных аномалий была снижена благодаря улучшению перинатального медицинского обслуживания, несовместимо с тем фактом, что почти все такие аномалии возникают до того, как большинство беременных обращаются за медицинской помощью [19].
- 3) *С биологией*. Требование биологической согласованности, под которым M.W. Susser имел в виду "здравый смысл (commonsense) Эванса" (A.S. Evans) [82], применяемый к биологическим системам, оставляет много места для суждений о причинности [19]. Притом, что "здравый смысл одного человека часто является глупостью другого" [18, 19] (на наш взгляд, слишком категорично). Помимо биологии и патологии человека, поиск биологической согласованности обычно предусматривает эксперименты на других видах. Подобный подход полезен при построении теории, но может сильно повлиять на причинный вывод. Так, тератогены, обнаруженные у людей, являются также тератогенами по крайней мере для одного вида животных [83]. Тестирование агента на достаточно большом числе видов (например, на семи и более), которое оказалось отрицательным, ставит под сомнение возможность положительного результата у людей (если только последние не будут удовлетворять постоянству репликации; от себя добавим приведенные выше как раз такие примеры с талидомидом и оксигенацией недоношенных новорожденных). И наоборот, положительные эффекты у какого-либо вида животных повышают достоверность положительных результатов у людей [18, 19]. В публикации [19] M.W. Susser подробно разбирает также примеры несопоставимости данных для животных и человека; это рассмотрено далее.
- 4) *Со статистикой*. Имеется в виду наличие зависимости "доза—эффект" [18, 19].

В целом наибольший вес в рамках критерия "Coherence" М.W. Susser придавал явной несовместимости между результатами исследования и существующими фактами [18, 19] (то есть — отбрасыванию, а не подтверждению гипотезы, как указывал К.R. Роррег [84]). Отметим, что в области радиационно-эпидемиологических эффектов этот момент нередко забывается, когда исследуются последствия разного рода экстремальных и аварийных воздействий (достаточно бросить беглый взгляд на тезисы форумов, посвященных эффектам аварии на Чернобыльской АЭС).

Неабсолютность критерия

На это указывалось еще Хиллом в 1965 г. [1]; воспроизведено во многих последующих источниках [11, 12, 24, 50, 51, 62, 65, 67, 68, 70, 85, 86].

"Согласованность — это окончательный (ultimate), но все же не необходимый критерий для причинной связи" (Susser M., 1977 [11]) 13 .

"Согласованность утешительна (comforting), [но] сама по себе несогласованность не является деструктивной для гипотезы, подчеркивая пробелы в научном понимании" (Fox G.A., 1991 [86]¹⁴; основатель внедрения причинных критериев в экоэпидемиологию).

Как отмечается в USEPA-2005, вывод о причинности в экоэпидемиологии может быть усилен данными, полученными на животных, в токсикокинетических и краткосрочных исследованиях. Однако отсутствие таких данных не является основанием для отказа от причинности [85].

ЭКСПЕРИМЕНТ ("EXPERIMENT") Эксперимент контрафактический: определение, философская и эпидемиологическая суть [8]

Контрафактический подход (counterfactual арргоасh), который Хилл выделил в критерий "Эксперимент" (т.е. по сути это "эксперимент контрафактический"), подробно рассмотрен в нашем обзоре [8]. Использование нами русскоязычного термина "контрафактический" здесь и ранее [2, 3, 6—8], вместо имеющегося в орфографическом словаре "контрфактический" (без "а"), обосновано в [8] тем, что в отечественной философской литературе, посвященной указанному подходу, встречается только первое наименование (к примеру, статья "Контрафактические высказывания" в томе 2 (2010) четырехтомника "Новая философская энциклопедия" [87]).

Неудовлетворительность термина для подразумеваемой Хиллом методологии [8]

Просто "Эксперимент" — это неудачное, слишком неспецифичное название для контрафактического подхода, имело истоком, вероятно, работу Lilienfeld A.M., 1959 [3, 8], в которой среди принципов установления причинности эффектов курения, с попутным упоминанием термина "эксперимент", предлагалась методология, осно-

ванная на устранении действия фактора: "Поставьте эксперимент, чтобы определить, приводит ли прекращение этой привычки к снижению смертности от конкретной патологии" (см. в [8]).

В 1965 г. Хилл так и назвал соответствующий критерий: "Эксперимент", хотя подразумевался не собственно эксперимент в том смысле, как все его понимают, а только контрафактический (без использования этого термина) [1]. Кратко в [1] было сказано об эффекте некоторых "превентивных мер". Например — уменьшения уровня пыли на рабочем месте, замены смазочных масел, отказа курить сигареты. "Изменится ли частота связанных с этими факторами событий? Таким образом может быть выявлена самая сильная поддержка гипотезы причинности" [1, 8].

"Самая сильная поддержка гипотезы причинности" [1]. Это положение затем повторяли и другие авторы [88].

Подход по наблюдению эффекта после предотвращения воздействия ("prevention") для медико-биологических дисциплин имелся в свое время у Клода Бернара (С. Bernard; 19 в.), на что указывал А.Ј. Bollet в 1964 г. [89] (см. в [3, 8]).

О названном подходе в эпидемиологии *как правиле* впервые упоминалось, по всей видимости, в работе Wynder E.L., 1956 [3, 8]. В 1957 г. подход в форме предотвращения действия агента ("prevention") был введен R.J. Huebner для инфекционных (вирусных) заболеваний и А.М. Lilienfeld для хронических патологий [3, 8].

И никто из перечисленных авторов, кроме Хилла, не давал конкретного названия указанному постулату/критерию. Неудачное наименование "Эксперимент", как и некоторые другие рассмотренные термины из списка Хилла, привело к смещению понятий и критике [50, 64, 70, 90] (подробнее см. в [8, 9]). В результате во многих источниках (пособиях и работах) критерий "Эксперимент" Хилла понимается как эксперимент в обычном, не контрафактическом смысле, на клетках, животных, людях и даже in silico [62, 65, 72, 91-97] (и мн. др.; подробно см. в [8]). Что попадает скорее в сферу действия критерия "Биологическое правдоподобие" ("Biological plausibility") [7, 9]. Иной раз критерий "Эксперимент" вовсе опускался; его заменяли "Биологическое правдоподобие" или "Согласованность" ("Соherence"), без всякого контрафактического подхода [12, 13, 17, 72, 74, 98].

Философский смысл и история понятия "контрафактический" [8]

Судя по всему, для биологии, медицины и эпидемиологии теория контрафактического подхода в отечественных дисциплинах была формально не озвучена до нашего обзора [8].

Согласно западной энциклопедии (2005) (ссылку см. в [8]), термин "counterfactual condi-

tional" ("контрафактическая условность") "используется в логическом анализе применительно к выражениям типа: "Если бы A произошло, то и B бы произошло". Чтобы быть контрафактическим, т.е. "против факта", это A должно быть ложным или несоответствующим нашему миру".

В оксфордском словаре по эпидемиологии под редакцией М. Porta (2014) [99] термин "counterfactual" обозначает "событие или условие... которое не происходит (т.е. противно факту), но по одному из пунктов логически возможно".

В другом оксфордском словаре по эпидемиологии, под редакцией Дж. Ласта (2001 г.; перевод 2009 г.) [100], конструкция "counterfactual definition" ("контрафактическое определение") переведена как "определение от противного", или "мера эффекта, в определении которой хотя бы одно из двух условий определения переменных должно противоречить факту".

Согласно пособию по философии науки (Hofmann B. et al., 2007) [97], контрафактический подход состоит в том, что "присутствие или отсутствие причины приводит к различию".

Впервые контрафактический подход для определения причины был предложен, как считается, Д. Юмом (D. Hume; "Исследование о человеческом познании"; издания 1748 и 1753 г.), причем замечено это было спустя более 200 лет — в статье от 1973 г. философа Дэвида Люиса (D. Lewis; США) [8].

Контрафактический подход развивался в философии, гносеологии и языкознании в течение 20 в., причем знаковыми считаются монография и статья D. Lewis от 1973 г. [8].

Контрафактический подход в эпидемиологии. Терминологические вариации [8]

Такой подход использовался в эпидемиологии задолго до формирования формальных построений и терминологии. John Snow (1813-1858) в 1854 г. рекомендовал вывести из эксплуатации общественную водоразборную колонку (снять рычаг), которая, как ему удалось показать, могла распространять холеру в одном из районов Лондона. После этого локальная эпидемия пошла на убыль. Данная иллюстрация контрафактического подхода входит во многие пособия и словари по эпидемиологии (см. в [8]). Другие примеры из общей эпидемиологии, взятые из [43, 67, 101] и др. источников, были приведены нами в [6-8]. Вслед за Сообщениями Главного врача США о последствиях курения от 1964 и 2004 г. [10, 66], во многих пособиях и публикациях (см. в [8]) распространенной иллюстрацией стал отказ от курения с последующей фиксацией снижения частоты заболеваний.

В работе [102] приведены источники 1970-х — начала 2000-х гг., в которых наблюдали эффект (атрибутивные фракции для заболеваемости/смерт-

ности) после сокращения уровня экспозиции неблагоприятным фактором вплоть до нуля, при *ceteris paribus* ("прочих равных условиях"; лат).

Заметим, однако, что термин "counterfactual" ("контрафактический") в раннее время эпидемиологами не использовался. Ряд авторов и организаций не используют его и сейчас, причем многословных замен немало [8]:

"Natural experiment" ("полуэксперимент" — "semi-experimental" [1]; "semiexperiment" [103]), "Reversibility" [13, 73, 104, 105], "Stop/recovery studies" [79], "Intervention" [18, 64, 86, 106], "Preventive action" [64], "Preventive intervention" [71], "Prevention" [107], "Manipulation" [20, 63], "Essentiality of Key Events" [108], "Cessation of exposure" [67], "Terminating exposure" [67], "Исчезновение эффекта при прекращении экспозиции" [24], "Доказательство "от противного"" (пособие Покровский В.И. и др., 2007; ссылку см. в [3, 4, 6, 8], "Обратимость" (перевод пособия Fletcher R.H. et al., 1998; 2005; см. в [8]), "Обратимость (эффективность мер вмешательства)" [109].

Представляется целесообразным заменить в эпидемиологии и медицине "кустарные" и многословные определения, которых более десятка, на единое унифицированное название "counterfactual approach" ("контрафактический подход") [8].

"Контрафактический идеал" и "контрафактический контраст" в эпидемиологии [8]

Теоретически это синонимы, но в реальной практике появляются замены второй категории. Термин "counterfactual ideal"впервые встретился нам, вкупе с "counterfactual contrast", в "Modern Epidemiology" Rothman K.J. et al., 2008 [51].

Контрафактический идеал — это теоретический сценарий, когда индивидуум или группа людей, подвергавшихся воздействию, сравниваются с тем же самым индивидуумом или с той же самой группой, но без воздействия. Причем в то же самое время [47, 68, 104, 110].

Поскольку подобный сценарий на деле невозможен, то, как указано в [110], используется подход по замене идеального "контрафактического контраста" на реально возможные группы сравнения, т.е. контроли [20]). Валидность подобной замещающей стадии (приближение к идеальному контролю) определяет валидность оценки эффекта [110]. А получение абсолютного знания о причинности для медико-биологических дисциплин невозможно в каком угодно эксперименте, повторим это вслед за Юмом и Хиллом (подробнее см. в [2, 8, 9], а также ниже).

В конце программной статьи от 1965 г. [1] Хилл высказал свое кредо для практики и этики медико-биологических дисциплин, которое стало как бы манифестом для многих западных авторов. В пособиях [20, 67, 68, 111], энциклопедиях [112] и

концептуальных работах [86, 93] (и пр. источники; см. в [8]) приводится прямо буквальная цитата из [1]. Уместно и здесь воспроизвести данное кредо Хилла, поскольку до нашего обзора [8] нигде в отечественной литературе оно, по всей видимости, не приводилось. Итак [1]:

"Вся научная работа является неполной, будь то наблюдательные или экспериментальные исследования. Вся научная работа может быть разрушена или изменена путем продвижения знания. [Но] это не дает нам свободы игнорировать уже имеющиеся данные или откладывать действие, которое, по-видимому, требуется в данный момент"¹⁵.

"Контрафактический" — на практике означает и синоним контроля или группы сравнения, и методический подход по устранению воздействия [8]

Как следует из предыдущего материала, "контрафактический" имеет два значения:

- Контроль, группа сравнения (попытка приближения к "контрафактическому идеалу"). Описательные и экспериментальные дисциплины;
- Методический подход (дизайн) по устранению воздействия с последующим наблюдением за эффектом. В основном описательные дисциплины.

Этот дуализм, приведенный и в нашей предыдущей публикации на тему [8], не был разъяснен ранее (два таких пункта рядом нам не встретились ни в одном из источников).

Термин "Контрафактический эксперимент" для критерия Хилла и понятия с определением "контрафактический" [8]

Термин "Контрафактический эксперимент" был введен нами независимо, в Сообщении 2 [3]. Позднее во всей массе источников обнаружилось всего четыре прототипа; они не совпадают и, вероятно, случайны (в пособиях встречаются однократно):

- "Counterfactual experience" (контрафактическое испытание; опыт) [68];
- "Counterfactual thought experiments" (контрафактически замысленный эксперимент) [47];
- "Counterfactual study" (контрафактическое исследование) [20];
- "Counterfactual experiments test" (тест на контрафактические эксперименты) [78].

В зарубежной эпидемиологической литературе обнаружены десятки конструкций и сочетаний слов с определением "counterfactual"; получается прямо "альтернативный мир", как у D. Lewis (см. в [8]). Таким образом, в данной области концепция и подход достаточно распространены уже более 20 лет; детально разработана формализация; но в отечественных источниках по названному направлению, как сказано, нами не был найден даже термин.

Неабсолютность контрафактического эксперимента [8]

Понятно, что если последствия зашли достаточно далеко и уже необратимы, то устранение причины может не дать эффекта [63, 67, 73, 104, 1131. Кроме того, успешность контрафактического подхода зависит еще и от степени компонентности и множественности причины (см. в [2]). Многие патологии являются результатом мультифакториальной причинности, поэтому прекращение какого-то воздействия не всегда способно отменить или замедлить прогрессирование заболевания. Иногда множественные факторы риска, включая диету, физические упражнения, курение, химические агенты и генетическую предрасположенность, способствуют индукции и прогрессу патологии. Комбинация этих факторов может завершаться заболеванием, но экспериментальные манипуляции только с одним из них способны как привести, так и не привести к снижению эффекта [113].

Контрафактический подход и контрафактический эксперимент в радиационных дисциплинах [8]

Для экспериментальных дисциплин радиационного профиля (радиобиология, радиационная генетика и т.д.) контрафактический подход, понятно, неспецифично предусмотрен априори — в виде обязательного формирования контрольной группы. Что же касается контрафактического эксперимента, когда устраняется воздействие радиационного фактора с последующим наблюдением за эффектом, то это, скорее, область радиационной экологии, радиационной гигиены, ред-- радиационной эпидемиологии, но не лабораторных исследований (не удалось вспомнить для радиобиологии ни одного такого примера). В нашем обзоре [8] подробно разобран ряд ситуаций, входящих в сферу радиационной эпидемиологии, которые в той или иной степени можно отнести к контрафактическому подходу и, порой, даже к эксперименту в его как бы "природной" форме (полуэксперимент – semi-experiment Хилла [1, 103). Большинство перечисленных ниже примеров связаны с облучением детей (ссылки см. в [8]):

Остановка работы американских АЭС — якобы снижение детской смертности от злокачественных новообразований поблизости [8]

Группа авторов (J.J. Mangano, Gould J.M. и др.) из некоммерческой организации "Radiation and Public Health Project" (Нью-Йорк) опубликовали несколько работ, в которых приводятся данные о снижении уровня детской смертности, в том числе от раков и лейкозов, неподалеку от американских АЭС после остановки их работы (а во время работы АЭС перечисленные показатели якобы были повышены сравнительно с регионами без АЭС). И хотя данные указанных авторов подвергались критике ("мусорные" — "junk" — работы),

2021

не подтверждаясь другими исследованиями, и они не цитируются международными или имеющими международный авторитет организациями, тем не менее важен сам факт использования в радиационной эпидемиологии/радиационной гигиене контрафактического подхода/эксперимента.

Уменьшение доз при рентгеноскопии in utero снижение риска последующих детских раков и лейкозов [8]

Эффектам пренатального медицинского облучения в прошлые десятилетия посвящен ряд масштабных исследований "случай-контроль", среди которых главным является Оксфордское (The Oxford Survey of Childhood Cancers). Был сделан вывод, что дозы в 6-10-20 мГр при рентгеноскопии беременных (в 1940—1960 гг.) приводят к учащению смертности от детских раков и лейкозов к возрасту в 10-15 лет в 1.4 раза. Имелось множество неопределенностей в этих исследованиях, в результате чего МКРЗ (ІСПР-90; 2003 г. [114]) и НКДАР (с 1972 г.; последний документ – НКДАР-2012; издан в 2015 г. [115]) выразили сомнения в радиационной атрибутивности эффектов (несмотря на значительное число воспроизводимых исследований). Тем не менее данные эффекты, скорее всего, реальны, и это канцерогенные последствия наименьших доз из известных ныне [116].

Последнее подтверждает и "контрафактический эксперимент": параллельно со снижением дозовой нагрузки при рентгеноскопии беременных с 18 мГр в 1940-х гг. до 2 мГр в 1960-х гг. за процедуру (film; дозиметрия по данным НКДАР-1972), отмечено и уменьшение RR для смертности детей от злокачественных новообразований с 1.9 до 1.17.

Последствия терапевтического облучения детей при нераковых патологиях [8]

В 1920-х — 1950-х годах практиковалась радиотерапия детей, причем в значительных дозах, для лечения множества нераковых патологий, большинство которых ныне не представляются серьезными (аденоиды, потеря волос, воспаления, гемангиома, глухота, коклюш, пневмония, синусит, лишай, увеличение тимуса, тонзиллит и миндалины, угри и карбункулы, фарингит и др.). Терапия была успешна, однако из источников тех лет следует, что у детей наблюдался ряд "субъективных" и объективных последствий, среди которых отчетливо выделяются первичные реакции лучевого поражения (тошнота, рвота и др.) и признаки лучевого синдрома (например, лейкопения). Очевидно, что с окончанием этой практики для нераковых заболеваний в 1960-х гг. контрафактически отменились и названные признаки лучевого поражения.

Вторичные раки после радиотерапии — возможность снижения частоты за счет улучшения техники [8]

Среди ряда факторов, которые обусловливают вторичные последствия радиотерапии злокачественных новообразований (наиболее значимые при облучении детей, поскольку те априори имеют больший ожидаемый период жизни), для контрафактического подхода можно выделить улучшение техники и технологии, снижающее поражение здоровых тканей. Но до последнего времени положительный эффект подобного улучшения не был показан (полагают, что прошло слишком мало времени с момента введения новых технологий радиотерапии — пока не выдержан латентный период для индукции раков).

Профессиональные радиационные воздействия: снижению экспозиции может сопутствовать уменьшение смертности от злокачественных новообразований [8]

Работники ядерной индустрии. В наших обзорах [7, 8] приводились данные по эволюции мировых норм радиационной безопасности (НРБ) с 1920-х до 1990 гг. Предельные дозы, что уже приводилось выше, снизились на два порядка с 1560 м3в/год в 1925 г. до 10-20 м3в/год в 1990-х годах. Казалось бы, параллельно должно наблюдаться и контрафактическое снижение смертности от радиационно-обусловленных заболеваний (раков, лейкозов, циркуляторных патологий), но ситуация оказалась не столь простой. Приведенные почти во всех хроно-исследованиях показатели стандартного индекса смертности (SMR) сравнительно с генеральной популяцией не только не улучшаются с 1940-х гг., а скорее, ухудшаются, хотя с 1960-х гг. и наблюдается нечто вроде плато. В 1940-х — начале 1950-х гг. смертность работников сравнительно с соответствующей половозрастной группой населения была ниже, чем ныне (по крайней мере для работников ядерной индустрии Великобритании [117]). Очевидно влияние конфаундеров (например, улучшения здоровья генеральной популяции от десятилетия к десятилетию), равно как и известного снижения SMR у работников вредных производств при увеличении длительности занятости [118]. Но формально факт все же остается: работать в системе ядерной индустрии сравнительно с обычной занятостью становится как бы все менее безопасно, поскольку относительная смертность от всех причин все выше от десятилетия к десятилетию (либо достигается плато). Несмотря на все ужесточения норм безопасности, прогресс в области защиты и здравоохранения¹⁶.

Тем не менее формальный пример контрафактического исхода нашелся и для одной из подобных когорт. Для работников ядерного центра в Окридже (США) с 1947 по 1974 г., параллельно с уменьшением допустимой годовой дозы, отмеча-

лось хроно-снижение SMR для рака легкого. Хотя работники ядерного центра в Окридже, помимо радиации, подвергались воздействию еще и бериллия и прочих агентов (бериллий также является причиной рака легкого).

Радиологи. Эти примеры более однозначны в плане лучевой атрибутивности контрафактических зависимостей.

В работе Berrington A. et al., 2001 [119] прослежена структура смертности британских радиологов (в основном мужчины) за период 1897—1997 гг. по показателю SMR сравнительно с тремя группами мужчин: всего населения Англии и Уэллса ("генеральная популяция"), соответствующего социального класса ("social class I males") и с медиками не радиологами. Наиболее показательно сравнение с последней группой.

В течение почти 100 лет общая смертность радиологов была несколько ниже, чем у других врачей (SMR от 0.68 до 1.0). То же наблюдалось и для смертности от нераковых патологий (SMR от 0.64 до 0.95). Однако для всех раков подобная тенденция имела место только для самого последнего периода (1955—1979), а до того была повышена (SMR от 1.75 до 1.12). В исследовании [119] были приведены оцененные пожизненные дозы, которые могли накопить радиологи в указанные периоды (от 20 Зв в 1897—1920-х гг. до 0.1 Зв в 1955—1979 гг.). Это позволило нам построить контрафактическую зависимость между SMR от раков и накопленными дозами (для логарифма дозы r = 0.980; p = 0.02; см. в [8]).

Сходная контрафактическая закономерность обнаружена и для RR рака молочной железы у радиологов США (в основном женщины) с 1949 г. до 1960 г. [120]. Дозовые лимиты для радиологов составляли 70 рэм/год до 1934 г., 30 рэм/год в 1934—1958 гг. и, наконец, 5 рэм/год с 1958 г. (см. в [8, 120])¹⁷.

Эксперимент в обычном понимании: роль в установлении эпидемиологической причинности

Как уже упоминалось, ряд авторов включают в критерий Хилла "Эксперимент" все эксперименты в обычном понимании: на людях, животных, *in vitro* и даже *in silico* (ссылки см. в [8], а также выше и ниже). Это не отвечает исходному замыслу А.В. Hill [1], подразумевавшему только контрафактический, природный эксперимент. Тем не менее целесообразно рассмотреть место "обычных" экспериментов при подтверждении эпидемиологических ассоциаций. Сходный материал был отчасти изложен в рамках критерия "Биологическое правдоподобие" [7, 9], но конкретная роль именно того или иного экспериментального методологического подхода отражена не была.

Эксперимент — это не правило установления причинности, а только проверка причинной гипотезы, причем не абсолютная

Кажется, что данный подраздел было бы уместно поместить в начале главы, посвященной критерию "Эксперимент", если бы не необходимость изложить сначала понятия о контрафактическом подходе, контрафактических идеале и контрасте (контроле). Без этих понятий затруднительно уяснить неабсолютность эмпирического полхода.

Эксперимент — это не руководящий принцип (guideline) и не критерий установления причинности в строгом смысле, а скорее метод проверки причинной гипотезы [68, 122]. Эмпирический подход является повторением канона "различий" Дж.С. Милля [68], согласно которому A вызывает B, если при прочих равных условиях изменение A приводит к последующему изменению B (оригинал основного перевода канонов Дж.С. Милля см. в [3]).

Правильно выполненные и имеющие хороший дизайн эксперименты могут предоставлять строгое доказательство "за" или "против" причинности [68]: "экспериментальные тесты могут быть намного сильнее, чем другие тесты" [122]. В 1954 г. статистик в области медицины Jerome Cornfield (1912—1979; США), являющийся "классиком" теории о силе связи [4, 9], сравнивая наблюдательный эпидемиологический подход и прямой эксперимент, указывал: "У всех у нас есть смутное ощущение, что если мы можем заставить событие произойти, то мы понимаем его лучше, чем если мы просто наблюдаем его пассивно" [123] (цитировано по [124]¹⁸.

Тем не менее эксперименты не столь решающи в вопросе определения причинности из-за трудностей в интерпретации результатов [50, 122]¹⁹. Приведем здесь важные для радиобиологии примеры "экспериментов" ("анекдотов" [125]), о которых исходно рассказано в блоге (2009) популяризатора науки, биолога А.Ю. Панчина; далее эта информация разошлась в Рунете [125].

1. В одном институте исследовали, так сказать, телепатию у крыс. Животных рассаживали в клетки парами для привыкания друг к другу; затем пары разъединяли и помещали в отдельные, полностью изолированные клетки. Первая группа получала неограниченное количество корма, а вторая, напротив, выдерживалась на голодной диете. Параллельно имелась группа контроля ("непарные"), которая тоже получала неограниченное количество корма. Было обнаружено, что, сравнительно с контролем, партнер голодающей крысы статистически значимо потреблял большее количество корма. Так сказать, "доедал за друга", который передавал какой-то сигнал.

2021

Результаты неуклонно воспроизводились, и был сделан вывод о новом способе передачи информации. Но проводящий экспертизу специалист из другого учреждения заставил распределять крыс между клетками (вначале и после) рандомизированно (по жребию), равно как и животных на контроль и опыт. После этого "телепатия" отменилась и более не воспроизводилась. Предполагают, что исследователи без намеренного умысла помещали более худых и более толстых крыс в клетки из разных групп, причем соответственно намеченным для этих групп задачам.

2. В другом опыте мышей обучали проходить лабиринт, затем скрещивали между собой самых "умных" (наиболее успешно выполнивших задачу) и самых "глупых". Потомки первых еще лучше проходили лабиринт, что как бы демонстрировало некую эволюцию (от себя скажем — ламаркистского или эпигенетического типа). Но и потомки "глупых" мышей тоже весьма умнели в плане лабиринта (а должны были быть еще более "глупыми"). То есть "эволюция" оказывалась обратной. Поэтому появилась гипотеза о наличии некоего информационного поля, которое передает навыки от одних обученных мышей другим, причем тем, которые, возможно, и лабиринта-то пока не видели.

Но вот кто-то догадался мыть лабиринт после каждого эксперимента — и "информационное поле" сразу исчезло.

Два приведенных "анекдота" из [125] рельефно иллюстрируют, что выводы из эксперимента могут нацело определяться неправильной интерпретацией результатов.

О неабсолютности экспериментального подхода имеются рассуждения также в работах не раз упоминавшихся К. Rothman и S. Greenland [50, 122]. Приводится пример проверки старинной гипотезы, что малярия вызывается болотным газом. Если осушить болота в одних регионах, оставив их в других, то получится, что заболеваемость малярией в первых явно упадет по сравнению со вторыми, и гипотеза по видимости окажется правильной [50, 51, 122]. Но, согласно К.R. Роррег, всегда есть много альтернативных объяснений результатов каждого эксперимента²⁰. И здесь альтернатива, которая правильна, это передача малярии москитами [50, 122].

Еще D. Hume (т.е. Дэвид Юм) в 18 в. указывал, что строгое доказательство в эмпирической науке — невозможно [126] (см. также выше про контрафактические идеал и контраст). Как подчеркивается в Rothman K., Greenland S., 2005 [50]:

"Этот простой факт важен для эпидемиологов, которые часто сталкиваются с утверждениями, будто в эпидемиологии доказательство невозможно, причем подразумевается, что оно якобы возможно в других дисциплинах. Подобная кри-

тика исходит из положения, что эксперименты являются определяющим источником научного знания. Данное мнение ошибочно по крайней мере в двух пунктах. Во-первых, неэкспериментальный характер науки не исключает впечатляющих открытий [геодезия, астрономия и пр., в том числе эпидемиология]. Во-вторых, даже когда они возможны, эксперименты (включая RCT) не дают ничего приближающегося к доказательству, и фактически могут быть спорными, противоречивыми или невоспроизводимыми" [50]²¹.

И далее (курсив наш) [50]:

"Некоторые экспериментаторы полагают, что эпидемиологические связи только наводят на размышления, и считают, что детальное лабораторное исследование механизмов [эффекта] у отдельных людей может выявить причинно-следственные связи с определенностью. Эта позиция не учитывает тот факт, что все связи наводят на размышления именно так, как это обсуждалось Д. Юмом: даже самый тщательный и подробный механистический анализ (dissection) отдельных событий не может обеспечить больше, чем ассоциации, хотя и на более тонком уровне. Лабораторные исследования часто включают наблюдаемый контроль, который нельзя выполнить в эпидемиологии, и именно этот контроль, а не уровень наблюдения, может усиливать выводы из лабораторных исследований. Однако и такой контроль не является гарантией от ошибок. Все плоды научной работы, в области эпидемиологии или других дисциплин, в лучшем случае представляют собой лишь ориентировочные формулировки описания природы, даже если сама работа выполняется без ошибок" [50]²².

Эти рассуждения К. Rothman, S. Greenland [50] полезно было бы сгладить приводимой ранее [8] и выше цитатой с "кредо" Хилла²³. Сами авторы [50], в отличие от многих других исследователей и аналитиков, этого не сделали, и они, как сказано, важность причинных критериев — отрицают [50, 51, 61, 69, 122].

Включение экспериментов на людях в критерии Хилла, предложенные для обсервационных исследований, нелогично

В нашей публикации [8] и выше указывалось, что целый ряд авторов критерий Хилла "Эксперимент" (по сути контрафактический) распространил не только на опыты с модельными системами и животными, но и на эксперименты с людьми, т.е. на контролируемые испытания (СТ) и RCT. То же отмечено в пособии "Modern Epidemiology" от 2008 г. К.Ј. Rothman с соавт. [51]²⁴, причем ранее, в энциклопедии от 2005 г., два первых автора выражали недоумение, что же такое А.В. Hill имел в виду под "экспериментом" [122]²⁵. Хотя в его публикации 1965 г. [1], как сказано, все изложено однозначно.

В результате во многих весомых источниках клинические испытания рассматриваются именно в рамках критерия Хилла "Эксперимент": это МАИР (правда, давно — IARC-1987) [127], British Medical Association (2004) [96], объемные западные пособия по эпидемиологии (2004—2019) [54, 62, 65, 72, 88, 97, 128], лекции по этому предмету (1997—2015) [129, 130] и иные, весьма значимые публикации (1987—2015) [14, 91, 93, 94, 131, 132]. В других источниках СТ и RCT, хотя и не относятся авторами к пункту "Эксперимент", тем не менее называются в контексте критериев Хилла [20, 133].

Это неправомерно с концептуальной позиции: ведь клинические испытания, точнее RCT, расценивают еще с 1979 г. [134] как вершину в иерархии доказательности медико-биологических эффектов у людей [20, 47, 65, 67, 73, 75, 135—139], причем их называют "золотым стандартом" подобной доказательности [21, 22, 47, 55, 65, 67, 75, 138, 140] (термин "золотой стандарт" для RCT, согласно [141], введен в 1982 г. А.R. Feinstein и R.I. Horwitz [142]; судя по тексту последней, это так).

Получается алогичность: чтобы оценить путем индукции через совокупность косвенных "пунктов" ("viewpoints" [1]), называемых "критерии", вероятность причинности ассоциации в обсервационных исследованиях, используют среди прочих подходов самое сильное, основанное на гипотетико-дедуктивном методе, экспериментальное доказательство причинности этой самой ассоциации. Зачем нужны иные критерии, подходы, если RCT (и даже CT) все доказывает априори, причем строже, чем какие-либо дизайны обсервационного характера?

Допустим, мы примем во внимание основной, неустранимый порок RCT – недостаточную "внешнюю валидность" (external validity), т.е. возможную нерепрезентативность данных, полученных на ограниченной группе пациентов или добровольцев (нередко здоровых, с особенностями менталитета, часто только мужчин), для всей популяции [26, 43, 47, 53, 59, 131, 135–137, 142–145] (известны случаи, когда это приводило к многочисленным жертвам [135, 145, 146]²⁶). Ведь сравнительно с RCT, обсервационные, эпидемиологические исследования, по определению этой дисциплины [99, 100, 147, 148], затрагивают широкие группы населения, т.е. их выводы как бы более репрезентативны. Однако придумать какойто агент или воздействие, эффекты которых были бы доказаны в клинике путем СТ или RCT, а потом, вдруг, стали актуальными для значительной части населения (вероятно, в результате аварии или несчастного случая), не слишком удается. Ведь RCT проводятся в рамках клиники и, из этических соображений, ограничены исследованиями только препаратов (либо вакцин в полевых испытаниях), а также средств терапии [149–151], хотя хирургия тоже встречается [152]. Можно выдумать историю про выброс с фармакологического предприятия, что подвергло население неконтролируемой экспозиции некоего фармпрепарата, и, потому, обсервационный вывод об эффекте здесь был сделан в том числе на основе более раннего RCT в клинике. Но подобные изощрения вряд ли практически значимы.

Таким образом, обнаруженное для множества западных пособий и иных источников самобытное введение "до кучи" СТ и RCT в комплекс критериев причинности Хилла нелогично и некорректно с позиции научной философии эпидемиологических подходов. Как и при элиминации рядом авторов критерия "Специфичность" [9], А.В. Hill явно никого не уполномочивал на принципиальные изменения, включая расширение контрафактического критерия "Эксперимент" до обычного. И сам A.B. Hill, судя по всему, четко видел границы между эпидемиологией и экспериментальной медициной [153]. Отметим, что официально A.B. Hill считается одним из пионеров внедрения RCT (1948) [23, 104, 149, 154], что не совсем правомерно. Первое известное RCT было проведено в 1925 г. Dora Colebrook (Великобритания) [155], а первое RCT современного дизайна (с распределением на группы по таблице случайных чисел) — в 1938—1941 гг. Joseph Asbury Bell (США) [156]²⁷.

Классическая эпидемиология— это не экспериментальная, а обсервационная дисциплина, основанная преимущественно на индуктивном подходе

Данный материал представляется лежащим вне основной темы настоящего сообщения, но, исходя из сказанного в предыдущем подразделе, это не так. Ибо можно встретить терминологическое смещение "классическая эпидемиология" — "экспериментальная эпидемиология". Понятно, что во втором случае предусматриваются контролируемый эксперимент и гипотетико-дедуктивный метод. Как это совмещается с тем положением, что эпидемиология — преимущественно обсервационная дисциплина, в которой доказательность поверяется комплексом критериев?

Термин "классическая эпидемиология" встретился в ряде западных источников [47, 74, 138, 157, 158], включая словарь по эпидемиологии под редакцией J.M. Last [100]. Термин был введен, по всей видимости, A.R. Feinstein не позднее 1968 г. [140, 159].

Начиная с этиологической теории факторов окружающей среды и образа жизни, предложенной Гиппократом [56], которая упоминается во множестве источников по эпидемиологии [47, 73, 74, 104, 138, 139, 157, 160, 161], данная дисциплина долгое время оставалась чисто наблюдательной, хотя и использующей вспомогательные лабора-

2021

торные эксперименты (особенно на раннем, инфекционном этапе [47]). Это следует из многих, вновь, западных пособий, обзоров, лекций [20, 65, 88, 139, 160, 162—165] и документов НКДАР ООН [95]. Такого рода дисциплины используют преимущественно индуктивный подход:

"В эпидемиологии научные исследования часто проходят индуктивно" (2010 г.; монография по каузальности из The Johns Hopkins University, США) [166]²⁸.

"Индуктивные методы составляют сущность стандарта эпидемиологических текстов..." (1995 г.; обзор L.R. Karhausen (Франция) по критике подходов K.R. Роррег в эпидемиологии) [167]²⁹.

"Конечно, эпидемиологи генерируют гипотезы путем индукции из массивов описательных данных и существующих знаний, с которых их исследования обязательно должны начинаться" [19, 168]³⁰.

"...эпидемиологические выводы являются лишь частью более широкого (индуктивного) эпидемиологического процесса" [169]³¹.

"...эпидемиология, по сути, является индуктивной дисциплиной" (1936 г.; монография Wade Hampton Frost (США), первого американского профессора по эпидемиологии [47]; разработал дизайн когортных исследований [47, 170] и ввел сам термин "когорта" [171]) [172] (цитировано по [173])³².

В обзоре 1978 г. по дефинициям предмета эпидемиологии [148] неоднократно повторяется слово "observation", но совсем нет слова "experiment".

Таким образом, эпидемиологию многие авторы (и мы тоже) причисляют преимущественно к наблюдательным, обсервационным дисциплинам, использующим для формирования выводов, как сказано, в первую очередь индукцию [19, 166—169, 172]. (Разумеется, без дедуктивного подхода тоже не обходится — даже выбор дизайна исследования и моделирование [174], стратификация по группам [165, 174], а также формальный статистический вывод (доверительный интервал) [174], — это уже дедукция [165, 174].)

Однако занятие "преимущественно индуктивной дисциплиной", по всем признакам, может вызывать комплекс неполноценности. "Нет истинной доказательности" по D. Hume [126]. "Ненастоящая наука" по К. R. Popper [84]. "Второсортная наука эпидемиология" ("second-rate science") [175]. И это притом, что мы все живем и действуем в нашем мире в основном по вероятностному, индуктивному принципу (подробнее об этом см. в части 1 настоящего сообщения [9]). В пособии 2016 г. [20] указывается, что эпидемиология, мол, подвергается критике за то, что она "наблюдательная". Автор [20] тут же отвергает эту критику, указывая, что в современной эпидемиологии обязательно используется и эксперимен-

тальный подход, хотя и редко. Сходные осторожные утверждения ("редко") можно найти и в некоторых других пособиях [72, 161]. Но в большинстве подобного рода изданий (кроме названных и цитированных здесь выше) осторожность опускается, и говорится однозначно, что данный предмет использует и наблюдения, и истинный эксперимент [47, 62, 73, 99, 104, 157, 176—179] (и др.).

Что же рассматривается в качестве эксперимента? Понятно, что СТ и RCT, и, как отмечается в [47], обычно ничего более ("Часто экспериментальная эпидемиология просто приравнивается к RCT"³³).

В пособиях [73, 179] в качестве экспериментов в эпидемиологии, помимо CT и RCT, приводятся также "field trials" ("полевые испытания" [178]) и "community trials". Как пример для первой области называется иммунизация/не иммунизация миллионных групп населения при испытаниях вакцин [73, 178]. Это узкая сфера полевой эпидемиологии, которая, согласно профильному изданию по данному предмету, является почти целиком обсервационной дисциплиной [179]³⁴. Что же касается "community trials", то это практически то же самое, что в первом случае, и пример в [73] приводится также с иммунизацией/не иммунизацией по округам целой страны. Отмечается множество ограничений данного дизайна, поскольку трудно создать равноценные группы-округа [73], и эксперимент во многом превращается в экологический (корреляционный) наблюдательный опыт, не имеющий доказательной силы в эпидемиологии и служащий только для формирования гипотез [24, 67, 73].

В результате попытки привязать к собственно эпидемиологии ("классической эпидемиологии") экспериментальную составляющую можно назвать формальными. Какие доли от эпидемиологических исследований составляют названные "field trials" и "community trials"? В пособии 2010 г. указывается, что испытания вакцин насчитывают не более 10—20% от всех эпидемиологических исследований на здоровых популяциях [160].

Однако мы, даже с приведенной выше подборкой ссылок и цитат из множества весомых пособий и иных источников, не можем оспаривать утверждения из десятков других, названных и не названных здесь западных и российских пособий по эпидемиологии, согласно которым все эксперименты в клинике и вообще вся экспериментальная медицина — это как бы и почему-то эпидемиология. Нам остается только констатация данного, явно неправомерного, утверждения.

В 1998 г. известный историк эпидемиологии и становления критериев причинности, Mark Parascandola (США), также отмечал: "Хотя некоторые исследователи рассматривают клинические

испытания с использованием экспериментальных вмешательств как часть эпидемиологии, это не общее мнение" [175]³⁵.

Тем не менее термин "экспериментальная эпидемиология" присутствует во многих современных источниках, порой единично и без объяснений [47, 65, 73, 99, 100, 139, 161, 176, 179, 180] (есть и другие примеры).

Известна еще дисциплина "клиническая эпидемиология" [47, 138, 140, 149, 158, 159], предтеча ЕВМ [47], представляющая собой использование в рамках клиники для групп пациентов подходов (в основном статистических), первично разработанных в обсервационных исследованиях населения эпидемиологией. В отличие от клинической медицины, имеющей дело с индивидуальным пациентом, клиническая эпидемиология оперирует статистическими закономерностями, выявленными на группах пациентов (но не населения, как классическая эпидемиология) [159]. То есть — некая суженная "эпидемиология в рамках клиники". Основными методами клинической эпидемиологии являются эксперименты — CT и RCT. В 1990-х гг. данная дисциплина трансформировалась в ЕВМ (историю этого см., например, в [47]), что более логично в плане терминологии и устраняет странный оксюморон "экспериментальная эпидемиология".

Эпидемиология Поппера (Popperian Epidemiology) виртуальная дисциплина философов и теоретиков

Этот подраздел является, вновь, логичным продолжением предыдущего.

Как уже говорилось, даже классическая эпидемиология использует комбинацию из индукции и дедукции, но о том, что должно превалировать, индуктивизм (позитивизм), или гипотетикодедуктивный метод фальсификации гипотез К. R. Popper [84], ранее велись долгие и многословные дискуссии, начиная с пионерской работы Buck C., 1975 [165] по внедрению взглядов K.R. Popper в эпидемиологию. Суть подобного подхода, активно и безальтернативно предлагавшегося позднее и другими авторами (см. в [181] и ниже), состоит в том, что эпидемиолог обязан начинать свое исследование-наблюдение не просто собирая материал, а имея предварительную гипотезу, что же он должен в результате получить. Чтобы ее, эту свою гипотезу, опровергнутьсфальсифицировать, или же нет [165, 173, 181, 182].

Корректный методологический и статистический подходы в эксперименте, действительно, требуют формулирования гипотезы перед началом исследования (а не изобретения или коррекции ее на основе полученных результатов) [169, 183—185]. Это отмечал еще в 1966 г. А.В. Hill [183]. Тем не менее для обсервационных исследований, в частности эпидемиологии, ситуация может

быть иной. Например, трудно себе представить, какие априорные гипотезы могли иметь исследователи канцерогенных эффектов, скажем, в японской когорте LSS пострадавших от атомных бомбардировок. Вкупе с изучением больных после радиотерапии было обнаружено, что ряд раков очень явно связан с радиационным воздействием (шитовидной и молочной железы), ряд связан как правило (легкого, желудка, толстой кишки, пищевода), ряд – связан редко (почки, кожи, прямой кишки, матки, кости и др.), а ряд вообще никогда не связан (не выявлено для поджелудочной, простаты, семенников, шейного отдела и некоторых других сайтов) [95, 186]. Почему раки поджелудочной, простаты и семенников независимы от облучения, в то время как, скажем, почки, желудка и пищевода — зависимы? Не прослеживаются никакие механизмы и закономерности, и потому – откуда здесь могут быть априорные гипотезы?

Конечно, поставив себя на позицию школьника, можно придумать что угодно (например, что исходная гипотеза была как раз о разной лучевой атрибутивности различных раков), но подобный подход и неконструктивен, и не имеет практической значимости. На игры с попытками притянуть во всех случаях гипотетико-дедуктивные методы к практической эпидемиологии указывал еще M.W. Susser (1988): "Превратите "смутно сформулированные ожидания" в теорию, переименуйте процесс индуктивного мышления в "воспроизведение", и трансформация завершена" [187]³⁶.

Однако дискуссии относительно "Popperian Epidemiology" все же начались, как сказано, с подачи философов в 1975—1976 гг., со множества откликов на статью Buck C. (1975) [165], и активно продолжались в 1980-х гг., как с поддержкой [173, 182], так и с указаниями на практическую неконструктивность подобного подхода, особенно в области мероприятий для здравоохранения [19, 168, 169, 187], нередко основанных на "предупредительном принципе" (см. в [2]). В 1985 г. в США на базе Society for Epidemiologic Research был созван соответствующий симпозиум (так сказать, "Popper – non Popper Epidemiology"), который вызвал тогда чрезвычайный интерес [182]. Материалы 13 ведущих авторов были опубликованы в ныне доступном сборнике 1988 г. [181]. Эти материалы являются основными на тему до сих пор. В 1990-х гг. работ по подходу К. R. Роррег в эпидемиологии стало много меньше, а в 2000-х гг. и позже – еще меньше.

К нынешнему времени, судя по десяткам западных пособий, вопрос почти потерял актуальность, и даже в объемных изданиях по эпидемиологии (например, 2014 г. — 2498 страниц [47], 2016 г. — 442 страницы [20] и 2020 г. — 596 страниц [68]) еще более кратко приведено то, что мы только что

кратко и рассмотрели, преимущественно со все теми же дискуссионными ссылками 1970-х — 1980-х гг. [19, 165, 169, 173, 181, 182, 187] (и др.). Основной консенсус, на котором, вероятно, все и сошлись, это использование в эпидемиологии и индуктивных, и дедуктивных подходов [24, 68, 991. Конечно, все так, но очевидно, что основным, концептуальным подходом здесь служит индукция, и, потому, достаточно виртуальная "Popperian Epidemiology" является уделом философов и теоретиков. Мы разделяем мнение M.W. Susser [19, 168, 187], M. Jacobsen [169, 188], M. Parascandola [175], L.R. Karhausen [167] и некоторых других, не названных здесь авторов [189, 190], об особой важности для практических решений в эпидемиологии именно индуктивного подхода. Называют ли ту эпидемиологию "классической" или, неправомерно, "экспериментальной".

Эксперименты по испытанию препаратов, воздействий и средств терапии для людей наиболее адекватно проводить на людях

Рассмотренный материал свидетельствует, что для задач классической эпидемиологии (а радиапионная эпилемиология по своим особенностям является именно такой [95]) клинические эксперименты, СТ и RCT, малоактуальны. Поэтому здесь нецелесообразно слишком подробно раскрывать постулат, что испытания препаратов, воздействий и средств терапии для людей наиболее адекватно проводить именно на людях. Это известно еще со времен Авиценны (980–1037), который с явным юмором отмечал, что тестирование лекарств следует проводить на людях, "поскольку проверка на львах и конях ничего не скажет о действии вещества на организм человека" [191] (ясно, что медицинские опыты на львах проблематичны для любых эпох). В российском пособии от 2013 г. [192] также сказано, что "достоверно предсказать действие новой субстанции на человеческий организм на основании экспериментов на животных невозможно. Фармакокинетика у человека отличается от фармакокинетики даже у приматов".

Утверждения, что именно данные для людей наиболее адекватно отражают влияние на человека факторов окружающей среды (химических и пр.) и наиболее важны при оценке соответствующих рисков, можно найти в документах USEPA [193]³⁷ (хотя и не во всех [63, 85]), ЕСЕТОС (European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals) [194]³⁸, Teratology Society [133]³⁹, МАИР (отражено в градациях канцерогенности факторов) [127], в работах на тему включения эпидемиологии в государственную и правовую политику [54]⁴⁰, в юридическую практику [195]⁴¹ и пр. [196]⁴². (Следует отметить, что найти ссылки и цитаты для подобных, как бы априори ясных

утверждений, оказалось не так просто. Их нет даже во множестве пособий по эпидемиологии и ЕВМ.)

Игнорирование этого правила тысячелетней лавности и использование в мелицине основанных только на лабораторных опытах или на биологических теориях подходов приводили, порой, к плачевным последствиям, сопровождавшимся тысячами и десятками тысяч жертв (см. выше и в [7] примеры про талидомид и оксигенацию новорожденных). Однако основатель экспериментальной медицины C. Bernard (т.е. Клод Бернар) в 19 в. придерживался идеи, что только строго контролируемые эксперименты на животных могут обеспечить надежные данные о физиологии и патологии, имеющие медицинское значение. Этот исследователь находил истоки экспериментальной медицины в экспериментальной физиологии [197, 198]⁴³. В конце 1920-x-в 1930 гг. Совет по медицинским исследованиям Великобритании (Medical Research Council; MRC), как указано в историческом обзоре [180], выполнял программы в области экспериментальной эпидемиологии — на животных. В 1930-х гг. М. Greenwood и А.В. Hill (оба — Великобритания), считающиеся именно в такой последовательности основателями эпидемиологии "ранней генерации" (всего для 20 в. насчитывают три генерации) [199], продвигали экспериментальную эпидемиологию [200]. Эта "экспериментальная эпидемиология" 1930-х гг. не совпадает по смыслу с рассмотренной выше одноименной надуманной дисциплиной нашего времени, включающей в эпидемиологию CT и RCT (т.е. эксперименты на людях). Согласно [201], MRC и его представители M. Greenwood и A.B. Hill понимали под "экспериментальной эпидемиологией" тестирование эпидемиологических гипотез в опытах на животных.

В 1940-х гг. опыты на животных все еще включали в "терапевтические (therapeutic) эксперименты" [202] (цитировано по [203]).

Время показало, что прав был скорее Авиценна⁴⁴. В частности, доклинические исследования новых препаратов на животных не всегда дают адекватные предпосылки для фазы I клинического испытания, приводя, порой, к трагедиям на этой фазе⁴⁵. Хотя *в среднем* процент экстраполяции медицинских эффектов с животных на человека удивительно высок (см. далее прим. 65).

Чем эксперименты на людях уступают экспериментам на животных

- 1) эксперименты на людях часто трудно и дорого организовать [20];
- 2) по этическим соображениям не все испытания на людях можно повторить и воспроизвести [183]. Это нередко касается и обсервационных, эпидемиологических исследований. Как сказал А.В. Hill в 1965 г.: "Еще раз взглянем [правде в

глаза]: будут случаи, когда повторение отсутствует или невозможно, и все же мы не должны стесняться делать выводы" $[1]^{46}$;

- 3) для многих факторов или воздействий исследования на людях вообще невозможно проводить по этическим соображениям [12, 20, 22, 47, 65, 66, 68, 96, 142, 149, 159, 164], поскольку "единственные этичные эксперименты относительно причинной связи на людях — это эксперименты по предотвращению" (R. Doll) [107]⁴⁷. "С этической позиции, участник должен иметь потенциал для получения выгоды, но при этом должна быть неопределенность по поставленному вопросу. Для факторов риска, в отличие от факторов защиты, такой пользы быть не может" $[20]^{48}$. То же – для RCT при облучении: "Должно иметься ожидание, что в популяции радиационное воздействие приведет к улучшению в состоянии здоровья относительно любой альтернативной терапии" (BEIR-VII) [30]⁴⁹. Поэтому для лучевого фактора единственные области, где возможны RCT, это аспекты радиотерапии (много работ) [208], сравнение скриннинговых эффектов различных типов диагностического облучения [209], бальнеология (мало публикаций) [210] и иммуностимуляция малыми дозами облучения у больных раком (единичные источники) [211]⁵⁰;
- 4) в некоторых случаях по этическим и методологическим соображениям рандомизация при СТ невозможна [184, 213], в то время как дизайн экспериментов на животных таковую предусматривает априори, что специально отмечается в документах МАИР [214], USEPA [85], FDA (U.S. Food and Drug Administration) [215], в российском обзоре [216] и в иных источниках [217]. В исследовании Hirst J.A. et al., 2014 [217] было показано, что в опытах на животных отсутствие рандомизации завышает эффект исследуемого воздействия, в то время как рандомизация, сокрытие распределения по группам и "ослепление" (маскировка) исследователей размер эффекта уменьшают. Точно такие же результаты получены для СТ и на людях: нерандомизированные исследования демонстрируют, как правило, более высокие эффекты, чем RCT [21, 218] (хотя иногда возможна и обратная зависимость [219]), равно как недостаточные "ослепление" и сокрытие распределения [218, 220, 221]. Более того, имеющие меньший размер выборки и низкокачественные RCT также завышают эффекты сравнительно с масштабными высококачественными RCT [220];
- 5) лабораторные эксперименты имеют намного больше, так сказать, "степеней свободы", чем СТ в клинике. Это еще в 1912 г. отмечал в своей концептуальной статье Т.Н. Sollmann (США): "Клинические наблюдения должны выполняться столь же точно, как и лабораторные наблюдения, но для людей опыты не могут быть так же легко

контролируемы, условия не могут быть так же легко поддерживаемы одинаковыми или разными, — одним словом, проблемы не могут быть проанализированы так, как они могут быть проанализированы на животном" [222]⁵¹.

Действительно, исследователь может использовать многие способы введения (или воздействия), широкий диапазон доз, сочетания с иными агентами; изучать объекты различных видов, животных с любыми гендерными и возрастными характеристиками, моделировать один и тот же объект in vitro, in vivo и in situ, и пр., включая использование контрафактических подходов (элиминирование, ингибирование, блокирование, нокаутирование [8]), а также возможность выявления зависимостей "доза-эффект". На последнем, как на одной из важных характеристик, оцениваемых в опытах на животных в токсикологическом и канцерогенном аспектах, сделан акцент авторами USEPA [85, 223], FDA [215] и др. [224]. Все сказанное, понятно, актуально и для исследования радиационного фактора;

6) в отличие от RCT, не способных выявить редкие побочные эффекты (их приходится собирать в течение многих лет на обсервационной фазе IV) [149, 192], эксперименты на животных можно проводить именно с этой целью. Согласно [225], токсикологические исследования на животных предназначены не для того, чтобы установить, является ли соединение безопасным для человека (поправим: не только для того), а чтобы изучить типы эффектов, которые это соединение может вызывать при определенных условиях. Исследования на животных часто проводятся с целью вызвать наибольшее количество побочных эффектов, что достигается использованием очень высоких доз и воздействиями по специальным путям доставки соединения прямо в конкретный орган, без учета нормального поглощения и метаболизма [225].

Когда оценка рисков и разработка стандартов безопасности осуществляется только на основе опытов на животных

Как было сказано выше, наиболее точные стандарты для человека можно разработать только на основе опытов на людях. Но это далеко не всегда возможно, в особенности для воздействий повреждающих факторов⁵². Согласно FDA ("Animal Rule", 2015), "...было бы неэтично намеренно подвергать здоровых добровольцев воздействию летального или перманентно выводящего из строя токсичного биологического, химического, радиологического или ядерного соединения..." [215]⁵³.

Причем речь идет не только о медицине, но и об эпидемиологии — как оценить потенциальную опасность соединения, если никакие группы людей с ним не контактировали; во всяком случае в

масштабах, обеспечивающих обсервационное исследование? Как отмечается, вновь, FDA и ведущими авторами в области радиозащиты США, проводящими поиск в рамках этой организации, когда "полевые испытания для изучения эффективности препарата после случайного или преднамеренного воздействия невозможны" [215, 232]⁵⁴.

В подобных случаях основной экспериментальной базой для определения самого факта опасности, затем — для количественной оценки рисков с последующей разработкой стандартов безопасности, служат эксперименты на животных. Этого положения в целом придерживаются соответствующие международные и имеющие международный авторитет организации, как нерадиационного, так и радиационного профиля.

1) MAUP (IARC-1987 [127]):

"При отсутствии адекватных данных для людей, биологически правдоподобно и разумно рассматривать агенты, в отношении которых имеется существенное доказательство канцерогенности у экспериментальных животных, как если бы они представляли канцерогенный риск для человека" (курсив – оригинала)55. Существенными доказательствами канцерогенности по МАИР является ее обнаружение на двух и более видах животных и в двух или более независимых исследованиях на одном виде, проводимых в разное время или в разных лабораториях или по разным протоколам. В исключительных случаях одно исследование на одном виде может рассматриваться как существенное доказательство канцерогенности, когда злокачественные новообразования возникают в необычной степени с точки зрения заболеваемости, локализации, типа опухоли или возраста начала заболевания [127].

Сходные положения повторены в IARC-2007 и в IARC-2012 [214]:

"Хотя из этой ассоциации [для животных] нельзя установить, что все агенты, вызывающие рак у экспериментальных животных, также вызывают рак у людей, биологически вероятно, что агенты, канцерогенность которых у экспериментальных животных достаточно очевидна, также представляют канцерогенную опасность для людей. Соответственно, в отсутствие дополнительной научной информации считается, что эти агенты представляют канцерогенную опасность для человека" 56.

2) FDA (США). Руководство "Product Development Under the Animal Rule" [215] "предоставляет информацию и рекомендации по разработке препаратов и биологических продуктов, когда исследования эффективности для человека неэтичны или неосуществимы" 57.

"Правило "Animal Rule" гласит, что на препараты, разработанные для улучшения или предотвращения серьезных либо опасных для жизни со-

стояний, вызванных воздействием летальных или навсегда выводящих из строя токсичных соединений, когда исследования эффективности на людях неэтичны, а полевые испытания невозможны, FDA может *предоставить разрешение на маркетине* на основании адекватных и хорошо контролируемых исследований эффективности на животных, если результаты этих исследований покажут, что препарат с достаточной вероятностью обеспечит клиническую пользу и для людей" (курсив наш. -A.K.) [215]⁵⁸.

Четыре критерия (criteria), позволяющие, согласно FDA, делать выводы для человека на основе экспериментов на животных, следующие [215, 233–235]:

- Существует достаточно изученный патофизиологический механизм токсичности соединения и ее предотвращения или ощутимого снижения препаратом;
- Эффект продемонстрирован для более чем одного вида животных, которые, как ожидается, будут реагировать предсказуемо для человека, а если эффект показан только на одном виде животных, то таковой должен представлять собой достаточно хорошо охарактеризованную животную модель для предсказания реакции у людей;
- Конечный показатель (endpoint) исследования на животных должен быть четко связан с желаемой пользой для людей, которая заключается, как правило, в повышении выживаемости или предотвращении серьезных заболеваний;
- Данные или информация о кинетике и фармакодинамике препарата или другие соответствующие данные либо информация для животных и для людей позволяют выбрать эффективную дозу для человека.

FDA регулирует также разработку и внедрение радиопротекторов/радимитигаторов [232]:

"Маркетинговое утверждение (approval) новых противолучевых средств, для которых определение эффективности на людях неосуществимо или неэтично, будет основываться на исследованиях эффективности на животных и данных по безопасности для фазы I на здоровых добровольцах. Согласно "Animal Rule", испытания противолучевых средств на людях можно обойти с помощью сокращенного, но строгого пути утверждения [препарата] FDA, который предусматривает выявление его эффективности на двух видах животных, предсказуемый ответ у человека, четкое понимание механизмов действия и безопасность для людей⁵⁹.

FDA подчеркивает [232], что для доклинических исследований безопасности и эффективности противолучевых средств следует больше полагаться на модель крупных животных, но национальные ресурсы в этом плане ограничены. (Хотя показателем сходства с людьми является генетика

и таксономия, а не размер видов. Наиболее весомо эффекты могут быть продемонстрированы на животных, таксономически связанных с людьми, и в дозах, аналогичных тем, которые ожидаются для людей [236].) Исследования на приматах считаются "золотой стандартной моделью" для опытов на животных при разработке и утверждении препаратов FDA [235]. В результате, как указано в Singh V.K., Olabisi A.O., 2017 [235], несмотря на значительные достижения за последние 60 лет в области разработки противолучевых средств на основе опытов на животных, только два фармпрепарата были одобрены FDA для терапии острого лучевого синдрома.

3) USEPA (CIIIA), European Food Safety Authority (EFSA), the Joint Food and Agriculture Organization (FAO), the European Chemicals Agency (ECHA) [78], International Life Sciences Institute (ILSI) u International Programme for Chemical Safety (IPCS) [237] u т.п. Для данных организаций и названной международной программы концептуальный подход к определению степени опасности экологических факторов (преимущественно химических токсикантов) основывается на упомянутом выше понятии WoE (еще раз расшифруем: Weight of Evidence — "Вес свидетельств"; перевод наш; понятие введено в 1960 г. [238]), которое означает выводы на основе интеграции и синтеза разнородной информации, полученной в опытах и наблюдениях на разных уровнях биологической организации (в том числе in vitro и in silico [224]) [13, 55, 63, 224]. Подход требует суждения [224] и экспертной оценки [63]. Методологическим основанием служит исследование так называемого "MOA" ("Mode of Action" способ действия; перевод наш) в опытах на животных [13, 78, 85, 193, 224, 237]. Согласно пособию по причинности в экологии (2015), МОА означает "способ (way), с помощью которого механизм действия агента в конечном итоге влияет на объект" [239]60. Механизм действия и МОА ("mode") — это, таким образом, разные категории [239]. Применительно к канцерогенезу МОА предусматривает цепочку ключевых событий на разных уровнях организации, к нему и ведущих. Каждое звено исследуется и взвешивается отдельно [78].

Следует отметить, что оценки для WoE, и, главное, для значимости этапов MOA на животных, проводятся с помощью критериев Хилла, хотя и модифицированных [13, 78, 224, 239]. То есть — разработанные для эпидемиологии "пункты" Хилла применяются здесь для исследований на животных $(!)^{61}$.

USEPA и другие перечисленные выше организации экологического и токсикологического профиля разработали рекомендации по установлению МОА соединений в опытах на животных для использования при оценке рисков для человека [13, 85, 224, 237]. Утверждается, что в большин-

стве случаев различия в МОА для человека и животных будут носить количественный характер; примеры же качественных отличий редки [224]. Для экстраполяции выявленных эффектов по связке "животные — человек" верно и обратное: отсутствие опухолей в хорошо проведенных долгосрочных исследованиях по крайней мере на двух видах животных дает, согласно USEPA, разумную уверенность, что агент не вызывает канцерогенных последствий у человека [85].

Допущение по умолчанию, согласно которому данные на животных переносятся на людей, включено в руководящие принципы USEPA по крайней мере с 1991 г. (библиографию см. в [63, 193]).

- 4) NCRP (США). В NCRP-2005 отмечается, что эксперименты на животных, особенно на собаках, долгое время были одним из главных источников для оценки риска воздействия инкорпорированных радионуклидов [240].
- 5) UNSCEAR [36], MKP3 (ICRP) [241], BEIR (США) [30], NCRP (США) [240], COMARE (Великобритания) [37]: оценки радиационного генетического риска для человека. Выше и в предыдущей публикации [7] указывалось, что в реальных эпидемиологических исследованиях для людей не удается выявить трансгенерационные (наследственные генетические) изменения (см. также в [31–35]). В связи с этим для вычисления "удваивающей дозы" у человека (дозы облучения, которая увеличивала бы частоту спонтанного мутагенеза для одного поколения вдвое) первоначально была использована частота мутирования по семи реперным генным локусам у облученных мышей. Удваивающая доза, рассматриваемая с 1972—1977 гг. как 1 Гр на поколение, явилась, таким образом, простой экстраполяцией эффектов у мышей на эффекты у человека. В 2001 г. этот подход был модифицирован путем использования мутационной модели "человек – мышь". В последней за исходный фон берется частота наследственных заболеваний у человека, а индуцированный радиацией показатель учащения рассчитывается на основе увеличения частоты мутаций в локусах облученных мышей [32, 33, 36]. Можно видеть, что модель 2001 г. (в настоящее время не изменилась) не основана на получении каких-либо эпидемиологических данных [36].

На наш взгляд, использование *количественных данных* о трансгенерационных рисках облучения у мышей непосредственно для оценок таковых у человека является наиболее ярким примером настоящего подраздела.

Ограничения экспериментов на животных

Хотя опыты на животных ныне предшествуют любому новому клиническому испытанию, и без доклинической фазы не мыслится никакое RCT^{62} , тем не менее выявленные в подобных

опытах закономерности следует интерпретировать с осторожностью.

1. Банально: животные – не люди. Экстраполяция выявленных на животных закономерностей не всегда адекватна как из-за межвидовых различий [18, 51, 63, 71, 88, 93, 193, 195, 196, 225, 245—247], так и из-за того, что различия в механизме эффектов часто неизвестны [245]. Метаболические пути соединения могут отличаться у человека и животных [14, 63, 225], поэтому экстраполяция между видами требует знания физиологии видов [86]. Это касается и экстраполяции "животные \rightarrow → человек" в радиобиологии [248]. Конечно, сравнительно с индуктивными обсервационными исследованиями только прямой эксперимент. основанный на гипотетико-дедуктивном методе, может дать строгие доказательства (см. выше), позволяя контролировать все условия. Но, как указано в [249], "попытка нивелировать названные проблемы экспериментами на животных вводит новые проблемы, поскольку перенос выявленных на животных эффектов на человека далеко не тривиален"63. В работе Cole P., 1991 (США) [195] о роли эпидемиологии в юриспруденции отмечается: "Суды признают, что попытка применить данные для лабораторных животных к человеку не является экстраполяцией, даже если ее обычно и называют так. Скорее это обобщение, в первую очередь субъективный процесс, в котором неявно применяется ряд незащищенных допущений"⁶⁴.

Разработка фармпрепаратов в настоящее время (2019) характеризуется высоким уровнем отсева; многие предлагаемые методы терапии не выдерживают клинических испытаний. Частично это может быть связано с показателями успешности трансляции результатов от животных к человеку; так называемым "трансляционным сбоем" ("translational failure") [250]⁶⁵.

- 2. Исследования в лаборатории часто проводят при высоких уровнях воздействия, редко имеюших место в ситуации с человеком [51, 75, 164, 245—247]. В связи с этим тестирование канцерогенов на грызунах в значительном числе случаев было ложноположительным. Действительно, дозы соединений, близкие к максимально переносимым, могут вызывать митогенез, который способствует мутагенезу и, таким образом, приводит к канцерогенезу, хотя те же соединения в дозах, близких к тем, которые обычно встречаются в повседневной жизни, могут быть безвредными [164]. Таким образом, экстраполяция эффектов от животного к человеку усложняется по крайней мере дуализмом: к качественному межвидовому переходу добавляется количественный дозовый переход [247].
- 3. "Искусственность лабораторных воздействий" [196]⁶⁶. Путь, по которому вещество попа-

- дает в организм, может оказать влияние на его эффективность. В лаборатории животным часто вводят соединения специальными путями: внутрибрюшинно, подкожно, внутримышечно и внутривенное. Эти способы могут обходить нормальные механизмы, посредством которых потенциальные токсины удаляются до достижения общего кровообращения [225]. Так, длительные попытки доказать связь между курением и повышением частоты рака легкого на животных не приводили к успеху. Обкуривание мышей не вызывало у них учащения указанной опухоли помимо прочего по той причине, что мыши не желали по-настоящему вдыхать табачный дым [251].
- 4. Животные содержатся в контролируемой и стабильной среде, минимизирующей факторы образа жизни (питания, физической нагрузки, стресса и пр.); прием препаратов также контролируется и стабилен, в отличие от пациентов вне клиники [75].
- 5. Линии лабораторных животных, как правило, инбредны, что обусловливает намного более четкие, "искусственные" зависимости, чем для генетически разнообразных популяций человека [75, 193, 246].
- 6. Исследования на животных не воспроизводят длительность, степень, продолжительность, пути воздействия (length, magnitude, duration, routes) и вариабельность воздействия для людей [246].
- 7. Редукционизм: воздействие на человека нередко происходит через мультимедийные пути, включая пищу, воду, воздух, а также внутреннюю и внешнюю среду. Но в лабораторных исследованиях обычно используется единственный путь воздействия. Кроме того, люди могут одновременно подвергаться эффекту нескольких химических и/или иных факторов, тогда как в большинстве опытов на животных исследуется только единственный фактор [246]. Полная оценка риска, а не идентификация и не описание отдельных опасностей, требует анализа воздействия на человека в "реальном мире" повседневной деятельности и деятельности на протяжении всей жизни [237].
- 8. Продолжительность жизни человека больше, чем у лабораторных животных, что может не дать развиться у последних изучаемым эффектам (например, канцерогенным) [63].
- 9. Эффект соединения может зависеть не только от вида (известно множество различий в канцерогенности соединений даже среди грызунов [247]), но и от линии лабораторных животных [247, 252]. Например, пестицид атразин вызывал опухоли молочных желез у самок крыс Sprague-Dawley, но не у крыс F344, Long-Evans, не у мышей CD или самцов крыс Sprague-Dawley [252]. Чувствительность к диоксиноподобным соедине-

ниям различается между разными линиями грызунов [253].

10. Имеются другие, хотя и нечастые примеры, когда доказанные для животных канцерогенные [224, 225] и терапевтические [254] эффекты отсутствовали у человека (о более трагичном обратном феномене неоднократно говорилось выше — талидомид, оксигенация новорожденных, антитело CD28TGN1412; см. прим. 44). Иногда люди менее чувствительны к неблагоприятным эффектам, чем животные, что показано, например, для диоксиноподобных соединений на грызунах [253].

Перспективы использования экспериментов in vitro и in silico при оценке рисков и разработке стандартов безопасности

В целом подобные эксперименты служат подкреплением причинности в рамках критерия "Биологическое правдоподобие" (см. выше и в [7]). Хотя "замена теста in vivo клеточным, химико-аналитическим или же вычислительным подходом явно редукционистская" [255]⁶⁷, иной раз отсутствует возможность провести исследования эффекта токсиканта не только на людях, но и на животных. Тогда, по рассуждениям в ряде источников, возможны попытки оценить риск в том числе в опытах *in vitro* [113, 256–259] и *in silico* [63, 113, 192, 246, 249, 256] (мнения цитированных авторов, насколько это вероятно и практически значимо, разные). Например, согласно [113], для факторов токсикологии "исследования in vitro, которые тестируют пути в рамках механизма [действия], и демонстрируют биологическую роль агента в прогрессировании патологии, могут дать информацию для прогнозирования потенциальных результатов для здоровья человека гораздо более эффективным способом, чем исследования на людях, особенно для неблагоприятных результатов с длительным латентным периодом" (курсив наш. -A.K.)⁶⁸.

Вряд ли эта категоричность оправданна, особенно в рамках всего, представленного в наших публикациях на тему [2–9] (а также здесь выше), но сам факт столь высокой оценки практической значимости опытов *in vitro* может быть полезен.

В публикации 2010 г. [258] Committee on Toxicity Testing and Assessment of Environmental Agents, сформированного в рамках National Research Council (NRC) США, рассматривается перспектива использования только экспериментов *in vitro* в испытаниях соединений на токсичность. Методика заключается в идентификации сигнальных путей, нарушение которых может привести к побочным эффектам. Указывается, что "в конечном итоге оценки риска будут проводиться с использованием математического моделирования путей токсичности для определения воздействия, которое не вызовет биологически значимых нарушений в этих путях"69.

Отмечается высокая степень неопределенности подобного подхода в связи с очень большим количеством сигнальных путей. И самое, похоже, главное (курсив наш — A.K.): "Маловероятно, что модели путей токсичности будут вносить количественный вклад в оценку риска по нескольким причинам, в том числе из-за того, что статистическая изменчивость, присущая столь сложным моделям, серьезно ограничивает их полезность при оценке небольших изменений в ответной реакции, и что подобные модели, вероятно, по-прежнему будут включать эмпирическое моделирование дозовых реакций" $[258]^{70}$. То есть для оценки эффектов малых доз такие модели не подходят.

Далее в работе [258] рассматриваются моменты, демонстрирующие сложность и неоднозначность подхода, но выводом является предсказание (predict) названного комитета, что при таком подходе "химические вещества будут проверяться быстрее и дешевле, а испытания на животных будут сокращены или отменены". Замена опытов на животных моделями обусловлена, насколько можно понять, сомнительными этическими соображениями, вряд ли правомерными при определении серьезных опасностей для человека.

Исследования по оценкам риска для человека через опыты *in vitro* проводятся также в рамках нанотоксикологии, где для этого, в частности, анализируется степень корреляции эффектов наночастиц в опытах *in vivo* и *in vitro* [259].

Рассмотренные надежды несколько проблематичны при имеющихся ныне методах. Например, тестирование *in vitro* генотоксических агентов на карцерогенность сравнительно с детекцией на грызунах оказалось не слишком успешным. Хотя для канцерогенов по ряду основных молекулярно-клеточных тестов выявлялась хорошая чувствительность (74% [260]), для неканцерогенов имелась низкая специфичность (75—95% ложноположительных результатов [260]) [260—262]⁷¹.

Перспективы оценки моделей *in silico* с соответствующими заключениями и цитатами рассмотрены нами ранее [8].

АНАЛОГИЯ ("ANALOGY")

История и суть критерия

Как отмечалось нами ранее, это единственный "пункт" из девяти, введенный собственно А.В. Hill [2, 3]. В его публикации 1965 г. [1] данному критерию посвящено пять строчек в журнальном столбце, и суть разъяснена только на двух примерах, причем из области медицины, хотя, как будет видно далее, "Аналогия" актуальна скорее для токсикологических и канцерогенных эффектов соединений.

Суть по Хиллу следующая [1]: "В некоторых случаях было бы справедливо судить [о возможности ассоциации] по аналогии. На основе эффектов талидомида и краснухи [при беременности], мы,

несомненно, будем готовы принимать менее значительные (slighter), но похожие свидетельства для другого препарата или для другого вирусного заболевания во время беременности"⁷².

То есть идея заключалась в том, чтобы не дать беременным принимать препараты, которые аналогичны ("похожи") на талидомид, а также устранять контакты их с вирусами, похожими на вирус краснухи (профилактика). Согласно [263], при подобном, по сути недоказанном подходе, в первом случае можно было получить и негативные последствия от запрета полезных и безвредных препаратов. Приводился и пример, прямо "по Хиллу". Доктор W.G. McBride (Австралия), первым поднявший тревогу в 1961 г. относительно талидомида, позже предостерегал и от иного препарата (от утренней тошноты) на предмет его аналогичной тератогенности. Исследования показали, однако, что препарат был безопасен, но фирма уже прекратила его маркетинг $[263]^{73}$.

После А.В. Hill суть критерия "Аналогия" развивалась рядом авторов, вплоть до последнего времени (2018) [264]. В пособии по экоэпидемиологии [239] рассматриваются философские основы. Сказано, что идея формального вывода из сходства восходит к древним грекам как "аналогия": связь между любыми двумя вещами или понятиями. Аналогия является выводом из того неспецифического принципа, что вещи, которые имеют похожую структуру, имеют и сходную функцию. Подход используется для определения атрибутов или способов действия вероятной причины, связывая ее по аналогии с более доказанной причиной [239].

Важная смысловая интерпретация M.W. Susser критерия "Аналогия" следующая: "Когда известно, что один класс причинных агентов произвел эффект, то стандарты доказательства того, что другой агент этого класса произведет подобный же эффект, могут быть снижены" [64]⁷⁴.

Отмечалось, что ныне ценность подхода по аналогии заключается не в подтверждении причинно-следственной связи, а в предложении и проверке гипотез [50, 64, 113, 181, 239]. Проверке — для нового фактора или соединения по аналогии с механизмом для уже исследованного.

Частота упоминаний и использования критерия

Критерий "Аналогия" рассматривается в приведенных выше смыслах во многих источниках по причинности в эпидемиологии [55, 64, 70, 71, 91, 93, 132, 225, 264—266], включая пособия [62, 68, 72, 88, 90, 97, 138, 161], а также документы международных и имеющий международный авторитет организаций [13, 85, 95, 214, 239], но далеко не во всех. "Аналогия" среди критериев Хилла отсутствует в обоих цитированных выше оксфордских словарях по эпидемиологии [99, 100], в документах МАИР (1987 и 2006 г.) [127, 267],

British Medical Association (2004) [96], в важных обзорах по причинности в эпидемиологии [11, 19, 105], в пособиях [12, 20, 53, 65, 67, 72–74, 98, 128], в университетских лекциях [268] и др. [269].

В 2018 г. неоднократно упоминавшийся нами лично [3, 6, 7, 9] американский авторитет на стыке медико-биологических дисциплин, права, коммерции и политики, Douglas L. Weed, в своем обзоре именно по критерию Хилла "Аналогия" (единственный такой обзор за все времена) [264], также приводил около десятка пособий и иных источников (в том числе документ МАИР) с 1970 г., в которых указанный критерий или отсутствовал, или заменялся на иные критерии. В нашем приводившемся выше анализе публикаций за 2013— 2019 гг. (35 работ) критерий "Analogy", как и "Coherence", находился на последнем месте из девяти (по 26 использований). В более раннем, также не раз упоминавшемся нами исследовании Weed D.L., Gorelic L.S., 1996 [76], среди 14 обзоров по критериям причинности пункт "Analogy" по упоминанию тоже находился на последнем месте.

В целом ряде случаев, как сказано в [264] и одновременно выявлено нами (см. выше и в [7, 9]), "Аналогия" заменялась другими критериями или объединялась с таковыми: с "Biological plausibility" [53, 66, 71, 93, 270], с "Coherence" [13, 53, 66, 71, 266] и даже с "Consistency" ("Постоянство ассоциации") [78].

Таким образом, единственный предложенный лично А.В. Hill критерий причинности по значимости, как кажется, находится практически на последнем месте. Некоторые авторы рассматривают три критерия "Специфичность", "Согласованность" и "Аналогию" как вовсе "бесполезные" [50, 65, 67]. "Возможно, это один из наиболее слабых критериев" [129], "потенциально вводящий в заблуждение" (из-за умозрительности аналогий) [271], "слабая поддержка причинности" [132], "абсолютно недействительный критерий в суждении о причинной обусловленности" [54], "даже более сомнителен, чем "правдоподобие" и "согласованность"" [69] (цитировано по [70]).

Мы в Сообщении 2 [3] также отметились в плане "незначимости" критерия "Аналогия", цитируя соответствующие источники.

На чем же базируются такие утверждения, и обоснованы ли они?

Единственная критика критерия: "Аналогии обильны"

Хотя в Weed D.L., 2018 [264] указывается, что критерий "Аналогия" часто элиминируется из списка начиная с 1970 г., обоснования этого были найдены нами только в более поздних работах. Самый ранний источник — ныне некая лекция on-line по каузальности из университета в Атланте: Frumkin H. (Instructor), 1997 [130]. Сказано

так: "Аналогия может быть полезна, хотя ее помощь представляется ограниченной, поскольку любой, *кто обладает малым творчеством*, может, вероятно, грезить об аналогии!" (курсив наш. — A.K.)⁷⁵. Мол, дело только в фантазии.

Кто же первым высказал эту мысль, хотя и кажущуюся тривиальной?

В списке литературы к названной лекции 1997 г. [130] есть ссылка на упоминавшийся выше сборник симпозиума "Popper — Non Popper Epidemiology" под редакцией К.Ј. Rothman [181]. В вводной статье этого автора к сборнику [182] ничего про "воображение" и "творчество" нет. Но в другой публикации этого же издания, в Weed D.L., 1988 [272], сказано так:

"..."Аналогия" становится одним из способов придумать гипотезу, хотя [этот подход] немного лишен воображения. Альтернативой "Аналогии" по К. R. Роррег была бы творческая изобретательность"⁷⁶.

То есть идея обратна: кто использует аналогию, тот не имеет воображения сам придумать гипотетический механизм. А было: аналогию находит тот, у кого воображение. Так сказать, диалектика.

Более в сборнике [181] ничего про "Аналогию" и воображение нет. Таким образом выходит, что первоисточник построения об аналогии и воображении в лекции 1997 г. [130] непонятен. И нам придется считать автором этой часто цитируемой мысли по нивелированию критерия инструктора Howard Frumkin, составившего университетскую лекцию [130] (на деле – профессор, директор и руководитель ряда американских центров 77). В то время как большинство исследователей считают ее автором К.J. Rothman. Возможно, подобные рассуждения были в первом издании его "Modern Epidemiology" от 1986 г. [273], которое нам недоступно, в отличие от третьего [51], но соответствующей ссылки в Frumkin H., 1997 [130] нет. Судя по пособию [54], мысли о "воображении" и "аналогии" есть во втором издании "Modern Epidemiology" от 1998 г. [69]. Но по факту это позже лекции 1997 г. [130].

В работе Rothman K.J., Greenland S., 2005 [50] имеется однозначное заключение:

"Независимо от того, что понимается под "Аналогией", оно связано с изобретательским воображением исследователей, которые могут найти аналогии повсюду. В лучшем случае аналогия дает источник более сложных гипотез об исследуемых ассоциациях; отсутствие аналогов отражает только отсутствие воображения или опыта, а не ложность гипотезы"⁷⁸.

В других монографиях К.J. Rothman про то же сказано или более кратко (2012): "Аналогии обильны" [61], или более развернуто: помимо прочего, начетнически (на наш взгляд) обсужда-

ется формальное противоречие критерия "Аналогия" критерию "Специфичность" (2008) [51].

Остальные известные нам авторы как основу для вывода о ненужности критерия повторяют названные построения J. Rothman (например [54, 62, 113, 129, 239, 268]).

Примеры использования критерия Умозрительные: обзоры и пособия

Примеры представлены по хронологии источников.

- Первыми являлись упомянутые А.В. Hill талидомид и краснуха у беременных [1]. Пример воспроизведен позднее в [68, 70, 88, 111, 130].
- После обнаружения ассоциаций между, например, HPV и раком шейки матки, можно ожидать, что вирус способен вызывать и другой тип рака [274].
- Аналогия: влияние сходных факторов в других продуктах питания и диете может рассматриваться как часть общего сценария исследования [131].
- Поскольку молекулярная конформация эстрогенов обеспечивает феминизирующую способность, молекулы одинаковой формы должны обладать феминизирующим эффектом. Поэтому можно сделать вывод, что конкретная молекула, имеющая аналогичную форму, вызовет феминизацию... Аналогии, основанные на способах действия молекулярной структуры или последовательностей ДНК [239].
- Для углеродных нанотрубок с использованием литературы по механизму токсичности асбестовых волокон и моделей, основанных на молекулярной структуре и физико-химических характеристиках, сделано предсказание о механизме действия нанотрубок, аналогичном механизму влияния асбеста. Морфология углеродных нанотрубок аналогична асбестовым волокнам; таким образом, ожидается, что волокна вдыхаемого размера будут вести себя одинаково при профессиональных загрязнениях и будут приводить к аналогичной транслокации, отложению в легких и т.д. [113].
- По аналогии с риском рака легких у активных курильщиков возможно судить о таком же риске при пассивным курении, хотя из-за множества вмешивающихся факторов и уклонов точная оценка воздействия может быть затруднена [275].
- Зная о причинном влиянии курения беременной матерью на массу тела новорожденных, можно ожидать, что более низкие уровни воздействия из-за пассивного курения или загрязнения атмосферы будут иметь аналогичные (хотя и меньшие) последствия [88].

Это все, что нашлось в десятках пособий по эпидемиологии и в иных подобных источниках. Кажется, что с "воображением исследователей", по H. Frumkin и по K. Rothman, не слишком хоро-

шо, но все не так, о чем свидетельствует следующий подраздел.

Реальные: в работах, в которых критерии Хилла используются как методология

Таких работ за 2013—2019 гг. нами, как сказано, проанализировано 35. В 26 из них критерий "Аналогия" назван и используется. Авторами представлены самые разные примеры для исследуемых ими эффектов, когда имеется аналогия с другими, уместными фактами и зависимостями. Недостатка в воображении при этом, действительно, не наблюдается.

Наша выборка, конечно, не отличается полнотой (можно добавить исследования до 2013 г. и за 2020 г.). В большинстве случаев авторы придерживаются основного перечня, предложенного Хиллом [1], так что даже наименее популярные критерии "Coherence" и "Analogy" используются в 74% приведенной ниже выборки. Имеется широкий спектр тем, направлений и дисциплин, в которых для доказательности эффектов применяются критерии Хилла (полные ссылки не приводятся):

- Aghajafari F. et al., 2013 витамин D и беременность;
- Ahmad M.M. et al., 2017 аневризма аорты и наследственность;
- Altieri B. et al., 2017 витамин D и поджелудочная железа;
- Amoroso T., 2019 экстази и когнитивные функции;
- Bazerbachi F. et al., 2017 глобулинемия и гепатит;
 - Beaule PE et al., 2018 остеоартрит;
- Biddle S.J. et al., 2016 сидячая жизнь и смертность;
 - Buse D.C. et al., 2019 причины мигрени;
- Cairney J. et al., 2013 факторы нарушения координации;
 - Chen W., Plewig G., 2015 розацеа и клещи;
- Degelman M.L., Herman K.M., 2017 курение и склероз;
- Frank C. et al., 2016 вирус Зика и микроцефалия;
- Garg K et al., 2018 полимикробный иммунный ответ;
- Grant W.B., 2018 витамин *D* и предотвращение рака;
- На М. et al., 2016 дезинфектанты и повреждение легких;
 - Hu F.B., 2013 сахар и ожирение;
- Hussain S.M. et al., 2018 причины остеоартрита;
- Jenkins W.D. et al., 2013 уголь в шахтах и рак;
 - Kolkhir P. et al., 2017 причины крапивницы;
 - Large M.M. et al., 2017 риск суицидов;

- Le Houezec D., 2014 рассеянный склероз и вакцинация гепатит В;
 - Loeb S. et al., 2017 риск меланомы;
- Manu P. et al., 2014 воспаления при шизофрении;
- McCaddon A., Miller J.W., 2015 гомоцистеин и когнитивные функции;
- McDonald R., Strang J., 2016 эффективность налоксона;
- Miklossy J., 2011 болезнь Альцгеймера и спирохетоз;
- Muganurmath C.S. et al., 2018 обонятельные и вкусовая дисфункции от флутиказона;
- Nakanishi K. et al., 2018 эффект препаратов от блох на популяции стрекоз;
 - Olsen A. et al., 2016 эффекты налоксона;
- Ravnskov U. et al., 2018 врожденные факторы при гиперхолистеринемии;
- Ronald L.A. et al., 2016 коммерция и уход в домах престарелых;
 - Roy C. et al., 2017 ртуть и развитие диабета;
- Urquhart D.M. et al., 2015 бактерии и боль в пояснице;
- Walton J.R., 2014 соединения алюминия и болезнь Альцгеймера;
- Weyland P.C. et al., 2014 витамин D и риск сердечно-сосудистых патологий.

Не совсем в тему настоящего подраздела, но следует отметить, что в списке не видно использования критериев Хилла для оценки эффектов лучевых факторов, хотя данные критерии упоминаются в документах международных и имеющих международный авторитет организаций: НКДАР [95, 115], МАИР (радиационный канцерогенез) [214], BEIR [30] и NCRP [276]. Наша выборка, как уже говорилось, охватывает только 2013—2019 гг., однако есть публикации за иные годы (или в виде иных документов, не статей) по применению критериев Хилла для оценки причинности радиационных эффектов:

- Раки в популяциях вблизи АЭС (Shleien B. et al., 1991) [277];
- Эффекты у работников ядерной индустрии США. Упоминание критериев Хилла (Wakeford R. et al., 1998) [278]. Richard Wakeford (Великобритания) один из ведущих радиационных эпидемиологов мира, член НКДАР, МКРЗ и других организаций лучевого профиля, главный редактор "Journal of Radiological Protection". В 2015 г., к 50-летию публикации с критериями Хилла [1], вышла посвященная этой дате статья R. Wakeford [279]:
- Детские раки на территориях вблизи АЭС (Fairlie I., 2009) [280];
- Радиация и лейкозы (Martinez-Betancur O., 2010) [281];

- Эффекты малых доз радиации (Ulsh B.A., 2012) [282];
- Возможность канцерогенных эффектов от мобильных телефонов. В монографии (Jorgensen T.J., 2016) [283];
- Эффекты малых доз. В учебной программе для специальности "Химия высоких энергий", БГУ (Иванов Е.П., 2016) [284].

Актуальность критерия "Аналогия" при оценке токсических, канцерогенных и фармакологических эффектов соединений

Пренебрежительное отношение к "фантазийному" критерию "Аналогия", которое коснулось и нас ранее [3], оказывается неоправданным для целых направлений медико-биологических дисциплин, имеющих высокую практическую значимость. D.L. Weed недаром обратил на это внимание в обзоре 2018 г., посвященном именно этому критерию [264], поскольку, в рамках "предупредительного принципа" [1], аналогию для суждения о рисках для человека использует и МАИР [127, 214, 267, 285], и FDA [215], и агентства по охране окружающей среды [13, 85, 239], и организации, исследующие химические токсиканты [78, 237, 286] и фарминдустрия [94, 271].

Во-первых, что было рассмотрено выше, названные организации могут делать выводы о рисках и опасностях для человека *по аналогии* с данными, полученными на животных. Во-вторых, используется априорное суждение о токсичности, канцерогенности и фармакологических свойствах соединений, *аналогичных* по химической структуре уже изученным [13, 14, 85, 94, 113, 127, 225, 239, 264, 271, 285, 286].

В данном плане представляется странной позиция МАИР. Используя в доказательности комплекс критериев Хилла [127, 267] и, широко, аналогию двух названных типов [127, 214, 267, 285], МАИР среди перечня критериев "Analogy" не упоминает [127, 267]. Получается, так сказать, известное: "предмет есть, а слова такого нет".

А.В. Hill, когда вводил "Аналогию" в состав девяти причинных критериев [1], не имел, по-видимому, осознанной мысли об особой роли этого пункта для токсикологии и канцерогенеза. Иначе его примеры, наверное, были бы расширены с только талидомида и краснухи. Но интуиция этого исследователя, судя по всему, вновь была на высоте, и то, что после него казалось другим эпидемиологам никчемным применением "фантазии и воображения" (даже авторам двух оксфордских словарей по эпидемиологии [99, 100]), на деле имеет высокую практическую значимость и используется в важных направлениях по охране здоровья и безопасности населения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

"Я останавливаюсь на этом с такой подробностью потому, что, может статься, те, кто будет

жить после меня, столкнутся с подобной бедой и им тоже придется делать выбор; вот я и хотел бы, чтоб мой рассказ был для них указанием, как надо действовать; а сама по себе история моя гроша ломаного не стоит, и незачем было бы привлекать к ней внимание".

Д. Дефо. "Дневник чумного года".

В состоящем из двух частей Сообщении 3 были рассмотрены, по нашему мнению, почти все возможные аспекты для девяти критериев Хилла, начиная от истории появления и дефиниций до философской и эпидемиологической сути, использования, ограничений и актуальности для различных медико-биологических дисциплин. Мы можем утверждать, что в столь объемной полноте критерии Хилла вряд ли были изложены ранее, включая десятки западных пособий и монографий по эпидемиологии и по доказательствам каузальности в различных дисциплинах. Полнота объясняется как раз тем, что нами и были использованы практически все основные источники самого разного уровня, от пособий и монографий до малодоступных работ, университетских лекций и иных материалов on-line. Таким образом, вкупе со статьями-преамбулами по критериям "Сила связи" [4, 5], "Временная зависимость" [6], "Биологическое правдоподобие" [7] и "Эксперимент контрафактический" [8], три сообщения [2, 3] (включая настоящее), как мы надеемся, охватывают вопросы наиболее исчерпывающе на настоящий момент.

Актуальность материала, как не раз говорилось, объясняется вездесущностью критериев Хилла для любых дисциплин, основанных на обсервационных подходах, не только естественнонаучных, но и социальных, экономических, юридических и пр. Более того, как было видно выше, критерии Хилла используют даже в опытах на животных [13, 78, 224, 239]. Логика определения причинности едина для человеческого разума, какие бы направления деятельности ни брать, поэтому ориентация в методологических подходах при доказательности ассоциаций между причиной и следствием необходима и в обыденной жизни.

Несмотря на то что А.В. Hill в своей статье 1965 г. [1] только собрал разработанные иными авторами восемь критериев воедино (не сославшись ни на кого) [3], и добавил всего один свой, заслуга этого автора состоит именно в обобщении и формировании единого, в то время наиболее полного, комплекса подходов к оценке вероятности эпидемиологических и других ассоциаций. Британец А.В. Hill официально считается одним из основателей эпидемиологии и эпидемиологических методов 20 в. [199], основателем медицинской статистики [3, 199], а также пионером внедрения RCT [23, 104, 149, 154] (т.е. основателем и главного современного подхода EBM). Во всех

случаях имелись иные, менее известные (в данном плане, конечно) предшественники, почти все из США (см. выше и в [3]); тем не менее, названные дисциплины и подходы связываются почти всегда с именем Хилла. Это делает его, вновь скажем пафосно, похожим на Р. Амундсена, открывшего, по сути, и Южный, и Северный полюсы.

В рамках темы цикла сообщений осталось рассмотреть несколько моментов.

- 1. Некоторые авторы модифицировали критерии причинности для эпидемиологии и социологии. Например, М.W. Susser попытался выработать из них действительно строгие правила доказательности (1973—1991) [11, 18, 19, 64, 168, 187]. Другие, как Р. Cole, расширили для юриспруденции эти эпидемиологические, вероятностные и частотные подходы с уровня популяции до отдельного индивидуума (1997) [287]. Третьи авторы, как А.S. Evans, предложили единый комплекс причинных "постулатов" для хронических и инфекционных патологий (1976—1993) [2, 82] (на наш взгляд, наиболее исчерпывающий, но почти нигде не используемый).
- 2. Имеются попытки выработать градации значимости тех или иных критериев, равно как и их рубрификацию, с позиции научной философии (концептуально) или в плане более конкретных отражений доказательности. Этот аспект критериев нами пока не излагался.
- 3. Впечатляет широта использования причинных критериев ("критерии Хилла") официальными организациями, программами ВОЗ, различными видами эпидемиологий, экспериментальными и учебными процессами и пр. Данный момент был рассмотрен нами пока только вкратце. При этом, как было видно выше и в [7], ряд ведущих эпидемиологов отрицают целесообразность использования в доказательности каких-то критериев или подходов, равно как индуктивного принципа вообще. Теоретическое отрицание с попытками нахождения на каждый пункт умозрительных и, действительно, порой фантастических контрпримеров [6-8, 50, 51, 61, 69, 122], никак не способно устранить тот факт, что и индукция, и соответствующие подходы, безальтернативно используются в нашей жизни, в здравоохранении и в дисциплинах, связанных с безопасностью населения. Хотя, конечно, причинные критерии или пункты, строго говоря, служат только для оценки вероятности ассоциаций, а не как конечное доказательство.
- 4. Помимо критериев ("Хилла") в медико-биологических дисциплинах применяются иные подходы к доказательности причинности и к оценке "Веса свидетельств" (WoE), чему, в частности, посвящен недавний обзор Martin P. et al., 2018 [288]. Наш анализ показывает, однако, что более половины из таких подходов, перечисленных в [288], сводятся ко все тем же критериям

Хилла, а среди оставшихся значительная часть — просто обзорные и экспертные заключения (т.е. выводы делаются непосредственно из обзоров или из мнений экспертов). Получается, в самом деле, что критерии Хилла — это действительно какие-то "общечеловеческие ценности".

Есть еще некоторые моменты по теме, но названные — основные, которые мы надеемся рассмотреть в заключительном Сообщении 4.

ПРИМЕЧАНИЯ

- 1. Пока нет данных, что эти тонкие изменения могут реализоваться в ощутимые нарушения, аномалии и патологии, которые зарегистрировать так и не удалось, как сказано, на десятках тысяч потомков в различных когортах в течение более чем 60 лет [30—37].
- 2. Авторы [40, 41] указывают, что, поскольку возраст потомков не превышал 40 лет, а эпигенетические изменения зависели от возраста, существует возможность, что частота передавшихся трансгенерационно изменений могла бы повыситься (accelerated) в будущем.
- 3. Например, по данным [44], для препаратов энкаинид и флекаинид, после среднего периода наблюдения, равного 10 мес, умерло 89 пациентов: 59 — от аритмии (43 с препаратом против 16 с плацебо; p = $= 4 \times 10^{-4}$), 22 — от неаритмических сердечных причин (17 против 5; p = 0.01) и 8 — от некардиальных причин (3 против 5).
- 4. "A remedy which is known to work, though nobody knows why, is preferable to a remedy which has the support of theory without the confirmation of practice" [58].
- 5. "Many things which in theory ought to be highly effective turn out in practice to be completely useless" [58].
- 6. "It is not based on any theory of how the treatments might work" [59].
- 7. "The question to which we must always find an answer is not "should it work?" but "does it work?" (even if we do not know why)" [58].
- 8. Термин "biologically implausible" (биологическое неправдоподобие) можно найти в постановлении органа английского здравоохранения от 1854 г., согласно которому доказательства заражения холерой через лондонскую воду (исследователь John Snow) не поддержаны лабораторными свидетельствами [7].
- 9. "Another factor is the widespread overemphasis on statistical approaches, with the concomitant tendency to neglect the fact that epidemiology is a biologic science concerned with disease in human beings" [60].
- 10. World Health Organization/International Programme on Chemical Safety. Обеспечивает официальную структуру для оценки данных о направлениях (раthways) причинно-следственных ключевых событий, ведущих к неблагоприятным последствиям для злоровья [78].
- 11. Например, в пособии Szklo M., Nieto F.J., 2019 (четвертое издание [65]) из списка критериев причинности удалены "Согласованность" (Coherence), "Специфичность" и "Аналогия". Сказано так: "Мы, как и другие авторы (Gordis L., 2014 [67]; Rothman K.J., Greenland S., 2005 [50]) считаем, что эти три руководящих принципа бесполезны по следующим причинам: "Согласованность" трудно отличить от "Биологического правдоподобия...".

- 12. Представлена суммирующая компиляция (смысловой перевод) работ [18, 19], материал в которых несколько отличается друг от друга по полноте.
- 13. "Coherence is an ultimate and yet not a necessary criterion for causality" [67].
- 14. "Coherence is comforting; incoherence by itself is often not destructive of a hypothesis but emphasizes gaps in scientific understanding" [86].
- 15. "All scientific work is incomplete whether it be observational or experimental. All scientific work is liable to be upset or modified by advancing knowledge. That does not confer upon us a freedom to ignore the knowledge we already have, or to postpone the action that it appears to demand at a given time" [1].
- 16. Этот вывод не следует рассматривать слишком серьезно, он типа софизма. Во-первых, мы не располагаем данными по динамике хроно-изменений для всех мировых когорт работников ядерной индустрии (приведен пример для работников Англии, правда, для всех [117]), а во-вторых более важны абсолютные (не относительные) риски, которые по сравнению с прежними десятилетиями, очевидно, снизились вместе с фоновыми значениями для генеральной популяции. В третьих, по мере удлинения стажа занятости "эффект здорового работника" становится меньше [117]. Но для СМИ и даже обыденно-научного сознания названный парадокс может представляться социально значимым.
 - 17. Rem roentgen equivalent man; 1 psm = 0.01 3B [121].
- 18. "We all have a vague feeling that if we can make an event occur, we understand it better than if we simply observe it passively" [123] (цитировано по [124].
- 19. "Although experimental tests can be much stronger than other tests, they are not as decisive as often thought, because of difficulties in interpretation" [122]. С этим согласится каждый, кому поступали на рецензирование экспериментальные работы. Иной раз именно интерпретация авторов является основой (порой некорректной и субъективной) выводов, а в суть методологии (по смыслу объективной) не всегда и углубляются.
- 20. "As Popper emphasized, however, there are always many alternative explanations for the outcome of every experiment" [50, 122].
- 21. "This simple fact is especially important to epidemiologists, who often face the criticism that proof is impossible in epidemiology, with the implication that it is possible in other scientific disciplines. Such criticism may stem from a view that experiments are the definitive source of scientific knowledge. Such a view is mistaken on at least two counts. First, the nonexperimental nature of a science does not preclude impressive scientific discoveries; the myriad examples include plate tectonics, the evolution of species, planets orbiting other stars, and the effects of cigarette smoking on human health. Even when they are possible, experiments (including randomized trials) do not provide anything approaching proof, and in fact may be controversial, contradictory, or irreproducible" [50].
- 22. "Some experimental scientists hold that epidemiologic relations are only suggestive, and believe that detailed laboratory study of mechanisms within single individuals can reveal cause—effect relations with certainty. This view overlooks the fact that all relations are suggestive in exactly the manner discussed by Hume: even the most careful and detailed mechanistic dissection of individual events cannot provide more than associations, albeit at a finer level. Lab-

- oratory studies often involve a degree of observer control that cannot be approached in epidemiology; it is only this control, not the level of observation, that can strengthen the inferences from laboratory studies. Furthermore, such control is no guarantee against error. All of the fruits of scientific work, in epidemiology or other disciplines, are at best only tentative formulations of a description of nature, even when the work itself is carried out without mistakes" [50].
- 23. Выше указывалось на широкое, буквальное цитирование этого "кредо" Хилла в зарубежных публикациях. Поиск Google на точное сочетание для цитаты выдает порядка 1.65 млн источников; высказывание рассматривается в том числе в рамках "предупредительного принципа".
- 24. Применительно к критерию Хилла "Эксперимент" в [51] указано: "Для разных авторов экспериментальные данные могут относиться к клиническим испытаниям, к лабораторным опытам на грызунах или на других отличных от человека организмах, или же к тем и другим" ("To different observers, experimental evidence can refer to clinical trials, to laboratory experiments with rodents or other nonhuman organisms, or to both".)
- 25. "Неясно, что Хилл имел в виду под экспериментальными данными. Он мог бы сослаться на свидетельства лабораторных опытов на животных или на доказательства, полученные в экспериментах на людях" ("It is not clear what Hill meant by experimental evidence. It might have referred to evidence from laboratory experiments on animals, or to evidence from human experiments".) [122].
- 26. Например, в начале 1980-х гг. был разработан нестероидный противовоспалительный препарат benохаргоfen для терапии артрита/мышечно-скелетной боли [135, 145] (под коммерческими названиями "Opren" в Европе и "Oraflex" в США [135]). Проведенное масштабное RCT на контингенте возрастом 18—65 лет продемонстрировало эффективность, и препарат путем агрессивного маркетинга стал продвигаться в Великобритании и США. Однако у тысяч престарелых пациентов наблюдались тяжелые побочные эффекты, и отмечалось множество смертей от гепаторенальной недостаточности [135, 145] (согласно парламентскому отчету, только в Великобритании — 77 смертей [146]).
- 27. С историей развития RCT можно ознакомиться на сайте тематической библиотеки "James Lind Library" (Эдинбург).
- 28. "In epidemiology, scientific investigations often proceed inductively" [166].
- 29. "Inductive methods constitute the substance of standard epidemiological texts such as Rothman's, Kahn's, Miettinen's etc" [167].
- 30. "Certainly epidemiologists are in the habit of generating hypotheses by induction from the arrays of descriptive data and existing knowledge with which their studies are bound to begin" [168].
- 31. "My reply is that epidemiologic inferences are but a part of a wider (inductive) epidemiologic process" [169].
- 32. "...epidemiology is essentially an inductive science, concerned not merely with describing the distribution of disease, but equally or more with fitting it into a consistent philosophy" [172] (цитировано по [173]).
- 33. "Often experimental epidemiology is simply equated with randomized controlled trials" [47].

- 34. "...the book will be addressing issues relating to observational epidemiology not experimental epidemiology". "almost all studies conducted by field epidemiologists are observational studies, in which the epidemiologists document rather than determine exposures" [179]. То есть "природные", полуэксперименты.
- 35. "Although some researchers consider clinical trials that employ experimental interventions part of epidemiology, this is not the common view" [175].
- 36. "Elevate "vaguely formulated expectations" into theory, rename the inductive reasoning process "reproduction", and the transformation is accomplished" [187].
- 37. "Adequate human data are the most relevant for assessing risks to humans. When sufficient human data are available to describe the exposure-response relationship for an adverse outcome(s) that is judged to be the most sensitive effect(s), reference values should be based on human data" [193].
- 38. "Human data form the most direct evidence for an association between health effects and exposure to chemicals" [194].
- 39. "Human data are required for conclusions that there is a causal relationship between an exposure and an outcome in humans. Experimental animal data are commonly and appropriately used in establishing regulatory exposure limits and are useful in addressing biologic plausibility and mechanism questions, but are not by themselves sufficient to establish causation in a lawsuit. In vitro data may be helpful in exploring mechanisms of toxicity but are not by themselves evidence of causation" [133].
- 40. "Experimental evidence in humans would indeed constitute proof of causation..." [54].
- 41. "A number of learned and progressive jurists have recognized that, in the presence of meaningful epidemiologic studies, the contrived exposure situations of animals in laboratories produce information of relatively little value" [195].
- 42. "...human data are the most valid metric to determine human causality" [196].
- 43. Еще ранее, в начале 19 в., F. Magendie (1783—1855 гг.; Франция), разработал подход в области фармакологии и терапии, основанный на тестах на животных [57].
- 44. В 1938 г. венеролог из Бирмингема опубликовал в провинциальном журнале данные сравнительного исследования трех препаратов для лечения сифилиса: английского "Novostab", американского "Mapharside" и немецкого "Neosalvarsan". Йемецкий препарат оказался наиболее эффективным по способности очищать сифилитические язвы от спирохет у пациентов. Подход MRC Великобритании, однако, заключался в сравнении новых соединений мышьяка со стандартными препаратами сальварсана и неосальварсана с использованием трипаносомового теста на мышах (названная "экспериментальная эпидемиология"). Возможность противоречия стандартного подхода MRC прямым данным на людях, полученным E.W. Assinder (вкупе с "непатриотичностью" его вывода), насторожила тогда не только указанную организацию, но и Министерство здравоохранения Великобритании [180].
- 45. Например, в 2006 г. в Великобритании проводили в рамках фазы I исследование разработанного германской фирмой TeGenero моноклонального антитела CD28TGN1412 к рецептору CD28 Т-лимфоцитов

- [204-207] на 8 добровольцах [206]. Препарат предполагалось использовать при аутоиммунных заболеваниях и лейкозах [204, 206, 207]. Доклинические испытания на приматах и кроликах не выявили побочных эффектов [207]. Двум добровольцам вводили плацебо [206], а шести – всего 1/500 часть от дозы, оцененной на приматах [204]. У всех шести добровольцев препарат вызвал резкую реакцию по типу "цитокинового шторма" [204–206], приводящую к полиорганной недостаточности и другим тяжелым эффектам [205-207]. Отеки были столь велики, что испытание получило наименование "The Elephant Man Clinical Trial" [206]. У одного участника развилась сухая гангрена с последующей ампутацией части стопы и кончиков пальцев (феномен Рейно). Когнитивные и многие другие серьезные нарушения наблюдались спустя годы после эксперимента, хотя все испытуемые выжили [205].
- 46. "Once again looking at the obverse of the coin, there will be occasions when repetition is absent or impossible and yet we should not hesitate to draw conclusions" [1].
- 47. "Because the only ethical experiments concerning causality in humans are experiments in prevention" (Doll R., 1978) [107].
- 48. "Ethically, the individual involved must have the potential to benefit and yet there must be uncertainty on the question posed. For risk factors, as opposed to protective factors, there may be no such benefit" [20].
- 49. "There must be the expectation that in the population under study the radiation will lead to an improvement in health status relative to any alternative treatment" [30].
- 50. В японской статье 2018 г. [212] приведены следующие неопубликованные данные по RCT для "исследования гормезиса". N. Shimizu из университета в Осаке анализировал показатели у добровольцев, которые ежедневно спали на специальных радиоактивных ковриках (mat), содержащих ²²⁸Ас и ⁷⁷Вг с фоновым излучением 5 мкГр/ч. Контролем служили такие же коврики, но без радиоактивности. Здоровые добровольцы (30 мужчин и 30 женщин) со средним возрастом 32 года (22-48 лет) были рандомизированно разделены пополам на группу "гормезиса" и группу плацебо. Через 3 мес. [накопленная доза получается более 3 мГр] уровень активных форм кислорода был в среднем на 3.1 и 9.4% ниже, чем исходные показатели для групп плацебо и гормезиса, соответственно, у мужчин, и на 3.1 и 8.5% у женщин (в обеих группах p < 0.05). "Задержка сна, а также физический, психологический и нейросенсорный статус улучшились в группе гормезиса по сравнению с группой плацебо" [212]. Данные были представлены на симпозиуме "Japanese Society for Radiation Oncology" (Symposium for Cancer Control) в Нагое в 2017 г. В еще олном таком же RCT, выполненном N. Shimizu на 40 мужчинах, в опытной группе наблюдались повышение уровня IgA в слюне и удлинение периода медленного сна [212]. Вряд ли можно сделать серьезные выводы из этого исследования, но сам факт настоящего RCT с облучением здоровых людей все же уникален.
- 51. "Clinical observations can be made (and to be of any use. they must be made) just as accurate as laboratory observations; but in the human subject, observations cannot be as readily controlled, the conditions cannot be so easily kept uniform or varied in one word, the problems cannot be analyzed, as they can be in the animal" [222].

- 52. Порог для известного всем радиобиологам наиболее радиочувствительного детерминированного эффекта — временного подавления сперматогенеза — в большинстве источников, включая российские пособия, соответствует 0.15 Гр (ссылки не приводятся). В других, также весомых публикациях, называется 0.1 Гр (например, [226, 227]). Мало где упоминаются две исходные работы [228, 229] (и суммирующий обзор [230]), причем практически нигде не указывается, что эти данные, доныне являющиеся эталонными, получены в двух клинических исследованиях (1963-1973) на "добровольцах" (22-52 года) в тюрьмах США (Вашингтон и Орегон). Участникам на специальном лежаке локально облучали семенники рентгеновскими лучами, причем неоднократно, до накопленных доз в 75 мГр — 6 Гр. В конце всем проводилась вазэктомия. Тогда и был выявлен порог временного подавления сперматогенеза у человека (периодически брались пункции для биопсии), порядка 0.08-0.1 Гр [228-230]. Предпосылками эксперимента была необходимость защитить "семейные драгоценности" (как выразился американский полковник ВВС) у пилотов строящихся в 1950-х гг. самолетов с атомным двигателем и, в 1960-х гг., у космонавтов. В 1963 г. на конференции в Колорадо ведущий эндокринолог США С.G. Heller сказал: "Если всем интересно, что же происходит [при облучении семенников] с человеком, то зачем нам суетиться с мышами, собаками-биглами, канарейками (canaries) и т.д.? Если надо знать о ситуации с человеком, то почему бы не провести эксперименты на людях?" [231]. В начале 1970 гг. эти эксперименты были остановлены по этическим соображениям, а в 1994 г. созданная Б. Клинтоном комиссия расследовала все обстоятельства, включая издержки для здоровья и последующей жизни у многих "добровольцев" [231]. Данные опыты не могут быть названы RCT с облучением, но просто СТ на здоровых добровольцах – являются.
- 53. "...it would be unethical to deliberately expose healthy human volunteers to a lethal or permanently disabling toxic biological, chemical, radiological, or nuclear substance..." [215].
- 54. "Approval under the Animal Rule can be pursued only if human efficacy studies cannot be conducted because the conduct of such trials is unethical and field trials after an accidental or deliberate exposure are not feasible" [215]. "Furthermore, field trials to study a product"s effectiveness after an accidental or intentional exposure are not feasible" [232].
- 55. "In the absence of adequate data on humans, it is biologically plausible and prudent to regard agents for which there *is sufficient evidence* of carcinogenicity in experimental animals as if they presented a carcinogenic risk to humans" [127].
- 56. "Although this association cannot establish that all agents that cause cancer in experimental animals also cause cancer in humans, it is biologically plausible that agents for which there is sufficient evidence of carcinogenicity in experimental animals also present a carcinogenic hazard to humans" [214].
- 57. "This guidance provides information and recommendations on drug and biological product development when human efficacy studies are not ethical or feasible" [215].

- 58. "The Animal Rule states that for drugs developed to ameliorate or prevent serious or life-threatening conditions caused by exposure to lethal or permanently disabling toxic substances, when human efficacy studies are not ethical and field trials are not feasible, FDA may grant marketing approval based on adequate and well-controlled animal efficacy studies when the results of those studies establish that the drug is reasonably likely to produce clinical benefit in humans" [215].
- 59. "Marketing approval for new radiation countermeasures for which human efficacy studies are not feasible or ethical would be based on animal efficacy studies and phase I safety data in healthy volunteers. Under this animal rule, human efficacy trials of radiation countermeasures could be bypassed through a shortened but stringent FDA approval pathway that demonstrates drug efficacy in two animal species predictive of human responsiveness, a sound understanding of the mechanisms of action, and safety in humans" [232].
- 60. "The mode of action is the way that the mechanism ultimately affects the entity". Приведен пример из водной экологии: связывание ионов меди в жабрах нарушает ионную регуляцию, приводя к снижению концентрации натрия и хлорида в крови, что влияет на ее вязкость (механизм), а это, в свою очередь, вызывает остановку (arrest) сердца рыбы (mode of action) [239].
- 61. Вездесущность критериев причинности Хилла для доказательности как в медико-биологических дисциплинах, так и в самых разных эпидемиологиях (классической, полевой, молекулярной, судебной, поведения, психиатрической, социальной, и пр.; все такие дисциплины имеются), в тератологии, нейропсихиатрии, юриспруденции, экономике и др., запланировано рассмотреть в сообщении 4. Здесь же мы видим, что критерии Хилла дотянулись в областях экологии и токсикологии даже до исследований на животных. Так сказать, "общечеловеческие ценности". Это, как уже указывалось в части 1 настоящего сообщения [9], связано с тем, что индуктивно-дедуктивные правила установления причинных зависимостей едины для человеческого разума и являются следствием законов логики, уходя корнями в построения философов прошлых столетий, преимущественно Д. Юма и Дж. Милля [2, 3].
- 62. Самым, по-видимому, ярким примером, чем заканчивается отсутствие испытания на животных при внедрении препарата в практику, стало массовое отравление диэтиленгликолем в 1937 г. в США [192, 242-244]. Это был первый описанный случай токсичности указанного соединения для человека [242]. Дети и взрослые отравились не потому, что "пили антифриз" (куда входит похожее соединение), а потому, что принимали сульфаниламидный препарат-сироп "с малиновым вкусом" [243], под названием "Elixir Sulfanilamide", растворителем в котором был 72%-ный диэтиленгликоль (в воде сульфаниламиды нерастворимы, а фирме хотелось сделать сироп) [192, 242-244]. В то время в США не было закона, запрещающего маркетинг непроверенных препаратов [244], поэтому "эликсир" прошел только органолептическую проверку [192], без испытаний на животных, и был запущен в продажу [192, 242-244]. Препарат получили 353 пациента, из которых умерло от почечной недостаточности 105 (34 ребенка и 71 взрослый) [242]. Химик фирмы,

- додумавшийся взять растворителем 72%-ный (!) диэтиленгликоль, покончил с собой [244]. В результате FDA приняла в 1938 г. закон об обязательном тестировании препаратов на животных [242, 243]. Заметим, что, в отличие от рассмотренного выше талидомида 1950-х гг., для которого опыты на животных не показали тератогенности, для "Elixir Sulfanilamide" подобных опытов вовсе не было. И это притом, что, как сказано, еще в начале 19 в. F. Magendie начал использовать тестирование препаратов на животных [57].
- 63. "Resorting to animal experimentation can reduce some of these problems but introduces new ones, because inference from results in animals to effects in humans is far from trivial" [249].
- 64. "Courts are recognizing that the effort to apply laboratory animal findings to man is not an extrapolation-even though it is commonly referred to as such. Rather it is a generalization, primarily a subjective process, in which a number of undefended assumptions are implicitly invoked" [195].
- 65. Однако этот аналитический обзор [250] по 121 исследованию экстраполяции эффектов медицинских препаратов, вмешательств и просто "событий" (event) с животных на человека, несмотря на неопрелеленные выводы, реально дает иную картину. Наша оцифровка (GetData Graph Digitizer, ver. 2.26.0.20) и расчеты данных с диаграммы и box-plots работы [250] (figures 2, 4, 7) показывают следующее. Успешная экстраполяция (на 50-100%) соответствует 67% выборки (75-100% - 27%); по медианным величинам исследования в области вмешательств и просто исследования оказались экстраполяционно адекватными в 64 и 79% случаев соответственно. Наконец, для конкретных видов медианы успешности экстраполяции были равны: 82% — мышь, 73% — кролик, 67% — крыса, 64% приматы, 54% — собака и 33% — морская свинка. Для свиньи в [250] имелось только одно исследование, потому успешность экстраполяции составила 100%.
- 66. M.W. Susser в работе 1986 г. [18] приводит пример искусственности дизайна экспериментов на животных, который может не воспроизводиться в обсервационных исследованиях на людях. В 1966 г. было обнаружено, что у крыс острая недостаточность белка на ранних стадиях развития приводит к истощению клеток головного мозга. Данный факт привел ко многим эпидемиологическим исследованиям детей по проверке влияние раннего недоедания на умственное развитие. Но такие работы не могли и не проверяли последствия острой пищевой недостаточности; вместо этого они оценивали эффекты постоянного и хронического недоедания. Таким образом, пока не были изучены эффекты на развитие детей острого пренатального голодания во время голода, адекватных подтверждений опытам на крысах получить было нельзя.
- 67. "Replacing a test on a living organism with a cellular, chemicoanalytical, or computational approach obviously is reductionistic" [255].
- 68. "In vitro studies that test mechanistic pathways and demonstrate the biological role of an agent in disease progression may result in knowledge that can be used to predict potential human health outcomes in a much more time-efficient manner than human studies, particularly for adverse outcomes with a long latency period" [113].

- 69. "Risk assessments would eventually be conducted using mathematical models of toxicity pathways (TP models) to estimate exposures that will not cause biologically significant perturbations in these pathways" [258].
- 70. "Toxicity pathways models are unlikely to contribute quantitatively to risk assessments for several reasons, including that the statistical variability inherent in such complex models severely limits their usefulness in estimating small changes in response, and that such models will likely continue to involve empirical modeling of dose responses" [258].
- 71. Тесты: на наличие вируса Эймса, мышиной лимфомы, на микроядра или аберрации хромосом [260, 262], на образование аддуктов ДНК [261].
- 72. "Analogy: in some circumstances, it would be fair to judge by analogy. With the effects of thalidomide and rubella before us, we would surely be ready to accept slighter but similar evidence with another drug or another viral disease in pregnancy" [1].
- 73. Позже оказалось, что W.G. МсBride сфальсифицировал опыты на животных с новым препаратом от тошноты [263]. На наш взгляд, он мог руководствоваться здесь и добрыми побуждениями, будучи напуганным талидомидом, хотя, конечно, подобные методы непростительны даже в рамках "предупредительного принципа".
- 74. "...when one of a class of causal agents is known to have produced an effect, the standards for evidence that another agent of that class produces a similar effect can be reduced" [64].
- 75. "Analogy can be helpful, although the help seems limited since anybody with a little creativity can probably dream up an analogy!" [130].
- 76. "Analogy, then, becomes one way to invent a hypothesis, although it is a bit unimaginative. A Popperian alternative to analogy would be: creative inventiveness" [272].
- 77. Howard Frumkin is Professor Emeritus of Environmental and Occupational Health Sciences at the University of Washington School of Public Health; Professor and Chair of Environmental and Occupational Health at Emory University's Rollins School of Public Health and Professor of Medicine at Emory Medical School from 1990—2005. см. на https://deohs.washington.edu/faculty/howard-frumkin (address data 28.11.2020).
- 78. "Whatever insight might be derived from analogy is handicapped by the inventive imagination of scientists who can find analogies everywhere. At best, analogy provides a source of more elaborate hypotheses about the associations under study; absence of such analogies only reflects lack of imagination or experience, not falsity of the hypothesis" [50].

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ И ВОЗМОЖНОСТЬ СУБЪЕКТИВНЫХ УКЛОНОВ

Конфликт интересов отсутствует. Представленное исследование, выполненное попутно в рамках более широкой бюджетной темы НИР ФМБА России, не поддерживалось никакими иными источниками финансирования. При выполнении работы не имелось временных рамок, официальных требований, ограничений, или же иных внешних объективных либо субъективных вмешивающихся факторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Hill B.A.* The environment and disease: association or causation? // Proc. R. Soc. Med. 1965. V. 58. № 5. P. 295–300.
 - https://doi.org/10.1177/0141076814562718
- 2. Котеров А.Н. Критерии причинности в медикобиологических дисциплинах: история, сущность и радиационный аспект. Сообщение 1. Постановка проблемы, понятие о причинах и причинности, ложные ассоциации // Радиац. биология. Радиоэкология. 2019. Т. 59. № 1. С. 1-32. [Koterov A.N. Causal criteria in medical and biological disciplines: history, essence and radiation aspect. Report 1. Problem statement, conception of causes and causation, false associations // Radiats. Biol. Radioecol. ('Radiat ion biology. Radioecology', Moscow). 2019. V. 59. № 1. P. 1–32. (In Russian, Engl. abstr.) Koterov A.N. Causal criteria in medical and biological disciplines: history, essence and radiation aspect. Report 1. Problem statement, conception of causes and causation, false associations // Biol. Bull. (Moscow). 2019. V. 46. № 11. P. 1458-1488.
 - https://doi.org/10.1134/S1062359019110165 https://doi.org/10.1134/S0869803119010065
- 3. Котеров А.Н. Критерии причинности в медико-биологических дисциплинах: история, сущность и радиационный аспект. Сообщение 2. Постулаты Генле-Коха и критерии причинности неинфекционных патологий до Хилла // Радиац. биология. Радиоэкология. 2019. Т. 59. № 4. С. 341—375. [Koterov A.N. Causal criteria in medical and biological disciplines: history, essence and radiation aspect. Rep. 2. Henle-Koch postulates and criteria for causality of non-communicable pathologies before Hill // Radiats. Biol. Radioecol. ('Radiation biology. Radioecology', Moscow). 2019. V. 59. № 4. P. 341—375. (In Russian. Engl. abstr.)]
 - https://doi.org/10.1134/S0869803119040052
- 4. Котеров А.Н., Ушенкова Л.Н., Зубенкова Э.С. и др. Сила связи. Сообщение 1. Градации относительного риска // Мед. радиология и радиац. безопасность. 2019. Т. 64. № 4. С. 5—17. [Koterov A.N., Ushenkova L.N., Zubenkova E.S. et al. Strength of association. Report 1. Graduation of relative risk // Med. Radiol. Radiat. Bezopasnost ('Medical Radiology and Radiation Safety'; Moscow). 2019. V. 64. № 4. P. 5—17. (In Russian. Engl. abst.)] https://doi.org/10.12737/article 5d1adb25725023.14868717
- 5. Котеров А.Н., Ушенкова Л.Н., Молодцова и др. Сила связи. Сообщение 2. Градации величины корреляции // Мед. радиология и радиац. безопасность. 2019. Т. 64. № 6. С. 12—24. [Koterov A.N., Ushenkova L.N., Molodtsova D.V. et al. Strength of association. Report 2. Graduation of correlation size // Med. Radiol. Radiat. Bezopasnost ('Medical Radiology and Radiation Safety'; Moscow). 2019. V. 64. № 6. Р. 12—24. (In Russian. Engl. abst.)]
 - https://doi.org/10.12737/1024-6177-2019-64-6-12-24
- 6. Котеров А.Н., Ушенкова Л.Н., Бирюков А.П. Критерий Хилла "Временная зависимость". Обратная причинность и ее радиационный аспект // Радиац. биология. Радиоэкология. 2020. Т. 60. № 2. С. 115—152. [Koterov A.N., Ushenkova L.N., Biryukov A.P.

- Hill's criteria 'Temporality'. Reverse causation and its radiation aspect // Radiats. Biol. Radioecol. ('Radiation biology. Radioecology', Moscow). 2020. V. 60. № 2. P. 115–152. (In Russian. Engl. abstr.)] *Koterov A.N., Ushenkova L.N., Biryukov A.P.* Hill's Temporality criterion: reverse causation and its radiation aspect // Biol. Bull. (Moscow). 2020. T. 47. № 12. C. 1–33. https://doi.org/10.1134/S1062359020120031. https://doi.org/10.31857/S086980312002006X
- 7. Котеров А.Н., Ушенкова Л.Н., Бирюков А.П. Критерий Хилла "Биологическое правдоподобие". Интеграция данных из различных дисциплин в эпидемиологии и радиационной эпидемиологии // Радиац. биология. Радиоэкология. 2020. Т. 60. № 5. С. 453—480. [Koterov A.N., Ushenkova L.N., Biryukov A.P. Hill's criteria 'Biological plausibility'. The data integration from different disciplines in Epidemiology and Radiation Epidemiology // Radiats. Biol. Radioecol. ('Radiation biology. Radioecology', Moscow). 2020. V. 60. № 5. P. 453—480. (In Russian. Engl. abstr.)] https://doi.org/10.31857/S0869803120050069
- 8. Котеров А.Н., Ушенкова Л.Н., Бирюков А.П. Критерий Хилла "Эксперимент". Контрафактический подход в дисциплинах нерадиационного и радиационного профиля // / Радиац. биология. Радиоэкология. 2020. Т. 60. № 6. С. 565—594. [Котего А.N., Ushenkova L.N., Biryukov A.P. Hill's criteria 'Experiment'. The counterfactual approach in non-radiation and radiation sciences // 'Radiats. Biol. Radioecol. ('Radiation biology. Radioecology', Moscow). 2020. V. 60. № 6. P. 565—594. (In Russian. Engl. abstr.)] https://doi.org/10.31857/S0869803120060193
- 9. Котеров А.Н. Критерии причинности в медико-биологических дисциплинах: история, сущность и радиационный аспект. Сообщение З. Ч. 1: первые пять критериев Хилла: использование и ограничения // Радиац. биология. Радиоэкология. 2021. Т. 61. № 3. С. 301—332. [Koterov A.N. Causal criteria in medical and biological disciplines: history, essence and radiation aspect. Report 3, Part 1: first five Hill's criteria: use and limitations // Radiats. Biol. Radioecol. ('Radiation biology. Radioecology', Moscow). 2021. V. 61. № 3. Р. 301—332. (In Russian. Engl. abstr.)] https://doi.org/10.31857/S0869803121030085.
- United States Department of Health, Education and Welfare (USDHEW). Smoking and Health: Report of the Advisory Committee to the Surgeon General of the Public Health Service Publication No. 1103. Washington DC: U.S. Department of Health, Education and Welfare, 1964. 387 p. https://biotech.law.lsu.edu/cases/tobacco/nnbbmq.pdf (Address data 11.10.2020).
- Susser M. Judgement and causal inference: criteria in epidemiologic studies // Am. J. Epidemiol. 1977.
 V. 105. № 1. P. 1–15. Reprint: Am. J. Epidemiol. 1995.
 V. 141. № 8. P. 701–715.
- 12. *Strom B.L.* Study designs available for pharmacoepidemiology studies // Pharmacoepidemiology / Ed. by B.L. Strom. 3rd Ed. Baffins Lane, Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2000. P. 17–30.
- 13. Meek M.E., Palermo C.M., Bachman A.N. et al. Mode of action human relevance (species concordance) framework: Evolution of the Bradford Hill considerations and comparative analysis of Weight of Evidence //

- J. Appl. Toxicol. 2014. V. 34. № 6. P. 595–606. https://doi.org/10.1002/jat.2984
- 14. *Carbone M., Klein G., Gruber J., Wong M.* Modern criteria to establish human cancer etiology // Cancer Res. 2004. V. 64. № 15. P. 5518–5524. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0255
- 15. Weed D.L., Hursting S.D. Biologic plausibility in causal inference: current method and practice // Am. J. Epidemiol. 1998. V. 147. № 5. P. 415–425. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a009466
- Weed D.L. Precaution, prevention, and public health ethics // J. Med. Philosophy. 2004. V. 29. № 3. P. 313—332. https://doi.org/10.1080/03605310490500527
- 17. *Weed D.L.* Epidemiologic evidence and causal inference // Hematol. Oncol. Clin. North Am. 2000. V. 14. № 4. P. 797–807. https://doi.org/10.1016/S0889-8588(05)70312-9
- 18. *Susser M.* Rules of inference in epidemiology // Regul. Toxicol. Pharmacol. 1986. V. 6. № 2. P. 116–128. https://doi.org/10.1016/0273-2300(86)90029-2
- 19. *Susser M*. The logic of Sir Karl Popper and the practice of epidemiology // Am. J. Epidemiol. 1986. V. 124. № 5. P. 711–718. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a114446
- 20. *Bhopal R.S.* Concepts of Epidemiology: Integrated the ideas, theories, principles and methods of epidemiology. 3rd Ed. Oxford: University Press, 2016. 442 p.
- 21. *Worrall J.* What evidence in Evidence-Based Medicine? // Philosophy of Science. 2002. V. 69. № S3. P. S316—S330. https://doi.org/10.1086/341855
- 22. *Worrall J.* Why randomize? Evidence and ethics in clinical trials // Contemporary Perspectives in Philosophy and Methodology of Science / Eds W.J. Gonzalez, J. Alcolea. A Coruna: Netbiblo, 2006. P. 65–82.
- 23. Worrall J. Causality in medicine: getting back to the Hill top // Prev. Med. 2011. V. 53. № 4–5. P. 235–238. https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2011.08.009
- 24. *Власов В.В.* Эпидемиология: Учебное пособие. 2-е изд., испр. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. 464 с. [*Vlasov V.V.* Epidemiology. 2nd ed., rev. M.: GEOTAR-Media, 2006. 464 p. (In Russian)]
- 25. *Hrobjartsson B., Gotzsche P.C., Gluud C.* The controlled clinical trial turns 100 years: Fibiger"s trial of serum treatment of diphtheria // Beit. Med. J. 1998. V. 317. № 7167. P. 1243–1245. https://doi.org/10.1136/bmj.317.7167.1243
- 26. *Meldrum M.L.* A brief history of the randomized controlled trial. From oranges and lemons to the gold standard // Hematol. Oncol. Clin. North. Am. 2000. V. 14. № 4. P. 745–760, vii. https://doi.org/10.1016/s0889-8588(05)70309-9
- 27. *Phillips A.N., Davey Smith G.* Confounding in epidemiological studies // Br. Med. J. 1993. V. 306. № 870. P. 142. https://doi.org/10.1136/bmj.306.6870.142-b
- 28. DOE 1995. U.S. Department of Energy. Closing the Circle on the Splitting of the Atom // The Environmental Legacy of Nuclear Weapons Production in the United States and What the Department of Energy is Doing About It. U.S. Department of Energy, Office of Envi-

- ronmental Management, January 1995. DOE/EM-0266, 106 p.
- https://www.energy.gov/sites/prod/files/2014/03/f8/Closing the Circle Report.pdf (address data 11.10.2020).
- Frame P., Kolb W. Living with Radiation: the First Hundred Years. 2nd Ed. Maryland: Syntec, Inc. 2000; and // Gilbert U-238 Atomic Energy Lab (1950–1951). Oak Ridge Associated Universities, 1999. https://www.orau.org/ptp/collection/atomictoys/atomictoys.htm (address data 11.10.2020).
- BEIR VII Report 2006. Phase 2. Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation. Committee to Assess Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation, National Research Council. http://www.nap.edu/catalog/11340.html (address data 11.10.2020).
- 31. *Koterov A.N., Biryukov A.P.* The possibility of determining of anomalies and pathologies in the offspring of liquidators of Chernobyl accident by the non-radiation factors // Int. J. Low Radiat. (Paris). 2011. V. 8. № 4. P. 256–312. https://doi.org/10.1504/IJLR.2011.046529
- 32. Котеров А.Н., Бирюков А.П. Дети ликвидаторов аварии на Чернобыльской атомной электростанции. 1. Оценка принципиальной возможности зарегистрировать радиационные эффекты // Мед. радиология и радиац. безопасность. 2012. Т. 57. № 1. С. 58—79. [Koterov A.N., Biryukov A.P. The offspring of liquidators of Chernobyl Atomic Power Station accident. 1. The estimation of the basic opportunity to register of radiation effect // Med. Radiol. Radiat. Bezopasnost ('Medical Radiology and Radiation Safety'; Moscow). 2012. V. 57. № 1. P. 58—79. (In Russian. Engl. abstr.)]
- 33. Котеров А.Н., Бирюков А.П. Дети участников ликвидации последствий аварии на Чернобыльской атомной электростанции. 2. Частота отклонений и патологий и их связь с нерадиационными факторами // Мед. радиология и радиац. безопасность. 2012. Т. 57. № 2. С. 51–77. [Koterov A.N., Biryukov A.P. The offspring of liquidators of Chernobyl Atomic Power Station accident. 2. The frequency of anomalies and pathologies and its connection to non-radiation factors // Med. Radiol. Radiat. Bezopasnost ('Medical Radiology and Radiation Safety'; Moscow). 2012. V. 57. № 2. P. 51–77. (In Russian. Engl. abstr.)]
- 34. Котеров А.Н. Малые дозы радиации: факты и мифы. Основные понятия и нестабильность генома. М.: Изд-во "ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России", 2010. 283 с. [Koterov A.N. Low Dose of Radiation: the Facts and Myths. The Basic Concepts and Genomic Instability. Moscow: Publ. by "FMBC by A.I. Burnazjan FMBA of Russia", 2010. 283 p. (In Russian. Eng. abstr.)]
- 35. *Koterov A.N.* Genomic instability at exposure of low dose radiation with low LET. Mythical mechanism of unproved carcinogenic effects // Int. J. Low Radiat. 2005. V. 1. № 4. P. 376–451. https://doi.org/10.1504/IJLR.2005.007913
- UNSCEAR 2001. Report to the General Assembly, with Scientific Annexes. Annex Hereditary effects of radiation. New York: United Nations, 2001, P. 5–160.

- 37. COMARE 2002. 7th Report. Parents occupationally exposed to radiation prior to the conception of their children. A review of the evidence concerning the incidence of cancer in their children / Ed. Crown. Produced by the National Radiological Protection Board, 2002. 86 p.
- 38. Захарова М.Л., Безлепкин В.Г., Кириллова Е.Н. и др. Генетический материал радиобиологического репозитория тканей человека и некоторые результаты его исследования // Мед. радиол. и радиац. безопасность. 2010. Т. 55. № 5. С. 5—13. [Zakharova M.L., Bezlepkin V.G., Kirillova E.N. et al. Radiobiology human tissue repository genetic material and the certain results of its study // Med. Radiol. Radiat. Bezopasnost ('Medical Radiology and Radiation Safety'; Moscow). 2010 V. 55. № 3. Р. 27—45. (In Russian. Engl. abstr.)]
- 39. Безлепкин В.Г., Кириллова Е.Н., Захарова М.Л. и др. Отдаленные и трансгенерационные молекулярногенетические эффекты пролонгированного воздействия ионизирующей радиации у работников предприятия ядерной промышленности // Радиац. биология. Радиоэкология. 2011. Т. 51. № 1. С. 20—32. [Bezlepkin V.G., Kirillova E.N., Zakharova M.L. et al. Delayed and transgenerational molecular and genetic effects of prolonged influence of ionizing radiation in nuclear plant workers // Radiats. Biol. Radioecol. ("Radiation biology. Radioecology", Moscow). 2011. V. 51. № 1. P. 20—32. (In Russian. Engl. abstr. PubMed)]
- 40. *Kuzmina N.S.*, *Myazin A.E.*, *Lapteva N.Sh.*, *Rubanovich A.V.* The study of hypermethylation in irradiated parents and their children blood leukocytes // Cent. Eur. J. Biol. 2014. V. 9. № 10. P. 941–950.
- 41. *Kuzmina N.S.*, *Lapteva N.Sh.*, *Rubanovich A.V.* Hypermethylation of gene promoters in peripheral blood leukocytes in humans long term after radiation exposure // Environ. Res. 2016. V. 146. P. 10–17. https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.12.008
- 42. *Kuzmina N.S., Lapteva N.Sh., Rusinova G.G. et al.* Gene hypermethylation in blood leukocytes in humans long term after radiation exposure. Validation set // Environ. Pollut. 2018. V. 234. P. 935–942. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.039
- 43. *Gotzsche P.C.* Deadly Medicines and Organised Crime. How Big Pharma has Corrupted Healthcare. London: Radcliffe Publishing, 2013. 310 p.
- 44. Echt D.S., Liebson P.R., Mitchell L.B. et al. Mortality and morbidity in patients receiving encainide, flecainide, or placebo. The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial // N. Engl. J. Med. 1991. V. 324. № 12. P. 781–788. https://doi.org/10.1056/NEJM199103213241201
- 45. *Pocock S.J.* When to stop a clinical trial // Br. Med. J. 1992. V. 305. № 6847. P. 235–240. https://doi.org/10.1136/bmj.305.6847.235
- 46. *Moore T.* Deadly medicine: Why tens of thousands of heart patients died in America's worst drug disaster. New York: Simon & Schuster, 1995. 352 p.
- 47. Handbook of Epidemiology / Eds W. Ahrens, I. Pigeot. 2nd ed. New York, Heidelberg, Dordrecht, London: Springer, 2014. 2498 p.
- 48. *Davey Smith G*. Data dredging, bias, or confounding. They can all get you into the BMJ and the Friday papers //

- Br. Med. J. 2002. V. 325. № 7378. P. 1437—1438. https://doi.org/10.1136/bmj.325.7378.1437
- 49. *Gage S.H.*, *Munafo M.R.*, *Davey Smith G*. Causal inference in developmental origins of health and disease (DOHaD) research // Annu. Rev. Psychol. 2016. V. 67. P. 567–585.
 - https://doi.org/10.1146/annurev-psych-122414-033352
- Rothman K.J., Greenland S. Causation and causal inference in epidemiology // Am. J. Public Health. 2005.
 V. 95. Suppl 1. P. S144—S150. https://doi.org/10.2105/AJPH.2004.059204
- 51. Rothman K.J., Greenland S., Poole C., Lash T.L. Causation and causal inferene // Modern Epidemiology / Eds K.J. Rothman, S. Greenland, T.L. Lash. 3rd ed. Philadelphia (PA): Wolters Kluwer, 2008. P. 5–31.
- 52. Goodman K.J., Phillips C.V. Hill"s criteria of causation // Encyclopedia of Statistics in Behavioral Science. V. 2 / Eds B.S. Everitt, D.C. Howell. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2005. P. 818–820.
- Goodman S.N., Samet J.M. Cause and Cancer Epidemiology // Schottenfeld and Fraumeni Cancer Epidemiology and Prevention / Eds M. J. Thun et al. 4th ed. New York: Oxford University Press. Printed by Sheridan Books, Inc., USA, 2018. P. 97–104.
- 54. *Gori G.B.* Epidemiologic evidence in public and legal policy: reality or metaphor? Critical Legal Issues. Washington: Washington Legal Foundation. Working Paper Series No. 124, 2004. 33 p.
- 55. *Swaen G., van Amelsvoort L.* A weight of evidence approach to causal inference // J. Clin. Epidemiol. 2009. V. 62. № 3. P. 270–277. https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2008.06.013
- 56. Hippocrates. Precepts // Works: Translated by W.H.S. Jones. London: Wm. Heinemann, 1923, V. I. P. 313.
- 57. *Bull J.P.* The historical development of clinical therapeutic trials // J. Chronic Dis. 1959. V. 10. № 3. P. 218–248. https://doi.org/10.1016/0021-9681(59)90004-9
- 58. *Asher R*. Apriority: thoughts on treatment // Lancet. 1961. V. 2. № 7217. P. 1403–1404. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(61)91217-x
- 59. *Mathews J.N.S.* Introduction to Randomized Controlled Clinical Trials. Texts in Statistical Science. 2nd ed. Charman & Hall/CRC, 2006. 272 p.
- 60. *Terris M*. The Society for Epidemiologic Research and the future of epidemiology // J. Publ. Health Policy. 1993. V. 14. № 2. P. 137–148. https://doi.org/10.2307/3342960
- 61. *Rothman K.J.* Epidemiology. An Introduction. 2nd ed. Oxford etc.: Oxford University Press Inc., 2012. 268 p.
- 62. *Merrill R.M.* Introduction to Epidemiology. 7th ed. Burlington: Jones & Bartlett Learning, 2017. 339 p.
- 63. USEPA 2006. A Framework for Assessing Health Risks of Environmental Exposures to Children. EPA/600/R-05/093F. Washington, DC: National Center for Environmental Assessment Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency, 2006. 145 p.
- 64. *Susser M*. What is a cause and how do we know one? A grammar for pragmatic epidemiology // Am. J. Epidemiol. 1991. V. 133. № 7. P. 635–648. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a115939

- 65. *Szklo M.*, *Nieto F.J.* Epidemiology. Beyond the Basics. 4th ed. Burlington: Jones & Bartlett Learning, 2019. 577 p.
- 66. The Health Consequences of Smoking: A Report of the Surgeon General Rockville, MD: Office of the Surgeon General, US Public Health Service, 2004. 910 p.
- 67. Gordis L. Epidemiology. 5th Ed. Philadelphia: Saunders, Elsevier Inc., 2014. 392 p.
- 68. Aschengrau A., Seage G.R., III. Epidemiology in Public Health. 3rd ed. Burlington: Jones & Bartlett Learning, LLC, 2014. 596 p.
- Rothman K.J., Greenland S. Causation and causal inference Modern Epidemiology / Ed. K.J. Rothman. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1998. P. 7–28.
- 70. *Hofler M*. The Bradford Hill considerations on causality: a counterfactual perspective // Emerg. Them. Epidemiol. 2005. V. 2. №. 11. 9 p. https://doi.org/10.1186/1742-7622-2-11
- 71. *Thygesen L.C., Andersen G.S., Andersen H.* A philosophical analysis of the Hill criteria // J. Epidemiol. Commun. Health. 2005. V. 59. № 6. P. 512–516. https://doi.org/10.1136/jech.2004.027524
- Webb P., Bain C. Essential Epidemiology. An Introduction for Students and Health Professionals. 2nd ed. Cambridge etc.: Cambridge University Press, 2011. 445 p.
- 73. *Bonita R.*, *Beaglehole R.*, *Kjellstrom T.* Basic epidemiology. 2nd ed. World Health Organization, 2006. 212 p.
- 74. *Katz D.L., Elmore J.G., Wild D.M.G., Lucan S.C.* Jekel"s Epidemiology, Biostatistics, Preventive Medicine, and Public Health. 4th ed. Philadelphia: Elsevier Inc., 2014. 453 p.
- 75. *Greenhalgh T.* The Basics of Evidence Based Medicine. 2nd ed. London, UK: BMJ Books, 2001. 222 p.
- 76. Weed D.L., Gorelic L.S. The practice of causal inference in cancer epidemiology // Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. 1996. V. 5. № 4. P. 303–311.
- Encyclopedia of Statistics in Behavioral Science. V. 1 / Eds B.S. Everit, D.C. Howell. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2005. 2990 p.
- 78. Becker R.A., Dellarco V., Seed J. et al. Quantitative weight of evidence to assess confidence in potential modes of action // Regul. Toxicol. Pharmacol. 2017. V. 86. P. 205–220. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.02.017
- 79. Sonich-Mullin C., Fielder R., Wiltse J. et al. International Programme on Chemical Safety. IPCS conceptual framework for evaluating a mode of action for chemical carcinogenesis // Regul. Toxicol. Pharmacol. 2001. V. 34. № 2. P. 146–152.
 - https://doi.org/10.1006/rtph.2001.1493
- 80. *Ulanova M., Gekalyuk A., Agranovich I. et al.* Stress-induced stroke and stomach cancer: sex differences in oxygen saturation // Adv. Exp. Med. Biol. 2016. V. 923. P. 135–140. https://doi.org/10.1007/978-3-319-38810-6_18
- 81. Воробцова И.Е. Генетические и соматические эффекты ионизирующей радиации у людей и животных (сравнительный аспект) // Радиац. биология. Радиоэкология. 2002. Т. 42. № 6. С. 639—643. [Vorobtsova I.E. Genetic and somatic effects of ionizing ra-

- diation in humans and animals (comparative aspect) // Radiats. Biol. Radioecol. ('Radiation biology. Radioecology', Moscow). 2002. V. 42. № 6. P. 639–643. (In Russian. Engl. abstr. PubMed)]
- 82. Evans A.S. Causation and disease: The Henle-Koch postulates revisited // Yale J. Biol. Med. 1976. V. 49. № 2. P. 175–195.
- 83. *Brown N.A.*, *Fabro S*. The value of animal teratogenicity testing for predicting human risk // Clin. Obstet. Gynecol. 1983. V. 26. № 2. P. 467–477. https://doi.org/10.1016/0890-6238(93)90025-3
- 84. *Popper K.R.* The Logic of Scientific Discovery. London and New York: Routledge Classics, 2002. 513 p.
- 85. USEPA 2005. Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. EPA/630/P-03/001B. Washington, DC: Risk Assessment Forum. National Center for Environmental Assessment Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency, 2005. 166 p.
- 86. Fox G.A. Practical causal inference for ecoepidemiologists // J. Toxicol. Environ. Health. 1991. V. 33. № 4. P. 359–273. https://doi.org/10.1080/15287399109531535
- 87. Сидоренко Е.А. Контрафактические высказывания // Новая философская энциклопедия. В 4 т. Т. 2. М.: Мысль, 2010. С. 297—298. [Sidorenko E.A. Counterfactual statements // New Philosophical Encyclopedia. In 4 v. V. 2. Moscow, Mysl, 2010. P. 297—298. (In Russian)]
- 88. *Bruce N., Pope D., Stanistreet D.* Quantitative Methods for Health Research. A Practical Interactive Guide to Epidemiology and Statistics. 2nd Ed. Oxford: John Wiley & Sons, 2019. 545 p.
- 89. *Bollet A.J.* On seeking the cause of disease // Clin. Res. 1964. V. 12. P. 305–310.
- 90. Merrill R.M., Frankenfeld C.L., Freeborne N., Mink M. Behavioral Epidemiology. Principles and Applications. Burlington: Jones & Bartlett Learning, LLC, 2016. 298 p.
- 91. *Egilman D., Kim J., Biklen M.* Proving causation: the use and abuse of medical and scientific evidence inside the courtroom an epidemiologist's critique of the judicial interpretation of the Daubert ruling // Food Drug. Law J. 2003. V. 58. № 2. P. 223–250.
- 92. Котеров А.Н., Жаркова Г.П., Бирюков А.П. Тандем радиационной эпидемиологии и радиобиологии для практики радиационной защиты // Мед. радиол. и радиац. безопасность. 2010. Т. 55. № 4. С. 55—84. [Koterov A.N., Zharkova G.P., Biryukov A.P. Tandem of radiation epidemiology and radiobiology for practice and radiation protection // Med. Radiol. Radiat. Bezopasnost ('Medical Radiology and Radiation Safety'; Moscow). 2010. V. 55. № 5. P. 48—73. (In English.) (In Russian. Eng. abstr.)]
- 93. Schlesselman J.J. "Proof" of cause and effect in epidemiologic studies: criteria for judgment // Prev. Med. 1987. V. 16. № 2. P. 195–210. https://doi.org/10.1016/0091-7435(87)90083-1
- 94. *Shakir S.A.*, *Layton D*. Causal association in pharmacovigilance and pharmacoepidemiology: thoughts on the application of the Austin Bradford-Hill criteria // Drug Saf. 2002. V. 25. № 6. P. 467–471. https://doi.org/10.2165/00002018-200225060-00012

- 95. UNSCEAR 2006. Report to the General Assembly, with Scientific Annexes. Annex A. Epidemiological studies of radiation and cancer. New York: United Nations, 2008. P. 17–322.
- 96. Smoking and reproductive life. The impact of smoking on sexual, reproductive and child health / Eds D. Carter D., N. Nathanson, C. Seddon et al. British Medical Association. Board of Science and Education & Tobacco Control Resource Centre, 2004. https://www.rauchfrei-info.de/fileadmin/main/data/Dokumente/Smoking_ReproductiveLife.pdf (address data 11.10.2020).
- 97. *Hofmann B., Holm S., Iversen J.-G.* Philosophy of science // Research methodology in the medical and biological sciences / Eds P. Laake, H.B. Benestad, B.R. Olsen. London etc.: Academic Press, Elsevier, 2007. P. 1–32.
- Gay J. Clinical Epidemiology & Evidence-Based Medicine Glossary: Terminology Specific to Epidemiology. 2005.
 http://people.vetmed.wsu.edu/jmgay/courses/GlossEpiTerminology.htm (address data 11.10.2020).
- 99. A Dictionary of Epidemiology / Ed. M. Porta. 6th ed. New York: Oxford University Press, 2014. 344 p.
- 100. A Dictionary of Epidemiology / Ed. J.M. Last. Oxford: Oxford University Press, 2001.
- 101. *Doll R*. Weak associations in epidemiology: importance, detection, and interpretation // J. Epidemiol. 1996. V. 6. № 4. Suppl. P. S11—S20. https://doi.org/10.2188/jea.6.4sup_11
- 102. *Murray C.J.L.*, *Ezzati M.*, *Lopez A.D. et al.* Comparative quantification of health risks: conceptual framework and methodological issues // Health Metrics. 2003. V. 1. Art. 1. 38 p. https://doi.org/10.1186/1478-7954-1-1
- 103. Guzelian P.S., Victoroff M.S., Halmes N.C. et al. Evidence-based toxicology: a comprehensive framework for causation // Hum. Exp. Toxicol. 2005. V. 24. № 4. P. 161–201. https://doi.org/10.1191/0960327105ht517oa
- 104. Epidemiology: Principles and Practical Guidelines / Eds J. Van den Broeck, J.R. Brestoff. Dordrecht: Springer, 2013. 621 p.
- 105. *Glynn J.R.* A question of attribution // Lancet. 1993. V. 342. № 8870. P. 530–532. https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)91651-2
- 106. *Bae S., Kim H.C., Ye B. et al.* Causal inference in environmental epidemiology // Environ. Health Toxicol. 2017. V. 32. Art. e2017015. https://doi.org/10.5620/eht.e2017015
- 107. Lower G.M., Kanarek M.S. Conceptual/operational criteria of causality: relevance to systematic epidemiologic theory // Med. Hypotheses. 1983. V. 11. P. 217–244. https://doi.org/10.1016/0306-9877(83)90064-6
- 108. Collier Z.A., Gust K.A., Gonzalez-Morales B. et al. A weight of evidence assessment approach for adverse outcome pathways // Regul. Toxicol. Pharmacol. 2016. V. 75. P. 46–57. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.12.014
- 109. Семеновых Г.К., Новиков С.М., Семеновых Л.Н. Анализ случаев заболеваний, обусловленных дей-

- ствием факторов среды обитания. Характеристика опасности для здоровья: Учеб. пособие. Вып. 4. М.: Изд-во Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, 2011. 88 с. [Semenovykh G.K., Novikov S.M., Semenovykh L.N. Analysis of cases caused by the action of environmental factors. Characteristics of health hazards: Textbook. allowance. Issue 4. M.: Publishing House Sechenov First Moscow State Medical University, 2011. 88 p. (In Russian)]
- 110. *Maldonado G., Greenland S.* Estimating causal effects // Int. J. Epidemiol. 2002. V. 31. № 2. P. 422–429.
- 111. *Friis R.H.*, *Sellers T.A*. Epidemiology for Public Health Practice. 5th Ed. Burlington: Jones & Bartlett Learning. 2014. 804 p.
- 112. *Phillips C.V., Goodman K.J.* Hill's considerations for causal inference // Encyclopedia of Epidemiology. Two Volume Set. / Ed. S. Boslaugh. Saint Louis University, SAGE Publications, Inc., 2008. P. 494–495.
- 113. Fedak K.M., Bernal A., Capshaw Z.A., Gross S. Applying the Bradford Hill criteria in the 21st century: how data integration has changed causal inference in molecular epidemiology // Emerg. Themes Epidemiol. 2015. V. 12. Article 14. https://doi.org/10.1186/s12982-015-0037-4
- 114. ICRP Publication 90. Biological effects after prenatal irradiation (embryo and fetus) // Ann. ICRP. 2003. V. 33. № 1–2. P. 5–206. https://doi.org/10.1016/S0146-6453(03)00021-6-ICRP 90.pdf
- 115. UNSCEAR 2012. Report to the General Assembly, with Scientific Annexes. Annex A. Attributing health effects to ionizing radiation exposure and inferring risks. New York: United Nations, 2015. 86 p.
- 116. Котеров А.Н., Вайнсон А.А. Биологические и медицинские эффекты излучения с низкой ЛПЭ для различных диапазонов доз // Мед. радиология и радиац. безопасность. 2015. Т. 60. №. 3. С. 5—31. [Koterov A.N., Wainson A.A. Health effects of low Let radiation for various dose ranges // Med. Radiol. Radiat. Bezopasnost ('Medical Radiology and Radiation Safety'; Moscow). 2015. V. 60. № 3. P. 5—31. (In Russian. Engl. abstr.)]
- 117. Atkinson W.D., Law D.V., Bromley K.J., Inskip H.M. Mortality of employees of the United Kingdom Atomic Energy Authority, 1946–97 // Occup. Environ. Med. 2004. V. 61. № 7. P. 577–585.
- 118. *Bell C.M.*, *Coleman D.A*. Models of the healthy worker effect in industrial cohorts // Stat. Med. 1987. V. 6. № 8. P. 901–909. https://doi.org/10.1002/sim.4780060805
- 119. Berrington A., Darby S.C., Weiss S.A., Doll R. 100 years of observation on British radiologists: mortality from cancer and other causes 1897–1997 // Br. J. Radiol. 2001. V. 74. № 882. P. 507–519. https://doi.org/10.1259/bjr.74.882.740507
- 120. Mohan A.K., Hauptmann M., Linet M.S. et al. Breast cancer mortality among female radiologic technologists in the United States // J. Natl. Cancer Inst. 2002. V. 94. № 12. P. 943–948. https://doi.org/10.1093/jnci/94.12.943

- 121. ICRP Publication 118. ICRP Statement on tissue reactions and early and late effects of radiation in normal tissues and organs threshold doses for tissue reactions in a radiation protection context. Annals of the ICRP / Ed. C.H. Clement. Amsterdam—New York: Elsevier, 2012. 325 p.
- 122. Rothman K., Greenland S. Hill"s Criteria for Causality // Encyclopedia of Biostatistics, Online. John Wiley & Sons, Ltd., 2005. 4 p. https://www.rtihs.org/sites/default/files/26902%20Rothman%201998%20The%20encyclopedia%20of%20biostatistics.pdf (дата обращения 11.10.2020).
- 123. *Cornfield J.* Statistical relationships and proof in medicine // Am. Stat. 1954. V. 8. № 5. P. 19–23.
- 124. *Greenhouse J.B.* Commentary: Cornfield, epidemiology and causality // Int. J. Epidemiol. 2009. V. 38. № 5. P. 1199—1201. https://doi.org/10.1093/ije/dyp299
- 125. Panchin A. Yu. The Science. Small nonsense with big consequences // Blog. 2009-08-01. https://scinquisitor.livejournal.com/9724.html; "Epigenetics" website. Laboratory of Epigenetics of the Institute of Gerontology, NAMSU. Posted on 16.09.2011. https://www.epigenetics.com.ua/?p=153; "Biomolecule" website. Special project "Clinical Research". 2018/06.29. https://biomolecula.ru/articles/put-k-tysiachamaptek-nachinaetsia-s-odnoi-molekuly and many others. https://biomolecula.ru/articles/put-k-tysiachamaptek-nachinaetsia-s-odnoi-molekuly и мн. др. (addresses data 20.10.2020).
- 126. *Hume D.* A Treatise of Human Nature. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 1978.
- 127. IARC 1987. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Supplement 7, Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs, Volumes 1 to 42, Lyon, 1987. 449 p.
- 128. Stewart A. Basic Statistics and Epidemiology A Practical Guide. 4th ed. CRC Press, 2016. 212 p.
- 129. Alexander L.K., Lopes B., Ricchetti-Masterson K., Yeatts K.B. Causality // Epidemiologic Research and Information Center (ERIC) Notebook. 2nd Ed. UNC Gillings School of Global Public Health, 2015. 5 p. https://sph.unc.edu/files/2015/07/nciph_ERIC15.pdf (address data 17.10.2020).
- 130. Frumkin H. (Instructor). Causation in Medicine // Emory University Rollins School of Public Health. Atlanta, Georgia, 1997. http://www.aoec.org/ceem/methods/emory2.html (address data 17.10.2020).
- 131. *Biesalski H.K., Aggett P.J., Anton R. et al.* 26th Hohenheim Consensus Conference, September 11, 2010 Scientific substantiation of health claims: evidence-based nutrition // Nutrition. 2011. V. 27. № 10. Suppl. S1—S20. https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.04.002.
- 132. *King J.* Bradford Hill Criteria for causal inference. Presentation at the 2015 ANZEA Conference // Auckland: Julian King & Associates. https://www.julianking.co.nz/wp-content/uploads/2018/01/150602-BHC-jk5-web.pdf (address data 17.10.2020).

- 133. Public Affairs Committee of the Teratology Society. Causation in teratology-related litigation // Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol. 2005. V. 73. № 6. P. 421–423. https://doi.org/10.1002/bdra.20139
- 134. Canadian Task Force on the Periodic Health Examination. The periodic health examination // Can. Med. Assoc. J. 1979. V. 121. № 9. P. 1193–1254.
- 135. *Howick J.* The Philosophy of Evidence-Based Medicine. Chichester: Wiley-Blackwell, 2011. 248 p.
- 136. Howick J., Chalmers I., Glasziou P. et al. The 2011 Oxford CEBM Evidence Levels of Evidence (Introductory Document) // Oxford Centre for Evidence-Based Medicine. 2011. 3 p. https://www.cebm.ox.ac.uk/resources/levels-of-evidence/ocebm-levels-of-evidence (address data 18.11.2020).
- 137. *Андреева Н.С., Реброва О.Ю., Зорин Н.А. и др.* Системы оценки достоверности научных доказательств и убедительности рекомендаций: сравнительная характеристика и перспективы унификации // Мед. технологии. Оценка и выбор. 2012. № 4. С. 10—24. [*Andreeva N.S., Rebrova O.Y., Zorin N.A. et al.* Systems for assessing the reliability of scientific evidence and the soundness of guidelines: comparison and prospects for unification // Medical Technologies. Assessment and Choice (Moscow). 2012. № 4. Р. 10—24. (In Russian. Engl. abstr.)]
- 138. Fletcher R.H., Fletcher S.W., Wagner E.H. Clinical Epidemiology: The Essentials. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1996. 276 p.
- 139. Lilienfeld"s Foundations of Epidemiology. 4th ed. Original Ed. A.M. Lilienfeld / Eds D. Schneider, D.E. Lilienfeld. New York: Oxford University Press, 2015. 333 p.
- 140. Feinstein A.R. Clinical epidemiology. I. The populational experiments of nature and of man in human illness // Ann. Int. Med. 1968. V. 69. № 4. P. 807–820. https://doi.org/10.7326/0003-4819-69-4-807
- 141. *Jones D.S.*, *Podolsky S.H*. The art of medicine. The history and fate of the gold standard // Lancet. 2015. V. 385. № 9977. P. 1502–1503. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60742-5
- 142. Feinstein A.R., Horwitz R.I. Double standards, scientific methods, and epidemiologic research // N. Engl. J. Med. 1982. V. 307. № 26. P. 1611–1617. https://doi.org/10.1056/NEJM198212233072604
- 143. *Mant D*. Can randomised trials inform clinical decisions about individual patients? // Lancet. 1999. V. 353. № 9154. P. 743–746. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)09102-8
- 144. *Mayer D*. Essential Evidence-based Medicine. 2nd ed. Cambridge University Press, 2010. 442 p. https://www.yumpu.com/en/document/read/56834431/dan-mayer-essential-evidence-based-medicine (address data 18.11.2020).
- 145. *Worrall J.* Evidence: philosophy of science meets medicine // J. Eval. Clin. Pract. 2010. V. 16. № 2. P. 356—362. https://doi.org/10.1111/j.1365-2753.2010.01400.x
- 146. Opren. Parliament.uk. Hansard 1803–2005. HC. Deb 20 July 1987. Volume 120. cc. 183–188.

- https://api.parliament.uk/historic-hansard/commons/1987/jul/20/opren (address data 2020/06/21).
- 147. MacMahon B., Pugh T.F., Ipsen J. Epidemiologic Methods. Boston: Little, Brown, 1960. 302 p.
- 148. *Lilienfeld D.E.* Definitions of epidemiology // Am. J. Epidemiol. 1978. V. 107. № 2. P. 87–90. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a112521
- 149. *Jadad A.R., Enkin M.W.* Randomized Controlled Trials. Questions, Answers, and Musings. 2nd ed. Malden, Oxford, Carlton: BMJ Books, 2007. 136 p.
- 150. *Worrall J*. Evidence in medicine // Compass. 2007. V. 2. № 6. P. 981–1022. https://doi.org/10.1111/j.1747-9991.2007.00106.x
- 151. Krauss A. Why all randomised controlled trials produce biased results // Ann. Med. 2018. V. 50. № 4. P. 312—322. https://doi.org/10.1080/07853890.2018.1453233
- 152. Wartolowska K., Beard D.J., Carr A.J. The use of placebos in controlled trials of surgical interventions: a brief history // J. R. Soc. Med. 2018. V. 111. № 5. P. 177–182. https://doi.org/10.1177/0141076818769833
- 153. *Hill A.B.* Observation and experiment // N. Engl. J. Med. 1953. V. 248. № 24. P. 995–1001. https://doi.org/10.1056/NEJM195306112482401
- 154. *Doll R*. Clinical trials: retrospect and prospect // Stat. Med. 1982. V. 1. № 4. P. 337–344. https://doi.org/10.1002/sim.4780010411
- 155. *Colebrook D*. Report of the work at the North Islington Infant Welfare Centre Light Department. 3 March, FD1/5052. National Archive in Kew, London, 1925.
- 156. *Bell J.A.* Pertussis prophylaxis with two doses of alumprecipitated vaccine // Public Health Rep. 1941. V. 56. № 31. P. 1535–1546. https://doi.org/10.2307/4583816
- 157. Teaching Epidemiology. A Guide for Teachers in Epidemiology, Public Health, and Clinical Medicine. 4th ed. / Eds J. Olsen, N. Greene, R. Saracci, D. Trichopoulos. New York: Oxford University Press, 2015. 555 p.
- 158. *Sackett D.L.* Clinical epidemiology. what, who, and whither // J. Clin. Epidemiol. 2002. V. 55. № 12. P. 1161–1166. https://doi.org/10.1016/s0895-4356(02)00521-8
- 159. *Feinstein A.R.* Clinical epidemiology: The architecture of clinical research. Philadelphia etc.: W. B. Saunders Company, 1985. 812 p.
- 160. Saracci R. Epidemiology. A Very Short Introduction. New York: Oxford University Press. Inc., 2010. 171 p.
- 161. *Holmes L.J.* Applied Epidemiologic Principles and Concepts. Clinicians" Guide to Study Design and Conduct. New York: Taylor & Francis, 2018. 316 p.
- 162. *Taylor I*. Epidemiology 1866–1966 // Public Health. 1967. V. 82. № 1. P. 31–37. https://doi.org/10.1016/s0033-3506(67)80063-5
- 163. Kincaid H. Causal modelling, mechanism, and probability in epidemiology // Causality in the Sciences / Eds P.M. Illari, F. Russo, J. Williamson New York: Oxford University Press, 2011. 20 p. https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199574131.003.0004

- 164. *Lagiou P., Adami H.O., Trichopoulos D.* Causality in cancer epidemiology // Eur. J. Epidemiol. 2005. V. 20. № 7. P. 565–574. https://doi.org/10.1007/sl0654-005-7968-y
- 165. *Buck C*. Popper's philosophy for epidemiologists // Int. J. Epidemiol. 1975. V. 4. № 3. P. 159–168. https://doi.org/10.1093/ije/4.3.159
- 166. Coughlin S.S. Causal Inference and Scientific Paradigms in Epidemiology. Bentham E-book. 2010. 70 p. https://doi.org/10.2174/97816080518161100101. https://ebooks.bentham-science.com/book/9781608051816/ (address data 19.11.2020).
- 167. *Karhausen L.R.* The poverty of Popperian epidemiology // Int. J. Epidemiol. 1995. V. 24. № 5. P. 869–874. https://doi.org/10.1093/ije/24.5.869
- 168. Susser M. Falsification, verification and causal inference in epidemiology: reconsiderations in the light of sir Karl Popper's philosophy // Causal Inference / Ed. K.J. Rothman. Chestnut Hill, MS: Epidemiologic Resources, 1988. P. 33–57.
- 169. *Jacobsen M.* Inference in Epidemiology // Causal Inference / Ed. K.J. Rothman. Chestnut Hill, MS: Epidemiologic Resources, 1988. P. 105–117.
- 170. *Frost W.H.* Risk of persons in familial contact with pulmonary tuberculosis // Am. J. Public Health Nations Health. 1933. V. 23. № 5. P. 426–432. https://doi.org/10.2105/ajph.23.5.426
- 171. *Doll R*. Cohort studies: history of the method. I. Prospective cohort studies // Soz. Praventivmed. 2001. V. 46. № 2. P. 75–86. https://doi.org/10.1007/bf01299724
- 172. Frost W.H. Snow on Cholera: being a reprint of two papers by John Snow, M.D. together with a biographical memoir by B.W. Richardson and an introduction by Wade Hampton Frost, M.D. The Commonwealth Fund. New York, 1936. P. 15.
- 173. *Labarthe D.M., Stallones R.A.* Epidemiologic inference // Causal Inference / Ed. K.J. Rothman. Chestnut Hill, MS: Epidemiologic Resources, 1988. P. 119–129.
- 174. *Maclure M*. Popperian refutation in epidemiology // Am. J. Epidemiol. 1985. V. 121. № 3. P. 343–350. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a114005
- 175. *Parascandola M*. Epidemiology: second-rate science? // Public Health Rep. 1998. V. 113. № 4. P. 312–320.
- 176. *Ahlbom A., Norell S.* Introduction to Modern Epidemiology. 2nd Ed. Epidemiology Resources Inc., 1990.
- 177. Susser M., Stein Z. Eras in Epidemiology: The Evolution of Ideas. New York: Oxford University Press, 2009. 368 p.
- 178. Общая эпидемиология с основами доказательной медицины: руководство к практическим занятиям: Учеб. Пособие / Под. ред. В. И. Покровского, Н.И. Брико. 2-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. 496 с. [Base Epidemiology with the Basics of Evidence-Based Medicine: a Guide to Practical Exercises: textbook / Eds V.I. Pokrovsky, N.I. Brico. 2nd ed. Moscow: GEOTAR-Media. 2012. 496 p. (In Russian)]
- 179. Field Epidemiology / Ed. M.B. Gregg. 3rd Ed. Oxford University Press, 2008. 572 p.
- 180. *Toth B*. Why the MRC therapeutic trials committee did not introduce controlled clinical trials // J.R. Soc.

- Med. 2015. V. 108. № 12. P. 499–511. https://doi.org/10.1177/0141076815618891
- 181. Causal Inference / Ed. K.J. Rothman. Epidemiology Resources Inc. Mass., USA, 1988. 207 p.
- 182. *Rothman K.J.* Inferring causal connection habit, faith or logic? // Causal inference / Ed. K.J. Rothman. Epidemiology Resources Inc., Mass., USA, 1988. P. 3–12.
- 183. *Hill A.B.* Reflections on the controlled trial // Ann. Rheum. Dis. 1966. V. 25. № 2. P. 107–113. https://doi.org/10.1136/ard.25.2.107
- 184. *Vandenbroucke J.P.* Observational research, randomised trials, and two views of medical science // PLoS Med. 2008. V. 5. № 3. P. Art. e67. 5 p. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050067
- 185. *Collier R*. Legumes, lemons and streptomycin: a short history of the clinical trial // CMAJ. 2009. V. 180. № 1. P. 23–24. https://doi.org/10.1503/cmaj.081879
- 186. *Boice J.D., Jr.* Ionizing Radiation // Schottenfeld and Fraumeni Cancer Epidemiology and Prevention / Eds D. Schottenfeld and J. F. Fraumeni. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 2006. P. 259–293.
- 187. Susser M. Rational science versus a system of logic // Causal Inference / Ed. K.J. Rothman. Chestnut Hill, MS: Epidemiologic Resources, 1988. P. 189–199.
- 188. *Jacobsen M.* Against Popperized Epidemiology // Int. J. Epidemiol. 1976. V. 5. № 1. P. 9–11. https://doi.org/10.1093/ije/5.1.9
- 189. Schlesinger G.N. There"s a fascination frantic in philosophical fancies / Causal Inference / Ed. K.J. Rothman. Chestnut Hill, MS: Epidemiologic Resources, 1988. P. 165–172.
- 190. *Greenland S.* Induction versus Popper: substance versus semantics // Int. J. Epidemiol. 1998. V. 27. № 4. P. 543–548. https://doi.org/10.1093/ije/27.4.543
- 191. *Ibn Sina* (c. 1012 CE; c. 402 AH). Kitab al-Qanun fi altibb: Translation by A. Tibi, E. Savage-Smith. The James Lind Library. https://www.jameslindlibrary.org/ibn-sina-c-1012-ce-c-402-ah/ (address data 20.11.2020).
- 192. *Мелихов О.Г.* Клинические исследования. 3-е изд. М.: Изд-во Атмосфера, 2013. 200 с. [*Melikhov O.G.* Clinical Researches. 3rd Ed. Moscow: Atmosphere Publishing House, 2013. 200 p. (In Russian)]
- 193. USEPA 2002. A Review of the Reference Dose and Reference Concentration Processes. EPA/630/P-02/002F. Final Report. Washington, DC: Risk Assessment Forum. National Center for Environmental Assessment Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency, 2002. 192 p.
- 194. Framework for the Integration of Human and Animal Data in Chemical Risk Assessment. Technical Report No. 104. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC AISBL). Brussels, 2009. 124 p.
- 195. *Cole P.* The epidemiologist as an expert witness // J. Clin. Epidemiol. 1991. V. 44. Suppl. 1. P. 35S–39S. https://doi.org/10.1016/0895-4356(91)90173-7
- 196. *James R.C.*, *Britt J.K.*, *Halmes N.C.*, *Guzelian P.S.* Evidence-based causation in toxicology: a 10-year retro-

- spective // Hum. Exp. Toxicol. 2015. V. 34. № 12. P. 1245–1252. https://doi.org/10.1177/0960327115601767
- 197. *Franco N.H.* Animal experiments in biomedical research: a historical perspective // Animals (Basel). 2013. V. 3. № 1. P. 238–273. https://doi.org/10.3390/ani3010238
- 198. *Bernard C.* An Introduction to the Study of Experimental Medicine: Translated by H.C. Greene. Henry Schuman inc., 1949. 226 p.
- 199. Zhang F.F., Michaels D.C., Mathema B. et al. Evolution of epidemiologic methods and concepts in selected textbooks of the 20th century // Soz. Praventivmed. 2004. V. 49. № 2. P. 97–104. https://doi.org/10.1007/s00038-004-3117-8
- 200. Greenwood M., Hill A.B., Topley W.W.C., Wilson J. Experimental Epidemiology. Medical Research Council Special Report Series No 209, London: His Majesty's Stationery Office, 1936. 221 p. https://www.gwern.net/docs/genetics/selection/1936-greenwood-experimentalepidemiology.pdf (address data 23.11.2020).
- 201. *Parascandola M.* Two approaches to etiology: the debate over smoking and lung cancer in the 1950s // Endeavour. 2004. V. 28. № 2. P. 81–86. https://doi.org/10.1016/j.endeavour.2004.02.003
- 202. *Hinshaw H.C., Feldman W.H.* Evaluation of chemotherapeutic agents in clinical trials: a suggested procedure // Am. Rev. Tubercul. 1944. V. 50. P. 202–213.
- 203. *Vandenbroucke J.P.* A short note on the history of the randomized controlled trial // J. Chronic Dis. 1987. V. 40. № 10. P. 985–987. https://doi.org/10.1016/0021-9681(87)90149-4
- 204. *Attarwala H*. TGN1412: from discovery to disaster // J. Young Pharm. 2010. V. 2. № 3. P. 332–336. https://doi.org/10.4103/0975-1483.66810
- 205. Panoskaltsis N., McCarthy N.E., Stagg A.J. et al. Immune reconstitution and clinical recovery following anti-CD28 antibody (TGN1412)-induced cytokine storm // Cancer Immunol. Immunother. 2020. V. 8. P. 1–16. https://doi.org/10.1007/s00262-020-02725-2
- 206. Sandilands G.P., Wilson M., Huser C. et al. Were monocytes responsible for initiating the cytokine storm in the TGN1412 clinical trial tragedy? // Clin. Exp. Immunol. 2010. V. 162. № 3. P. 516–527. https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04264.x
- 207. *Wadman M*. London's disastrous drug trial has serious side effects for research // Nature. 2006. V. 40. № 7083. P. 388–389. https://doi.org/10.1038/440388a
- 208. *Nguyen T.K.*, *Nguyen E.K.*, *Warner A. et al.* Failed randomized clinical trials in Radiation Oncology: what can we learn? // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2018. V. 101. № 5. P. 1018–1024. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2018.04.030
- 209. National Lung Screening Trial Research Team, Aberle D.R., Adams A.M., Berg C.D. et al. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening // N. Engl. J. Med. 2011. V. 365. № 5. P. 395–409. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1102873

- 210. Santos I., Cantista P., Vasconcelos C. Balneotherapy in rheumatoid arthritis a systematic review // Int. J. Biometeorol. 2016. V. 60. № 8. P. 1287—12301. https://doi.org/10.1007/s00484-015-1108-5
- 211. Reissfelder C., Timke C., Schmitz-Winnenthal H. et al.
 A randomized controlled trial to investigate the influence of low dose radiotherapy on immune stimulatory effects in liver metastases of colorectal cancer // BMC Cancer. 2011. V. 11: Art. 419.
 https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-419
- 212. *Shibamoto Y., Nakamura H.* Overview of biological, epidemiological, and clinical evidence of radiation hormesis // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. № 8. Art. 2387. 16 p. https://doi.org/10.3390/ijms19082387
- 213. *Altman D.G.* Randomisation. Essential for reducing bias // Brit. Med. J. 1991. V. 302. № 6791. P. 1481–1482. https://doi.org/10.1136/bmj.302.6791.1481
- 214. IARC 2012. Radiation. A review of human carcinogens. V. 100 D. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France, 2012. 341 p.
- 215. FDA 2015. Product Development Under the Animal Rule. Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). Animal Rule, 2015. 54 p.
- 216. Селезнева А.И., Макарова М.Н., Рыбакова А.В. Методы рандомизации животных в эксперименте // Междунар. вестн. ветеринарии. 2014. № 2. С. 84—89. [Selezneva A.I., Makarova M.N., Rybakova A.V. Randomization of experimental animals // Int. Veterinar. Gazette. 2014. № 2. P. 84—89. (In Russian. Engl. abstr.)]
- 217. *Hirst J.A.*, *Howick J.*, *Aronson J.K. et al.* The need for randomization in animal trials: an overview of systematic reviews // PLoS One. 2014. V. 9. № 6. Article e98856. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098856
- 218. *Ioannidis J.P., Haidich A.B., Pappa M. et al.* Comparison of evidence of treatment effects in randomized and nonrandomized studies // J. Am. Med. Assoc. 2001. V. 286. № 7. P. 821–30. https://doi.org/10.1001/jama.286.7.821
- 219. Odgaard-Jensen J., Vist G.E., Timmer A. et al. Randomisation to protect against selection bias in healthcare trials // Cochrane Database Syst. Rev. 2011. № 4. Article № MR000012. 58 p. https://doi.org/10.1002/14651858.MR000012.pub3
- 220. Kunz R., Oxman A.D. The upredictability paradox: review of empirical comparisons of randomised and non-randomised clinical trials // Br. Med. J. 1998. V. 317. № 7167. P. 1185–1190. https://doi.org/10.1136/bmj.317.7167.1185
- 221. Schulz K.F., Chalmers I., Altman D.G. et al. "Allocation concealment": the evolution and adoption of a methodological term // J. R. Soc. Med. 2018. V. 111. № 6. P. 216–224. https://doi.org/10.1177/0141076818776604

- 222. *Sollmann T.* Experimental therapeutics // J. Am. Med. Assoc. 1912. V. 58. № 4. P. 242–244. https://doi.org/10.1001/jama.1912.04260010244004
- 223. USEPA 1995. U.S. Environmental Protection Agency. Final Water Quality Guidance for the Great Lakes System Rules and Regulations // Authenticated US Government Information. Federal Register. 1995. V. 60. №. 56. P. 15366—15425. Supply: https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/1995_water_quality_guidance_for_great_lakes_sid.pdf (adress data 21.11.2020).
- 224. *Meek M.E., Boobis A., Cote I. et al.* New developments in the evolution and application of the WHO/IPCS framework on mode of action/species concordance analysis // J. Appl. Toxicol. 2014. V. 34. № 1. P. 1–18. https://doi.org/10.1002/jat.2949
- 225. Hollingsworth J.G., Lasker E.G. The Case against differential diagnosis: Daubert, medical causation. Testimony, and the scientific method // J. Health Law. 2004. V. 37. № 1. P. 85–111.
- 226. Evans J.S., Abrahamson S., Bender M.A. et al. Health effects models for nuclear power-plant accident consequence analysis. Part I: Introduction, integration, and summary // U.S. Nuclear Regulatory Commission (NRC). NUREG/CR-4214. Rev. 2, TRI-141. 1993. 156 p. https://www.nrc.gov/docs/ML0500/ML050030192.pdf (address data 22.11.2020).
- 227. Statkiewicz Sherer M.A., Visconti P.J., Ritenour E.R. Radiation Protection in Medical Radiography. 6th ed. St. Louis, MO: Mosby Elsevier, 2011. 383 p.
- 228. Heller C.G. Effects on the germinal epithelium // Radiobiological Factors in Manned Space Flight / Ed. W.H. Langham. NRC Publication 1487. Washington, DC, National Academy of Sciences, National Research Council, 1967. P. 124–133.
- 229. Rowley M.J., Leach D.R., Warner G.A., Heller C.G. Effect of graded doses of ionizing radiation on the human testis // Radiat. Res. 1974. V. 59. № 3. P. 665–678. https://doi.org/10.2307/3574084
- 230. *Clifton D.K.*, *Bremner W.J.* The effect of testicular X-irradiation on spermatogenesis in man. A comparison with the mouse // J. Androl. 1983. V. 4. № 6. P. 387—392. https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1983.tb00765.x
- 231. Advisory Committee on Human Radiation Experiments (ACHRE) USA. Final Report. Washington: U.S. Government Printing Office, 1995. 929 p. https://bioethicsarchive.georgetown.edu/achre/final/report.html (address data 22.11.2020).
- 232. *Singh V.K.*, *Ducey E.J*, *Brown D.S.*, *Whitnall M.H.* A review of radiation countermeasure work ongoing at the Armed Forces Radiobiology Research Institute // Int. J. Radiat. Biol. 2012. V. 88. № 4. P. 296—310. https://doi.org/10.3109/09553002.2012.652726
- 233. Singh V.K., Newman V.L., Berg A.N., MacVittie T.J. Animal models for acute radiation syndrome drug discovery // Exp. Opin. Drug Discov. 2015. V. 10. № 5. P. 497–517. https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1023290
- 234. Singh V.K., Seed T.M. A review of radiation countermeasures focusing on injury-specific medicinals and

- regulatory approval status: part I. Radiation sub-syndromes, animal models and FDA-approved countermeasures // Int. J. Radiat. Biol. 2017. V. 93. № 9. P. 851–869.
- https://doi.org/10.1080/09553002.2017.1332438
- 235. Singh V.K., Olabisi A.O. Nonhuman primates as models for the discovery and development of radiation countermeasures // Exp. Opin. Drug Discov. 2017. V. 12. № 7. P. 695–709. https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1323863
- 236. *Gray G.M.*, *Steven B.*, *Gail C. et al.* The Annapolis accords on the use of toxicology in risk assessment and decision-making: an Annapolis center workshop report // Toxicol. Meth. 2001. V. 11. № 3. P. 225–231. https://doi.org/10.1080/105172301316871626
- 237. Seed J., Carney E.W., Corley R.A. et al. Overview: using mode of action and life stage information to evaluate the human relevance of animal toxicity data // Crit. Rev. Toxicol. 2005. V. 35. № 8–9. P. 663–672. https://doi.org/10.1080/10408440591007133
- 238. *Good I.J.* Weight of evidence, corroboration, explanatory power,information, and the utility of experiments // J. Royal Stat. Soc. Series B: Methodological. 1960. V. 22. № 2. P. 319—331. https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1960.tb00378.x
- 239. Ecological Causal Assessment / Eds S.B. Norton, S.M. Cormier, Glenn W. Suter II. U.S. Environmental Protection Agency. Cincinnati, OH, USA: CRC Press, 2015. 497 p.
- 240. NCRP. Report No 150. Extrapolation of radiation-induced cancer risks from nonhuman experimental systems to humans. National Council on Radiation Protection and Measurements, 2005. 280 p.
- ICRP Publication 103. The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. Annals of the ICRP / Ed. J. Valentin. Amsterdam—New York: Elsevier, 2007. 329 p.
- 242. *Schep L.J.*, *Slaughter R.J.*, *Temple W.A. et al.* Diethylene glycol poisoning // Clin. Toxicol. (Phila). 2009. V. 47. № 6. P. 525–535. https://doi.org/10.1080/15563650903086444
- 243. *Hajar R*. Animal testing and medicine // Heart Views. 2011. V. 12. № 1. P. 42. https://doi.org/10.4103/1995-705X.81548
- 244. *Ballentine C.* Sulfanilamide disaster. Taste of raspberries, taste of death: the 1937 elixir sulfanilamide incident // FDA Consumer magazine. June 1981 Issue. 5 p. https://www.fda.gov/files/about%20fda/published/The-Sulfanilamide-Disaster.pdf (address data 25.11.2020).
- 245. Animal and human studies addressing health effects // National Research Council. 2005. An Assessment of Potential Health Effects from Exposure to PAVE PAWS Low-Level Phased-Array Radiofrequency Energy. Washington, DC: The National Academies Press, 2005. 214 p. https://doi.org/10.17226/11205. https://www.nap.edu/catalog/11205/an-assessmentof-potential-health-effects-from-exposure-to-pave-
- 246. USEPA 2016. Framework for Incorporating Human Epidemiologic & Incident Data in Risk Assessments

paws-low-level-phased-array-radiofrequency-energy

- for Pesticides Office of Pesticide Programs" U.S. Environmental Protection Agency, 2016. 51 p.
- 247. Freedman D.A., Zeisel H. From mouse-to-man the quantitative assessment of cancer risks // Stat. Sci. 1988. V. 3. № 1. P. 3–28.
- 248. *Иванов И.В., Ушаков И.Б.* Основные подходы к экстраполяции данных с животных на человека в радиобиологическом эксперименте // Мед. радиология и радиац. безопасность. 2020. Т. 65. № 3. С. 5—12. [*Ivanov I.V., Ushakov I.B.* Basic approaches to the extrapolation of data of animals to human in radiobiological experiment // Med. Radiol. Radiat. Bezopasnost ('Medical Radiology and Radiation Safety'; Moscow). 2020. V. 65. № 3. Р. 5—12. (In Russian. Engl. abstr.)] https://doi.org/10.12737/1024-6177-2020-65-3-5-12
- 249. *Kundi M.* Causality and the interpretation of epidemiologic evidence // Environ. Health Perspect. 2006. V. 114. № 7. P. 969–974. https://doi.org/10.1289/ehp.8297
- 250. Leenaars C.H.C., Kouwenaar C., Stafleu F.R. et al. Animal to human translation: a systematic scoping review of reported concordance rates // J. Transl. Med. 2019. V. 17. Article 223. 22 p. https://doi.org/10.1186/s12967-019-1976-2
- 251. Suter G.W. II, Norton S., Cormier S. The science and philosophy of a method for assessing environmental causes // Hum. Ecol. Risk Assess. 2010. V. 16. №1. P. 19–34. https://doi.org/10.1080/10807030903459254
- 252. Schoeny R., Haber L., Dourson M. Data considerations for regulation of water contaminants // Toxicology. 2006. V. 221. № 2–3. P. 217–224. https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.01.019
- 253. Becker R.A., Patlewicz G., Simon T.W. et al. The adverse outcome pathway for rodent liver tumor promotion by sustained activation of the aryl hydrocarbon receptor // Regul. Toxicol. Pharmacol. 2015. V. 73. № 1. P. 172–190. https://doi.org/10.1016/j.vrtph.2015.06.015
- 254. Lacchetti C., Ioannidis J., Guyatt G. Surprising results of randomized trials // User"s Guides to the Medical Literature. A Manual for Evidence-Based Clinical Practice / Eds G. Guyatt, D. Rennie, M.O. Meade, D.J. Cook. 2nd Ed. JAMA Evidence. The Evidence-Based Medicine Working Group. New York etc.: McGraw Hill Medical, 2008. P. 113–151.
- 255. Hartung T., Luechtefeld T., Maertens A., Kleensang A. Integrated testing strategies for safety assessments // ALTEX. 2013. V. 30. № 1. P. 3–18. https://doi.org/10.14573/altex.2013.1.003
- 256. Non-clinical development: Basic principles. Medicines R&D. Toolbox (online library). The European Patients' Academy on Therapeutic Innovation (EUPATI): Patient Engagement Through Education. National Platforms. https://toolbox.eupati.eu/resources/non-clinical-development-basic-principles/ (address data 27.11.2020).
- 257. Environmental Health Risk Assessment. Guidelines for assessing human health risks from environmental hazards // Department of Health and Ageing and en-Health Council. Population Health Division. Publication Distribution Officer, 2002. 258 p.

- 258. *Crump K.S.*, *Chen C.*, *Louis T.A.* The future use of in vitro data in risk assessment to set human exposure standards: challenging problems and familiar solutions // Environ. Health Perspect. 2010. V. 118. № 10. P. 1350—1354. https://doi.org/10.1289/ehp.1001931
- 259. *Romeo D., Salieri B., Hischier R. et al.* An integrated pathway based on *in vitro* data for the human hazard assessment of nanomaterials // Environ. Int. 2020. V. 137. Article 105505. 12 p. https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105505
- 260. *Kirkland D., Aardema M., Henderson L., Müller L.* Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity // Mutat. Res. 2005. V. 584. № 1–2. P. 1–256.
 - https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.02.004
- 261. *Kirkland D., Aardema M., Muler L., Makoto H.* Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens II. Further analysis of mammalian cell results, relative predictivity and tumour profiles // Mutat. Res. 2006. V. 608. № 1. P. 29–42. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.04.017
- 262. *Kirkland D., Speit G.* Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo* // Mutat. Res. 2008. V. 654. № 2. P. 114–132. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.05.002
- 263. Andersen H. History and philosophy of modern epidemiology. Based on a talk delivered at the &HPS Conference, Pittsburgh, October 2007. http://philsci-archive.pitt.edu/4159/ (дата обращения 28.11.2020).
- 264. Weed D.L. Analogy in causal inference: rethinking Austin Bradford Hill's neglected consideration // Ann. Epidemiol. 2018. V. 8. № 5. P. 343–346. https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2018.03.004
- 265. Russo F., Williamson J. Interpreting causality in the health sciences // Int. Stud. Philos. Sci. 2007. V. 21. № 2. P. 157–170. https://doi.org/10.1080/02698590701498084
- 266. Lowell R.B., Culp J.M., Dube M.G. A weight-of-evidence approach for Northern river risk assessment: integrating the effects of multiple stressors // Environ. Toxicol. Chem. 2000. V. 19. № 4. P. 1182–1190. https://doi.org/10.1002/etc.5620190452
- 267. IARC 2006. International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Preamble. Lyon, France, 2006. 27 p.
- 268. *Pai M.* Fundamentals of Epidemiology. Lections. Montreal, Canada: McGill University, 2014. https://www.teachepi.org/courses/fundamentals-of-epidemiology/ (address data 28.11.2020).
- 269. Boobis A.R., Doe J.E., Heinrich-Hirsch B. et al. IPCS framework for analyzing the relevance of a noncancer mode of action for humans // Crit. Rev. Toxicol. 2008. V. 38. № 2. P. 87–96. https://doi.org/10.1080/10408440701749421

- 270. Becker R.A., Ankley G.T., Edwards S.W. et al. Increasing scientific confidence in adverse outcome pathways: application of tailored Bradford-Hill considerations for evaluating Weight of Evidence // Regul. Toxicol. Pharmacol. 2015. V. 72. № 3. P. 514–537. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.04.004
- 271. *Guess H.A.* Premarketing applications of pharmacoepidemiology // Pharmacoepidemiology / Ed. B.L. Strom. 3rd ed. Baffins Lane, Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2000. P. 449–462.
- 272. *Weed D.L.* Causal criteria and Popperian refutation // Causal Inference / Ed. K.J. Rothman. Chestnut Hill, MS: Epidemiologic Resources, 1988. P. 15–32.
- 273. *Rothman K.* Modern Epidemiology. 1st ed. Boston: Little Brown MA., 1986. 358 p.
- 274. *Kleinberg S., Hripcsak G.* A review of causal inference for biomedical informatics // J. Biomed. Inform. 2011. V. 44. P. 1102–1112. https://doi.org/10.1016/j.jbi.2011.07.001
- 275. Lucas R.M., McMichael A.J. Association or causation: evaluating links between "environment and disease" // Bull. World Health Organ. 2005. V. 83. № 10. P. 792—795. https://doi.org/10.1590/s0042-96862005001000017
- 276. NCRP 1994. Science and judgment in risk assessment // National Research Council. Washington, DC: National Academy Press, 1994. 672 p. https://doi.org/10.17226/2125
- 277. Shleien B., Ruttenber A.J., Sage M. Epidemiologic studies of cancer in populations near nuclear facilities // Health Phys., 1991. V. 61. № 6. P. 699–713. https://doi.org/10.1097/00004032-199112000-00001
- 278. Wakeford R., Antell B.A., Leigh W.J. A review of probability of causation and its use in a compensation scheme for nuclear industry workers in the United Kingdom // Health Phys. 1998, V. 74. № 1. P. 1–9. https://doi.org/10.1097/00004032-199801000-00001
- 279. *Wakeford R*. Association and causation in epidemiology half a century since the publication of Bradford Hill's interpretational guidance // J. R. Soc. Med. 2015.V. 108. № 1. P. 4–6. https://doi.org/10.1177/0141076814562713
- 280. Fairlie I. Commentary: childhood cancer near nuclear power stations // Environ. Health. 2009. V. 8. Art. 43. 12 p. https://doi.org/10.1186/1476-069X-8-43
- 281. *Martinez-Betancur O*. Causal judgment by Sir Austin Bradford Hill criteria: leukemias and radiation // Revista de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia. 2010. V. 58. № 3. P. 236–249.
- 282. *Ulsh B.A.* The new radiobiology: returning to our roots // Dose Response. 2012. V. 10. № 4. P. 593–609. https://doi.org/10.2203/dose-response.12-021
- 283. *Jorgensen T.J.* Strange Glow. The Story of Radiation. Princeton and Oxford: Princeton University Press, 2016. 490 p.
- 284. *Иванов Е.П.* Эффекты малых доз. Учебная программа для специальности 1-31 05 03 "Химия высоких энергий". Белорусский государственный университет, 2016. 23 с. [*Ivanov E.P.* Low dose effects. Curriculum for specialty 1-31 05 03 "Chemistry

2021

- of high energies". Belarusian State University, 2016. 23 p. (In Russian)]
- 285. IARC 2010. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, V. 93. Carbon Black, Titanium Dioxide, and Talc. Lyon, France, 2010. 466 p.
- 286. Faustman E.M., Gohlke J.M., Ponce R.A. et al. Experimental approaches to evaluate mechanisms of developmental toxicity // Handbook of Developmental
- Toxicology / Ed. R.D. Hood. New York: CRC Press, 1997. P. 13–41.
- 287. Cole P. Causality in epidemiology, health policy and law // Environ. Law Rep. 1997. V. 27. № 6. P. 10279—10285.
- 288. *Martin P., Bladier C., Meek B. et al.* Weight of evidence for hazard identification: a critical review of the literature // Environ. Health Perspect. 2018. V. 126. № 7. Art. 076001. 15 p. https://doi.org/10.1289/EHP3067

Causal Criteria in Medical and Biological Disciplines: History, Essence and Radiation Aspect. Report 3, Part 2: Last Four Hill's Criteria: Use and Limitations

A. N. Koterov^{a,#}

^a A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia [#]E-mail: govorilga@inbox.ru

Report 3 is devoted to the history, nature and limitations of the epidemiological criteria of causation ("Hill's criteria"). Based on material from the original publications of leading researchers of causality (A.B. Hill., M.W. Susser, K. Rothman and others; 1950s – 2019), from dozens of modern textbooks on epidemiology and carcinogenesis, from documents of international and internationally recognized organizations (UNSCEAR, BEIR, USEPA, IARC, etc.), as well as from many other sources, in part 2 of the report, the last four Hill criteria are considered: biological plausibility, coherence with current facts and theoretical knowledge, experimental and analogy. The theoretical and practical aspects for each criterion are presented: history of appearance, terminology, philosophical and epidemiological essence, applicability in various disciplines and limitations. Factual examples are provided for each of the criteria, including data from Radiation Epidemiology and Radiation Medicine.

Keywords: criteria for causality, the Hill criteria, biological plausibility, coherence, experimental and analogy

КЛЕТОЧНАЯ РАДИОБИОЛОГИЯ

УЛК 576.356:575.224:582.282.23:614.875

ВЫЖИВАЕМОСТЬ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК РАЗНОГО ГЕНОТИПА ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ УФ-СВЕТА

© 2021 г. Е. С. Евстратова¹, В. Г. Королев², В. Г. Петин³, М. С. Толкаева^{3,*}

¹ Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Минздрава России, Обнинск, Россия ² Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра Курчатовский институт, Гатчина, Россия ³ Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии Минздрава России, Обнинск, Россия

*E-mail: marya.tolkaeva@yandex.ru Поступила в редакцию 10.04.2021 г. После доработки 07.08.2021 г. Принята к публикации 01.09.2021 г.

Изучение закономерностей проявления генетической нестабильности клеток после лействия УФизлучения является актуальной задачей, поскольку этот эффект может предшествовать онкологическим заболеваниям. В работе представлены новые экспериментальные результаты, связанные с выживаемостью и генетической нестабильностью гаплоидных и диплоидных дрожжевых клеток Saccharomyces cerevisiae дикого типа и УФ-чувствительных мутантов, выживших после воздействия 254 нм УФ-излучения. Зависимость выживаемости клеток от плотности потока энергии УФ-излучения для гаплоидного штамма дикого типа была сигмоидной и экспоненциальной для чувствительных к УФ-излучению штаммов. Форма кривых выживаемости для диплоидных штаммов дикого типа также была сигмоидной, в то время как гомозиготные диплоидные мутанты, чувствительные к УФ-излучению, демонстрировали как экспоненциальные, так и сигмоилные кривые выживаемости, которые всегда были более чувствительными, чем их родительские штаммы. Генетическую нестабильность определяли по задержке формирования колоний клетками, выжившими после УФ-облучения. Показано, что этот эффект хорошо выражен и достигает 100% для диплоидных клеток как дикого типа, так и чувствительных мутантов, дефектных по репарации УФ-повреждений. Напротив, гаплоидные клетки показали значительно меньшую генетическую нестабильность (30-50%) независимо от их чувствительности. Сделан вывод, что генетическая нестабильность клеток, количественно оцениваемая задержкой формирования колоний выжившими после облучения клетками, в основном определяется плоидностью клеток, а не формой кривой выживаемости и способностью клеток восстанавливаться от радиационных повреждений, как это утверждалось ранее.

Ключевые слова: УФ-излучение, дрожжевые клетки, генетическая нестабильность, выживаемость, гаплоидные и диплоидные клетки

DOI: 10.31857/S0869803121060035

Люди, как и вся биосфера в целом, постоянно подвергаются действию УФ-излучения как части естественного солнечного электромагнитного излучения. Повышенный фон УФ-излучения, связанный с истощением озонового слоя в стратосфере, представляет собой потенциальную опасность для окружающей среды [1]. Вредное воздействие УФ-излучения может быть синергически усилено его совместным действием с другими факторами окружающей среды [2]. Помимо внешнего облучения от Солнца, наши внутренние органы постоянно подвергаются УФ-облучению в результате излучения Вавилова—Черенко-

ва, когда электроны, возникающие при действии ионизирующих излучений, движутся со скоростью, превышающей скорость света в биологической ткани [3, 4]. Известно, что УФ-воздействие может вызывать мутагенез и канцерогенез, включая развитие меланомы, различных видов рака кожи, а также ускоряет старение и появление морщин [1]. Полагают, что генетическая нестабильность может предшествовать онкологическим заболеваниям [5–7]. Поэтому анализ закономерностей генетической нестабильности клеток, выживших после УФ-излучения, представляется актуальной задачей.

Многие эффекты рассматриваются в качестве тестов генетической нестабильности, включая перестройку генома, злокачественную трансформацию, образование микроядер, хромосомные аберрации, снижение эффективности клонирования, гетерогенность среди потомков облученных клеток [8–10]. Большинство результатов по генетической нестабильности было получено на культивируемых клетках млекопитающих в диплоидном состоянии. Клетки дрожжей, как простейший пример эукариотических клеток, представляют собой модель, пригодную для изучения зависимости генетической нестабильности от плоидности клеток, дозы облучения, способности клеток к репарации [11–13]. Ранее было показано, что генетическая нестабильность, определяемая замедленным формированием колоний клетками, выжившими после у-облучения ("эффект дорастания"), является естественным для диплоидных дрожжевых клеток с сигмодной формой кривых выживаемости, в то время как этот эффект был незначительным или даже не наблюдался для гаплоидных штаммов с экспоненциальными кривыми выживаемости [14–16]. Однако в этих работах были использованы только дикие штаммы дрожжей, а не их радиочувствительные мутанты, неспособные восстанавливаться от радиационных повреждений. Поэтому мы исследовали задержку формирования гаплоидных и диплоидных дрожжевых клеток дикого типа и радиочувствительных мутантов, выживших после облучения γ-квантами и α-частицами [17]. В этой работе показано, что, в отличие от традиционных представлений [14–16], генетическая нестабильность клеток после действия ионизирующих излучений определяется не радиочувствительностью или формой кривых выживаемости, а полностью детерминируется плоидностью клеток независимо от их радиочувствительности после действия излучений с различными ЛПЭ. Аналогичные результаты были получены в наших предварительных исследованиях генетической нестабильности только диплоидных дрожжевых клеток, выживших после облучения УФ-светом [18]. В настоящей работе в параллельных экспериментах мы сравнили эффект замедленного формирования колоний гаплоидными и гомозиготными диплоидными клетками дикого типа и УФ-чувствительными мутантами, выживающими после УФ-облучения. Сравнение генетической нестабильности таких штаммов будет способствовать лучшему пониманию, действительно ли генетическая нестабильность дрожжевых клеток не связана со способностью клеток восстанавливаться от радиационных повреждений, а в большей степени детерминируется плоидностью клеток независимо от их чувствительности к радиационным воздействиям.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования использованы гаплоилные и гомозиготные липлоилные дрожжи Saccharomyces cerevisiae штаммов дикого типа S288C (RAD), T1 (RAD/RAD), XS800 (RAD/RAD) и их чувствительные к УФ-излучению мутанты LMG318 (rad2), T2 (rad2/rad2), XC6 (rad6). XS1956 (rad6/rad6) и 21-LMG-3031 (rad18). XS1924 (rad18/rad18). Штаммы XS800, XS1956 и XS1924 первоначально получены от S. Nakai (Япония), Т1 и Т2 от И.А. Захарова-Гезехуса, S288C и XC6 от В.И. Корогодина, LMG318 и 21-LMG-3031 синтезированы для этой работы В.Г. Королевым. Клетки дрожжей обладают рядом свойств, которые позволяют изучать механизмы различных процессов на молекулярном, субклеточном, клеточном и популяционном уровнях без использования сложных технологий и получать результаты в относительно короткие сроки. Короткий жизненный цикл дрожжей и возможность быстрого получения большого количества клеточных поколений позволяют изучать даже очень редкие явления. Большинство радиобиологических ответов дрожжевых клеток, таких как форма кривой выживаемости, зависимость ОБЭ от ЛПЭ, кислородный эффект, действие радиопротекторов и радиосенсибилизаторов, качественно аналогичны таковым у клеток млекопитающих [19, 20]. Перед облучением клетки инкубировали (термостат ОАО "Смоленское специализированное конструкторско-технологическое бюро систем программного управления" Россия) в течение 4-14 дней при 30° C на полной питательной среде до стационарной стадии роста. Продолжительность культивирования до облучения определяли по прекращению почкования клеток.

Суспензию клеток (10^6 клеток/мл, рН 7.4, 1.5 мл) облучали в открытом кварцевом сосуде бактерицидной лампой (General Electric/США), которая испускала преимущественно УФ-свет с длиной волны 254 нм с плотностью потока энергии 1.5 Bт/м², которая была оценена измерителем той же фирмы. Чтобы избежать фотореактивации, облучение, разведение суспензий и другие процедуры проводили при красном свете, а пострадиационная инкубация клеток происходила в темноте. Сразу после облучения клетки высевали на питательный агар таким образом, чтобы выжившие дрожжевые клетки сформировали 50-200 колоний на чашку. Культуры вырашивали на полной питательной среде (дрожжевой экстракт 1% (МГУ, Laboratory Building "A", Россия), пептон 1% (Химмед, Россия), глюкоза 2% (Химмед, Россия), агар 2% (Химмед, Россия)). Выживаемость клеток рассчитывали отношением числа колоний, сформированных выжившими после облучения клетками, к числу колоний, образованных

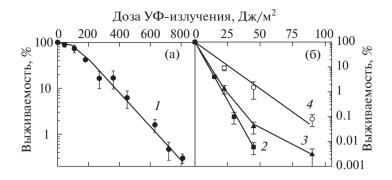


Рис. 1. Зависимость выживаемости от дозы УФ-излучения для гаплоидных дрожжевых клеток дикого типа *S. cerevisiae* и чувствительных к УФ-излучению мутантов: $a - \kappa$ летки дикого типа (кривая I); 6 - rad2, rad6 и rad18 (кривые 2, 3 и 4 соответственно).

Fig. 1. Dependence of cell survival on the dose of UV irradiation for *S. cerevisiae* haploid yeast cells of wild-type (Fig. 1, a, curve *I*) and UV-sensitive mutants: rad2, rad6, and rad18 (Fig. 1, b, curves 2, 3, and 4, respectively).

в контроле. Чтобы количественно оценить эффект замедленного роста клеток, колонии, выросшие в чашках Петри, подсчитывали через 22 ч после посева облученных клеток на питательную среду и в последующие 2-6 ч, пока колонии не переставали появляться. Последний подсчет производился через 4 сут. В качестве теста на генетическую нестабильность использовали процент колоний, образовавшихся позже, чем в контроле. Соответствие такого теста генетической нестабильности ранее было подтверждено рядом факторов – клетки из колоний, сформированных позже контроля, характеризовались повышенной радио- и термочувствительностью, повышенным содержанием морфологически измененных колоний, повышенным содержанием нежизнеспособных клеток, респираторных и рекомбинантных мутантов, а также поддержанием гетерогенности в размерах и морфологии колоний после повторных рассевов клеток из колоний, образованных выжившими после облучения клетками [14, 16]. Каждый опыт повторяли 2—5 раз. Результаты представлены в виде среднего значения и его стандартной ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 показана зависимость выживаемости клеток от дозы УФ-излучения (далее для простоты – кривые выживаемости) для гаплоидных дрожжевых клеток дикого типа (рис. 1, а) и чувствительных к УФ-излучению мутантов (рис. 1, б), использованных в данном исследовании. Видно. что выживаемость штамма дикого типа была сигмоидной, в то время как чувствительные к УФизлучению мутанты характеризуются экспоненциальным уменьшением выживаемости клеток с увеличением дозы УФ-света. Чтобы сравнить УФ-чувствительность различных штаммов, мы рассчитали дозу, которая снижает выживаемость клеток до 1% (ЛД 1%). Табл. 1 включает этот параметр, а также отношение этого параметра для штамма дикого типа и чувствительных к УФ-излучению мутантов, показывая, во сколько раз увеличилась чувствительность гаплоидных му-

Таблица 1. УФ-чувствительность и задержанное формирование колоний гаплоидными дрожжевыми клетками *S. cerevisiae*, выживающими после УФ-облучения

Table 1. UV sensitivity and delayed formation of colonies by haploid S. cerevisiae yeast cells surviving after UV exposure

Штамм	УФ-чувстви- тельный локус	ЛД для 1% выживаемости, Дж/м ²	<u>ЛД 1% (RAD)</u> ЛД 1% (<i>rad</i>)	ЭД ₅₀ , Дж/м ²	<u>ЭД₅₀(RAD)</u> ЭД ₅₀ (rad)
S288C	RAD	800	_	200	_
LMG318	rad2	23	35	13	15.4
XC6	rad6	25	32	36	5.5
21-LMG-3031	<i>rad</i> 18	54	15	24	8.3

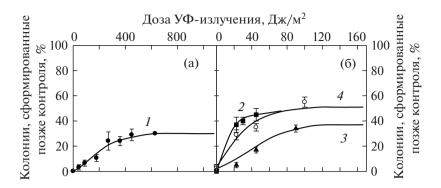


Рис. 2. Зависимость эффекта позднего появления колоний от дозы УФ-излучения для гаплоидных дрожжевых клеток дикого типа *S. cerevisiae* и УФ-чувствительных мутантов: $a - \kappa$ летки дикого типа (кривая 1); 6 - rad2, rad6 и rad18 (кривые 2, 3 и 4 соответственно).

Fig. 2. Dependence of the delayed formation of colonies by *S. cerevisiae* yeast cells surviving after UV irradiation on exposure dose for wild-type haploid yeast cells (Fig. 2, a, curve *I*) and UV-sensitive mutants: rad2, rad6, and rad18 (Fig. 2, b, curves 2, 3, and 4, respectively).

тантов по сравнению с таковой для исходного штамма дикого типа. Видно, что чувствительность штаммов увеличивалась в 35, 32 и 15 раз для мутантных клеток *rad*2, *rad*6 и *rad*18 соответственно.

Наши недавние исследования показали, что наибольший эффект замедленного формирования колоний дрожжевыми клетками различного генотипа, выживавших после воздействия редко-(γ-лучи ⁶⁰Co) и плотноионизирующего излучений (α-частицы ²³⁹Pu), составлял около 30% для гаплоидных клеток и почти 100% для диплоидных клеток [17]. Отметим, что эти параметры не зависели от радиочувствительности клеток и способности клеток восстанавливаться от радиационных повреждений или формы кривых выживаемости. Поэтому было бы интересно сравнить генетическую нестабильность гаплоидных и диплоидных дрожжей разного генотипа с их чувствительностью к УФ-излучению.

На рис. 2 показана зависимость задержки формирования колоний выжившими после УФ-облучения гаплоидными дрожжевыми клетками, кривые выживаемости которых показаны на рис. 1. Видно, что этот эффект увеличивался с дозой УФизлучения до определенного предела, который составлял около 30% для клеток дикого типа и 40— 50% для мутантов, чувствительных к ультрафиолету. Также очевидно, что этот эффект для мутантных клеток проявлялся в области более низких доз, чем для штамма дикого типа. Для количественной оценки эффекта замедленного роста клеток мы использовали эффективную дозу УФизлучения, при которой эффект достигал 50% от максимального значения (ЭД₅₀). Значения этого параметра, а также его отношение для клеток дикого типа и мутантов, чувствительных к УФ-свету, также суммированы в табл. 1. Отношения этих параметров для мутантов *rad*2, *rad*6 и *rad*18 составляли 15.4, 5.5 и 8.3 соответственно.

Аналогичные данные были получены для изогенных диплоидных штаммов дикого типа и их УФ-чувствительных мутантов. На рис. 3 показана зависимость выживаемости клеток от дозы УФизлучения для диплоидных дрожжевых клеток дикого типа и УФ-чувствительных. Видно, что форма кривой выживаемости была экспоненциальной для наиболее чувствительного мутанта rad2/rad2, в то время как кривые выживаемости были сигмоидными для штаммов дикого типа, а также для мутантов rad6/rad6 и rad18/rad18. Табл. 2 включает значения доз УФ-излучения, которые снижают выживаемость клеток до 1%, а также отношение этих доз для штамма дикого типа и УФ-чувствительных, показывая, во сколько раз увеличилась чувствительность диплоидных мутантов по сравнению с чувствительностью клеток дикого типа. Видно, что УФ-чувствительность этих штаммов увеличилась в 10.5, 2.4 и 1.5 раза для мутантных клеток rad2/rad2, rad6/rad6 и rad18/rad18 соответственно. Сравнение этих данных с результатами, приведенными в табл. 1, показывает, что повышенная чувствительность к действию УФсвета диплоидных мутантов была менее выражена, чем для гаплоидных штаммов. Это может быть связано с наличием двойного набора хромосом, что обеспечивает большую надежность этих клеток по сравнению с гаплоидными.

На рис. 4 представлена зависимость задержки формирования колоний выжившими после УФоблучения дрожжевыми клетками *S. cerevisiae* от дозы облучения диплоидных дрожжевых клеток, кривые выживаемости которых приведены на рис. 3. Видно, что этот эффект увеличивался с дозой УФ-излучения до определенного предела, который составлял 100% для клеток как дикого ти-

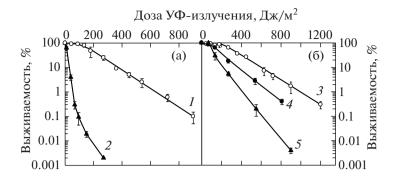


Рис. 3. Зависимость выживаемости от дозы УФ-излучения для диплоидных дрожжевых клеток дикого типа и чувствительных к УФ-излучению штаммов *S. cerevisiae*: а - Т1 (клетки дикого типа, кривая *1*), Т2 (rad2/rad2, кривая *2*); б - XS800 (клетки дикого типа, кривая *3*), XS1956 (rad6/rad6, кривая *4*) и XS1924 (rad18/rad18, кривая *5*).

Fig. 3. Dependence of cell survival on the dose of UV radiation for *S. cerevisiae* diploid yeast cells of various genotypes: strains T1 (RAD/RAD, Fig. 3, a, curve *1*) and T2 (*rad2/rad2*, Fig. 3, a, curve *2*); strains XS800 (RAD/RAD, Fig. 3, b, curve *3*), XS1956 (*rad6/rad6*, curve *4*) and XS1924 (*rad18/rad18*, curve *5*).

па, так и для мутантов, чувствительных к УФ-излучению. Здесь снова, чтобы количественно оценить эффективность эффекта замедленного роста клеток, мы использовали эффективную дозу УФ-излучения, при которой эффект достигал 50% от наибольшего значения (ЭД₅₀). Значения этого параметра, а также его отношение для клеток дикого типа и мутантов, чувствительных к ультрафиолету, также приведены в табл. 2. Видно, что отношения этих параметров для мутантов rad2/rad2, rad6/rad6 и rad18/rad18 составляли 7.4, 2.0 и 2.8. Вновь отметим, что это соотношение в 2-3 раза меньше соответствующих значений для гаплоидных штаммов, что свидетельствует о более высокой надежности клеток с двойным набором хромосом.

ОБСУЖДЕНИЕ

Задержка формирования колоний клетками, выжившими после облучения ионизирующим или УФ-излучением, как и другие отсроченные эффекты, включая хромосомные аберрации, перестройку генома, злокачественную трансформацию, снижение эффективности клонирования, образование микроялер и гетерогенность срели потомства облученных клеток, являются примерами генетической нестабильности выживших после облучения клеток [5-9]. Общими свойствами долгоживущих радиационных эффектов являются передача и сохранение в потомках клеток, выживших после облучения, некоторых субповреждений, неэффективных для инактивации клеток [2, 16]. В данной работе мы оценили эффект задержанного формирования колоний гап-

Таблица 2. УФ-чувствительность и задержанное формирование колоний диплоидными дрожжевыми клетками *S. cerevisiae*, выживающими после УФ-облучения

Table 2. UV sensitivity and delayed formation of colonies by diploid *S. cerevisiae* yeast cells surviving after UV exposure

Штамм	УФ-чувствительный локус	ЛД для 1% выживаемости, $Дж/м^2$	<u>ЛД 1%</u> (<u>RAD/RAD)</u> ЛД 1% (<i>rad/rad</i>)	ЭД ₅₀ , Дж/м ²	<u>ЭД₅₀(RAD/RAD)</u> ЭД ₅₀ (rad/rad)
T1	RAD/RAD	630	_	340	_
T2	rad2/rad2	60	10.5	46	7.4
XS800	RAD/RAD	985	_	310	_
XS1956	rad6/rad6	405	2.4	154	2.0
XS1924	rad18/rad18	645	1.5	110	2.8

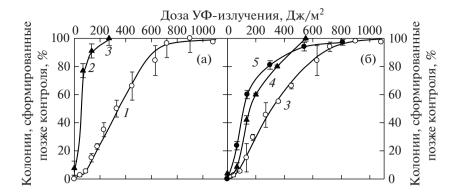


Рис. 4. Зависимость эффекта позднего появления колоний от дозы УФ-излучения для диплоидных дрожжевых клеток дикого типа и чувствительных к УФ-излучению штаммов *S. cerevisiae*: a-T1 (клетки дикого типа, кривая *I*), T2 (rad2/rad2, кривая *2*); 6-XS800 (клетки дикого типа, кривая *3*), XS1956 (rad6/rad6, кривая *4*) и XS1924 (rad18/rad18, кривая *5*).

Fig. 4. Dependence of the delayed formation of colonies by *S. cerevisiae* yeast cells surviving after UV irradiation on the exposure dose for diploid yeast cells of wild-type and UV sensitive mutants: T1 (RAD/RAD, Fig. 4, a, curve *I*), T2 (rad2/rad2, Fig. 4, a, curve *2*); XS800 (RAD/RAD, Fig. 4, b, curve *3*), XS1956 (*rad6/rad6*, Fig. 4, b, curve *4*) and XS1924 (*rad*18/*rad*18, Fig. 4, b, curve *5*).

лоидными и диплоидными дрожжевыми клетками S. cerevisiae дикого типа и УФ-чувствительными мутантами, выживающими после облучения. Полученные данные показывают, что УФ-индуцированная задержка образования колоний облученными клетками менее выражена для гаплоидных (30-50%), чем для диплоидных (100%)клеток независимо от их радиочувствительности, способности клеток восстанавливаться от УФиндуцированных повреждений и формы кривых выживаемости. Это означает, что анализируемый здесь эффект строго определяется плоидностью клеток, а не формой кривых выживания или способностью клеток восстанавливаться после повреждений, вызванных УФ-излучением. Отметим, что такой же эффект наблюдался у гаплоидных и диплоидных дрожжей S. cerevisiae дикого типа и радиочувствительных к ионизирующему излучению мутантов, выживших после облучения у-квантами или α-частицами [17]. В этом случае наибольшая задержка формирования колоний выжившими после облучения клеткам составляла только 20% для гаплоидных клеток, но достигала 100% для диплоидных штаммов независимо от их радиочувствительности и способности клеток восстанавливаться от радиационных повреждений. Эти данные показывают, что генетическая нестабильность дрожжевых клеток независимо от типа радиационного воздействия в значительной степени определяется количеством наборов хромосом, а не экспоненциальной или сигмовидной формой кривых выживаемости и способностью клеток восстанавливаться от радиационных повреждений.

Хотя биологические эффекты, связанные с индуцированной радиацией генетической неста-

бильностью, широко обсуждаются в литературе, природа событий, которые инициируют и сохраняют нестабильность в потомстве облученных клеток, все еще остается неясной. Было предложено множество механизмов, как радиационное воздействие может вызывать генетическую нестабильность [5–13]. В этих работах активно исследовалась роль повреждений и репараций ДНК в генетической нестабильности. Отмечается, что митотическая рекомбинация, инициация двойного разрыва ДНК, мутации и ошибки репарации ДНК могут быть ответственны за геномную нестабильность. Основным новым результатом нашей работы является то, что отсроченное формирование колоний дрожжевыми клетками, выжившими после УФ-излучения, в основном определяется плоидностью клеток, а не формой кривой выживаемости и способностью клеток восстанавливаться от радиационных повреждений, как это постулировалось ранее [14–16]. Аналогичный вывод был сформулирован в нашей работе с ионизирующими излучениями разного качества [17]. Несомненно, что эти закономерности проявления генетической нестабильности также должны быть связаны с повреждениями, но не репарацией ДНК, например, с некоторыми хромосомными аберрациями, которые смертельны в большей степени для гаплоидных, а не для диплоидных дрожжевых клеток, которые более надежны из-за двойного набора хромосом. Анализ штаммов почкующихся дрожжей показал, что все штаммы с анеуплоидией проявляют различные формы геномной нестабильности [13]. На дрожжах Pichia pinus было показано, что клетки, потерявшие одну или несколько хромосом, формируют колонии на питательной среде позже контроля [16, 22]. Можно до-

пустить, что механизм генетической нестабильности, наблюдавшийся в данном исследовании, может быть связан с образованием некоторых хромосомных аберраций, например, делеций, летальные последствия которых в большей степени должны проявляться для гаплоидных, а не диплоидных клеток. Наоборот, задержка деления выживших после облучения клеток должна проявляться в большей степени для диплоидных, а не гаплоидных клеток. Именно такие делеции, не связанные с формой кривой выживаемости и способностью клеток восстанавливаться от радиационных повреждений, могли приводить к замедленному делению выживших после облучения клеток и соответственно к задержке формирования колоний облученными клетками.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Castellani A. Research in Photobiology. Springer Science & Business Media, 2012. 776 p.
- 2. *Petin V.G.*, *Kim J.K.* Synergistic Interaction and Cell Responses to Environmental Factors. New York: Nova Sciences Publisher, 2016, 337 p.
- 3. *Morozov I.I.*, *Myasnik M.N*. The relationship between the phenomenon of photoreactivation in *Escherichia coli* following ionizing radiation and the Čerenkov emission // Radiat. Res. 1980. V. 82. P. 336–341.
- Петин В.Г., Морозов И.И. Синергетика факторов окружающей среды. М.: ГЕОС, 2015. 249 с. [Petin V.G., Morozov I.I. Sinergetica factorov okruzhayushchej sredy. M.: GEOS, 248 s. (In Russian)]
- 5. *Мазурик В.К., Михайлов В.Ф.* Радиационно-индуцируемая нестабильность генома: Феномен, молекулярные механизмы, патогенетическое значение // Радиац. биология. Радиоэкология. 2001. Т. 41. № 3. С. 272—289. [*Mazurik V.K., Michailov V.F.* Radiacionno-inducirovannaya nestabilnost genoma: fenomen, moleculyarnye mechanismy, patogeneticheskoe znachenie // Radiac. biologiya. Radioekologiya. 2001. Т. 41. № 3. S. 272—289 (In Russian)]
- 6. Воробцова И.Е. Трансгенерационная передача радиационно-индуцированной нестабильности генома // Радиац. биология. Радиоэкология. 2006. Т. 46. № 4. С. 441—446. [Vorobcova I.E. Transgeneracionnaya peredacha radiacionno-inducirovannoij nestabilnosti genoma // Radiac. biologiya. Radioekologiya. 2006. Т. 46. № 4. S. 441—446. (In Russian)]
- 7. Shen Z. Genomic instability and cancer: an introduction // J. Mol. Cell Biol. 2011. V. 3. P. 1–3.
- 8. *Marder B.A.*, *Morgan W.F.* Delayed chromosomal instability induced by DNA damage // Mol. Cell. Biol. 1993. V. 13. № 11. P. 6667–6677.
- 9. Little J.B. Radiation-induced genomic instability // Int. J. Radiat. Biol. 1998. V. 74. P. 663–671.
- McMurray M.A., Goltschling D.E. Aging and genetic instability in yeast // Curr. Opin. Microbiol. 2004. V. 7. P. 673–679.
- 11. Yuen K.W.Y., Warren C.D., Chen O., Kwok T., Hieter P., Spencer F.A. Systematic genome instability screens in

- yeast and their potential relevance to cancer // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 3925–3930.
- Skoneczna A., Kaniak A. Skoneczny M. Genetic instability in budding and fission yeast sources and mechanisms // FEMS Microbiol. Rev. 2015. V. 39. P. 917–967.
- Sheltzer J.M., Blank H.M., Pfau S.J. et al. Aneuploidy drives genomic instability in yeast // Sci. 2011. V. 333. P. 1026–1030.
- 14. *Капульцевич Ю.Г., Корогодин В.И., Петин В.Г.* Анализ радиобиологических реакций дрожжевых клеток. І. Кривые выживания и эффект дорастания // Радиобиология. 1972. Т. 12. № 2. С. 267—271. [*Kapultcevich Yu.G., Korogodin V.I., Petin V.G.* Analiz radiobiologicheskih reakcij drozzevyh kletok. І. Krivye vyzhivaniya i effect dorastaniya // Radiobiologiya. 1972. Т. 12. № 2. S. 267—271. (In Russian)]
- 15. *Капульцевич Ю.Г.* Количественные закономерности лучевого поражения клеток. М.: Атомиздат, 1978. 232 с. [*Kapultcevich Yu.G.* Kolichestvennye zakonomernosty luchevogo pora-zheniya kletok. M.: Atomizdat, 1978 (In Russian)]
- Korogodin V.I., Bliznik K.M., Kapul'tsevich Yu.G. et al. Cascade mutagenesis: regularities and mechanisms // Proc. Second Int. N. W. Timofeeff-Ressovsky conf. Dubna: JINR, 2007. V. 1. P. 419–447.
- 17. Evstratova E.S., Petin V.G. The delayed appearance of haploid and homozygous diploid Saccharomyces cerevisiae yeast cells of wild-type and radiosensitive mutants surviving after exposure to gamma rays and alpha particles // J. Radiat. Res. Appl. Sci. 2018. V. 11. № 1. P. 98–103.
- 18. *Евстратова Е.С., Королев В.Г., Петин В.Г.* Задержка образования колоний диплоидными клетками разного генотипа после облучения УФ светом // Генетика. 2019. Т. 55. № 7. С. 832—836. [*Enstratova E.S., Korolyov V.G., Petin V.G.* Zaderzhka obrazovaniya kolonij diploidnymi kletkami raznogo genotypa posle oblucheniya UF svetom // Genetica. 2019. Т. 55. № 7. S. 832—836. (In Russian)]
- 19. *Resnick M.A.*, *Cox B.S.* Yeast as an honorary mammal // Mutat. Res. 2000. V. 451. № 1. P. 1–11.
- 20. *Botstein D., Fink G.R.* Yeast: an experimental organism for 21st century // Genetics. 2011. V. 189. № 3. P. 695–704.
- 21. *Chang W.P., Little J.B.* Evidence that DNA double-strand break initiate the phenotype of delayed reproductive death in Chinese hamster ovary cells // Radiat. Res. 1992. V. 131. № 1. P. 53–59.
- 22. Толсторуков И.И., Близник К.М., Корогодин В.И. Митотическая нестабильность диплоидных клеток дрожжей *Pichia pinus*. Сообщение 1. Спонтанное расщепление // Генетика. 1979. V. 15. № 12. P. 2140—2147. [*Tolstorukov I.I., Bliznik K.M., Korogodin V.I.* Mitoticheskaya nestabilnost diploidnych kletok drozzeij Pichia pinus. Soobshchenie 1. Spontannoe rasshcheplenie // Genetika. 1979. T. 15. № 12. S. 2140—2147. (In Russian)]

Survival and Genetic Instability of Yeast Cells of Various Genotypes after UV Irradiation

E. S. Evstratova^a, V. G. Korolev^b, V. G. Petin^c, and M. S. Tolkaeva^{c, #}

^a National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia
 ^b B. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute of National Research Centre "Kurchatov Institute", Gatchina, Russia
 ^c A. Tsyb Medical Radiological Research Center — branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia
 [#] E-mail: marva.tolkaeva@vandex.ru

The study of the genetic instability patterns of cells after exposure to UV radiation is an urgent task, since this effect may precede cancer. New experimental results associated with survival and genetic instability of haploid and diploid *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells of wild-type and UV sensitive mutants surviving after exposure to 254 nm UV light are presented and discussed. The dependence of cell survival on UV light fluence for haploid strain of wild-type was sigmoid and exponential for UV sensitive strains. The shape of the survival curves for diploid wild-type strains was also sigmoid, while homozygous diploid UV sensitive mutants exhibited both exponential and sigmoid survival curves being always more sensitive than their parental strains. Genetic instability was determined by the delayed appearance of clones by cells surviving UV exposure. This effect was shown to be well expressed and attained 100% for diploid both wild-type and mutant cells. On the contrary, haploid cells showed significantly less genetic instability (30–50%) independently of their sensitivity. It is concluded that genetic instability is mainly determined by cell ploidy rather than the cell ability to recover from UV radiation damage and the shape of survival curve as it is conventionally asserted for *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells.

Keywords: ultraviolet radiation, yeast cells, genetic instability, survival, haploid and diploid cells

_____ РАДИАЦИОННАЯ _____ БИОХИМИЯ

УДК 577.1:599.323.4:591.481:591.436:539.1.047:57.084.1

АДАПТАЦИОННАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ КРЕАТИНКИНАЗЫ МОЗГА И ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ОБЩЕГО РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

© 2021 г. Л. С. Нерсесова^{1,*}, М. С. Петросян¹, С. С. Гаспарян¹, М. Г. Газарянц¹, Ж. И. Акопян¹

¹ Институт молекулярной биологии НАН РА, Ереван, Армения

*E-mail: l.nersesova@yahoo.com
Поступила в редакцию 13.08.2020 г.
После доработки 06.07.2021 г.
Принята к публикации 01.09.2021 г.

Адаптация организма к воздействию любого фактора связана с энергетическими затратами. Креатин-креатинкиназная (Кр-КК) система играет ключевую роль в поддержании энергетического и Са-гомеостаза клетки, а также в сохранении структурной и функциональной стабильности митохондрий и, таким образом, способствует адаптации энергетического метаболизма клетки к воздействию стрессорного фактора. Сравнительная оценка адаптационных возможностей КК мозга и печени крыс, подвергнутых воздействию однократного общего рентгеновского излучения, и влияния Кр, как пищевой добавки, на эти изменения на основании анализа динамики пострадиационных изменений уровней активности КК, а также аланин- и аспартат-аминитрансфераз (АСТ и АЛТ), исследованных в сравнительном плане, выявила следующее. Кр-КК система мозга и печени крыс обладает значительной нативной адаптационной пластичностью, которая стимулируется Кр. Динамика пострадиационных изменений уровней активности КК и АСТ печени имеет аналогичный характер, что указывает на совместное участие этих ферментов в пострадиационном адаптивном репрограммировании энергетического обмена митохондрий. Адаптационная пластичность КК имеет тканеспецифический характер, связанный с интенсивностью энергетического обмена и количественным содержанием фермента в ткани. Колебательный характер пострадиационных изменений уровней активности мозговой и печеночной КК-аз во времени может свидетельствовать, с одной стороны, об отдаленных эффектах рентгеновского облучения, с другой стороны — о включении различных пострадиационных механизмов адаптации фермента.

Ключевые слова: рентгеновское облучение, адаптация, активность креатинкиназы, креатин, энергетический метаболизм, мозг, печень, крысы

DOI: 10.31857/S0869803121060084

Адаптация – фундаментальное свойство живого организма, обеспечивающее его непрерывное приспособление к изменяющимся условиям окружающей среды. Наиболее ярко значение адаптации проявляется при повреждении организма. В развитии адаптационных реакций, обычно, прослеживается два этапа: этап срочной, но несовершенной адаптации и последующий этап устойчивой и более совершенной долговременной адаптации. Срочный этап адаптационной реакции возникает непосредственно после начала действия раздражителя и реализуется на основе уже имеющихся ресурсов клетки. Важнейшая черта этого этапа адаптации состоит в том. что организм в это время действует, как правило, на пределе своих функциональных возможностей и далеко не всегда обеспечивает необходимый адаптационный эффект. Вследствие этого наступает этап долговременной адаптации, связанный с более глубокими метаболическими перестройками [1, 2].

Адаптация организма к любому фактору связана с энергетическими затратами: при этом изменяется энергетический метаболизм, увеличивается использование энергетических, информационных и пластических ресурсов [1, 2]. Возникающий дефицит энергоресурсов является сигналом для генетического аппарата клеток, запускающим увеличение образования в них митохондрий, ферментов, что ведет к активизации синтеза белков, нуклеиновых кислот и АТФ. Последнее обеспечивает восстановление и рост энергетического потенциала клеток, а это является основой способности организма к последующим функциональным перестройкам в ходе новых адаптивных реакций в ответ на воздействие факторов внутренней или внешней среды [1, 2].

Как известно, в основе повреждающего действия рентгеновского излучения лежит окислительный стресс (ОС), индуцирующий в клетке адаптивные ответы [3, 4]. Радиация значительно снижает содержание АТФ в клетке вследствие, с

одной стороны, угнетения процессов окислительного фосфорилирования в митохондриях и, с другой стороны, повышения активности АТФ-аз в цитоплазме. На фоне уменьшения усвоения митохондриями глюкозы развиваются следующие адаптивные ответы: репрограммирование митохондриального метаболизма, которое ведет к активации окисления жирных кислот и глутамина через цикл трикарбоновых кислот (ЦТК), что повышает эффективность энергетического обмена; увеличение в митохондриальном дыхании доли несопряженных реакций; увеличение содержания митохондрий за счет их повышенного биогенеза; повышение активности АМФ-активируемой протеинкиназы, участвующей в качестве сигнальной молекулы в компенсаторных изменениях митохондриального энергетического обмена [4]. Креатин-креатинкиназная (Кр-КК) система играет ключевую роль в поддержании энергетического и Са-гомеостаза клетки, а также в сохранении структурной и функциональной целостности митохондрий [5-7] и, таким образом, способствует адаптации клетки к воздействию стрессорного фактора. Регуляция Кр-КК системы осуществляется через АМФ-активируемую протеинкиназу, которая может активироваться как понижением в клетке уровня отношения АТФ/АМФ, так и понижением уровня отношения креатинфосфат/Кр [6]. Таким образом, реакция клетки на опасные для нее внешние воздействия включает мобилизацию Кр-КК системы. Показано, что активация Кр-КК системы и изменения уровня экспрессии КК могут быть ранним индикатором окислительного и биоэнергетического стрессов в клетке [5-7]. Ранее нами показана высокая радиочувствительность КК как к рентгеновскому [8], так и к радиочастотному излучениям [9], а также радиозащитное действие Кр, используемого в качестве пищевой добавки [8]. Целью настоящей работы была сравнительная оценка адаптационных возможностей КК мозга, отличающегося интенсивным энергетическим обменом и высоким содержанием КК, и печени, характеризующейся низким содержанием фермента, но высокой способностью к адаптивному синтезу КК, а также влияния Кр на эти возможности у крыс, подвергнутых различным дозам общего однократного рентгеновского излучения. Кроме того, в сравнении с КК были оценены адаптационные возможности АЛТ и АСТ, которые осуществляют сопряжение аминокислотного и энергетического обменов в метаболоне Кребса, а также являются клиническими маркерами функционального состояния печени, основного органа детоксикации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

В опытах использовано 260 белых беспородных крыс-самцов, массой 180—210 г, которые содержались в стандартных условиях. Общее одно-

кратное облучение крыс проводили в изолированном помещении на рентгеновской установке "РУМ-17" (напряжение 200 кВт, сила тока 20 мА, Сu-Al фильтр; кожно-фокусное расстояние 50 см, мощность дозы облучения 1.78 Гр/мин).

Исходя из рекомендаций БЭК ИМБ НАН РА по использованию в опытах минимального количества животных, представленные результаты являются средними двух и, в одном случае, трех независимых экспериментов. В двух независимых экспериментах первой серии опытов животные в каждом эксперименте были разделены на опытную и контрольную (интактные) группы по восемь особей в каждой. Энзимологические пострадиационные эффекты исследовались на 6-е и 13-е сутки путем отбора на каждый срок из опытных и контрольных групп по 4 крысы (табл. 1).

В двух независимых экспериментах второй серии опытов, посвященной исследованию адаптационных свойств КК после облучения крыс в дозе 4.5 Гр в присутствии и в отсутствие Кр в качестве пищевой добавки, животные получали per os Кр в дозе 1 г/кг веса животного в растворе 0.9%ной глюкозы (способствует усвоению Кр клетками и повышению ее биодоступности [10]), за 2 нед до и 2 нед после облучения. В индивидуальной клетке наряду с поилкой для воды устанавливалась специальная поилка для раствора Кр в 0.9%-ной глюкозе (0.2 г/10 мл), который ежедневно потреблялся в полном объеме. В каждом опыте животные были разделены на четыре группы по 15 крыс в каждой. Первая, опытная группа крыс, получала раствор Кр/глюкоза; группа 2, служащая контролем на растворитель, по аналогичной схеме получала 0.9%-ную глюкозу; группы 3 и 4 служили в качестве облученного и интактного контролей соответственно. Пострадиационные эффекты исследовались на 1-е, 7-е и 15-е сутки путем отбора на каждый срок из опытных и контрольных групп по пять крыс.

В трех независимых экспериментах третьей серии опытов на выживаемость крыс облучали в дозе ЛД $_{70/30}$, равной 6.5 Гр. Животные были разделены на три группы по 12 особей в каждой, соответственно общепринятому протоколу опытов на выживаемость. Крысам первой опытной группы по указанной выше схеме вводили креатин в 0.9%-ном растворе глюкозы; группы 2 и 3 служили в качестве облученного и интактного контролей. На 30-е сутки после облучения в каждом опыте из каждой группы для исследования были отобраны по пять крыс, за исключением группы облученного контроля, в которой выживало по 3-4 крысы. В экстрактах мозга, печени и в сыворотке крови крыс определялись уровни активности КК и содержание Кр. Декапитацию животных проводили на фоне эфирного наркоза. Сыворотку крови получали после ее свертывания путем центрифугирования в рефрижераторной

Таблица 1. Распределение крыс по экспериментальным группам для исследования пострадиационных энзимологических эффектов

Table 1. Distribution of rats to	experimental groups	for the study of post-	-radiation enzvi	nological effects

I серия (2 независимых эксперимента)		II серия (два независимых эксперимента)		III серия (3 независимых эксперимента)	
	группы		группы		группы
3.5 Гр/6-е сутки	1 — облученные (n = 4 × 2)	4.5 Гр/1-е сутки	1) Кр/глюкоза (n = 5 × 2) 2) вода (n = 5 × 2)	6.5 Гр/30-е сутки	
	2 — интактные (n = 4 × 2)		3) глюкоза $(n = 5 \times 2)$ 4) интактные $(n = 5 \times 2)$		
3.5 Гр/13-е сутки	$1 - $ облученные $(n = 4 \times 2)$	4.5 Гр/7-е сутки	1) Кр/глюкоза (n = 5 × 2) 2) вода (n = 5 × 2)		 Кр/глюкоза (n = 5 × 3) облученный контроль (n = 3 + 3 + 4)
	2 — интактные $(n = 4 \times 2)$		3) глюкоза $(n = 5 \times 2)$ 4) интактные $(n = 5 \times 2)$		3) интактные(n = 5 × 3)
		4.5 Гр/15-е сутки	1) Кр/глюкоза (n = 5 × 2) 2) вода (n = 5 × 2) 3) глюкоза (n = 5 × 2) 4) интактные (n = 5 × 2)		

центрифуге при 800 g в течение 20 мин. Мозг и печень отмывали от крови охлажденным физиологическим раствором и гомогенизировали в экстрагирующем буферном растворе с рН 7.2 (0.1 моль/л трис — HCl, 5 ммоль/л дитиотреитола и 1 ммоль/л этилендиаминтетраацетата). Экстракты, полученные после центрифугирования гомогенатов при 23000 g в течение 30 мин, использовали для определения уровней ферментной активности и содержания Кр.

КК активность определяли спектрофотометрически по накоплению продукта реакции креатина [11], а АЛТ и АСТ активность — на основе измерения убыли восстановленного никотинамидадениндинуклеотида в сопряженных реакциях с лактатдегидрогеназой и малатдегидрогеназой соответственно [12]. Ферментную активность выражали в мкмоль/г влажной ткани в минуту для мозга и печени и мкмоль/л в минуту для сыворотки крови. Содержание креатина в мкг/г влажного веса органа и в мкг/мл сыворотки определяли спектрофотометрически согласно модифицированному методу Эннора Розенберга [11]. Исполь-

зованные реагенты: креатин моногидрат, креатинфосфат динатриевая соль (тетрагидрат), АДФ натриевая соль, 1-нафтол, диацетил, дитиотрейтол, ЭДТА фирмы "Sigma Aldrich" (Германия), а также 40%-ная глюкоза (ОАО Ереванская ХФФ) и диагностические наборы ООО "Дельта" (Армения). Для наглядного изображения рассчитанные средние и их стандартные отклонения для уровней активности ферментов и содержания Кр на графиках выражены в % по отношению к контрольному уровню, которым служили соответствующие данные, полученные для интактных животных. Для статистической обработки данных использован пакет SPSS (Statistical Package for Social Science). Характер распределения полученных данных определен методом Колмогорова-Смирнова. Сравнительный анализ проведен с использованием непараметрического теста Манна— Уитни. Различия считались достоверными при $p \le 0.05$. Корреляционный анализ проведен с использованием непараметрического теста Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как известно, окончательное проявление радиационного поражения ферментных молекул *in vivo* зависит от дозы облучения и может растягиваться на дни [13]. Исходя из этого, нами были выбраны различные дозы облучения животных и различные сроки исследования пострадиационных изменений уровней активности ферментов, которые, как известно, связаны не только со структурными повреждениями их молекул, но и с пострадиационным изменением состава биосред ферментов, за счет накопления или утраты в этих средах ингибиторов и активаторов ферментов, а также с включением во времени разных адаптационных механизмов [14, 15].

На рис. 1 представлена диаграмма динамики пострадиационных изменений уровней активности КК в мозге, печени и сыворотке крови крыс, подвергнутых рентгеновскому облучению в дозе 3.5 Гр и исследованых через 6 и 13 дней после лучевого воздействия. Из полученных данных следует, что облучение крыс вызывает разнонаправленные изменения активности ферментов во времени (рис. 1, а, б). В случае КК в мозге на 6-е сутки имеет место достоверное падение уровня активности фермента на 25%, которое к 13-м суткам сменяется повышением его на 25%, а в печени уже на 6-е сутки обнаруживается компенсаторное повышение уровня активности КК на 25%, которое удваивается по отношению к контролю к 13-м суткам. Динамика пострадиационных изменений уровней активности печеночных КК и АСТ имела одинаковый характер и была направлена на компенсаторное повышение активности обоих ферментов, особенно выраженное на 13-е сутки после облучения, что скорее всего связано с участием этих ферментов в адаптивном ответе митохондрий на радиостресс и с включением долгосрочных механизмов адаптации. В отличие от мембраносвязанных АСТ и КК, которые представлены также и в цитоплазме гепатоцитов, АЛТ, в основном, цитоплазматический фермент, с чем, по-видимому, связаны ее большая радиочувствительность и меньшая адаптабельность: как видно из рис. 1, а, б, на 6-е сутки после облучения наблюдается падение уровня активности печеночной АЛТ на 25%, которое к 13-м пострадиационным суткам сменяется лишь тенденцией к восстанавлению до контрольного уровня.

Изменения уровней активности сывороточных ферментов также носили разнонаправленный характер (рис. 1, а, б), однако не корреллировали с изменениями уровней активностей соответствующих ферментов в мозге и печени. Этот факт косвенно может свидетельствовать или о неизменности проницаемости клеточных мембран в этих органах при использованных дозе и способе облучения, а также пострадиационного срока исследования, или о разбалансировании регуля-

торных процессов в результате облучения [16]. На рис. 2 представлены данные по влиянию Кр, в качестве биологической добавки, на динамику изменений уровней активности КК (A) и содержания креатина (Б) в мозге, печени и сыворотке крови крыс на 1-е, 7-е и 15-е сутки после их облучения в дозе 4,5 Гр. Как следует из полученных данных, в первые пострадиационные сутки в мозге крыс контрольных групп 2 и 3, получавших воду и раствор глюкозы, активность КК достоверно падает (на 40-50%), однако в опытной группе крыс, получавших Кр, этот показатель вдвое меньше — 20% (p=0.05). Достоверных изменений уровней активности печеночной и сывороточной КК в этот срок не отмечается.

Развитие пострадиационных эффектов во времени приводит к компенсаторному повышению КК активности как в мозге, так и в печени опытных крыс, но с определенными различиями, связанными, по-видимому, с тканеспецифическими механизмами адаптации. Если на 15-е сутки активность мозговой КК возвращается к нативному контрольному уровню, то в случае печеночной КК повышение уровня активности во времени продолжается. Можно предположить, что резкое повышение активности КК в печени опытных крыс к этому сроку — в 2.5 раза (p = 0.05) — обусловлено действием механизма долгосрочной адаптации, связанной с экспрессией КК, стимулированной не только облучением, но и присутствием Кр-добавки (рис. 2, А, в).

В контрольных группах 2 и 3 наблюдающееся для печеночной КК на 7-е сутки компенсаторное повышение активности фермента, а для мозговой КК — стабилизация на уровне контроля, на 15-е сутки сменяется достоверным снижением активности фермента, причем для КК мозга ниже контрольного. Последнее, по-видимому, связано с истощением нативных адаптационных возможностей Кр-КК системы мозга и печени животных этих контрольных групп. Наблюдаемые небольшие колебания в уровнях активности КК и в содержании Кр в сыворотке крови животных всех групп во все пострадиационные сроки статистически недостоверны (рис. 2, (а) и (б)).

Что касается содержания креатина в мозге и печени, то во все сроки отмечаются всплески его уровня, но они достоверно не отличаются от контрольного уровня, за единичным исключением, касающимся достоверного повышения содержания Кр на 27% в мозге крыс опытной группы 1 в первые пострадиационные сутки (рис. 2, (б), а, 1). Поскольку корреляционный анализ не выявил взаимосвязь между этим повышением и указанным выше падением уровня активности мозговой КК в этой группе крыс (r = 0.017; p = 0.983), можно предположить, что указанное повышенное содержание Кр связано со стимуляцией радиострес-

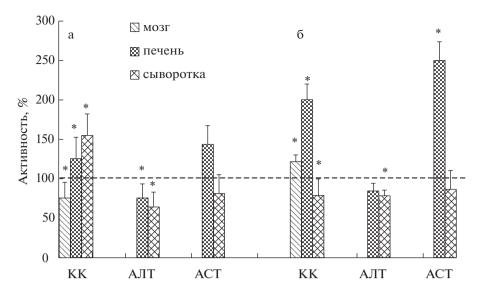


Рис. 1. Динамика пострадиационных изменений уровней активности КК, АЛТ и АСТ в мозге, печени и сыворотке крови крыс после облучения в дозе 3.5 Гр: a-6-е сутки, 6-13-е сутки (n=8 для каждой группы). Пунктирная линия — контрольный уровень, выражающий среднее значение активности КК интактных крыс, принятый за 100%.

* Отличие от контроля достоверно при $p \le 0.05$.

Fig. 1. Dynamics of post-radiation alterations in the activity levels of CK, ALT and AST in the brain, liver, and serum of rats, following their irradiation in the dosage of the 3.5 Gy: a - day 6; b - day 13 (n = 8 for each for each group). Dashed line – the control level, representing the mean value of the CK activity of the intact rats, taken then as 100%. * $p \le 0.05$, compared to the control group.

сом эндогенного синтеза Кр, характерного для отдельных видов клеток мозга [17].

В следующей серии экспериментов были изучены адаптационные возможности КК мозга и печени через 30 дней после облучения в ответ на возможные отдаленные эффекты рентгеновского излучения при облучении крыс в дозе $\Pi \Pi_{70/30}$, равной 6.5 Гр, в присутствии и в отсутствие Кр. При указанной дозе облучения у крыс имеет место развитие лучевой болезни средней тяжести [18], при которой в нашем случае в облученных группах, не получавших Кр, погибло 70% животных. Как следует из рис. 3, (а), (б), в опытной группе 1, животные которой получали Кр в растворе глюкозы, в мозге крыс как активность, так и содержание креатина почти не отличаются от контрольного уровня, что свидетельствует о стабилизации к этому сроку энергетического обмена мозговых клеток. Однако в печени и сыворотке крови как активность КК, так и содержание креатина на 30-й день после облучения остаются все еще повышенными.

Особый интерес представляют данные относительно выживших контрольных облученных крыс (группа 2), не получавших Кр. У этих животных определяются с высокой степенью достоверности повышенный уровень активности мозговой КК (более чем в 2 раза по сравнению с интактными крысами) при нормальном уровне содержания Кр в нем и повышенный уровень активности печеночной КК (на 20% по сравнению с

интактными крысами) при повышенном уровне содержания Кр как в печени (почти на 40% по сравнению с интактными крысами), так и в сыворотке крови, что однозначно свидетельствует о том, что Кр-КК система принимает участие в повышенной природной резистентности этих животных к воздействию ионизирующего излучения за счет компенсаторных изменений активности фермента и эндогенного синтеза Кр в печени, который через кровь переносится ко всем остальным органам. Кроме того, при 2-кратном повышении содержания Кр в сыворотке крови животных этой группы наблюдается примерно равноценное падение уровня активности их сывороточной КК (рис. 3, (a), (b), 2), при высокой степени взаимосвязи изменений этих параметров (r = -0.865; p = 0.05). В качестве спекулятивного объяснения эго факта можно предположить, что в данном случае, в отличие от опытных групп, имеет место известное для КК субстратное торможение избытком Кр [19]. Таким образом, компенсаторные повышения уровней активности КК и содержания Кр в мозге, печени и сыворотке крови в отдельных группах облученных крыс имеют место и на 30-е пострадиационные сутки, которые соответствуют сроку окончания разгара острого лучевого заболевания средней тяжести и начала стабилизации течения болезни.

ОБСУЖДЕНИЕ

Гомеостаз и адаптация — это два конечных результата, которые организуют функциональные

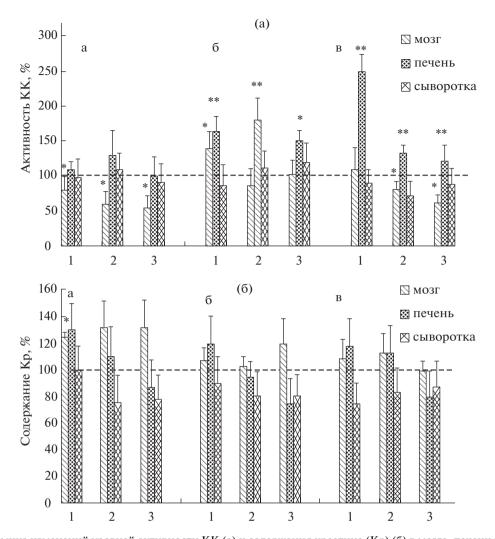


Рис. 2. Динамика изменений уровней активности КК (а) и содержания креатина (Кр) (б) в мозге, печени и сыворотке крови крыс после их облучения в дозе $4.5 \, \Gamma p$ в присутствии и в отсутствие креатина: 1 - Kp/глюкоза, 2 - вода, 3 - глюкоза; а — 1-е сутки, б — 7-е сутки, в — 15-е сутки (n = 10 для каждой группы). Пунктирная линия – контрольный уровень, выражающий среднее значение активности КК интактных крыс, принятый за 100%.

Fig. 2. Dynamics of post-radiation alterations in the CK (a), activity level and the Cr (b) content in the brain, liver, and serum of rats, following their irradiation in the dosage of the 4.5 Gy in the presence, as well as absence of Cr: 1 – Cr/glucose, 2 – water, 3 - glucose Post-radiation periods; a - 1st, b - 7th, c - 15th day (n = 10 for each group).

Dashed line – control level, representing mean value of CK activity of intact rats, taken then as 100%.

* $p \le 0.05$ compared to control; ** $p \le 0.01$ compared to control

системы организма. Влияние внешних факторов на состояние гомеостаза приводит к запуску процесса адаптивной перестройки организма человека, в результате которой функциональные системы компенсируют произведенные и возможные нарушения гомеостаза и восстанавливают равновесие. Ведущие ученые в области биохимической адаптации П. Хочачка [1] и К. Стори [2] выделяют следующие основные категории биохимической адаптации: 1) количественная адаптация, т.е. приспособительные изменения в концентрациях макромолекул; 2) качественная адаптация, когда в ответ на изменения среды в действующую систему включаются новые виды макромолекул; 3) адаптация модуляционного типа — приспособительные изменения активности существующих макромолекул. Биохимическая адаптация этих трех типов, реализующаяся совместно или по отдельности, может быть или компенсаторной, или эксплуативной. Компенсаторные пути биохимической адаптации обеспечивают организму сохранение статус кво и, как правило, имеют место в ответ на воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды, тогда как эксплуативные пути адаптации связаны с эволюционным прогрессом. Немедленная адаптация, так называемая

^{*} Отличие от контроля достоверно при $p \le 0.05$; ** отличие от контроля достоверно при $p \le 0.01$.

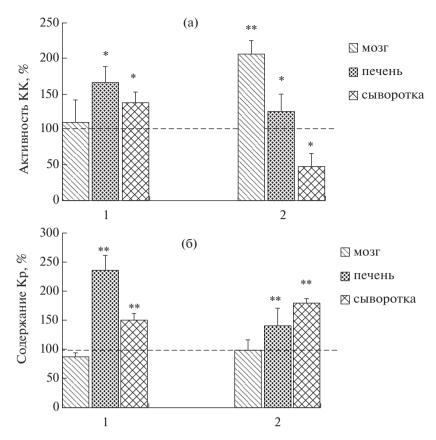


Рис. 3. Активность КК (а) и содержание креатина (Кр) (б) в мозге, печени и сыворотке крыс на 30-е сутки после облучения их в дозе 6.5 Гр в присутствии и в отсутствие Кр: 1 — креатин/глюкоза, 2 — облученный контроль (n = 15 для каждой группы, за исключением группы 2 - n = 10).

Пунктирная линия — контрольный уровень, выражающий среднее значение активности КК интактных крыс, принятый за 100%.

Fig. 3. CK (a) activity and Cr (b) content in the brain, liver, and serum of rats on day 30 after their irradiation in the dosage of 6.5 Gy dosage in the presence, as well as absence of Cr: 1 - Cr/glucose, 2 - irradiated control (n = 15 for each group, except group 2 - n = 10).

Dashed line – control level, representing mean value of CK activity of intact rats, taken then as 100%.

адаптация первой линии защиты, от влияния стресс-факторов окружающей среды, к которым, в частности, относится и ионизирующее излучение (ИИ), происходит быстро путем модуляции активности уже имеющихся ферментов. Со временем на смену этой реакции приходят изменения в экспрессии генов, которые могут иметь как количественный, так и качественный характер. как, например, экспрессия множественных форм одного и того же фермента. Поддержание энергетического гомеостаза клетки и повышение резистентности митохондрий – одно из основных условий защиты клетки от воздействия ИИ, особенно, если принять во внимание новый взгляд на критическую роль митохондрий, наряду с ядром, в развитии радиотоксикоза [3]. В этом смысле оценка адаптационных возможностей Кр-КК системы, которая, как было отмечено выше, играет ключевую роль в поддержании энергетического и Са-гомеостаза клетки, а также в обеспечении структурной и функциональной целостности митохондрий [5, 6] представляет значительный интерес. Анализ полученных данных по динамике пострадиационных изменений активности КК мозга и печени и влиянию Кр, как пищевой добавки, на эти изменения позволяет обсудить нам следующие аспекты адаптационных возможностей Кр-КК системы.

Во-первых, динамика пострадиационных изменений уровней активности КК как мозга, так и печени крыс, индуцированных облучением в дозах 3.5, 4.5 и 6.5 Гр, свидетельствует об их компенсаторно-адаптационной природе, направленной на восстановление энергетического гомеостаза клетки (рис. 1, 2, 3); при этом значительная нативная адаптационная пластичность КК стимулируется в присутствии Кр (рис. 2, 3). Так, падение уровня активности мозговой КК в начальные пострадиационные сутки как в опытной, так и в контрольных группах (рис. 1, 2), связанное скорее

^{*} Отличие от контроля достоверно при $p \le 0.05$; ** отличие от контроля достоверно при $p \le 0.01$.

^{*} $p \le 0.05$ compared to the control; ** $p \le 0.01$ compared to the control.

всего с окислением функционально активных SH-групп фермента [20], сменяется компенсаторным повышением уровня активности фермента в последующие сутки. В присутствии Кр начальное падение активности КК в опытной группе вдвое меньше, а последующее повышение активности вдвое больше, чем в отсутствие Кр (сравните рис. 1 и рис. 2, а). Кроме того, возвращение уровня активности мозговой КК к контрольному уровню к 15-му пострадиационному дню свидетельствует о стабилизации активности фермента к этому сроку, что примерно совпадает с окончанием разгара острой лучевой болезни у крыс при облучении их в сублетальных дозах. Стабилизация уровня активности КК мозга на уровне контроля наблюдается и через 30 дней после облучения в дозе 6.5 Гр, что совпадает со стабилизацией течения лучевой болезни [13]. Особо следует отметить проявление нативной адаптационной пластичности КК в группе контрольных крыс, выживших после облучения в дозе 6.5 Гр (рис. 3, (а), 2): повышенные уровни активности как мозговой, так и печеночной КК, а также содержания Кр в печени, где имеет место синтез эндогенного Кр [6, 21], и в сыворотке крови, через которую Кр переносится к органам [6, 21], несомненно, указывают на участие Кр-КК системы в повышенной адаптации этих животных к воздействию ИИ.

Во-вторых, колебательный характер пострадиационных изменений активности исследованных ферментов во времени свидетельствуют о смене механизмов адаптации в ответ на развитие ОС. Установлено, что колебательные изменения характерны как для уровней активности и экспрессии ферментов, так и изоферментных спектров и кинетических параметров ряда ферментов и, в целом, характерны для пострадиационных биологических эффектов, что, по-видимому, связано с развитием процессов ОС во времени, в том числе с отдаленными эффектами облучения, и с включением на разных пострадиационных этапах различных адаптационных механизмов клетки [7, 22—24].

В-третьих, адаптационная пластичность КК имеет тканеспецифичный характер и зависит, повидимому, от уровня содержания КК в ткани: если в мозге, отличающемся высоким содержанием КК, действуют механизмы как немедленной, так и долгосрочной адаптации, то в печени, отличающейся крайне низким содержанием КК, но высокой способностью к экспрессии фермента в стрессовых ситуациях [25–27], действуют механизмы долгосрочной адаптации, связанные с дополнительным синтезом ферментного белка. В отличие от мозговой КК, активность печеночной КК реагирует на радиостресс с некоторым отставанием, однако компенсаторное повышение уровня активности ее остается во все последую-

щие пострадиационные сроки при всех исследованных дозах облучения.

Значительный интерес представляет и другой выявленный нами факт: динамика пострадиационных изменений уровней активности КК и АСТ, индуцированных рентгеновским излучением, имела одинаковый характер и была направлена на компенсаторное повышение активности обоих ферментов, особенно выраженное на 13-е сутки после облучения, что, скорее всего, связано с участием этих ферментов в адаптивном ответе митохондрий на радиостресс. Показано, что ионизирующая радиация вызывает репрограммирование энергетического обмена митохондрий, направленное на использование в качестве субстратов вместо глюкозы жирных кислот и глютамина [4]. Вовлечение последнего в цикл Кребса, как известно, предполагает его превращение в глутарат, которое катализируеся мит-АСТ; при этом мит-КК обеспечивает транспорт произведенной энергии из митоходрий в цитоплазму и участвует в стабилизации высокопроницаемых пор митохондрий. К сожалению, корреляционный анализ не выявил связи между изменениями уровней активности этих ферментов. На участие КК в адаптивном репрограммировании энергетического обмена митохондрий в ответ на ОС, индуцированный рентгеновским излучением, указывает и возрастание под этим воздействим активности АМФ-активируемой протеинкиназы [4], участвующей в качестве сигнальной молекулы в регуляции активности КК в стрессовых ситуациях [6]. Что касается изменений уровней активности КК в сыворотке крови, то при облучении в сублетальных дозах они достоверно не отличались от контрольного уровня, а повышение активности фермента после облучения в дозе 6.5 Гр может быть связано, с одной стороны, с повышенным поступлением фермента в кровь из различных органов и клеток крови в результате их повышенной физиологической активности или патологических изменений, которые продолжают иметь место к 30-му пострадиационному дню, с другой стороны - с уменьшением скорости деградации циркулирующей КК, которая происходит в печени и ретикулоэндотелиальной системе [19]. Здесь необходимо отметить, что в сыворотке крови отсутствует собственная КК: при минимальной активности в норме основной вклад в пул сывороточной КК вносит мышечная ткань: до 90-94% — это MM изофермент [19]. В заключение следует отметить, что КК принадлежит к числу ферментов, существующих в разных множественных формах: изоферменты, конформеры, посттрансляционные белковые модификации, макромолекулярные комплексы, олигомерные агрегаты и экзотические формы, сопровождающие патологические процессы. Полиморфизм белков может быть результатом полипликации

или дупликации гена, экспрессии семейства гомологичных генов, множественного аллелизма, дифференциального процессинга мРНК, мутационных процессов, посттрансляционных модификаций белка. Именно наличие множественных форм дает возможность тонко регулировать уровень активности КК, что обеспечивает его адаптивную пластичность.

выводы

- 1. Кр-КК система мозга и печени крыс, подвергнутых общему однократному рентгеновскому излучению, обладает значительной адаптационной пластичностью, которая стимулируется Кр, получаемым животными в качестве пищевой добавки.
- 2. В отличие от АЛТ динамика пострадиационных изменений уровней активности КК и АСТ печени облученных крыс имеет аналогичный характер, что указывает на совместное участие этих ферментов в пострадиационном адаптивном репрограммировании энергетического обмена митохондрий, направленном на замещение пирувата глутаратом.
- 3. Адаптивная пластичность KK имеет тканеспецифический характер, обусловленный количественным содержанием фермента в ткани.
- 4. Колебательный характер пострадиационных изменений уровней активности мозговой и печеночной КК во времени свидетельствует, с одной стороны, об отдаленных эффектах облучения на фермент, с другой стороны, о включении различных механизмов адаптации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. М.: Мир, 1988. 568 с. [Khochachka P., Somero Dzh. Biokhimicheskaya adaptatsiya. М.: Mir, 1988. 568 р. (In Russian)]
- 2. Storey K.B., Storey J.M. Biochemical Adaptation to Extreme Environments. Integrative Physiology in the Proteomics and Post-Genomics Age / Ed. W. Walz. Totowa. NJ. Humana Press Inc., 2005. P. 169–197.
- 3. Azzam E.I., Jay-Gerin J.P., Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury // Cancer Lett. 2012. V. 327. № 1–2. P. 48–60.
- 4. *Kim E.J.*, *Lee M.*, *Kim D.Y. et al.* Mechanisms of energy metabolism in skeletal muscle mitochondria following radiation exposure // Cells. 2019. V. 8. № 9. P. 950.
- Schlattner U., Kay L., Tokarska-Schlattner M. Mitochondrial proteolipid complexes of creatine kinase // Subcell. Biochem. 2018. V. 87. P. 365–408.
- Wallimann T., Tokarska-Schlattner M., Schlattner U.
 The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine // Amino Acids. 2011. V. 40. № 5. P. 1271–1296.
- 7. Sersa I., Kranjc S., Sersa G. et al. Study of radiation induced changes of phosphorus metabolism in mice by 31P NMR spectroscopy // Radiol. Oncol. 2010. V. 44. № 3. P. 174–179.

- 8. Нерсесова Л.С., Петросян М.С., Каралова Е.М. и др. Оценка радиомодифицирующего действия креатина на выживаемость, креатин-креатинкиназную систему печени, ядерно-ядрышковый аппарат гепатоцитов и клетки периферической крови крыс // Радиац. биология. Радиоэкология. 2019. Т. 56. № 6. С. 599—609. [Nersesova L.S.. Petrosyan M.S. Karalova E.M. et al. Otsenka radiomodifitsiruyushchego deystviya kreatina na vyzhivayemost. kreatin-kreatinkinaznuyu sistemu pecheni. yaderno-yadryshkovyy apparat gepatotsitov i kletki perifericheskoy krovi krys // Radiat. biol. Radioecol. 2019. V. 56. № 6. Р. 599—609 (In Russian)]
- 9. Петросян М.С., Нерсесова Л.С., Газарянц М.Г. и др. Действие низкоинтенсивного электромагнитного излучения с частотой 900 МГц на активности ферментов, участвующих в энергетическом обмене мозга крыс // Радиац. биология. Радиоэкология. 2015. Т. 55. № 6. С. 1—7. [Petrosyan M.S., Nersesova L.S., Gazaryants M.G. et al. Deystviye nizkointensivnogo elektromagnitnogo izlucheniya s chastotoy 900 МГts na aktivnosti fermentov. uchastvuyushchikh v energeticheskom obmene mozga krys // Radiation biol. Radioecol. 2015. V. 55. № 6. Р. 1—7 (In Russian)]
- Cooke M., Cribb P.J. Ch. 9. Effective nutritional supplement combination // Cooke M., Cribb P.J., Ziegenfuss T., Kalman D.S., Antonio J. Nutritional supplements in sports and exercise. Switzerland: Humana press, 2015. C. 259–319.
- 11. Петрова Т.А., Лызлова С.Н. Оптимизация условий определения активности креатинкиназы колориметрическим методом // Вестн. ЛГУ. 1985. Т. 24. С. 88—90. [Petrova T.A.. Lyzlova S.N. Optimizatsiya usloviy opredeleniya aktivnosti kreatinkinazy kolorimetricheskim metodom // Vestn. LGU. 1985. V. 24. P. 88—90 (In Russian)]
- 12. *Tietz N.W.* Clinical guide to laboratory tests. 3d ed. Saunders Co.: Philadelphia, 1995. 374 p.
- 13. Куценко С.А., Бутомо Н.В., Гребенюк А.Н. и др. Военная токсикология, радиобиология и медицинская защита / Под ред. С.А. Куценко. СПб.: Фолиант, 2004. 528 с. [Kutsenko S.A., Butomo N.V., Grebenyuk A.N. et al. Voyennaya toksikologiya. radiobiologiya i meditsinskaya zashchita / Ed. S.A. Kutsenko. Sankt-Peterburg: Foliant, 2004. 528 p. (In Russian)]
- 14. *Ильичева В.Н., Ушаков Б.Н.* Влияние ионизирующего излучения на энергетический обмен в различных отделах коры головного мозга // Рос. мед. биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. 2013. Т. 1. С. 31—36. [*Ilicheva V.N., Ushakov B.N.* Vliyaniye ioniziruyushchego izlucheniya na energeticheskiy obmen v razlichnykh otdelakh kory golovnogo mozga // I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald. 2013. V. 1. P. 31—36 (In Russian)]
- 15. Collins-Underwood J.R., Zhao W.L, Sharpe J.G., Robbins M.E. NADPH oxidase mediates radiation-induced oxidative stress in rat brain microvascular endothelial cells // Free Radic. Biol. Med. 2008. V. 45. № 6. P. 929–938.
- 16. Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Мальцева Е.Л. Действие сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных физических факторов // Хим. физ. 2003. Т. 22. № 2. С. 21–40. [Burlakova E.B., Konradov A.A., Maltseva E.L. Deystviye sverkhmalykh doz biologicheski aktivnykh veshchestv i

- nizkointensivnykh fizicheskikh faktorov // Rus. J. Phys. Chem. 2003. V. 22. № 2. P. 21–40 (In Russian)]
- 17. Andres R.H., Ducray A.D., Schlattner U. et al. Functions and effects of creatine in the central nervous system // Brain Res. Bull. 2008. V. 76. № 4. P. 329–343.
- 18. Шевцов В.И., Ирьянов Ю.М., Петровская Н.В. и др. Методика моделирования острой лучевой болезни у крыс линии Август // Современные наукоемкие технологии. 2004. № 1. С. 95. [Shevtsov V.I., Irianov Yu.M., Petrovskaya N.V. et al. Metodika modelirovaniya ostroy luchevoy bolezni u krys linii Avgust // Modern High Technol. 2004. № 1. Р. 95 (In Russian)]
- 19. Lyzlova S.N., Stefanov W.E. Phosphagen kinases. Boston: CRC Press, 1991. 240 p.
- 20. *Koufen P., Stark G.* Free radical induced inactivation of creatine kinase: sites of interaction, protection, and recovery // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1501. № 1. P. 44–50.
- 21. Wyss M., Braissant O., Pischel I. et al. Creatine and creatine kinase in health and disease a bright future ahead? // Subcell. Biochem. 2007. V. 46. P. 309—334.
- 22. Reisz J.A., Bansal N., Qian J. et al. Effects of ionizing radiation on biological molecules-mechanisms of damage and emerging methods of detection // Antioxid. Redox. Signal. 2014. V. 21. № 2. P. 260–292.
- 23. Баранцева М.Ю. Сочетанное воздействие химического и радиационного факторов низкой интенсивности на цитогенетические и биохимические реакции организма экспериментальных животных: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М.: Институт медико-биологических проблем РАН. 2007. 26 с.

- [Barantseva M. Yu. Sochetannoye vozdeystviye khimicheskogo i radiatsionnogo faktorov nizkoy intensivnosti na tsitogeneticheskiye i biokhimicheskiye reaktsii organizma eksperimentalnykh zhivotnykh: Abstract of PhD thesis for the med. sci. M.: Institute of Biomedical Problems of RAS, 2007. 26 p. (In Russian)]
- 24. *Аль Меселмани М.А., Евсеев А.В., Солодова Е.К. и др.* Энергетический обмен и морфологические изменения в семенниках после однократного низкодозового радиационного облучения крыс // Обзоры по клин. фармакол. и лек. терапии. 2010. Т. 8. № 4. С. 40–46. [*Al Meselmani M.A., Evseyev A.V., Solodova E.K. et al.* Energeticheskiy obmen i morfologicheskiye izmeneniya v semennikakh posle odnokratnogo nizkodozovogo radiatsionnogo oblucheniya krys // Rev. Clin. Pharm. and Drug Therapy. 2010. V. 8. № 4. Р. 40–46 (In Russian)]
- 25. Auricchio A., Zhou R., Wilson J.M., Glickson J. In vivo detection of gene expression in liver by 31P nuclear magnetic resonance spectroscopy employing creatine kinase as a marker gene // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98 № 9. P. 5205–5210.
- 26. Satoh S., Tanaka A., Hatano E. et al. Energy metabolism and regeneration in transgenic mouse liver expressing creatine kinase after major hepatectomy // Gastroenterology. 1996; V. 110. № 4. P. 1166–1174.
- 27. *Hatano E., Tanaka A., Iwata S. et al.* Induction of endotoxin tolerance in transgenic mouse liver expressing creatine kinase // Hepatology. 1996. V. 24. № 3. P. 663–669.

Adaptation Plasticity of Brain and Liver Creatine Kinases of Rats Exposed to Total X-Ray Irradiation

L. S. Nersesova^{a,#}, M. S. Petrosyan^a, S. S. Gasparyan^a, M. G. Gazaryants^a, and J. I. Akopian^a

^aInstitute of Molecular Biology, National Academie of Sciences of RA, Yerevan, Armenia [#]E-mail: l.nersesoya@vahoo.com

The body's adaptation to the effect of any factor is associated with energy expense. The creatine-creatine kinase (Cr–CK) system plays a crucial role in maintaining the cell energy and Ca-homeostasis, as well as in preserving the structural and functional stability of the mitochondria. Thus, it facilitates the adaptation of the cellular energy metabolism to the potential impacts of the stress factors. The comparative assessment of the adaptive capacities of the rat brain and liver CK exposed to single-dose total irradiation, as well as the influence of Cr as a dietary supplement on the respective changes, based on the analysis of post-radiation alterations of the CK, as well as alanine and aspartate aminotransferases (AST and ALT) activity level dynamics cross-comparatively studied has revealed the following: the Cr-CK system of the rat brain and liver has a significant adaptive native plasticity, which is stimulated by Cr. The dynamics of post-radiation alterations in the activity levels of the liver CK and AST of the irradiated rats is of similar character, which is indicative of some joint engagement of these enzymes in the post-radiation adaptive reprogramming of the mitochondria energy metabolism. The adaptive plasticity of the CK is tissue-specific and relates to the intensity of the energy metabolism and the amount of enzyme in the tissue. The fluctuating nature of post-radiation changes in the brain and liver CK activity levels in time may indicate some delayed effects of X-ray radiation, as well as activation of various post-radiation enzyme adaptation mechanisms.

Keywords: X-ray irradiation, adaptation, creatine kinase activity, creatine, energy metabolism, brain, liver, rats

_ РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ _ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

УДК [57 + 61]::616-006.6:611.24:599.323.4:615.849:539.1.047

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ РАДИОМОДИФИКАТОРА БЕТАЛЕЙКИНА НА РОСТ ОБЛУЧЕННОЙ ПЕРЕВИВНОЙ КАРЦИНОМЫ ЛЬЮИСА У МЫШЕЙ

© 2021 г. Л. М. Рождественский^{1,*}, А. А. Липенгольц^{1,2}, Н. И. Лисина¹, К. Ю. Романова¹

¹ Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия ² Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, Россия

*E-mail: lemrod@mail.ru
Поступила в редакцию 29.10.2020 г.
После доработки 13.07.2021 г.
Принята к публикации 01.09.2021 г.

Проведены четыре серии опытов на мышах C57Bl/6 с локальным R-облучением в дозе 20 Гр перевивной карциномы Льюиса и 2-кратным введением (за сутки до и сразу после облучения) радиомодификатора и иммуномодулятора беталейкина (рекомбинантного человеческого интерлейкина-1β). Оценку влияния препарата на рост опухоли оценивали по критериям длительности задержки роста и скорости роста после его восстановления в сравнении с этими показателями у интактных и контрольных облученных мышей. Введение беталейкина не привело ни к укорочению стадии задержки роста, ни к ускорению роста после его восстановления ни в одной из серий опытов. В одной серии опытов были отмечены значимое удлинение задержки роста и тенденция к замедлению роста опухоли после его восстановления, причем в этой же серии была отмечена самая низкая скорость роста опухоли в необлученном контроле. Сделано заключение о перспективности разработки модели перевивной опухоли на мышах для оценки потенциальной возможности использования противолучевых средств в практике химиолучевой терапии опухолей.

Ключевые слова: перевивная карцинома Льюиса у мышей, локальное облучение опухоли, беталейкин. рост опухоли

DOI: 10.31857/S0869803121060096

Беталейкин, представляющий собой отечественный рекомбинантный препарат человеческого ИЛ-1β, позиционируется в настоящее время как противолучевое средство двойного назначения — для экстренного применения при остром лучевом поражении в различных экстремальных ситуациях и для ослабления лейкопенического действия длительных курсов лучевой и химиотерапии онкозаболеваний [1—4].

Учитывая наличие у ИЛ-1 свойства активизации сигнальной цепи, включающей транскрипционные факторы усиления клеточной пролиферации (NFkB, NFB1), исследователи и практики медицины все время должны контролировать вопрос о возможном негативном влиянии ИЛ-1 на опухолевый процесс [5, 6]. При этом надо различать выяснение роли эндогенно вырабатываемого ИЛ-1 и рекомбинантных препаратов ИЛ-1а и ИЛ-1β, вводимых извне. Для применения ИЛ-1 в широкой медицинской практике преимущественный интерес представляет, конечно, второе направление.

Взаимодействие цитокинов, как важнейших факторов врожденного иммунитета, и онкологической патологии имеет разные аспекты изучения и лежит в основе разработки направления иммунотерапии опухолей [5-7]. Особняком стоит направление использования цитокинов для противодействия лучевому поражению клеток радиочувствительной иммуногемопоэтической системы, вообще, и стволового кроветворного пула, особенно, хотя и здесь вопрос о возможности неблагоприятного влияния провоспалительных цитокинов (прежде всего ИЛ-1) стоит достаточно остро. Но здесь не обсуждается проблема роли вводимого цитокина как возможного участника злокачественной трансформации, а только вопрос о его влиянии на скорость роста опухоли, ее метастазирование и возможность защиты опухолевых клеток от лучевой гибели.

Учитывая наличие у ИЛ-1 провоспалительного, вообще, и гемопоэзстимулирующего, в частности, действия для продвижения беталейкина в онкологическую практику, важна дифференциация разновидностей злокачественных опухолей

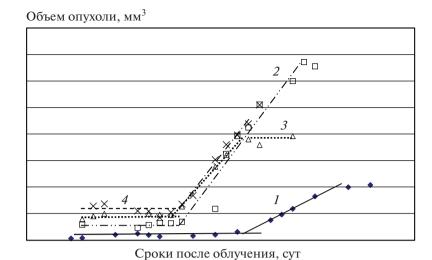


Рис. 1. Данные по динамике изменения усредненного объема опухоли в группе "Облучение + беталейкин" в разных сериях опыта. Цифры на рисунке — номер серии опыта.

Fig. 1. Dynamics of average tumor volume changes in the group "Exposure + betaleukine" in different experiment series. Digits near lines are series numbers.

по безопасности применения ИЛ-1 [5, 6]. Рекомбинантные препараты ИЛ-1 были апробированы при лучевой терапии как лейкозов, так и солидных опухолей в качестве стимуляторов гемопоэза, и пока негативного их влияния на результаты лучевой терапии отмечено не было [2, 9–11]. Несмотря на широкую апробацию рекомбинантных препаратов ИЛ-1 β и ИЛ-1 α в качестве стимуляторов гемопоэза, исследования ИЛ-1 на моделях перевивных опухолей в эксперименте не теряют своей актуальности в плане выявления различных особенностей влияния цитокинов на опухолевый рост.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

В экспериментах из четырех повторностей были использованы мыши самки С57В1/6 с массой 20-22 г, которым трансплантировали подкожно в правое бедро 14%-ю суспензию диспергированной опухолевой ткани в объеме 0.2 мл. Суспензию опухолевых клеток готовили путем сначала грубого измельчения с помощью ножниц выделенной и отсепарированной от окружающей соединительной ткани опухоли, а затем путем продавливания измельченной массы через металлическое ситечко с мелкими отверстиями и ее бужирования с помощью шприца и иглы диаметром 0.2 мм в объеме раствора Хенкса в мл, соотносящегося с массой выделенной опухоли в граммах как 6: 1. Культура клеток легочной карциномы Льюиса была получена из банка опухолевых клеток РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Затем из мышей с перевитой опухолью формировали следующие группы по восемь особей: необлученный контроль с привитой опухолью (К1), облученный контроль с привитой опухолью (К2), облученная группа с привитой опухолью и введением беталейкина (Обл + Бл). Локальное рентгеновское облучение опухоли осуществляли через 9-10 сут после перевивки в дозе 20 Гр (при мощности дозы 1.1 Гр/мин) производили на аппарате РУСТ М1 (200 кВ, 2.5 мА, алюминиевый фильтр 1.5 мм). Беталейкин производства ГНЦ НИИ особо чистых биопрепаратов (Санкт-Петербург) приобретали в аптечной сети. Лиофилизированный препарат в ампулах по 1 мкг/амп. растворяли перед введением в 0.9%-ный раствор NaCl и вводили в/бр в объеме 0.2 мл из расчета 50 мкг, кг двукратно (за сутки до облучения и сразу после него, в 3-й серии только профилактически). В 1-й серии опытов была дополнительная группа с перевитой опухолью и введением беталейкина через 9-10 сут после перевивки, но без облучения. Всем контрольным животным вводили растворитель в том же объеме. Динамику роста опухоли оценивали путем измерения ее объема ежедневно за исключением нерабочих дней с помощью штангенциркуля в трех взаимоперпендикулярных направлениях и последующего расчета объема элипсоида по формуле элипсоида [8] (рис. 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные результаты представлены в табл. 1.

Из данных, представленных в табл. 1, следует, что двукратное введение беталейкина до и после локального облучения опухоли (как бы суммирующее его радиозащитное и стимулирующее восстановление действия) не отразилось негативно

	Отсутствие роста, сут			Скорость роста, мм ³ /сут		
Серии	контроль необлученный (п/перевивки)-	контроль облученный (п/облучения)- К2	облучение + Бл (п/облучения) Обл + Бл	контроль необлученный (п/перевивки)-	контроль облученный (п/облучения)- К2	облучение + Бл (п/облучения) Обл + Бл
1-я	0	9	13	232.9	207.9	157.1
2-я	0	8.5	9	524.1	491.8	503.4
3-я	0	8	8	460.7	490	517
4-я	0	8	8	582.7	439.5	491.5

Таблица 1. Критерии и оценки динамики роста карциномы Льюиса в разных экспериментальных группах **Table 1.** Criteria and evaluation of Lewis carcinoma growth in different experimental groups

Примечание. Все аналитические зависимости изменения объема опухоли во времени в период выраженного роста имели значимые величины корреляции (r > 0.9) и оценки ошибки (p < 0.01).

ни на продолжительности периода отсутствия роста, ни на скорости роста в период его восстановления. Более того, в 1-й серии опытов было отмечено негативное влияние беталейкина на прогрессию опухоли, проявившееся в удлинении задержки роста и снижении скорости роста в период восстановившегося роста (рис. 2). При этом именно в этой серии был отмечен значимо сниженный рост необлученной опухоли в интактном контроле.

Отмеченное в 1-й серии различие в динамике роста опухоли в облученных группах контроля и введения беталейкина было исследовано на статистическую значимость следующим образом. В каждой из указанных групп оценочные параметры роста были рассчитаны для каждого отдельного животного, а полученные статистические ряды сравнены между собой по непараметрическому критерию Манна—Уитни. Различие по продолжительности периода задержки роста оказалось значимым (p = 0.04), а по скорости роста нет (p = 0.25).

Далее, в двух сериях опыта было проверено влияние беталейкина на рост необлученной опухоли, и также не было отмечено ускоряющего рост влияния. Результаты одного из этих дополнительных исследований представлены на рис. 3.

Как видно на рис. 3, динамика роста необлученной опухоли также не подвержена влиянию введенного беталейкина. Оценка по непараметрическому критерию Манна—Уитни статистической значимости различий в скорости роста опухоли в группах необлученных мышей с введением беталейкина и параллельного контроля в 1-й и 2-й сериях опыта дала отрицательный ответ (p = 0.7 и 0.6 соответственно).

ОБСУЖДЕНИЕ

Прежде всего возникает вопрос, насколько результаты данного опыта в конкретной его аран-

жировке могут быть распространены на ситуацию использования беталейкина с целью защиты иммуногемопоэза при лучевой терапии спонтанных опухолей иного вида и притом у человека. Представляемый в этой статье материал конечно не дает окончательного ответа на поставленный вопрос, а является только попыткой подхода к его разрешению.

В литературе встречаются примеры как с позитивной, так и с негативной ролью ИЛ-1 в развитии опухолевого процесса. Однако основная масса этих работ касается роли эндогенного ИЛ-1, вырабатываемого либо самими опухолевыми клетками (аутокринный фактор роста), либо стромальными клетками опухоли, либо различными типами лейкоцитов, привлеченными в ткань опухоли ее антигенными свойствами и являющимися по существу проявлением противоопухолевой активности иммунной системы организма [5–7]. Но этот аспект проблемы "провоспалительные цитокины — спонтанный опухолевый рост" выходит за рамки данной работы и здесь не рассматривается.

Ясно, что введение экзогенного ИЛ-1, да еще в условиях туморицидного действия большой дозы облучения представляет собой совершенно иную ситуацию, в которой конечный результат применения ИЛ-1 будет зависеть в первом приближении от соотношения противолучевого/стимулирующего влияния препарата на опухоль, с одной стороны, и на иммуногемопоэтическую систему организма — с другой стороны.

Подход, связанный с использованием лей-ко/нейтропоэз-стимулирующего действия ИЛ-1 был уже апробирован в клинике для устранения лейкопений разного генеза (после лучевой и химиотерапии опухолей, в том числе в комбинации с трансплантацией костного мозга), и при этом не было отмечено негативного влияния ИЛ-1 на результаты противоопухолевой терапии [2, 9–13]. В этом ряду выделяется исследование М.Л. Гер-

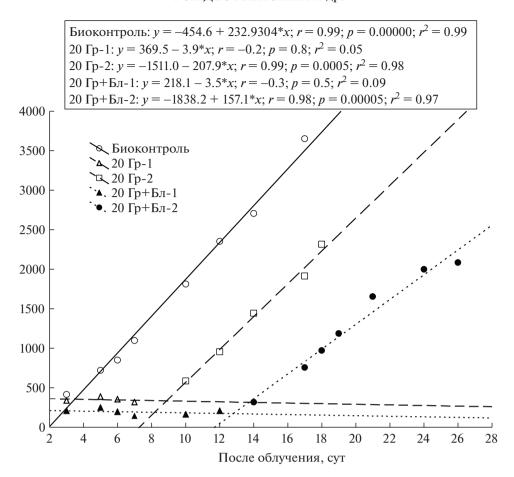


Рис. 2. Динамика роста опухоли в разных группах серии 1: 1 - K1, 2 - K2, 3 - Облучение + беталейкин. Для облученных групп представлены раздельно регрессионные зависимости роста в стадиях задержки и восстановившегося роста.**Fig. 2.**Tumor growth dynamics in different groups of the experiment series <math>1: 1 - an unexposed control with transplanted tumor (K1), 2 - an exposed control with transplanted tumor (K2), 3 - an exposed group with transplanted tumor and betaleukine injection (exposure + betaleukine).

шановича, который стал использовать беталейкин не на пике лейкопении, а параллельно с применением химиопрепаратов и облучения [2]. В результате ему удалось предотвращать развитие выраженной лейкопении и избегать прекращения курса уничтожающего клетки воздействия. Это дало ему право говорить не о восстанавливающем лейкопоэз действии, как при курсах введения Г-КСФ, а о протекторном (не буквально, а феноменологически) эффекте беталейкина.

Акцент в нашей работе, конечно, сделан на сугубо феноменологическом аспекте: оказывает ли применение ИЛ-1 негативное влияние на развитие конкретной карциномы (не более того), и на это получен однозначно отрицательный ответ. В наших исследованиях применение стимулирующего пролиферативный процесс ИЛ-1 в условиях однократного локального облучения опухоли в большой дозе 20 Гр не смогло ни сократить период постлучевого прекращения роста, ни увеличить скорость роста после его восстановления.

Однако в эту, в целом единообразную, картину как бы нейтрального отношения введенного в организм извне ИЛ-1 к росту облученной перевивной опухоли одна из серий опыта внесла важный нюанс, выразившийся в заметном удлинении периода задержки роста опухоли после облучения и тенденции к замедлению роста в период его возобновления. При этом в данной серии опыта была отмечена самая низкая скорость роста опухоли в необлученной группе. Возникло предположение, что влияние беталейкина на рост перевивной опухоли зависит не только от факторов облучения и стимулирующей иммунный ответ активности препарата, но и от соотношения пролиферативного потенциала самой опухоли и влияющей на этот потенциал иммунной системы организма.

Полученный экспериментальный материал был подвергнут следующему анализу. Чтобы наглядно выявить роль беталейкина, была сопоставлена связь роста опухоли в облученных группах с беталейкином и без него, а рост в интактном

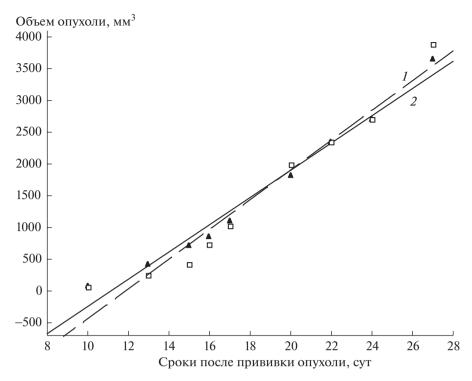


Рис. 3. Усредненная динамика роста опухоли после перевивки в необлученных группах с введением 1 и без введения 2 беталейкина.

Fig. 3. Average tumor growth dynamics in K1 with 1 and without 2 betaleukine injection.

контроле был использован как точка отсчета (рост для каждой группы выражался в % от роста в биоконтроле). Результат такой трансформации сопоставляемых показателей представлен на рис. 4.

На рис. 4 видно, что для трех серий имеется прямая линейная зависимость между сопоставляемыми показателями, лишь слегка (в пределах ошибки) превышающая диагональную линию равнозначного ответа, что свидетельствует об отсутствии влияния беталейкина на скорость роста опухоли в период выраженного роста после облучения. Аналитическое выражение представленной на рис. 4 зависимости

$$y = 16.4 + 0.9x$$
; $r = 0.98$, $p = 0.1$

свидетельствует также о недостаточности данных для утверждения значимости указанной на рис. 4 зависимости. В то же время соотношение показателей для одной из серий на рис. 4 лежит существенно ниже указанной линии, что отражает тормозящее влияние беталейкина на рост опухоли.

Затем отношение роста опухоли у облученных мышей с введением беталейкина и без него было сопоставлено непосредственно с выраженностью роста опухоли в интактном контроле (рис. 5).

На рис. 5 видно, что между ростом опухоли в необлученных контролях и в группах с введенным беталейкином, скорректированных данными в облученных контролях, наблюдается линей-

ная зависимость. Ее аналитическое выражение имеет следующий вид:

$$y = 53.2 + 0.1x$$
; $r = 0.97$, $p = 0.03$,

где y — отношение роста опухоли в облученных группах с введением беталейкина и без него, %; x — рост опухоли в интактном контроле, мм³/сут.

"Облучение + беталейкин"/К1, %

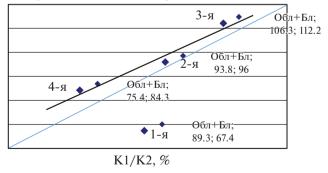
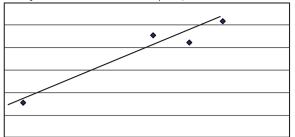


Рис. 4. Оценка влияния беталейкина на скорость роста опухоли в период восстановившегося после облучения роста в разных сериях опыта. (Цифры у точек — номер серии опыта). Диагональная линия — линия равнозначного ответа. Регрессионная зависимость сопоставляемых показателей серий опытов 2—4: y = 16.4 + 0.88x; r = 0.98, p = 0.12.

Fig. 4. Evaluation of betaleukine influence on growth rate in different experiment series. Digits near points are series numbers. Regression dependence of comparable indicators in 3 series: y = 16.4 + 0.88x; r = 0.98, p = 0.12.





Скорость роста опухоли K1, мм³

Рис. 5. Зависимость нормированного по K2 роста опухоли в группе "Облучение + беталейкин" ("Облучение + беталейкин"/K2, %) от роста опухоли в K1 в разных сериях опыта. Цифры у точек — номер серии опыта). Регрессионная зависимость сопоставляемых показатедей серий опытов 1-4: y=53.2+0.1x; r=0.97, p=0.03.

Fig. 5. Dependence of tumor growth in the group "Exposure + betaleukine", normalized on K2, on the tumor growth in K1 in different series. Regression dependence of comparable indicators in 4 series: y = 53.2 + 0.1x; r = 0.97, p = 0.03.

Таким образом, картина роста опухоли в условиях ее локального облучения и введения в организм беталейкина после включения показателя роста опухоли в интактном организме в качестве фактора, непосредственно влияющего на весь процесс, приобрела черты единой и значимой зависимости, связывающей все четыре серии опытов. Конечно, нельзя утверждать, что эта зависимость имеет строго линейный характер, так как она представлена всего двумя неравными по нагруженности областями: весьма слабого стимулирующего указанный рост или даже отсутствующего влияния беталейкина (три сконцентрированные точки в области высоких значений роста в интактном контроле) и одной, но выраженной по влиянию беталейкина точки в области низкого роста в интактном контроле. Задача последующих опытов в проверке высказанной гипотезы заключается в нагрузке промежуточных областей роста опухоли в интактном контроле. Для этого необходимо разработать подход к управляемому получению низких уровней роста перевивной опухоли в интактном контроле.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение беталейкина при локальном облучении перевивной карциномы Льюиса у мышей ни в одной из четырех серий опыта не привело к ускорению роста опухоли, так же как введение беталейкина необлученным мышам с перевитой опухолью. В одной из серий опыта, в которой была отмечена наиболее низкая скорость роста опухоли в необлученном контроле, введение бета-

лейкина привело даже к некоторому ограничению роста опухоли, что, возможно, указывает на оптимальные условия противоопухолевого действии иммуномодулятора в комбинации с облучением. Полученные результаты представленных опытов свидетельствуют о перспективности разработки модели с перевивной опухолью у мышей для предварительной оценки потенциальной возможности использования исследуемого противолучевого препарата в практике химиолучевой терапии опухолей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Симбирцев А.С. Интерлейкин-1: от эксперимента в клинику // Мед. иммунология. 2001. Т. 3. № 3 (27). С. 431–438. [Simbircev A.S. Interlejkin-1: ot eksperimenta v kliniku // Medicinskaya immunologiya. 2001. Т. 3. № 3(27). S. 431–438 (In Russian]
- 2. Гершанович М.Л., Аксенова Л.В. Беталейкин (рекомбинантный интерлейкин-1β) эффективный стимулятор и протектор лейкопоэза в условиях комбинированной химиотерапии злокачественных опухолей: Пособие для врачей. СПб.: Новая Альтернативная Полиграфия, 2008. С. 1–16. [Gershanovich M.L., Aksenova L.V. Betalejkin (rekombinantnyj interlejkin-1β) effektivnyj stimulyator i protektor lejkopoeza v usloviyah kombinirovannoj himioterapii zlokachestvennyh opuholej: Posobie dlya vrachej. SPb.: Novaya Al'ternativnaya Poligrafiya, 2008. S. 1–16 (In Russian]
- 3. *Гребенюк А.Н., Легеза В.И.* Противолучевые свойства интерлейкина-1. СПб.: Фолиант, 2012. 216 с. [*Grebenyuk A.N., Legeza V.I.* Protivoluchevye svojstva interlejkina-1. SPb.: Foliant, 2012. 216 s. (In Russian]
- 4. *Рождественский Л.М.* Актуальные вопросы поиска и исследования противолучевых средств // Радиац. биология. Радиоэкология. 2013. Т. 53. № 5. С. 513—520. [*Rozhdestvenskij L.M.* Aktual'nye voprosy poiska i issledovaniya protivoluchevyh sredstv // Radiac. biologiya. Radioekologiya. 2013. Т. 53. № 5. S. 513—520 (In Russian]
- Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб.: Фолиант, 2008. 552 с. [Ketlinskij S.A., Simbircev A.S. Citokiny. SPb.: Foliant, 2008. 552 s. (In Russian]
- 6. *Dinarello C.A.* Biological basis for interleukine-1 in disease // Blood. 1996. V.87. № 6. P. 2095–2147.
- 7. *Baker K.J., Houston A., Brint E.* IL-1 family members in cancer; two sides to every story // Front. Immunol., 07 June 2019. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01197
- 8. Липенгольц А.А., Черепанов А.А., Шейно И.Н. и др. Увеличение эффективности рентгенотерапии зло-качественных новообразований при помощи гадолинийсодержащего препарата // Радиац. биология. Радиоэкология. 2014. Т. 54. № 5. С. 479—481. [Lipengol'c A.A., Cherepanov A.A., Shejno I.N. i dr. Uvelichenie effektivnosti rentgenoterapii zlokachestvennyh novoobrazovanij pri pomoshchi gadolinijsoderzhashchego preparata // Radiac. Biologiya. Radioekologiya. 2014. Т. 54. № 5. S. 479—481 (In Russian)]

- Redman B.G., Abubakr Y., Chou T. et al. Phase II trial of recombinant interleukine-1β in patients with metastatic renal cell carcinoma // J. Immunother. 1994. V. 16. P. 211–215.
- 10. Nemunaitis J., Appelbaum F.R., Lilleby K. et al. Phase I study of recombinant interleukine Iβ in patients undergoing autologous bone marrow transplant for acute myelogenous leukemia // Blood. 1994. V. 83. № 12. P. 3473–3479.
- 11. *Iizumi T., Sato S., Iiyama T.* Recombinant human inreleukine-1β analogue as a regulator of hematopoiesis
- in patients receiving chemorherapy for urogenital cancers // Cancer 1991. V. 68. P. 1520–1523.
- 12. Crowm J., Moore M., Gabrilove J. et al. A Phase I trial of recombinant human interleukine-1β alone and in combination with myelosuppressive doses of 5-fluorouracil in patients with gastrointestinal cancer // Blood. 1991. V. 78. № 6. P. 1420–1427.
- 13. Weisdorf D., Catsanis E., Blazar B.R. et al. Interleukin-1α administered after auriologous transplantation: a phase I/II clinical trial // Blood. 1994. V. 84. № 6. P. 2044–2049.

Evaluation of Radiomodificator Betaleukine Influence on Exposed Lewis Carcinoma Growth in Mice

L. M. Rozhdestvensky^{a,#}, A. A. Lipengolts^{a,b}, N. I. Lisina^a, and K. Yu. Romanova^a

^a A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency of Russia, Moscow, Russia
 ^b N.N. Blochin National Medical Research Oncology Center of Russia Health Ministry, Moscow, Russia
 [#] E-mail: lemrod@mail.ru

There were conducted 4 experiments on mice C57Bl/6 with transplanted Lewis carcinoma consisted in administration radiomodificator betaleukine (recombinant human interleukine- 1β) twice (24 h before and immediately after local 20 Gy exposure). Criteria of betaleukine influence on carcinoma growth were duration of growth retardation after exposure and growth rate after restoring the last one in comparison with intact and exposed controles. Betaleukine administration didn't influence nor growth retardation nor growth rate. But in one from 4 experiment series it was noted growth retardation increasing and growth rate decreasing (the former was valid, the last was just a trend). In the same experiment the carcinoma growth rate in intact controle was the least one among all others. It is concluded that model of transplantation tumor in mice may serve for radiation countermeasure agents preliminary evaluation regarding their use in medical praxis of caner radiation and chemotherapy.

Keywords: transfused Lewis carcinoma in mice, local radiation of the tumor, betaleukin, tumor growth

МОДИФИКАЦИЯ РАЛИАЦИОННЫХ ЭФФЕКТОВ

УЛК 616-03:615: 599.323.4: 57.084.1:539.1.047

ПРОТИВОЛУЧЕВЫЕ ЭФФЕКТЫ Т1082 — ФОСФАТА 1-ИЗОБУТАНОИЛ-2-ИЗОПРОПИЛИЗОТИОМОЧЕВИНЫ, В СРАВНЕНИИ С ЕГО АНАЛОГОМ Т1023

© 2021 г. М. В. Филимонова^{1,*}, Л. И. Шевченко¹, В. М. Макарчук¹, А. С. Сабурова¹, О. В. Солдатова¹, А. А. Шитова¹, А. О. Косаченко¹, В. А. Рыбачук¹, В. О. Сабуров¹, А. С. Филимонов¹

¹ Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Обнинск, Россия

*E-mail: mari_fil@mail.ru
Поступила в редакцию 22.06.2021 г.
После доработки 02.08.2021 г.
Принята к публикации 01.09.2021 г.

Целью исследования было сравнительное изучение токсических свойств и противолучевой активности нового ингибитора NOS T1082 — 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевины фосфата, в сравнении с его близким химическим аналогом, известным Т1023 – 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевины гидробромидом. Изучение токсических свойств проведено по тесту острой токсичности для аутбредных мышей СD-1 при однократном внутрибрюшинном (в/б) и внутрижелудочном (в/ж) введении. Сравнительное изучение радиозащитной активности соединений Т1082 и Т1023 при в/б введении в дозах 1/18-1/2 ЛД $_{10}$ проведено на самцах мышей-гибридов F_1 (CBA × C57BL6j) по тесту селезеночных эндоколоний и 30-суточной выживаемости. Изучение эффектов Т1082 и Т1023 при в/ж введении в дозах 50-150 мг/кг проведено по тесту 30-суточной выживаемости. Результаты этого исследования показали, что замешение солеобразующей кислоты с НВг на Н₁РО₁ значимо не изменяет токсических свойств, но значительно модифицирует противолучевую активность солей 1изобутаноил-2-изопропилизотиомочевины. Фосфатная соль (Т1082) приобретает способность к эффективному радиозащитному действию при в/б введении в низких дозах $(1/12-1/8 \, \text{ЛД}_{10})$, в которых соль гидробромида (Т1023) низкоэффективна или уже не действует. Следствия таких особенностей Т1082 являются значительными. Наблюдается 2-кратное расширение диапазона эффективных доз — от 1/5-1/3 ЛД₁₀ (60—90 мг/кг) у Т1023 до 1/12-1/3 ЛД₁₀ (27—90 мг/кг) у Т1082. Такая возможность применения в 2-3 раза меньших доз без потери противолучевой эффективности дает соединению Т1082 существенные преимущества, в первую очередь, в безопасности. При в/ж введении Т1082 в дозах 50—150 мг/кг реализует радиозащитное действие, выраженность которого имеет дозово-зависимый характер, при этом эффекты Т1082 статистически значимо превышают действие равных доз Т1023. Причем при пероральном введении уровень безопасности действия Т1082 еще более возрастает — терапевтический индекс ($\Pi J_{50}/ED_{50}$) достигает 30, а оптимальные радиозащитные дозы Т1082 (ED $_{84-98}$ — 141—224 мг/кг) более, чем на порядок ниже максимально переносимых доз (1/16—1/10 ЛД $_{10}$). Полученные данные доказывают наличие у фосфата 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевины выраженных преимуществ над прототипом (Т1023), которые позволяют отнести соединение Т1082 к числу наиболее безопасных потенциальных противолучевых средств, и свидетельствуют о его высокой перспективности в качестве основы нового радиопротектора или средства профилактики осложнений лучевой терапии.

Ключевые слова: радиозащитная эффективность, облучение, выживаемость, фармакологическая безопасность, острая токсичность, соединение T1023, ингибиторы NOS

DOI: 10.31857/S0869803121060059

Ионизирующие излучения, являясь неотъемлемой частью современной цивилизации, способны представлять прямую угрозу здоровью и жизни человека. В последние десятилетия такая угроза обусловлена как возрастанием рисков радиационных техногенных аварий или террори-

стических атак, так и широким применением радиологических методов терапии и диагностики. Поэтому для обеспечения безопасности как отдельного индивидуума, так и глобальных перспектив всего человечества значительно возрастает необходимость наличия безопасных и эффективных

Рис. 1. Изучаемые соединения: а -1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевины гидробромид (Т1023); б -1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевины фосфат (Т1082).

Fig. 1. Studied compounds: a-1-isobutanoyl-2-isopropylisothiourea hydrobromide (T1023); b-1-isobutanoyl-2-isopropylisothiourea phosphate (T1082).

лекарственных средств (ЛС), способных к профилактике и лечению лучевых патологий [1-3].

Однако анализ степени разработки имеющихся противолучевых средств свидетельствует, что перечень таких ЛС, допущенных к применению для противодействия лучевым поражениям человека, остается чрезвычайно ограниченным [4-7]. Особенно это касается радиопротекторов и средств профилактики осложнений лучевой терапии. Так, за 70 лет развития радиационной фармакологии ни один радиопротектор не был одобрен FDA USA к применению непосредственно для ОЛБ человека, а арсенал средств, способных противодействовать токсическим эффектам радиотерапии, представлен лишь двумя препаратами (амифостин и палифермин), клиническое применение которых имеет существенные ограничения и самостоятельные риски [4, 8, 9]. Сложившаяся ситуация обусловлена как сложностями прохождения этапов доклинических и клинических исследований средств лечения радиационных патологий, так и неудовлетворительным уровнем безопасности для человека многих известных средств, способных эффективно противодействовать лучевым поражениям [3-6, 10, 11].

В этой связи проблема разработки противолучевых средств в последние годы вышла за пределы радиобиологии и радиационной фармакологии и привлекла внимание специалистов многих областей биологии и медицины. Объектом таких исследований в настоящее время является широкий круг синтетических и биотехнологических соединений, биохимическая и физиологическая активность которых позволяет ограничивать первичную лучевую альтерацию, модулировать процессы клеточной гибели, активность постлучевой репарации, течение иммуновоспалительных процессов и фиброгенеза [5, 6, 12, 13]. При этом ряд перспективных для радиационной фармакологии классов соединений пополнили и модификаторы NO-зависимых сигнальных путей, поскольку было показано, что такие эффекторы способны выраженно влиять на многие процессы, в том числе определяющие радиочувствительность биологических объектов и развитие лучевых поражений [14—17].

В частности, в своих исследованиях ранее мы показали, что некоторые тиоамидиновые ингибиторы NOS (линейные и циклические N,S-замещенные изотиомочевины), блокируя в эндотелии сосудов NOS/sGC/cGMP-путь, способны индуцировать транзиторную тканевую гипоксию и повышать резистентность биологических тканей к действию ионизирующих излучений [18-21]. Скрининг в этой химической области позволил нам обосновать перспективность 1-изобутаноил-2-изопролизотиомочевины гидробромида (соединение Т1023; рис. 1, а) в качестве основы нового противолучевого средства с NOS-ингибирующим механизмом действия. Было установлено, что превентивное парентеральное введение Т1023 в относительно безопасных дозах $(1/5-1/4 \Pi \Pi_{10})$; 60-75 мг/кг) обеспечивает выраженную профилактику костномозговой и кишечной ОЛБ у мелких лабораторных животных ($\Phi И \Pi - 1.6 - 1.9$), не уступая либо превосходя в эффективности действию известных радиопротекторов [22-24]. Кроме того, было показано, что соединение Т1023 является эффективным и в профилактике осложнений лучевой терапии. В радиозащитных дозах T1023 выраженно ($\Phi И Д - 1.4 - 1.7$) ограничивает частоту и тяжесть как острых лучевых повреждений (лучевой ожог кожи и оральный мукозит у мышей и крыс), так и отдаленных лучевых повреждений нормальных тканей (лучевой пневмофиброз у крыс). Причем при лучевой терапии солидных опухолей Т1023 реализует избирательную защиту нормальных тканей, без ослабления противоопухолевых эффектов и общей эффективности лучевой терапии неоплазий [25–28].

Вместе с тем в этих исследованиях обозначились и особенности соединения Т1023, способные негативно влиять на его эффективность и безопасность: близость эффективных доз к токсическому порогу (1/4 ЛД₁₀; 75 мг/кг) и недостаточная, на наш взгляд, радиозащитная широта (1/5–1/3 ЛД₁₀; 60–90 мг/кг) – уже при дозах 1/8 ЛД₁₀ (40 мг/кг) действие Т1023, как правило, слабое

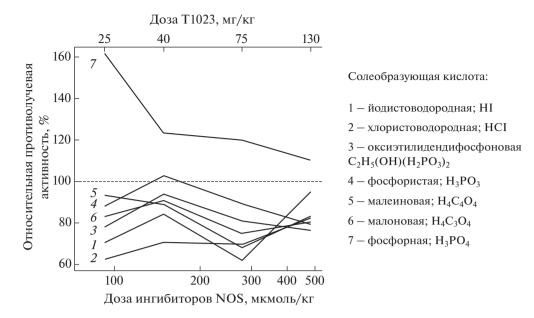


Рис. 2. Влияние вида солеобразующих кислот на противолучевую активность солей 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевины (обобщение данных работы [30]). Относительная противолучевая активность (%) — отношение среднего числа КОЕ у мышей, получавших тестируемую соль, к среднему числу КОЕ у мышей, получавших эквимолярную дозу соли гидробромида (T1023).

Fig. 2. Influence of the type of salt-forming acids on the radioprotective activity of 1-isobutanoyl-2-isopropylisothiourea salts (generalization of the data from [30]). Relative radioprotective activity (%) — the ratio of the average CFU number in mice treated with the test salt to the average CFU number in mice treated with an equimolar dose of hydrobromide salt (T1023).

[22, 24]. Такие особенности, по нашему мнению, сохраняют значимыми риски, как развития нежелательных эффектов, так и низкоэффективного действия Т1023, вследствие влияния неконтролируемых факторов, например, метаболических особенностей или патологий, искажающих фармакокинетику действующего вещества [29].

В этой связи перед началом практической разработки соединения Т1023 мы сочли целесообразным проведение дополнительного поиска более приемлемой "транспортной" формы действующего вещества среди ближайших аналогов Т1023 — в ряду солей 1-изобутаноил-2-изопролизотиомочевины с различными неорганическими и органическими кислотами [30]. Результаты этих исследований показали, что изменение солеобразующей кислоты с гидробромида на гидроиодид, гидрохлорид, оксиэтилидендифосфонат, фосфонат, малеинат и малонат негативно сказывалось на противолучевой активности солей 1-изобутаноил-2-изопролизотиомочевины (рис. 2). Такие соединения, исследованные в широком диапазоне доз (25-130 мг/кг) в различной степени выраженно (на 10-40%) уступали радиозащитному действию соли гидробромида (Т1023) в эквимолярных дозах. В то же время в ряду исследованных солей существенно выделялся 1-изобутаноил-2-изопролизотиомочевины фосфат (соединение Т1082; рис. 1, б). В отличие от других соединений, эта соль во всем диапазоне доз реализовала более высокую (на 15-60%) противолучевую активность, чем T1023 в эквимолярных дозах. Причем наиболее выраженное радиозащитное преимущество соединение T1082 проявляло при низких дозах (1/12-1/8 ЛД $_{10}$; 25–40 мг/кг), в которых T1023 малоэффективно или не действует. Эти данные свидетельствовали о возможно более широком диапазоне эффективных доз у соединения T1082, что, очевидно, могло существенно скорректировать отмеченные выше недостатки T1023.

В этой связи для подтверждения характера и масштаба особенностей радиозащитного действия Т1082, а также оценки значимости возможных радиобиологических и фармакологических преимуществ фосфатной соли 1-изобутаноил-2-изопролизотиомочевины, как действующего вещества радиозащитного средства, было проведено достаточно детальное исследование токсических свойств и противолучевой активности этого соединения, результаты которого мы приводим в данной работе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Лабораторные животные. Исследование выполнено на 96 самцах аутбредных мышей CD-1 (возраст -2-2.5 мес.; масса тела -21-24 г) и на

850 самцах мышей-гибридов F_1 (CBA × C57BL6j) (возраст -2-3 мес.; масса тела -19-23 г). Животные были получены из питомника ФГБУН НЦБМТ ФМБА. Мышей содержали в помещениях вивария МРНЦ им. А.Ф. Цыба в клетках Т-3 в условиях естественного освещения, при температуре 18-20°С и относительной влажности воздуха 40-70%, на подстиле из простерилизованных древесных стружек со свободным доступом к питьевой воде и корму для грызунов ПК-120-1 (Лабораторснаб, РФ). Все работы с животными были одобрены Этическим комитетом и выполнены на основе СОП, принятых в МРНЦ, которые соответствуют правилам Европейской конвенции ETS 123. Плановую эвтаназию проводили путем цервикальной дислокации под эфирным наркозом.

Используемые соединения. В работе изучались и сопоставлялись свойства и эффекты двух солей 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевины соли, образованной бромистоводородной кислотой (соединение Т1023; рис. 1, а), и соли, образованной ортофосфорной кислотой (соединение Т1082; рис. 1, б). Для проведения исследований соединения Т1023 и Т1082 нарабатывались в лаборатории радиационной фармакологии МРНЦ им. А.Ф. Цыба. Способ получения Т1023 детально описан нами в работе [24]. Способ получения Т1082 состоял в выделении из соединения Т1023 свободного основания — 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевины, которое далее подвергали взаимодействию с ортофосфорной кислотой [30, 31]. Методы синтеза, выделения и очистки обеспечивали стабильное качество субстанций Т1023 и Т1082 с содержанием действующего вещества более 95%. В экспериментах Т1023 и Т1082 вводили подопытным животным однократно внутрибрющинно (в/б) или внутрижелудочно (в/ж) в виде водных растворов, которые готовили ex temроге на основе воды для инъекций (Фармсинтез, РФ). Контрольным животным в те же сроки и тем же способом однократно вводили асептический 0.9%-ный раствор натрия хлорида (Дальхимфарм, $P\Phi$) в эквивалентном объеме.

Токсикологические исследования соединения Т1082 проведены на аутбредных мышах по тесту острой токсичности при однократном в/б и в/ж введении. Предварительно для каждого способа введения на ограниченном числе животных (пять групп по 2 особи) оценивали ориентировочное значение ЛД_{50/15} по методу Дейхмана—Лебланка, с учетом которого далее проводили детальные оценки параметров токсичности методом пробит-анализа по Литчфилду и Уилкоксону [32]. Для каждого способа введения формировали по пять групп животных (7—8 мышей в каждой). При парентеральном способе введения животным этих групп вводили Т1082 в дозах 300—470 мг/кг (0.2 мл 1.5—2.35% раствора на 10 г массы тела),

при пероральном способе введения — в дозах 2300-3250 мг/кг (0.2 мл 11.5-16.25% раствора на 10 г массы тела). Наблюдение за животными осуществляли в течение 15 сут.

Лучевые воздействия на животных во всех экспериментах осуществляли на установке "Луч-1" (РФ) с источником 60 Со со средней энергией 1.25 МэВ. Воздействие γ -излучением на мышей, фиксированных в ячейках пластикового контейнера, проводили в дорзально-вентральной геометрии в группах по 8-12 особей в поле облучения 220×220 мм с фокусным расстоянием 450 мм при мощности дозы 4.95 мГр/с.

Схемы радиобиологических экспериментов, оценка эффектов. Сравнительное изучение противолучевой активности соединений T1023 и T1082 проведено в трех сериях экспериментов.

В первой серии экспериментов по методу Тилла и МакКаллока [33] проведено сравнительное исследование влияния соединений Т1023 и Т1082 при парентеральном введении в эквимолярных дозах, соответствующих уровням 1/18, 1/12, 1/8, 1/4 и 1/3 ЛД₁₀, на численность эндогенных селезеночных гемопоэтических колоний (КОЕ) у самцов мышей F_1 (CBA × C57BL6j) при воздействии у-излучения в дозе 5 Гр. Выполнено два независимых опыта по единой схеме, в которой использовано по 11 групп мышей (n = 16-17 в каждой) — группа контроля облучения и 10 опытных групп. За 30 мин до облучения животным опытных групп однократно в/б вводили Т1023 или Т1082 в дозах 63, 93, 149, 278 и 480 мкмоль/кг (17/18, 25/27, 40/43, 75/80 и 130/138 мг/кг -0.1 мл 0.17-1.38% раствора на 10 г массы тела), а контрольным мышам — эквивалентный объем 0.9%ного раствора натрия хлорида. Через 8 сут после облучения всех животных выводили из опыта. Извлеченные селезенки фиксировали 24 ч в жидкости Буэна и проводили подсчет на их поверхности числа эндогенных КОЕ. Для обобщенного анализа этих экспериментов данные каждого опыта нормировали на среднее число КОЕ у контрольных мышей (переводили в отн. ед., в которых число КОЕ в контроле каждого опыта составляет $1 \pm SD$). О выраженности и различиях противолучевой активности Т1023 и Т1082 в этих опытах судили по межгрупповым статистическим различиям числа КОЕ в обобщенных данных.

Во второй серии экспериментов проведено сравнительное исследование влияния соединений Т1023 и Т1082 при парентеральном введении в эквимолярных дозах, соответствующих уровням 1/12, 1/8 и 1/4 Π Д₁₀, на 30-суточную выживаемость самцов мышей F_1 (CBA × C57BL6j) при воздействии γ -излучения в дозе 9.5 Гр. За 30 мин до облучения животным опытных групп (n=15—31) однократно в/б вводили Т1023 или Т1082 в дозах 93, 149 и 278 мкмоль/кг (25.0/26.5, 40.0/42.5 и

Таблица 1. Показатели "острой" токсичности соединений Т1082 и Т1023 для аутбредных мышей при однократном внутрибрюшинном и внутрижелудочном введении

Table 1. "Acute" toxicity indicators of T1082 and T1023 for outbred mice after a single intraperitoneal and intragastric administration

Соединение,	ЛД _{10/15}		ЛД _{16/15}		ЛД _{50/15}		ЛД _{84/15}	
способ введения	мг/кг	ммоль/л	мг/кг	ммоль/л	мг/кг	ммоль/л	мг/кг	ммоль/л
Т1082, в/б	321	1.12	338	1.18	403	1.41	481	1.68
Т1023, в/б *	317	1.18	333	1.24	410	1.52	488	1.81
Т1082, в/ж	2290	8.01	2364	8.26	2638	9.22	2944	10.29

Примечание: * показатели для соединения Т1023, полученные ранее [22, 24].

 $75.0/79.7 \,\mathrm{mr/kr} - 0.1 \,\mathrm{mn}\,0.25 - 0.8\%$ раствора на $10\,\mathrm{r}$ массы тела), а контрольным мышам (n=30) — эквивалентный объем 0.9%-ного раствора натрия хлорида. В течение $30\,\mathrm{cyr}$ после облучения при 2-кратном ежедневном осмотре оценивали состояние животных и регистрировали время их гибели. Далее по методу Каплана—Майера строили диаграммы выживаемости мышей экспериментальных групп, по статистическим различиям которых судили о выраженности и различиях противолучевой активности $T1023\,\mathrm{u}\,T1082\,\mathrm{g}$ этих экспериментах.

В третьей серии экспериментов проведено сравнительное исследование влияния соединений Т1023 и Т1082 при пероральном введении на 30-суточную выживаемость самцов мышей F_1 (CBA × C57BL6j) при воздействии у-излучения в дозе 9 Гр. За 30 мин до облучения животным опытных групп (n = 20-34) однократно в/ж вводили соединение Т1082 в дозах 50, 75, 100, 125 и 150 мг/кг (0.1 мл 0.5-1.5% раствора на 10 г массы тела) или соединение Т1023 в дозах 125 и 150 мг/кг (0.1 мл 1.25—1.5% раствора на 10 г массы тела), а контрольным мышам (n = 34) — эквивалентный объем 0.9%-ного раствора натрия хлорида. Регистрацию и анализ данных проводили тем же путем, как и при парентеральном введении. Расчет эффективных радиозащитных доз Т1082 при пероральном введении проведен методом пробитанализа.

Статистическая обработка. Значимость межгрупповых различий числа КОЕ оценивали по ANOVA-тесту Краскела—Уоллиса с апостериорным анализом по U-критерию Манна—Уитни в процедуре множественного сравнения Холма—Бонферрони [34]. Значимость межгрупповых различий диаграмм выживаемости при множественном сравнении оценивали по χ^2 -критерию с апостериорным анализом по χ^2 -критерию Кокса в процедуре множественного сравнения Холма—

Бонферрони, при парном сравнении — по *F*-критерию Кокса. Во всех случаях различия полагались статистически значимыми на 5%-ном уровне. Расчеты выполнены с применением программного пакета Statistica 10 (StatSoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В токсикологических исследованиях соединение Т1082 при однократном в/б введении в дозах 300—470 мг/кг вызывало у мышей интоксикацию, линамика и проявления которой воспроизволили токсические эффекты Т1023 при таких же дозах и способе применения [24]. У мышей быстро развивалась адинамия, при дозах 350 мг/кг и выше нарастала дыхательная аритмия, тремор и клонические судороги, на пике которых наступали остановка дыхания и гибель. Летальное действие Т1082 развивалось в первые 20-60 мин после в/б введения. Проявления интоксикации у выживших мышей ослабевали через 1.5-2 ч и в последующие 15 дней наблюдения эти животные по внешнему виду, двигательной и пищевой активности не отличались от интактных мышей. Макроскопических изменений внутренних органов у погибших и выживших мышей не выявлялось.

По результатам токсикометрии оценки максимально переносимой дозы (ЛД $_{10}$) и средней летальной дозы (ЛД $_{50}$) соединения T1082 при в/б введении составили 321 и 403 мг/кг. Сопоставление параметров токсичности соединений T1082 и T1023 при таком способе введения не выявило существенных отличий — по всем показателям различия не превышали статистических погрешностей оценок и находились в пределах 5–8% (табл. 1).

При в/ж введении Т 1082 чувствительность мышей к токсическому действию этого соединения снижалась в 6.5-7.0 раз — оценки $ЛД_{10}$ и $ЛД_{50}$ составили 2290 и 2638 мг/кг соответственно. Интоксикация у мышей в этом случае носила такой

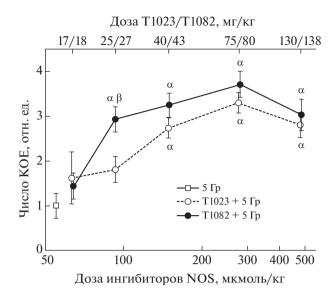


Рис. 3. Влияние соединений Т1023 и Т1084 при парентеральном введении (однократно, в/б, за 30 мин до облучения) в эквимолярных дозах 63, 93, 149, 278 и 480 мкмоль/кг (17/18, 25/27, 40/43, 75/80 и 130/138 мг/кг соответственно) на число селезеночных эндоколоний (КОЕ) у самцов мышей F_1 (СВА × С57ВL6j) через 8 сут после воздействия у-излучения в дозе 5 Гр. Объединенные результаты двух экспериментов (n = 32— 34 на точку) — данные по каждому опыту нормированы на среднее число КОЕ в облученном контроле. Отклонения в точках соответствуют SD. α , β — статистически значимые межгрупповые различия по U-тесту Манна-Уитни с поправками Холма-Бонферрони: α — с облученным контролем (для T1023: p = 0.007341, p = 0.000124, p = 0.004873; для T1082: p = 0.002630, p = 0.002630= 0.000279, p = 0.000036, p = 0.001798 cootветственно); В – между группами, получавшими Т1023 и Т1082 в эквимолярных дозах (p = 0.003857).

Fig. 3. The effect of compounds T1023 and T1084 after parenteral administration (single dose, i.p., 30 min before irradiation) at equimolar doses of 63, 93, 149, 278 and 480 µmol/kg (17/18, 25/27, 40/43, 75/80 and 130/138 mg/kg, respectively) on the number of splenic endocolonies (CFU) in male F_1 mice (CBA × C57BL6j) 8 days after exposure to y-radiation at a dose of 5 Gy. The combined results of two experiments (n = 32-34 per point) – the data for each experiment are normalized to the average number of CFU in the irradiated control. Point deviations correspond to SD. α , β – significant intergroup differences according to the Mann–Whitney *U*-test with Holm–Bonferroni corrections: α – with irradiated control (for T1023: p = 0.007341, p = 0.000124, p = 0.004873; for T1082: p =p = 0.002630, p = 0.000279, p = 0.000036, p = 0.001798, respectively); β – between groups receiving T1023 and T1082 at equimolar doses (p = 0.003857).

же характер, но развивалась менее стремительно, а летальное действие T 1082 было более отсроченным — на 2—4-м часу после в/ж введения.

В целом данные, полученные в токсикологических исследованиях, свидетельствовали, что изменение солеобразующей кислоты с гидробромида на фосфат не оказало существенного влия-

ния на токсичность солей 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевины — оба соединения являются "умеренно токсичными" [35] с близкими количественными характеристиками.

Вместе с тем такое молекулярно-структурное изменение оказало значительное влияние на противолучевую активность фосфатной соли этой изотиомочевины.

В первой серии радиобиологических экспериментов в двух независимых опытах было проведено сравнительное исследование влияния T1023 и T1082 при парентеральном (в/б) введении в эквимолярных дозах, соответствующих уровням 1/18, 1/12, 1/8, 1/4 и 1/3 ЛД $_{10}$, на численность эндогенных селезеночных колоний у самцов мышей F_1 (CBA×C57BL6j) при воздействии γ -излучения в дозе 5 Гр.

В этих опытах Т1023 стабильно реализовало характерную для этого соединения дозовую зависимость противолучевой активности [22, 24] (рис. 3) — в области $1/18-1/12 \, \Pi \Pi_{10} \, (17-25 \, \text{мг/кг})$ радиозащитное действие отсутствовало, значимый эффект проявлялся при $1/8 \, \text{ЛД}_{10} \, (40 \, \text{мг/кг})$ и достигал максимума в области $1/4 \, \Pi \, \Pi_{10} \, (75 \, \text{мг/кг})$. Однако дозовая зависимость противолучевой активности соединения Т1082 в обоих опытах была существенно иной - радиозащитное действие отсутствовало только в области $1/18 \, \text{ЛД}_{10} \, (18 \, \text{мг/кг})$, а в диапазоне доз 1/12-1/4 ЛД $_{10}$ (27-80 мг/кг) эффект был статистически значимым и равным по эффективности (p = 0.49 - 0.85). Значимость наблюдаемых в этих опытах отличий противолучевой активности соединения Т1082 подтверждало статистическое сравнение эффектов эквимолярных доз Т1023 и Т1082: в области 1/8 ЛД $_{10}$ — на уровне статистической тенденции (p = 0.052549), в области $1/12 \ \Pi \Pi_{10}$ – на значимом статистическом уровне (p = 0.003857).

Способность соединения T1082 к эффективному радиозащитному действию при применении в низких дозах (1/12-1/8 ЛД $_{10}$) более контрастно проявилась при сравнительном исследовании влияния T1023 и T1082 при парентеральном (в/б) введении в эквимолярных дозах, соответствующих уровням 1/12, 1/8 и 1/4 ЛД $_{10}$, на 30-суточную выживаемость самцов мышей F_1 (CBA × C57BL6j) при воздействии γ -излучения в дозе 9.5 Гр.

В этом исследовании соединение Т1023 также реализовало характерную для этого теста дозовую зависимость противолучевой активности [22, 24] (рис. 4) — высокоэффективное действие (выживаемость — 63%) в оптимальной дозе 1/4 ЛД $_{10}$ (75 мг/кг), минимальное значимое действие (выживаемость — 36%) в дозе 1/8 ЛД $_{10}$ (40 мг/кг), и отсутствие значимого действия (выживаемость — 27%) в дозе 1/12 ЛД $_{10}$ (25 мг/кг). В то же время действие Т1082 обеспечивало выраженный про-

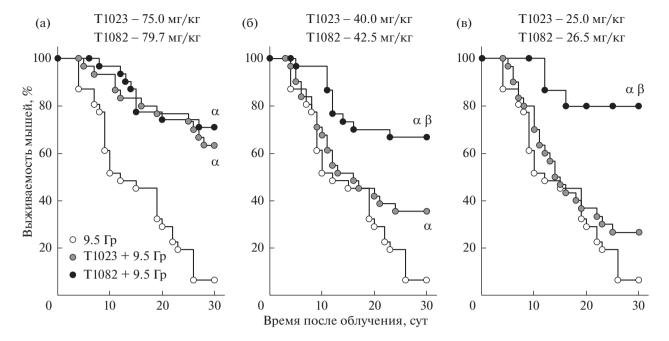


Рис. 4. Влияние соединений Т1023 и Т1084 при парентеральном введении (однократно, в/б, за 30 мин до облучения) в эквимолярных дозах, уровня 1/4 ЛД $_{10}$ (а), 1/8 ЛД $_{10}$ (б) и 1/12 ЛД $_{10}$ (в), на 30-суточную выживаемость самцов мышей F_1 (СВА \times С57ВLбј) при воздействии γ -излучения в дозе 9.5 Гр. Объединенные результаты двух экспериментов (n=15-31 в группе). Диаграммы выживаемости построены по методу Каплана—Майера. α , β — статистически значимые межгрупповые различия по F-тесту Кокса с поправками Холма—Бонферрони: α — с облученным контролем (для Т1023: p=0.000084, p=0.031577; для Т1082: p=0.000062, p=0.000217, p=0.000036), β — с группой, получавшей Т1023 (6: p=0.008075; В: p=0.000493).

Fig. 4. Influence of compounds T1023 and T1084 after parenteral administration (once, i.p., 30 min before irradiation) in equimolar doses, corresponding to 1/4 LD10 (a), 1/8 LD10 (b) and 1/12 LD10 (c), on 30-day survival of F1 (CBA × C57BL6j) male mice exposed to-radiation at a dose of 9.5 Gy. The combined results of two experiments (n = 15-31 per group). Survival diagrams were constructed using the Kaplan–Meier method. α, β – statistically significant intergroup differences according to the Cox *F*-test with Holm–Bonferroni corrections: α – with irradiated control (for T1023: p = 0.000084, p = 0.031577; for T1082: p = 0.000062, p = 0.000217, p = 0.000036), β – with group receiving T1023 (6: p = 0.008075; B: p = 0.000493).

тиволучевой эффект (выживаемость — 67–80%) во всем диапазоне доз 1/12-1/4 ЛД $_{10}$ (27–80 мг/кг). Радиозащитное действие T1082 при всех уровнях доз с высокой вероятностью (p=0.53-0.76) было равным по эффективности, и при дозах 1/12 и 1/8 ЛД $_{10}$ статистически значимо (p=0.000493, p=0.008075) превышало эффекты T1023 в соответствующих дозах.

Таким образом, результаты двух независимых серий экспериментов по тесту селезеночных эндоколоний и тесту 30-суточной выживаемости убедительно подтвердили данные предварительного скрининга (рис. 2) о том, что изменение солеобразующей кислоты с HBr на $\rm H_3PO_4$ позитивно модифицирует противолучевую активность солей 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевины. При этом масштаб такой модификации с позиций фармакологии является значительным. Наблюдается 2-кратное увеличение диапазона эффективных радиозащитных доз (радиозащитной широты) — от 60–90 мг/кг у соли гидробромида до 27–90 мг/кг у фосфатной соли. Причем

увеличение этого диапазона реализуется за счет расширения в область низких, более безопасных доз — $1/12-1/8~\Pi Д_{10}$. И в этом случае увеличение в 2-3 раза дистанции от токсического порога позволяет соединению T1082 существенно ограничить риски развития негативных эффектов без потери противолучевой эффективности.

Вместе с тем способность T1082 к эффективному противолучевому действию в низких дозах (концентрациях) может дать значительные преимущества этому соединению не только в безопасности, но и в применимости. В частности, такая особенность T1082 может повысить приемлемость такого действующего вещества для перорального способа применения. В этой связи для более полной оценки перспективности соединения T1082 на завершающем этапе этой работы было проведено сравнительное исследование влияния T1023 и T1082 при пероральном введении на 30-суточную выживаемость самцов мышей F_1 (CBA × C57BL6j) при воздействии γ -излучения в дозе 9 Гр. В этих экспериментах было установлено, что T1082 при

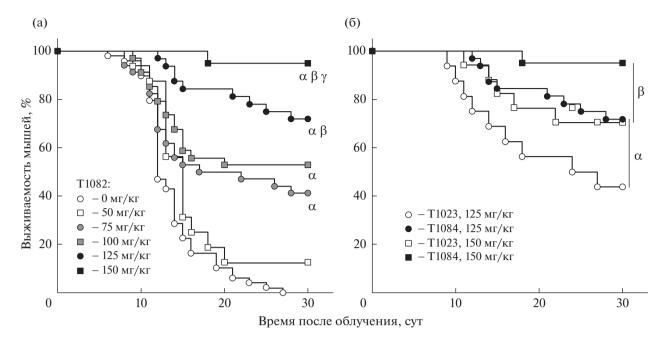


Рис. 5. Влияние соединений Т1023 и Т1084 при пероральном введении (однократно, в/ж, за 30 мин до облучения) на 30-суточную выживаемость самцов мышей F_1 (CBA × C57BL6j) при воздействии γ -излучения в дозе 9 Гр. а — эффекты Т1082 при дозах 50—150 мг/кг. Объединенные результаты двух экспериментов (n=20—34 в группе). α , β , γ — статистически значимые межгрупповые различия по F-тесту Кокса с поправками Холма—Бонферрони: α — с облученным контролем (p=0.012219, p=0.009427, p=0.0000073, p<0.000001); β — с группой, получавшей 75 мг/кг (p=0.013702, p=0.000306); γ — с группой, получавшей 125 мг/кг (p=0.005431). 6— эффекты Т1023 и Т1082 в дозах 125 и 150 мг/кг. Объединенные результаты двух экспериментов (n=15—34 в группе). α — различие эффектов Т1023 и Т1082 при дозе 125 мг/кг (p=0.016827); β — различие эффектов Т1023 и Т1082 при дозе 150 мг/кг (p=0.026849) по F-критерию Кокса.

Fig. 5. The effect of compounds T1023 and T1084 after oral administration (once, i/g, 30 min before irradiation) on the 30-day survival of male mice $F_1(CBA \times C57BL6j)$ exposed to γ -radiation at a dose of 9 Gy. a – effects of T1082 at doses of 50–150 mg/kg. Combined results from two experiments (n=20-34 in group). α , β , γ – statistically significant intergroup differences according to the Cox F-test with Holm–Bonferroni corrections: α – with irradiated control (p=0.012219, p=0.009427, p=0.000073, p<0.000001); β – with the group receiving 125 mg/kg (p=0.005431).

6 – effects of T1023 and T1082 at doses of 125 and 150 mg/kg. Combined results from two experiments (n = 15–34 in group). α – difference in the effects of T1023 and T1082 at a dose of 125 mg/kg (p = 0.016827); β – difference between the effects of T1023 and T1082 at a dose of 150 mg/kg (p = 0.026849) according to the Cox *F*-test.

однократном в/ж введении в дозах 50-150 мг/кг проявляет радиозащитную активность, выраженность которой носит отчетливую дозовую зависимость (рис. 5, а) – уровень эффекта нарастал от незначимого (выживаемость – 17%) при 50 мг/кг до высокоэффективного (выживаемость - 73%) при 125 мг/кг и абсолютно эффективного (выживаемость — 95%) при 150 мг/кг. Соединение Т1023 при в/ж введении в дозах 125 и 150 мг/кг в этих опытах также оказывало противолучевое действие (рис. 5, б). Тем не менее при обеих дозах эффект Т1082 статистически значимо превосходил (p = 0.016827, p = 0.026849) эффект соединения Т1023. А равное радиозащитное действие соединение Т1082 при пероральном введении реализовало при существенно меньших дозах (на 25-50 мг/кг; на 20-40%), чем соединение Т1023 противолучевой эффект Т1023 в дозе 125 мг/кг был равноэффективен (p = 0.61-0.79) действию Т1082 в дозах 75—100 мг/кг, а противолучевой эффект Т1023 в дозе 150 мг/кг был равноэффективен (p = 0.84) действию Т1082 в дозе 125 мг/кг.

Полученные в этих опытах данные позволили нам также статистически надежно (p=0.00621) охарактеризовать дозовую зависимость противолучевого действия T1082 при пероральном введении (рис. 6). Согласно результатам пробит-анализа, для мышей при таком способе введения минимальная радиозащитная доза T1082 (ED_{16}) составляет 54.4 мг/кг, средняя эффективная доза (ED_{50}) составляет 87.6 мг/кг, а диапазон оптимальных радиозащитных доз (ED_{84-98} — пробит в интервале 6.0-7.0) находится в пределах 141.2-224.1 мг/кг.

В полученных данных обращало на себя внимание различие влияния способа введения Т1082 на чувствительность мышей к острому токсическому и радиозащитному действию этого соеди-

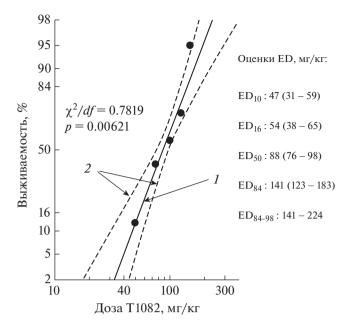


Рис. 6. Пробит-анализ дозовой зависимости радиозащитного эффекта T1082 при пероральном введении для мышей F_1 (CBA × C57BL6j) по критерию 30-суточной выживаемости. Темные символы — экспериментальные наблюдения (из рис. 5, а), I — средние ожидаемые эффективные дозы T1082, 2 — 95%-ный доверительный интервал ожидаемых эффективных доз T1082, p — уровень значимости пробит-логарифмической регрессии. Справа — оценки ED T1082 различной противолучевой эффективности.

Fig. 6. Probit analysis of the dose dependence of T1082 radioprotective effect after oral administration in F1 (CBA \times C57BL6j) mice according to 30-day survival criterion. Dark symbols – experimental observations (from Fig. 5, a), I – average expected effective doses of T1082, 2 – 95% confidence interval of T1082 expected effective doses, p – the significance level of probit-logarithmic regression. Right – estimates of T1082 ED of various radiation efficacy.

нения. Действительно, если острая токсичность Т 1082 при пероральном применении снижалась в 6.5—7.0 раз в сравнении с в/б введением (ЛД $_{10}$ и ЛД $_{50}$ возросли от 321 и 403 мг/кг до 2290 и 2638 мг/кг), то чувствительность к радиозащитному действию Т 1082 при этом снижалась заметно слабее — в 2.5—5.0 раз (Е $_{\rm opt}$ возросли от 27—90 мг/кг до 141—224 мг/кг). И в этом случае при пероральном применении Т 1082 существенно (не

менее чем на 40%) возрастала дистанция радиозащитных доз от токсического порога. Расчеты показали (табл. 2), что терапевтический индекс ($\Pi \Delta_{50}/\mathrm{ED_{50}}$) Т1082 при пероральном применении равен 30, при этом его оптимальные радиозащитные дозы более чем на порядок ниже максимально переносимых доз — 1/16-1/10 $\Pi \Delta_{10}$. Следовательно, по соотношениям эффективности и безопасности соединение Т1082 при пероральном способе введения превосходит характеристики для данного вида животных многих известных противолучевых средств [36].

Такая картина свидетельствует в пользу того, что пероральный способ применения Т1082 является не только приемлемым, но и, вероятно, наиболее предпочтительным, в том числе и с позиций безопасности. Причем экстраполяция радиозащитных доз соединения Т1082 для человека показывает, что пероральный способ применения этого средства вполне приемлем для фармацевтической разработки (табл. 3) – для людей с массой тела 60-80 кг эффективное радиозащитное действие будет обеспечиваться при пероральном приеме 750-1250 мг соединения Т1082. В этом случае фармацевтическая разработка такого ЛС в виде твердой лекарственной формы, содержащей 250 мг (3-5 единиц на прием) или 400 мг (2-3 единицы на прием) действующего вещества, будет вполне приемлемой для однократного или кратного применения как в качестве радиопротектора, так и средства профилактики осложнений лучевой терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты этого исследования показали, что замещение солеобразующей кислоты с гидробромида на фосфат не изменяет токсических характеристик, но позитивно модифицирует противолучевую активность солей 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевины. Фосфатная соль (соединение T1082) приобретает способность к эффективному радиозащитному действию при парентеральном введении в относительно низких дозах (1/12-1/8 ЛД₁₀), в которых соль гидробромида (соединение T1023) низкоэффективна или уже не действует. Масштаб такой модификации с позиций фармакологии является значительным. Наблюдается 2-кратное расширение

Таблица 2. Фармакологические показатели безопасности радиозащитного действия соединений T1082 для мышей **Table 2.** Pharmacological safety parameters of the radioprotective action of T1082 compounds for mice

Соединение, способ введения	ЛД ₁₀ / ED ₁₆	ЛД ₅₀ / ED ₅₀	ЛД ₁₀ / ED ₅₀	ЛД ₁₀ / ED _{opt}
Т1082, в/ж	42.1	30.1	26.1	10.2-16.2

 Человек *

 Мышь
 Человек *

 масса тела 60 кг
 масса тела 80 кг

 ED₈₄₋₉₈, мг/кг
 ED₈₄₋₉₈, мг/кг
 на прием, мг
 ED₈₄₋₉₈, мг/кг
 на прием, мг

 141.2-224.1
 12.6-17.4
 755-1046
 11.4-15.7
 909-1258

Таблица 3. Расчеты первично рекомендуемых радиозащитных доз T 1082 для человека при пероральном введении **Table 3.** Calculations of the primary recommended radioprotective doses of T 1082 for humans after oral administration

диапазона эффективных доз — от 1/5-1/3 ЛД $_{10}$ (60—90 мг/кг) у T1023 до 1/12-1/3 ЛД $_{10}$ (27—90 мг/кг) у T1082. Такая возможность применения в 2—3 раза меньших доз без потери противолучевой эффективности дает соединению T1082 существенные преимущества над исходным T1023, в первую очередь, в безопасности.

При пероральном введении Т1082 в дозах 50—150 мг/кг наблюдается радиозащитное действие, имеющее отчетливый дозово-зависимый характер, при этом эффекты Т1082 статистически значимо превышают действие равных доз Т1023. Причем при пероральном способе введения уровень безопасности радиозащитного действия Т1082 еще более возрастает — терапевтический индекс ($\Pi \Lambda_{50}/ED_{50}$) достигает 30, а оптимальные радиозащитные дозы Т1082 ($ED_{84-98}-141-224$ мг/кг) при этом более чем на порядок ниже максимально переносимых доз (1/16-1/10 $\Pi \Lambda_{10}$).

Совокупность этих данных доказывает наличие у химического аналога T1023 — 1-изобутаноил-2-изопропилизотиомочевины фосфата, выраженных радиобиологических и фармакологических преимуществ над прототипом, что позволяет отнести T1082 к числу наиболее безопасных потенциальных противолучевых средств и свидетельствует о высокой перспективности этого соединения в качестве основы нового радиопротектора или средства профилактики осложнений лучевой терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Pellmar T.C., Rockwell S.* Priority list of research areas for radiological nuclear threat countermeasures // Radiat. Res. 2005. V. 163. № 1. P. 115–123. https://doi.org/10.1667/rr3283
- 2. Singh V.K., Romaine P.L., Seed T.M. Medical countermeasures for radiation exposure and related injuries: characterization of medicines, FDA-approval status and inclusion into the strategic national stockpile // Health Phys. 2015. V. 108. № 6. P. 607–630. https://doi.org/10.1097/HP.00000000000000279

- 3. *Рождественский Л.М.* Актуальные вопросы поиска и исследования противолучевых средств // Радиац. биология. Радиоэкология. 2013. Т. 53. № 5. С. 513—520. [*Rozhdestvensky LM.* Actual problems of searching and studying radiation countermeasures // Radiatsionnaia biologiia. Radioecologiia = Radiation Biology. Radioecology. 2013. V. 53. № 5. P. 513—520. (in Russian)] https://doi.org/10.7868/S0869803113050135
- 4. Singh V.K., Seed T.M. A review of radiation countermeasures focusing on injury-specific medicinals and regulatory approval status: part I. Radiation subsyndromes, animal models and FDA-approved countermeasures // Int. J. Radiat. Biol. 2017. V. 93. № 9. P. 851–869.
 - https://doi.org/10.1080/09553002.2017.1332438
- 5. Singh V.K., Garcia M., Seed T.M. A review of radiation countermeasures focusing on injury-specific medicinals and regulatory approval status: part II. Countermeasures for limited indications, internalized radionuclides, emesis, late effects, and agents demonstrating efficacy in large animals with or without FDA IND status // Int. J. Radiat. Biol. 2017. V. 93. № 9. P. 870–884. https://doi.org/10.1080/09553002.2017.1338782
- 6. *Grebenyuk A.N.*, *Gladkikh V.D.* Modern condition and prospects for the development of medicines towards prevention and early treatment of radiation damage // Biol. Bull. 2019. V. 46 № 11. P. 1540–1555. https://doi.org/10.1134/S1062359019110141
- 7. Rozhdestvensky L.M. Challenges in the design of Russian radiation protection means in the crisis period: The search for key directions of development // Biol. Bull. 2020. V. 47. № 12. P. 1659–1668. https://doi.org/10.1134/S1062359020120080
- 8. King M., Joseph S., Albert A. et al. Use of amifostine for cytoprotection during radiation therapy: a review // Oncology. 2020. V. 98. № 2. P. 61–80. https://doi.org/10.1159/000502979
- 9. Le Q.T., Kim H.E., Schneider C.J. et al. Palifermin reduced severe mucositis in definitive chemoradiotherapy of locally advanced head and neck cancer: a randomized, placebo-controlled study // J. Clin. Oncol. 2011. V. 29. № 20. P. 2808–2814. https://doi.org/10.1200/JCO.2010.32.4095
- 10. *Филимонова М.В.*, *Филимонов А.С.* Современные проблемы и перспективы разработки и внедрения отечественных противолучевых лекарственных

^{*} Значения ED рассчитаны по действующим коэффициентам межвидовой экстраполяции доз [32].

- средств // Радиац. биология. Радиоэкология. 2019. T. 59. № 2. C. 127-131. [Filimonova M.V., Filimonov A.S. Contemporary problems and perspectives of development and implementation of domestic radioprotective drugs // Radiatsionnaia biologiia. radioecologiia = Radiation Biology. Radioecology. 2019. V. 59. № 2. P. 127–131. (in Russian)] https://doi.org/10.1134/S0869803119020061
- 11. Васин М.В. Средства профилактики и лечения лучевых поражений. М., 2006. 340 с. [Vasin M.V. Medicines of prophylaxis and treatment of radiation injuries. Moscow, 2006. 340 p. (in Russian)]
- 12. Singh V.K., Hanlon B.K., Santiago P.T., Seed T.M. A review of radiation countermeasures focusing on injuryspecific medicinals and regulatory approval status: part III. Countermeasures under early stages of development along with 'standard of care' medicinal and procedures not requiring regulatory approval for use // Int. J. Radiat. Biol. 2017. V. 93. № 9. P. 885–906. https://doi.org/10.1080/09553002.2017.1332440
- 13. Legeza V.I., Drachev I.S., Grebenyuk A.N. Radiomitigators: classification, pharmacological properties, and application prospects // Biol. Bull. 2019. V. 46. № 12. P. 1625-1632. https://doi.org/10.1134/S1062359019120045
- 14. Forstermann U., Sessa W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function // Eur. Heart J. 2012. V. 33. № 7. P. 829-837. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304
- 15. Liebmann J., DeLuca A.M., Coffin D., Keefer L.K., Venzon D., Wink D.A., et al. In vivo radiation protection by nitric oxide modulation // Cancer Res. 1994. V. 54. № 13. P. 3365-3368. PMID: 7516820
- 16. Gorbunov N.V., Pogue-Geile K.L. et al. Activation of nitric oxide synthase 2 pathway in the response of bone marrow stromal cells to high doses of ionizing radiation // Radiat. Res. 2000. V. 154. № 1. P. 73-86. https://doi.org/10.1667/0033-7587(2000)154[0073:aotnos]2.0.co;2
- 17. Barthlen W., Klemens C., Rogenhofer S. et al. Critical role of nitric oxide for proliferation and apoptosis of bone-marrow cells under septic conditions // Ann. Hematol. 2000. V. 79. № 5. P. 249-254. https://doi.org/10.1007/s002770050588
- 18. Proskuryakov S. Ya., Kucherenko N.G., Trishkina A.I. et al. NO-inhibiting and vasotropic activity of some compounds with thioamidine group // Bull. Experim. Biol. Med. 2002. V. 134. № 4. P. 338-341. https://doi.org/10.1023/A:1021943811672
- 19. Филимонова М.В., Проскуряков С.Я., Шевченко Л.И. и др. Радиозащитные свойства производных изотиомочевины с NO-ингибирующим механизмом действия // Радиац. биология. Радиоэкология. 2012. T. 52. № 6. C. 593-601. [Filimonova M.V., Proskuriakov S.Y., Shevchenko L.I. et al. Radioprotective properties of isothiourea derivatives with NO-inhibitory mechanism of action // Radiatsionnaia biologiia. radioecologiia // Radiation Biology. Radioecology. 2012. V. 52. № 6. P. 593–601. (in Russian)]
- 20. Филимонова М.В., Шевченко Л.И., Трофимова Т.П. $u \, \partial p$. К вопросу о механизме радиозащитного дей-

- ствия ингибиторов NO-синтаз // Радиац. биология. Радиоэкология. 2014. Т. 54. № 5. С. 500-506. [Filimonova M.V., Shevchenko L.I., Trofimova T.P. et al. On the mechanism of radioprotective effect of NO-synthase inhibitors // Radiatsionnaia biologiia. Radioecologiia // Radiation Biology. Radioecology. 2014. V. 54. № 5. P. 500–506. (in Russian)] https://doi.org/10.7868/S086980311405004X
- 21. Макарчук В.М., Филимонова М.В., Филимонов А.С. и др. Лактатемия как возможный фармакологический маркер радиорезистентности при действии ингибитора NOS T1023 // Радиация и риск. 2020. T. 29. № 1. C. 45–56. [Makarchuk V.M., Filimonova M.V., Filimonov A.S. et al. Lactatemia as a possible pharmacological marker of NOS-inhibitor T1023 induced radioresistance // Radiation and Risk. 2020. V. 29. № 1. P. 45-56. (in Russian)] https://doi.org/10.21870/0131-3878-2020-29-1-45-56
- 22. Филимонова М.В., Шевченко Л.И., Макарчук В.М. и др. Радиозащитные свойства ингибитора NOсинтаз Т1023: І. Показатели противолучевой активности и взаимодействие с другими радиопротекторами // Радиац. биология. Радиоэкология. 2015. T. 55. № 3. C. 250-259. [Filimonova M.V., Shevchenko L.I., Makarchuk V.M. et al. Radioprotective properties of NO-synthase inhibitor T1023: I. Indicators of radioprotective activity and interaction with other radioprotectors // Radiatsionnaia biologiia. Radioecologiia // Radiation Biology. Radioecology. 2015. V. 55. № 3. P. 250–259. (in Russian)] https://doi.org/10.7868/S0869803115030042
- 23. Макарчук В.М., Филимонова М.В., Изместьева О.С. *и др.* Радиозащитные свойства ингибитора NOсинтаз Т1023: III. Механизмы противолучевого действия in vivo // Радиаци. биология. Радиоэкология. 2016. Т. 56. № 6. С. 590-597. [Makarchuk V.M., Filimonova M.V., Izmestieva O.S. et al. Radioprotective properties of NO-synthase Inhibitor T1023: III. Mechanisms of radioprotective action in vivo // Radiatsionnaia biologiia. Radioecologiia = Radiation Biology. Radioecology. 2016. V. 56. № 6. P. 590-597. (in Russian)] https://doi.org/10.7868/S0869803116060060
- Filimonova M.V., Makarchuk V.M., Shevchenko L.I. et al. Radioprotective activity of nitric oxide synthase inhibitor T1023. Toxicological and biochemical properties, cardiovascular and radioprotective effects // Radiat. Res. 2020. V. 194. № 5. P. 532-543. https://doi.org/10.1667/RADE-20-00046.1
- 25. Филимонова М.В., Ульяненко С.Е., Шевченко Л.И. и др. Радиозащитные свойства ингибитора NOсинтаз Т1023: II. Способность к селективной защите нормальных тканей при лучевой терапии новообразований // Радиаци. биология. Радиоэкология. 2015. Т. 55. № 3. С. 260-266. [Filimonova M.V., Ulyanenko S.E., Shevchenko L.I. et al. Radioprotective properties of NO-synthase Inhibitor T1023: II. The ability for selective protection of normal tissues during radiotherapy of tumor // Radiatsionnaia biologiia. Radioecologiia // Radiation Biology. Radioecology. 2015. V. 55. № 3. P. 260–266. (in Russian)] https://doi.org/10.7868/S0869803115030054

- 26. Филимонова М.В., Самсонова А.С., Корнеева Т.С. и др. Исследование способности нового ингибитора синтаз оксида азота INOS1 селективно защищать нормальные ткани на модели лучевой терапии карциномы Эрлиха // Радиация и риск. 2018. Т. 27. № 2. С. 37—45. [Filimonova M.V., Samsonova A.S., Korneeva T.S. et al. Study of the ability of a new nitric oxide synthase inhibitor INOS1 to selectively protect the normal tissue in the Ehrlich carcinoma radiotherapy model // Radiation and Risk. 2018. V. 27. № 2. P. 37—45. (in Russian)] https://doi.org/10.21870/0131-3878-2018-27-2-37-45
- 27. Филимонова М.В., Самсонова А.С., Корнеева Т.С. и др. Противолучевые эффекты ингибитора синтаз оксида азота Т1023 в нормальных и малигнизированных тканях // Радиация и риск. 2018. Т. 27. № 4. С. 155—169. [Filimonova M.V., Samsonova A.S., Korneeva T.S. et al. The radioprotective effects of nitric oxide synthase inhibitor T1023 on normal and malignant tissues // Radiation and Risk. 2018. V. 27. № 4. Р. 155—169. (in Russian)] https://doi.org/10.21870/0131-3878-2018-27-4-155-169
- 28. Сабурова А.С., Филимонова М.В., Южаков В.В. и др. Влияние ингибитора синтаз оксида азота Т1023 на развитие лучевого пневмофиброза у крыс // Радиац. гигиена. 2020. Т. 13. № 1. С. 60—67. [Saburova A.S., Filimonova M.V., Yuzhakov V.V. et al. The influence of nitric oxide synthases inhibitor T1023 on the development of radiation pneumofibrosis in rats // Radiatsionnaya Gygiena = Radiation Hygiene. 2020. V. 13. № 1. Р. 60—67. (in Russian)] https://doi.org/10.21514/1998-426X-2020-13-1-60-67
- 29. *Curry S.H.*, *Whelpton R*. Drug disposition and pharmacokinetics: From principles to applications, 2nd Ed. John Wiley & Sons Ltd., 2011. 388 p. https://doi.org/10.1002/9780470665190.ch11
- 30. *Филимонова М.В., Сабурова А.А., Шевченко Л.И. и др.* Влияние вида солеобразующих кислот на противолучевую активность аналогов T1023 солей

- N-изобутанол-S-изопропилизотиомочевины // Радиац. гигиена. 2021. Т. 14. № 1. С. 68–74. [Filimonova M.V., Saburova A.S., Shevchenko L.I. et al. Influence of the of salt-forming acids on the antiradiation activity of T1023 analogs salts of N-isobutanoyl-S-isopropylisothiourea // Radiatsionnaya Gygiena // Radiation Hygiene. 2021. V. 14. № 1. P. 68–74. (in Russian)] https://doi.org/10.21514/1998-426X-2021-14-1-68-74
- 31. *Филимонова М.В., Шевченко Л.И., Филимонов А.С. и др.* Радиозащитное фармакологическое средство: Патент на изобретение Российской Федерации RU 2733883, 07.10.2020. [*Filimonova M.V., Shevchenko L.I., Filimonov A.S. et al.* Radioprotective pharmacological agent: Russian Federation patent RU 2733883, 07.10.2020 (in Russian)]
- 32. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1-я / Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012. 944 с. [Guidelines on conduction of pre-clinical trials. Part one / Ed. A.N. Mironov. Moscow: Grif and Co, 2012. 944 p. (in Russian)]
- 33. *McCulloch E.A.*, *Till J.E.* The sensitivity of cells from normal mouse bone marrow to gamma radiation in vitro and in vivo // Radiat. Res. 1962. V. 16. P. 822–832. PMID: 16722000
- 34. *Holm S*. A simple sequentially rejective multiple test procedure // Scand. J. Stat. 1979. V. 6. № 2. P. 65–70. JSTOR 4615733.
- 35. *Berezovskaya I.V.* Classification of substances with respect to acute toxicity for parenteral administration // Pharmaceut. Chem. J. 2003. V. 37. № 3. P. 139–141. https://doi.org/10.1023/A:1024586630954
- 36. *Vasin M.V., Ushakov I.B.* Comparative efficacy and the window of radioprotection for adrenergic and serotoninergic agents and aminothiols in experiments with small and large animals // J. Radiat. Res. 2015. V. 56. № 1. P. 1–10. https://doi.org/10.1093/jrr/rru087

Radioprotective Effects of T1082 — Phosphate 1-isobutanoyl-2-isopropylisothiurea in Comparisson with its Analogue T1023

M. V. Filimonova^{a,#}, L. I. Shevchenko^a, V. M. Makarchuk^a, A. S. Saburova^a, O. V. Soldatova^a, A. A. Shitova^a, A. O. Kosachenko^a, V. A. Rybachuk^a, V. O. Saburov^a, and A. S. Filimonov^a

^a A. Tsyb Medical Radiological Research Center — branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia

#E-mail: mari fil@mail.ru

The aim of the research was a comparative study of the toxic properties and radioprotective activity of a new NOS inhibitor T1082, 1-isobutanoyl-2-isopropylisothiourea phosphate, in comparison with its close chemical analogue, known as T1023 - 1-isobutanoyl-2-isopropylisothiourea hydrobromide. The study of toxic properties was carried out according to the acute toxicity test for outbred CD-1 mice with a single intraperitoneal (i/p) and intragastric (i/g) administration. A comparative study of T1082 and T1023 radioprotective activity after i/p administration at doses of $1/18-1/2\ LD_{10}$ was carried out on male F_1 hybrid mice (CBA \times C57BL6j) according to the tests of splenic endocolonies and 30-day survival. The study of T1082 and T1023 effects after i/g administration at doses of $50-150\ mg/kg$ was carried out according to the 30-day survival test. The results of this study showed that the replacement of the salt-forming acid from HBr to H_3PO_4 does not

significantly change the toxic properties, but significantly modifies the padioprotective activity of 1-isobutanoyl-2-isopropyl isothiourea salts. Phosphate salt (T1082) acquires the ability to have an effective radioprotective effect when administered i/p in low doses (1/12-1/8 LD₁₀), at which the hydrobromide salt (T1023) is ineffective or no longer works. The consequences of such features of the T1082 are significant. There is a 2-fold expansion of the range of effective doses – from 1/5-1/3 LD₁₀ (60-90 mg/kg) for T1023 to 1/12-1/3 LD₁₀ (27-90 mg/kg) for T1082. This possibility of using 2–3 times lower doses without loss of radioprotective efficiency gives the T1082 compound significant advantages, first of all, in safety. After i/g administration, T1082 at doses of 50-150 mg/kg implements dose-dependent radioprotective effect, which statistically significantly exceed the effect of equal doses of T1023. Moreover, after i/g administration, the level of T1082 safety increases even more – the therapeutic index (LD₅₀/ED₅₀) reaches 30, and the optimal radioprotective doses of T1082 (ED₈₄₋₉₈ – 224 mg/kg) are more than an order of magnitude lower than the maximum tolerated doses (1/16-1/10 LD₁₀). The data obtained prove that 1-isobutanoyl-2-isopropylisothiourea phosphate has pronounced advantages over the prototype (T1023), which make it possible to classify the T1082 compound as one of the safest potential radioprotective agents, and indicate its high prospects as a basis for a new radioprotector or a mean of preventing radiation therapy complications.

Keywords: Radioprotective efficacy, irradiation, survival, pharmacological safety, acute toxicity, compound T1023, NOS inhibitor

МОДИФИКАЦИЯ РАДИАЦИОННЫХ ЭФФЕКТОВ

УЛК 616-03:615: 599.323.4: 57.084.1:539.1.047

ПРОТИВОЛУЧЕВЫЕ СВОЙСТВА ИНДРАЛИНА И ЭССЕНЦИАЛЕ Н ПРИ РАЗДЕЛЬНОМ И СОЧЕТАННОМ ПРИМЕНЕНИИ В УСЛОВИЯХ ФРАКЦИОНИРОВАННОГО γ-ОБЛУЧЕНИЯ

© 2021 г. М. В. Васин^{1,*}, И. Б. Ушаков², Ю. Н. Чернов³, Л. А. Семенова⁴, Р. В. Афанасьев⁴

¹ Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава РФ, Москва, Россия
 ² Государственный научный центр — Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА РФ, Москва, Россия

³ Государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко, Воронеж, Россия

⁴ Научно-исследовательский испытательный центр (авиационно-космической медицины и военной эргономики) ЦНИИ ВВС МО РФ, Москва, Россия

*E-mail: mikhail-v-vasin@yandex.ru
Поступила в редакцию 08.04.2021 г.
После доработки 12.07.2021 г.
Принята к публикации 01.09.2021 г.

В опытах на мышах (CBA × C57BL/6)F1 проведено изучение противолучевых свойств радиопротектора индралина и препарата Эссенциале Н при раздельном и сочетанном применении в условиях различного режима фракционированного у-облучения. Животных облучали на γ^{60} Со-терапевтической установке при мощности дозы 68.1-73.5 сГр/мин однократно при дозе 10 Гр, 3-кратно через неделю в дозе 6 Гр (суммарная доза 18 Гр), 7-кратно через день в дозе 2.8 Гр (суммарная доза 19.6 Гр) и 11-кратно ежедневно в дозе 2 Гр (суммарная доза 22 Гр). Все препараты вводили мышам перорально: индралин в дозе 50 мг/кг за 10 мин перед каждой фракцией облучения. Эссенциале Н в дозах 0.6 мл/кг (30 мг/кг по фосфолипиду и 3 мг/кг никотинамиду в его составе) семь раз через день за 2 ч перед каждой фракцией облучения. Противолучевую эффективность радиопротекторов оценивали по выживаемости мышей в течение 30 сут и средней продолжительности жизни погибших животных. В условиях несмертельного фракционированного ежедневного облучения в дозе 1 Гр в течение 5 сут оценивали влияние Эссенциале Н на выраженность пострадиационной лейкопении, на снижение массы селезенки и скорость восстановления системы кроветворения. Установлено, что при 3-кратном облучении один раз в неделю индралин полностью сохраняет свою высокую противолучевую эффективность, равную 72.5-77.5%. При облучении через день или ежедневно в течение 2 нед индралин снижал свои защитные свойства в 2 раза. Эссенциале Н, применяемый во время фракционированного облучения через день или ежедневно, проявил небольшой противолучевой эффект, равный 25% (p < 0.05). Эссенциале H способен снижать выраженность пострадиационной лейкопении и сокращать время восстановления системы кроветворения в условиях ежедневного фракционированного облучения. При сочетанном применении индралина и Эссенциале Н отмечаемое противолучевое действие оставалось без существенных изменений, при отсутствии эффекта аддитивности или потенцирования активности радиопротектора.

Ключевые слова: индралин, Эссенциале H, никотинамид, фосфатный концентрат подсолнечного масла, фракционированное γ -облучение, острое γ -облучение

DOI: 10.31857/S0869803121060126

В клинической практике радиотерапии онкологических больных применяется фракционированное локальное облучение области проекции на поверхность тела опухоли при различном количестве фракций (от единичных до более трех десятков), различных временных промежутках между фракциями и дозах облучения в одной фракции в зависимости от онкологической нозологии [1]. Единственный разработанный радиопротектор как лекарственное средство амифо-

стин применяется при радиотерапии опухолей головы и шеи [2]. Амифостин снижает риск осложнений радиотерапии в виде развития пострадиационного мукозита, острой и поздней ксеростомии и дисфагии при отсутствии радиозащитного эффекта на опухоль и влияния на изменение гематологических показателей после радиотерапии в виде лейкопении, анемии и тромбоцитопении.

Отечественный радиопротектор экстренного действия индрадин прошел доклинические исследования его эффективности при локальном у-облучении кожи и области головы. Обнаружены его высокие противолучевые свойства как при острых, так и поздних местных лучевых поражениях кожи, слюнных желез и слизистой области рта [3-7]. В настоящем исследовании изучали влияние различных режимов фракционированного у-облучения на проявления противолучевых свойств индралина. Принимая во внимание, что в процессе фракционирования дозы облучения в практике радиотерапии имеет место длительная стимуляция процессов регенерации облученных тканей с возможным их истощением, проведено изучение в этих условиях влияния препарата Эссенциале Н на течение репарации радиочувствительных тканей, в том числе на фоне применения радиопротектора индралина.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Опыты проведены на мышах (CBA × C57BL/6)F1 самках массой 23-28 г. Животных подвергали воздействию у-лучей ⁶⁰Со на установке "Хизотрон" (Чехия), сравнивали следующие варианты фракционированного облучения: 3-кратное облучение через неделю в дозе 6 Гр (суммарная доза 18 Гр), 7-кратное облучение через день в дозе 2.8 Гр (суммарная доза 19.6 Гр) и 11-кратное облучение ежедневно в дозе 2 Гр (суммарная доза 22 Гр) кроме двух воскресных дней в неделю. Облучение начинали с понедельника. Расчет дозовых нагрузок проводили с учетом скорости пострадиационного восстановления при фракционированном облучении для достижения ЛД_{90-95/30} у-излучения. Однократное облучение осуществляли в дозе 10 Гр. В отдельной серии опытов для исследования влияния Эссенциале Н на систему кроветворения мышей облучали ежедневно в дозе 1 Гр в течение 5 дней (суммарная доза 5 Гр). Мощность дозы у-излучения составила 68.1— 73.5 сГр/мин.

Радиобиологический эффект и противолучевые свойства препаратов оценивали по выживаемости мышей в течение 30 сут после облучения и средней продолжительности жизни погибших животных (СПЖ) в течение данного срока наблюдения. При несмертельном фракционированном облучении (суммарная доза 5 Гр) противолучевые свойства Эссенциале Н оценивали по его влиянию на проявление пострадиационной лейкопении и снижение массы селезенки в течении 60 сут после облучения. Исследование крови и массу селезенки мышей определяли на 5-е, 10-е, 20-е, 30-е и 60-е сутки после облучения. Подсчет лейкоцитов осуществляли в камере Горяева. Взвешивание селезенки проводили на торзионных весах.

Изучены противолучевые свойства радиопротектора индралина и препарата Эссенциале Н (Rhone-Poulene Rorer, Франция) в виде раствора, содержащего фосфатидилхолин, никотинамид, цианокобаламин, пиридоксин и натрий-d-пантотенат, при раздельном и сочетанном применении. Все препараты применяли перорально через зонд в желудок в объеме 0.5 мл на мышь. Индралин применяли в виде эмульсии в 0.7%-ном растворе крахмала. Мышам контрольных групп на облучение вводили воду в том же объеме и режиме применения. Индралин вводили в дозе 50 мг/кг за 10 мин перед каждой фракцией облучения, Эссенциале Н 7 раз через день и за 2 ч перед каждой фракцией облучения. Эссенциале Н применяли в дозе 0.6 мл/кг или 30 мг/кг по входящему в его состав фосфатидилхолину. В случае однократного облучения Эссенциале Н применяли также 7 раз через день с последним введением за 2 ч до воздействия радиации. Так как в воскресные дни препараты не применяли, общая продолжительность режима повторного ежедневного или через сутки облучения составила 15 сут.

Достоверность полученных результатов исследования оценивали по непараметрическим критериям: по точному критерию Фишера и критерию Вилкоксона—Манна—Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Индралин в дозе 50 мг/кг при однократном облучении обладал выраженными противолучевыми свойствами, обеспечивая выживаемость 77.5% мышей при 89%-ной смертности животных в контрольной группе облучения в дозе 10 Гр. 7-кратное через день повторное применение Эссенциале Н в дозе 30 мг/кг по фосфолипиду и 3 мг/кг по никотинамиду перед однократным облучением в дозе 10 Гр не оказывало влияния на тяжесть лучевого поражения и смертность облученных животных. В случае сочетанного по той же схеме применения с индралином он не изменял его радиозащитный эффект (табл. 1).

При трехкратном облучении через неделю индралин, применяемый перед каждой фракцией, сохранял свои высокие противолучевые свойства. При его введении перед каждой фракцией при ежедневном или через день облучении радиозащитное действие радиопротектора снижалось примерно в 2 раза. В то же время Эссенциале Н, применяемый через день во время данных режимов фракционированного облучения, проявил небольшой противолучевой эффект, равный 25% (p < 0.05). В случае сочетанного применения индралина и Эссенциале Н при ежедневном или через день фракционированном облучении конечный противолучевой эффект не изменялся при отсутствии аддитивности в их действии. В отдельной серии опытов при несмертельном фракцио-

Таблица 1. Противолучевые свойства индралина и Эссенциале H при применении *per os* мышам (CBA × C57BL/6)F1 в условиях фракционированного 60 Со γ -облучения

Table 1. Radioprotective properties of indralin and Essentiale H when applied *per os* to mice (CBA × C57BL/6)F1 under fractionated 60 Co γ -irradiation

Группы	Доза препарата, мг/кг	Схема и дозы облучения	n	Выжива-емость, %	СПЖ, сут
Контроль на облучение	_	Однократно 10 Гр	100	11.0	12.9
Индралин	50.0 за 10 мин до облучения	Однократно 10 Гр	80	77.5*	13.3
Эссенциале Н	3.0 (семь раз через день и последняя за 2 ч до облучения)	Однократно 10 Гр	60	6.7	10.2
Эссенциале Н + индралин	3.0 (семь раз через день и последняя за 2 ч до облучения) + 50.0 за 10 мин до облучения	Однократно 10 Гр	40	72.5*	13.5
Контроль на облучение	_	Трехкратное облучение через неделю в дозе 6 Гр	30	3.3	12.1
Индралин	50.0 за 10 мин перед каждой фракцией	Трехкратное облучение через неделю в дозе 6 Гр	30	72.5*	11.7
Контроль облучения	_	Семикратное облучение через день в дозе 2.8 Гр	20	20.0	12.2
Индралин	50.0 за 10 мин перед каждой фракцией	Семикратное облучение через день в дозе 2.8 Гр	20	65.0*	11.7
Эссенциале Н	3.0 за 2 ч перед каждой фракцией	Семикратное облучение через день в дозе 2.8 Гр	20	45.0	11.6
Эссенциале Н + индралин	3.0 за 2 ч + 50.0 за 10 мин перед каждой фракцией	Семикратное облучение через день в дозе 2.8 Гр	20	65.0*	7.9
Контроль на облучение	_	11-кратное облучение ежедневно в дозе 2 Гр	40	12.5	7.8
Индралин	50.0 за 10 мин перед каждой фракцией	11-кратное облучение ежедневно в дозе 2 Гр	40	42.5*(**)	8.9
Эссенциале Н	3.0 семь раз через день и за 2 ч до облучения	11-кратное облучение ежедневно в дозе 2 Гр	40	37.5*	9.6
Эссенциале Н + индралин	3.0 семь раз через день за 2 ч до облучения + + 50.0 за 10 мин перед каждой фракцией	11-кратное облучение ежедневно в дозе 2 Гр	40	37.5*	7.9

^{*} p < 0.05 по сравнению с контрольной группой на облучение по точному критерию Фишера; ** p < 0.05 по сравнению с эффектом радиопротектора при однократном облучении по точному критерию Фишера. n — число мышей в группе.

нированном облучении (ежедневно по 1 Hp в течение 5 сут) Эссенциале H снижал выраженность пострадиационной лейкопени и сокращал время восстановления системы крови. Если в контрольной группе на облучение уровень лейкоцитов достигал исходных значений к концу 2-го месяца

после облучения, то в группе с применением Эссенциале Н это происходит значительно раньше (к 20-30-м суткам заболевания) (p < 0.05) (рис. 1) с учетом доверительных границ данного показателя в группе биологического контроля. По факту уменьшения снижения массы селезенки и более

2021

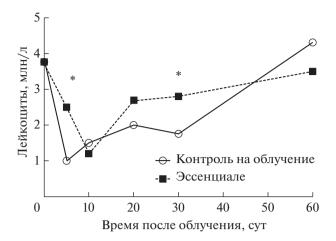


Рис. 1. Влияние Эссенциале Н на проявление пострадиационной лейкопении в условиях ежедневного фракционированного облучения в дозе 1 Гр в течение 5 дней.

Каждая точка на графике представляет средние данные по 10 животным. В группе биологического контроля средние значения по количеству лейкоцитов крови с доверительным интервалом при p=0.05 соответствовало 3.75 (3.0–4.5) $10^6/\pi$.

*p < 0.05 по сравнению с контрольной группой на облучение по критерию Вилкоксона—Манна—Уитни.

Fig. 1. Effect of Essentiale H on post-radiation leukopenia under daily fractionated irradiation at 1 Gy for 5 days/ Each point in the graph represents an average of 10 animals. In biological control group, mean for the number of blood leukocytes with a confidence interval at p = 0.05 corresponded to 3.75 (3.0–4.5) 10^6 /l.

* p < 0.05 as compared to Wilcoxon—Mann—Whitney exposure control.

быстрому ее восстановлению после облучения (к 20-м суткам) под влиянием Эссенциале H (p < 0.05) по сравнению с контрольной группой на облучение (рис. 2) можно судить о его благоприятном влиянии на процессы колонии образования стволовых кроветворных клеток в селезенке и в целом на систему кроветворения в течение фракционированного облучения.

ОБСУЖДЕНИЕ

Существующие сведения по противолучевым свойствам радиопротекторов при фракционированном облучении свидетельствуют о возможном снижении их эффективности при определенных режимах воздействия радиации. Первые сведения об эффекте длительного ежедневного перорального применения радиопротектора цистамина были сообщены Зеноном Баком [8]. Скармливание цистамина с кормом в условиях постоянного низко-интенсивного облучения мышей приводило к сокращению продолжительности их жизни. Нами было установлено, что при ежедневном фракционном облучении в дозе 2 Гр в течение 11 сут цистамин терял свои противолучевые свойства при

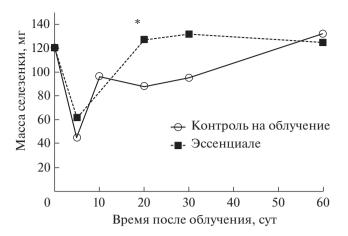


Рис. 2. Влияние Эссенциале H на снижение массы селезенки в условиях ежедневного фракционированного облучения в дозе 1 Гр в течение 5 дней.

Каждая точка на графике представляет средние данные по 10 животным. В группе биологического контроля средние значения по массе селезенки с доверительным интервалом при p=0.05 соответствовали 120~(102.5-137.5) мг.

* p < 0.05 по сравнению с контрольной группой на облучение по критерию Вилкоксона—Манна—Уитни.

Fig. 2. Effect of Essentiale H on spleen weight reduction under 1 Gy daily fractionated irradiation for 5 days. Each point in the graph represents an average of 10 animals. In biological control group, mean for spleen weight with confidence interval at p = 0.05 was 120 (102.5–137.5) mg.

* p < 0.05 as compared to Wilcoxon—Mann—Whitney exposure control.

его пероральном применении перед каждой фракцией, при этом он вызывал сокращение продолжительности жизни облученных животных почти в 2 раза [9]. В этих условиях противолучевая эффективность мексамина, производного серотонина, снижалась в 2 раза.

Причиной подобного эффекта может быть проявление кумулятивной шитотоксичности аминотиола, либо при рецепторном механизме действия мексамина десенситизации организма к препарату. Наличие кумулятивной токсичности было выявлено на примере радиопротектора амифостина из ряда аминотиолов, которая снижалась при совместном его применении с аскорбиновой кислотой или с мелатонином [10]. Известно, что элиминация цитотоксического действия цистамина происходит значительно дольше, чем время его противолучевого действия, причем воздействие радиации увеличивает время его токсического последействия [11]. Время последействия цистамина в оптимальных радиозащитных дозах может продолжаться до 6 ч [12]. В случае повторного применения мексамина, радиопротектора рецепторного механизма действия, имеет место эффект десенситизации по проявлению его противолучевых и токсических свойств, который усиливается в условиях облучения животных [13]. На примере индралина эффект десенситизации наблюдается через 1 ч, когда завершается его противолучевое действие, однако его продолжительность не больше 1 ч [14]. Третьей причиной снижения противолучевых свойств радиопротекторов при частом повторном применении в условиях фракционированного облучения может быть замедление процессов пострадиационного восстановления, в частности, кроветворной ткани. Известно, что периодическая цитотоксическая или тканевая гипоксия (биохимический восстановительный стресс или шок по Зенону Баку), лежащая в основе механизма реализации их противолучевого эффекта, подавляет репопуляцию костного мозга, которая происходит в процессе фракционного облучения, за счет митотической блокады при одновременном сохранении большей части стволовых кроветворных клеток под их действием [15], что можно рассматривать как кумуляцию токсического эффекта радиопротектора.

Небольшой противолучевой эффект Эссенциле Н при ежедневном или через день фракционном облучении связан с усилением репаративных процессов в радиочувствительных тканях, прежде всего, под действием никотинамида в его составе [16—19]. Как ранее было показано при той же схеме и дозах фракционного облучения, фосфолипиды в виде фосфатного концентрата их растительного масла или комплекс витаминов в препарате глутамевит не обладали противолучевым действием [9].

При длительной активации фермента поли (АДФ-рибоза) полимеразы (PARP), участвующего в репарации ДНК, что имеет место при фракционном облучении, происходит снижение содержания в клетке НАД+, необходимого для клеточного дыхания и синтеза АТФ. Никотинамид в небольших дозах как субстрат для синтеза никотинамид мононуклеотида, предшественника НАД+, поддерживает его содержания в клетке, тем самым сохраняя энергообеспечение репаративных процессов. Одновременно он в определенной мере сдерживает активность фермента PARP по механизму обратной связи. В больших дозах никотинамид может блокировать синтез ДНК [20].

Как оценивать отсутствие суммации противолучевого действия индралина и Эссенциале Н при сочетанном их применении в режиме ежедневного или через день фракционного облучения, принимая при этом во внимание практически их равный эффект в этих условиях. Блокада никотинамидом, вызывающим вазодилятацию, вазоконстрикторного действия индралина как альфа1-адреномиметика, в принципе возможна [21]. Тем не менее с учетом, что Эссенциале Н применяли в дозе 3 мг/кг по никотинамиду за 2 ч до облучения и применения индралина, трудно ожидать проявление его блокирующего действия

в столь малой дозе на действие радиопротектора. При однократном облучении Эссенциале Н в том же режиме применения не изменял высокие противолучевые свойства индралина (табл. 1). По всей вероятности, именно индралин благодаря гипоксическому действию устранял потенцирующий эффект никотидамида на репаративные процессы в течение фракционного облучения.

выводы

Индралин при пероральном применении в дозе 50 мг/кг за 10 мин до облучения полностью сохраняет свою высокую противолучевую эффективность, равную 72.5-77.5%, при еженедельном облучении животных. При облучении через день или ежедневно в течение 2 нед индралин снижает свои защитные свойства в 2 раза. Эссенциале Н, применяемый перорально в дозе 0.6 или 30 мг/кг по фосфолипиду и 3 мг/кг по никотинамиду в его составе повторно через день за 2 ч до облучения во время фракционированного облучения через день или ежедневно, обладает небольшим противолучевым эффектом, равный 25% (p < 0.05). Эссенциале Н способен снижать выраженность пострадиационной лейкопении и сокращать время восстановления системы кроветворения в условиях ежедневного фракционированного облучения. При сочетанном применении индралина и Эссенциале Н сохраняется радиозащитная активность радиопротектора при отсутствии эффекта аддитивности или потенцирования его противолучевых свойств.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Sugano Y., Mizuta M., Takao S. et al. Optimization of the fractionated irradiation scheme considering physical doses to tumor and organ at risk based on dose-volume histograms // Med. Phys. 2015. V. 42. № 11. P. 6203–6210. https://doi.org/10.1118/1.4931969
- 2. *King M., Joseph S., Albert A. et al.* Use of amifostine for cytoprotection during radiation therapy: a review // Oncology. 2020. V. 98. P. 61–80. https://doi.org/10.1159/000502979
- 3. *Васин М.В., Ушаков И.Б., Суворов Н.Н.* Противолучевая эффективность индралина при локальном уоблучении кожи // Радиац. биология. Радиоэкология. 1998. Т. 38. № 1. С. 42—54. [*Vasin M.V., Ushakov I.B., Suvokov N.N.* Radioprotective effectiveness of indralin at skin local irradiation // Radiat. biol. Radioecol. 1998. V. 38. № 1. P.42-54 (In Russian)]
- 4. *Васин М.В., Ушаков И.Б., Семенова Л.А. и др.* Противолучевая эффективность α-адреномиметиков при локальном γ-облучении кожи // Радиац. Биология. Радиоэкология. 1999. Т. 39. № 2—3. С. 249—253. [*Vasin M.V., Ushakov I.B., Semenova L.A. et al.* Radioprotective effectiveness of γ-adrenomimetics at local skin γ-irradiation // Radiat. biol. Radioecol. 1999. V. 39. № 2—3. P. 249—253 (In Russian)]

2021

- 5. Васин М.В., Ушаков И.Б., Ковтун В.Ю., Комарова С.Н. Сравнительная эффективность антиоксиданта мелатонина и радиопротекторов индралина и мезатона при местных лучевых поражениях // Радиац. биология. Радиоэкология. 2004. Т. 44. № 1. С. 68—71. [Vasin M.V., Ushakov I.B., Kovtun V.Yu., Komarova S.N. Comparative efficacy of melatonin antioxidant and indralin and mesaton radioprotectors in local radiation injuries // Radiat. biol. Radioecol. 2004. V. 44. № 1. Р. 68—71(In Russian)]
- 6. Васин М.В., Ушаков И.Б., Ковтун В.Ю., Коровкина Э.П. Противолучевые свойства индралина по снижению тяжести лучевого поражения слюнных желез // Радиац. биология. Радиоэкология. 2004. Т. 44. № 3. С. 333—335. [Vasin M.V., Ushakov I.B., Kovtun V.Yu., Korovkina E.P. Radioprotective properties of indralin to reduce the severity of radiation damage to salivary glands // Radiat. biol. Radioecol. 2004. V. 44. № 3. P. 333—335 (In Russian)]
- 7. Васин М.В., Ушаков И.Б., Ковтун В.Ю. Радиопротектор индралин при ранних и поздних проявлениях местных лучевых поражениях // Вопр. онкол. 2016. Т. 62. № 3. С. 406—412. [Vasin M.V., Ushakov I.B., Kovtun V.Yu. Indralin radioprotector in early and late manifestations of local radiation injuries // Voprosy onkol. 2016. V. 62. № 3. P. 406—412 (In Russian)]
- 8. Bacq Z.M., Van Caneghem P. The influence of cystamine administered by mouth to mice irradiated with gamma-rays at a low dose-rate // Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med. 1966. V. 10. № 6. P. 595–599.
- 9. Васин М.В., Чернов Ю.Н., Семенова Л.А. Противолучевые свойства радиопротекторов, иммуномодуляторов и средств, влияющих на тканевой обмен, при фракционированном облучении // Радиобиология. 1991. Т. 31. № 2. С. 271—275. [Vasin M.V., Chernov Yu.N., Semenova L.A. Radioprotective properties of radioprotectors, immunomodculators and agents affecting tissue exchange in fractionated irradiation // Radiobiologiya. 1991. V. 31. № 2. P. 271—275 (In Russian)]
- 10. Васин М.В., Ушаков И.Б., Ковтун В.Ю., Семенова Л.А., Комарова С.Н. Влияние мелатонина, аскорбиновой и янтарной кислот на кумуляцию токсического эффекта гаммафоса (амифостина) при его повторном применении // Бюл. эксперим. биол. мед. 2004. Т. 137. № 5. С. 515—518. [Vasin M.V., Ushakov I.B., Kovtun V. Yu. et al. The influence of melatonin, ascorbic and succinic acids on the accumulation of the toxic effect of gammaphos (amifostine) during its repeated use // Bull. Exp. Biol. Med. 2004. V. 137. № 5. P. 515—518 (In Russian)]
- 11. Васин М.В., Давыдов Б.И., Антипов В.В. Сравнительная элиминация радиозащитного и токсического эффекта цистамина // Радиобиология. 1971. Т. 11. № 4. С. 517—521. [Vasin M.V., Davydov B.I., Antipov V.V. Comparative elimination of radioprotective and toxic effect of cystamine // Radiobiologiya. 1971. V. 11. № 4. P. 517—521 (In Russian)]
- 12. *Васин М.В.*, *Антипов В.В.* Противолучевая эффективность цистамина при его повторном применении перед воздействием облучения // Радиобиология. 1972. Т. 12. № 6. С. 924—927. [Vasin M.V., Anti-

- pov V.V. Radioprotective effectiveness of cystamine during its repeated use before exposure to radiation // Radiobiologiya.1972. V. 12. № 6. P. 924–927 (In Russian)]
- 13. *Васин М.В.* Влияние предварительного применения мексамина на токсичность препарата при его повторном применении у облученных и необлученных животных // Радиобиология. 1973. Т. 13. № 1. С. 129—131. [*Vasin M.V.* The effect of mexamine pre-use on the toxicity of drug in its repeated use in irradiated and non-irradiated animals // Radiobiologiya. 1973. V. 13. № 1. Р. 129—131 (In Russian)]
- 14. *Васин М.В., Ушаков И.Б., Антипов В.В.* Потенциальная роль реакции катехоламинов на острую гипоксию в модификации противолучевого действия радиопротекторов // Бюл. эксперим. биол. мед. 2015. Т. 159. № 5. С. 649—552. [*Vasin M.V., Ushakov I.B., Antipov V.V.* The potential role of the reaction of catecholamines to acute hypoxia in modifying the radioprotective action of radioprotectors // Bull. exp. biol. med. 2015. V. 159. № 5. Р. 649—552 (In Russian)]
- 15. Васин М.В., Ушаков И.Б., Бухтияров И.В. Стрессреакция и состояние биохимического шока как взаимосвязанные и неизбежные компоненты в формировании повышенной радиорезистентности организма в условиях острой гипоксии // Известия РАН. Сер. биол. 2018. № 1. С. 83—92. [Vasin M.V., Ushakov I.B., Bukhtiyarov I.V. Stress reaction and the state of biochemical shock as interconnected and inevitable components in the formation of increased radio resistance of the body in conditions of acute hypoxia // Izv. RAS. Ser. biol. 2018. № 1. P. 83—92. https://doi.org/10.7868/S0002332918010113
- 16. Cheda A., Nowosielska E.M., Gebicki J. et al. A derivative of vitamin B3 applied several days after exposure reduces lethality of severely irradiated mice // Sci. Rep. 2021. V. 11. № 7922. https://doi.org/10.1038/s41598-021-86870-3
- 17. *Riklis E., Kol R., Marko R.* Trends and developments in radioprotection: the effect of nicotinamide on DNA repair // Int. J. Radiat. Biol. 1990. V. 57. № 4. P. 699–708.
- 18. *Rovito H.A.*, *Oblong J.E.* Nicotinamide preferentially protects glycolysis in dermal fibroblasts under oxidative stress conditions // Br. J. Dermatol. 2013. V. 169. Suppl. 2. P. 15–24. https://doi.org/10.1111/bjd.12365
- 19. *Hwang E.S., Song S.B.* Possible adverse effects of high-dose nicotinamide: mechanisms and safety assessment // Biomolecules. 2020. V. 10. № 687. https://doi.org/10.3390/biom10050687
- 20. Fricker R.A., Green E.L., Jenkins S.I., Griffin S.M. The Influence of nicotinamide on health and disease in the central nervous system // Int. J. Tryptophan Res. 2018. V. 11. № 1178646918776658. https://doi.org/10.1177/1178646918776658
- 21. *Ruddock M.W., Hirst D.G.* Nicotinamide relaxes vascular smooth muscle by inhibiting myosin light chain kinase-dependent signaling pathways: implications for anticancer efficacy // Oncol. Res. 2004. V. 14. № 10. P. 483–489.

Radioprotective Properties of Indralin and Essentiale H for Separate and Combined Application under Fractionated γ-Irradiation

M. V. Vasin^{a,#}, I. B. Ushakov^b, Yu. N. Chernov^c, L. A. Semenova^d, and R. V. Afanasyev^d

^a Russian Medical Academy of Continuing Professional Education of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

#E-mail: mikhail-v-vasin@yandex.ru

In experiments on mice (CBA × C57BL/6)F1. Radioprotective properties of radioprotector indralin and Essentiale H preparation were studied with separate and combined application under conditions of different mode of fractionated γ -irradiation. Animals were irradiated on γ^{60} Co-therapeutic unit at a dose rate of 68.1– 73.5 cGy/min: once in a dose of 10 Gy, it is multiple in a week in a dose of 6 Gy (total dose of 18 Gy), 7-multiply every other day in a dose of 2.8 Gy (total dose of 19.6 Gy) and 11-multiply daily in a dose of 2 Gy (total dose of 22 Gy). All drugs were administered to mice orally: indralin at a dose of 50 mg/kg in 10 min before each irradiation fraction, Essenciale H in doses of 30 mg/kg by phospholipids and 3 mg/kg by nicotinamide seven times a day and the last dose 2 hours before each irradiation fraction. Radioprotective efficacy of the radioprotectors was evaluated by the survival of mice for 30 days and the average life expectancy of dead animals. Under conditions of non-lethal fractionated daily irradiation at a dose of 1 Gy for 5 days, the effect of Essentiale H on the severity of post-radiation leukopenia, on the reduction of spleen weight and the rate of hematopoietic system recovery was evaluated. It was found that at 3 times exposure once a week, indralin completely retains its high radioprotective efficiency of 72.5–77.5%. When irradiated every other day or daily for 2 weeks, indralin reduced protective properties by 2 times. Esseniale H used during fractionated irradiation after a day or daily showed a small protective effect of 25% (p < 0.05). Essentiale H is able to reduce the severity of post-radiation leukopenia and reduce the time to restore the hematopoietic system under conditions of daily fractionated exposure. With the combined use of indralin and Essentiale H, the observed radioprotective action remained without significant changes, in the absence of an effect of additivity or potentiation of the activity of the radioprotector.

Keywords: indralin, Essentiale H, nicotinamide, fractionated γ -irradiation, acute γ -irradiation

^b Burnazyan State Scientific Center – Federal Medical Biophysical Center FMBA of the Russian Federation, Moscow, Russia
^c Burdenko State Medical University, Voronezh, Russia

^d Research and Testing Center (Aerospace Medicine and Military Ergonomics) of the Central Research Institute of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Moscow, Russia

—— РАДИОЭКОЛОГИЯ ——

УДК 574:539.163:636.084:614.876

РАДИОЭКОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ КОНТРОЛЬНЫХ УРОВНЕЙ СОДЕРЖАНИЯ ¹³⁷Cs В КОРМАХ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

© 2021 г. С. В. Фесенко^{1,*}, Н. Н. Исамов¹, П. В. Прудников², Е. С. Емлютина¹

 1 Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии, Обнинск, Россия 2 Брянскагрохимрадиология, Брянск, Россия

*E-mail: Corwin_17@mail.ru
Поступила в редакцию 30.04.2021 г.
После доработки 23.08.2021 г.
Принята к публикации 01.09.2021 г.

Представлен методический подход к обоснованию контрольных уровней содержания ¹³⁷Сs в кормах крупного рогатого скота (KPC), основанный на учете вероятностного характера параметров перехода ¹³⁷Сs в корма, молоко и мясо KPC. Выполнен сравнительный анализ мировых и российских данных по параметрам перехода ¹³⁷Сs из кормов в продукцию животноводства. Показано, что концентрации ¹³⁷Сs в молоке и мясе при содержании этого радионуклида в кормах, равные существующим контрольным уровням, обеспечивают безопасность молока, но не гарантируют соблюдение гигиенических нормативов на содержание ¹³⁷Сs в мясе. На основе методического подхода предложены контрольные уровни для мониторинга ¹³⁷Сs в кормах молочного и мясного скота в районах, подвергшихся загрязнению после Чернобыльской аварии. Использование предложенных контрольных уровней позволяет оптимизировать технологии ведения животноводства в районах Российской Федерации, загрязненных после аварии на ЧАЭС.

Ключевые слова: Чернобыльская авария, ¹³⁷Cs, контрольные уровни, крупный рогатый скот, молоко, мясо, коэффициенты перехода из кормов в продукцию животноводства

DOI: 10.31857/S0869803121060047

Ограничения на облучение человека, вызванные чернобыльской аварией, включая ограничения на использование содержащих радионуклиды пищевых продуктах, питьевой воде, древесине и некоторых других продовольственных и не продовольственных товарах, были внедрены вскоре после этой аварии как в СССР, так и во многих европейских странах [1-7]. В соответствии с Нормами радиационной безопасности [7], действующими в то время, Министерство здравоохранения СССР ввело временный предел на все тело средней эквивалентной дозы 100 мЗв в течение первого года после чернобыльской аварии (с 26 апреля 1986 г. по 26 апреля 1987 г.), 30 мЗв в течение второго года и по 25 мЗв в 1988 и 1989 г. [8]. Для ограничения внутреннего облучения населения в СССР были введены временные допустимые уровни (ВДУ) содержания радионуклидов в пищевых продуктах и питьевой воде [9–18].

Начиная с 1991 г., "нормальность" радиологической ситуации в отношении пищевых продуктов связывалась с эффективной дозой 1 мЗв/год (совместно от 90 Sr и 137 Cs) как уровнем невмешательства при распространении продуктов в торго-

вой сети [7]. В развитие этого дозового предела в 1996 г. были разработаны, а с 1997 г. введены в действие гигиенические нормативы СанПиН 2.3.2.560-96 "Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов" (далее СанПиН-96), согласно которым радиационная безопасность пищевых продуктов определяется соответствием этих продуктов определенным значениям удельной активности 90 Sr и 137 Cs [14]. Соблюдение этих требований является обязательным на территории России для отечественной и импортной пищевой продукции.

СанПиН-96 был введен на всей территории России как важный элемент регулирования процесса реабилитации территорий и возвращения населения к нормальным условиям жизнедеятельности. Хотя разработка СанПиН-96 была инициирована в рамках государственной программы преодоления последствий Чернобыльской аварии и допустимые уровни удельной активности (ДУА) могли служить рабочими критериями для выделения территорий, где производится нормативно "чистая" продукция и защитные меропри-

ятия в агропромышленном комплексе не требуются, назначение ДУА было шире — контроль радиационной безопасности пищевых продуктов вне системы аварийного вмешательства.

Таким образом, СанПиН-96 замыкал систему радиационно-гигиенического нормирования пищевых продуктов от текущего периода времени до возникновения возможных радиационных аварий, когда может появиться дилемма — вводить ли аварийные уровни вмешательства или удерживать ситуацию в рамках требований СанПиН.

Как в начальный период после Чернобыльской аварии, так и в отдаленный период основной вклад в облучение население вносила продукция животноводства. С целью оперативного мониторинга загрязнения продукции животноводства в 1994 г. были предложены контрольные уровни (КУ) на содержание ¹³⁷Сs в кормах. Дополнительно к этим контрольным уровням, введенным впервые в 1994 г. (КУ-94), в Брянской и Калужской областях были введены более жесткие региональные контрольные уровни для концентрации ¹³⁷Сs в барде и жоме, которых составляли 111 и 185 Бк/кг соответственно.

Для обеспечения требований к безопасности пищевых продуктов в 2001 г. контрольные уровни содержания ¹³⁷Сѕ в кормах были изменены и введены в действие новые ветеринарные правила (ВП 13.5.13/06-01) [18]. В этом документе были приведены контрольные уровни (КУ-2001) концентраций ⁹⁰Ѕг и ¹³⁷Сѕ в кормах. При разработке этих показателей в значительной мере учитывались достигнутые уровни загрязнения кормов, а также молока и мяса на начало 2000-х годов. К сожалению, в 2001 г. эти ветеринарные правила были отменены, и в настоящее время единственным легитимным официальным документом, устанавливающим контрольные уровни содержания ¹³⁷Сѕ в кормах, остаются КУ-94, введенные в 1994 г.

Таким образом, в настоящее время отсутствует современная система нормативов, определяющих допустимые концентрации радионуклидов в кормах животных. Это существенно осложняет мониторинг радиоактивного загрязнения кормов, особенно в районах, пострадавших в результате аварии на Чернобыльской АЭС, а "допустимые" уровни содержания ¹³⁷Сs не гарантируют получение молока и мяса с содержанием, удовлетворяющим требованиям СанПиН 2.3.2.1078-01 (с доп. и изм. №18 — СанПиН 2.3.2.2650-10). Отсутствие документа, определяющего допустимые концентрации радионуклидов в кормах животных, является пробелом в российском регулировании, касающемся радиационной безопасности, и осложняет переход к нормальной жизнедеятельности в регионах, имеющих аварийный статус после ядерных аварий.

Вследствие изложенного, основной целью настоящей статьи является обоснование контрольных уровней содержания ¹³⁷Сs в кормах крупного рогатого скота, гарантирующих получение молока и мяса с концентрациями ¹³⁷Сs, удовлетворяющими требованиям современных санитарных норм и правил в отдаленный период после аварии на Чернобыльской АЭС.

МЕТОДИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ КОНТРОЛЬНЫХ УРОВНЕЙ ¹³⁷Cs В КОРМАХ

Контрольные уровни содержания ¹³⁷Cs в кормах и допустимые концентрации ¹³⁷Cs в продукции, используемые в различные периоды времени после аварии на ЧАЭС, приведены в табл. 1. Значения контрольных уровней устанавливались таким образом, чтобы было гарантировано непревышение допустимых уровней в пищевых продуктах, с учетом снижения этих нормативов до возможно низкого уровня. Для оценки допустимого количества радиоцезия в суточном рационе кормления животных использовались средние значения коэффициентов перехода ¹³⁷Cs из кормов в продукцию 0.01 для молока и 0.04 для мяса крупного рогатого скота (КРС).

В случае превышения контрольных уровней допускалось использование кормов для кормления рабочего скота и на ранней стадии откорма животных на мясо. В то же время анализ данных по поступлению ¹³⁷Сs в продукцию животноводства показал, что содержание радионуклидов в кормах на уровне КУ приводило в некоторых случаях к превышению допустимых концентраций ¹³⁷Сs в пищевых продуктах. Во многом это было связано с отсутствием учета неопределенности в оценке параметров перехода радионуклидов в продукцию животноводства и спецификой некоторых рационов кормления животных.

К основным видам кормов, составляющих рацион питания животных, входят: грубые (сено, солома, мякина) и сочные корма (силос, сенаж), корнеплоды, зеленые корма (травы естественные, сеяные и др.), концентрированные корма (зерно злаковых и бобовых культур, отруби), комбикорма и др. В районах, в которых находятся предприятия по производству этилового спирта и сахарной свеклы на сахар, в основу рациона кормления животных могут входить барда и свекловичный жом. Бардой называются отходы (побочный продукт) от винокурения, употребляемые как корм для домашних животных. Свекловичный жом – это "обессахаренная" свекольная стружка, растворенная в воде перед использованием в качестве корма для животных. Из тонны сахарной свеклы получают около 35 кг сахара, 540 кг сырого жома и 40 кг мелассы или кормовой патоки.

Таблица 1. Допустимые уровни содержания ¹³⁷Cs (ВДУ) в пищевых продуктах (СанПиН) и контрольные уровни содержания этого радионуклида в кормах

	pagnon, minga b nopman	
Table 1. Permissible	 Levels (PL) in the food and reference 1 	levels (CL) of ¹³⁷ Cs in the animal fodder

Вид продукта/Документ	ВДУ-91	ВДУ-93	СанПиН 2.3.2.560-96	СанПиН 2.3.2.1078-01	СанПиН 2.3.2. 2650 — 10				
	Допустимые уровни в пищевых продуктах, Бк								
Молоко	370	370	50.0	100.0	100				
Мясо (говядина)	740	600	160.0	160.0	200.0				
Годы действия	1991-1993	1993-1996	1996-2001	2001-2010	2010-нв				
Контрольные уровни содержания ¹³⁷ Cs в кормах									
Компоненты рациона		КУ-94		ВП 13.5.13/06-01					
Грубые корма – сено		600		400.0					
Грубые корма – солома		600		400.0					
Сочные корма – силос		600		80.0					
Сочные корма – сенаж		600		80.0					
Корнеплоды		600		60.0					
Зеленые корма		370		100.0					
Концентрированные корма		600		200.0					
Барда, жом свекольный		600		65					

В состав рациона могут входить и различного рода кормовые добавки, такие как мел, поваренная соль с микроэлементами, витамины A и D_2 , а также диаммонийфосфат. В то же время весовые количества кормовых добавок низки, не влияют на поступление $^{137}\mathrm{Cs}$ в рацион и не являются объектом нормирования.

При обосновании допустимых уровней содержания ¹³⁷Cs в кормах необходимо учитывать стохастический характер процессов, определяющих перенос радионуклидов в продукцию животноводства. Поэтому важным является обеспечение "непревышения" нормативов СанПиН 2.3.2.1078-01 и СанПиН 2.3.2.2650—10 на определенном уровне вероятности. В качестве такого уровня вероятности был принят 95%-ный квантиль. Квантиль – это значение, которое заданная случайная величина не превышает с фиксированной вероятностью. Так, например, если 95%-ный квантиль распределения радионуклидов в пробах молока составляет 100 Бк/л, это означает, что в 95% проб концентрация радионуклидов будет меньше или равна 100 Бк/л, и только в 5% проб она может превышать это значение.

Допустимое содержание радионуклида в суточном рационе "k" ($Q_k^{\text{ЛУ}}$, Бк/кг) определяется нормативами СанПиН 2.3.2.1078—01 и СанПиН 2.3.2.2650—10 на содержание радионуклидов в k-й продукции животноводства (молоко, мясо) ($A_k^{\text{ЛУ}}$, Бк/кг $^{-1}$) (табл. 1) и значением коэффициента перехода радионуклидов в этот вид продукции (K_{Π}^{R} , (Бк кг)/(Бк/сут)). Учитывая, что коэффициент

перехода радионуклидов из кормов в продукцию животноводства варьирует (распределен) в некотором диапазоне значений, для оценки $K_{\Pi_k^{\text{ЛУ}}}$, используемого для нормирования, целесообразно взять значение, соответствующее 95%-ной квантили соответствующего распределения. Такой подход соответствует тому, что допустимое суточное поступление ^{137}Cs в организм животного — $Q_k^{\text{ДУ}}$, рассчитанное на основе следующего выражения:

$$Q_k^{\Pi Y} = \frac{A_k^{\Pi Y}}{K_{\Pi_k^{\Pi Y}}} \tag{1}$$

гарантирует непревышение норматива Сан Π иН (A^{j}) в 95% случаев.

Содержание 137 Сs в суточном стандартном рационе кормления животных (Q_j) при известной концентрации радионуклидов в кормах рассчитывается на основе стандартного выражения:

$$Q^{k} = \sum_{i=1}^{N} \delta_{i}^{k} \times q_{i}, \qquad (2)$$

где δ_i^j — весовое количество кормов вида (*i*) в суточном рационе кормления животных (*k*); q_i — концентрация ¹³⁷Cs в *i*-м виде кормов, N — количество различных кормов в рационе.

При оценке контрольных уровней важным является вопрос квотирования, т.е. определения квот на суточное поступление радиоцезия в организм животного с различными кормами. В реаль-

ных условиях между загрязнением кормов существуют определенные соотношения, которые определяются как закономерностями накопления радионуклидов сельскохозяйственными растениями, так и особенностями их переработки, применяемой для производства кормов для животных.

В качестве реперного вида корма можно рассматривать сено (грубые корма), которое входит в большинство рационов кормления животных. Вследствие этого при оценке квоты отдельных видов кормов в суточное поступление радионуклидов в организм животного содержание ¹³⁷Сs в кормах принималось за единицу, а загрязнение остальных видов кормов оценивалось как отношение концентрации ¹³⁷Сs в каждом из кормов к содержанию ¹³⁷Сs в сене.

Отношения загрязнения различных видов кормов к загрязнению сена (r_i) в каждом конкретном случае являются случайной величиной. Вследствие этого для гарантированного обеспечения соблюдения нормативов СанПин в качестве отношений, принимаемых для расчета контрольных уровней в кормах, принималась 95%-ная граница распределения величины r_i . Таким образом, $Q_i^{\text{ДУ}}$ можно представить в следующем виде:

$$Q_k^{\Pi Y} = \left(KY_1 \times \delta_1^j + \sum_{i=1}^N KY_i \times \delta_i^j\right), \tag{3}$$

где KY_1 — контрольный уровень содержания радионуклида в сене (Бк/кг), KY_i — контрольный уровень содержания радионуклида в i виде кормов, N — количество кормов в рационе. Остальные параметры определены выше.

Поскольку принимается, что $KY_i = KY_1 \times r_i$, где r_i является отношением концентрации ¹³⁷Cs в i-м виде кормов к его концентрации в сене, выражение (3) можно преобразовать к следующему виду:

$$Q_k^{\text{MY}} = KY_1 \times \left\{ \delta_1^k + \sum_{i=1}^N \delta_i^k \times r_i \right\}. \tag{4}$$

Тогда контрольный уровень содержания 137 Cs в сене (KY_1) можно определить как:

$$KY_{1} = \frac{Q_{k}^{\Pi Y}}{\left\{\delta_{1}^{k} + \sum_{2}^{N} \delta_{i}^{k} \times r_{i}\right\}}$$
 или
$$KY_{1} = \frac{A_{k}^{\Pi Y}}{K\Pi_{k}^{\Pi Y} \times \left\{\delta_{1}^{k} + \sum_{2}^{N} \delta_{i}^{k} \times r_{i}\right\}}.$$
 (5)

Соответственно контрольные уровни в других видах кормов (KY_i) можно рассчитать, как:

$$KY_i^k = KY_1^k \times r_i. (6)$$

Как отмечено выше, в качестве оценки r_i используется 95%-ный квантиль от выборки отношений, концентраций ¹³⁷Сs в кормах, нормированных на содержание этого радионуклида в сене, рассчитанных на основе данных мониторинга загрязнения кормов в районах, подвергшихся загрязнению после аварии на Чернобыльской АЭС.

Значения KY рассчитываются для всех рационов кормления животных, при этом выбираются значения, которые обеспечивают "непревышение" нормативов СанПиН для всех возможных рационов, т.е. в качестве контрольных уровней следует выбрать минимальные значения из набора KY_i^j , рассчитанных для всех типичных рационов кормления животных.

ОБОСНОВАНИЕ КОНТРОЛЬНЫХ УРОВНЕЙ КОНЦЕНТРАЦИИ В КОРМАХ

Для применения представленного подхода к обоснованию значений контрольных уровней радионуклидов в кормах необходима следующая информация:

- состав типовых рационов кормления животных, предназначенных для производства продукции животноводства;
- 95%-ные квантили коэффициентов перехода в молоко и мясо;
- 95%-ные квантили отношений концентрации радионуклидов в различных видах кормов к концентрации радионуклидов в грубых кормах (сене).

Отметим, что в последнем случае отношения концентраций радионуклидов в различных видах кормов к концентрации радионуклидов в сене отражают реально существующие различия в уровнях загрязнения кормов, обеспечивая одинаковые требования к выбору контрольных уровней.

Рационы кормления животных

Для оценки поступления радионуклидов в продукцию животноводства использовались типовые рационы кормления молочного скота, рационы кормления выбракованных взрослых животных и молодняка КРС старше года на мясо при стойловом содержании в зимний период и выгульном содержании в летний период [19].

Следует отметить существующие отличия между рационами кормления лактирующих коров, выбракованных взрослых животных и молодняка КРС, выращиваемого на мясо при стойловом содержании в зимний период. Так, рацион лактирующих коров намного разнообразнее и включает ряд компонентов, обеспечивающих сбалансированность питания животных.

14010 21 0011	•••••••••					
Продукт	N	Геометрическое среднее	Геометрическое стандартное отклонение	Среднее	Стандартное отклонение	95%-ный квантиль
Оценка на основе мировых данных						
Молоко	288	4.6×10^{-3}	2.0	6.1×10^{-3}	6.3×10^{-3}	1.3×10^{-2}
Мясо	58	2.2×10^{-2}	2.2	3.0×10^{-2}	2.3×10^{-2}	7.8×10^{-2}
Оценка на основе только российских (советских) данных						
Молоко	21	9.2×10^{-3}	1.3	9.8×10^{-3}	3.8×10^{-3}	1.3×10^{-2}
Мясо	13	3.8×10^{-2}	1.6	4.2×10^{-2}	1.7×10^{-2}	7.3×10^{-2}

Таблица 2. Коэффициенты перехода 137 Cs в молоко и мясо крупного рогатого скота **Table 2.** Concentration factors of 137 Cs to cattle milk and meat

Отдельно рассматривался травяной рацион, включающий зеленые и концентрированные корма. В этом случае зеленые корма определялись как референтный компонент рациона, а концентрированные корма — как дополнительный. Основой рациона лактирующих коров в зимне-стойловый период содержания в большинстве случаев служат грубые корма, тогда как в зимнестойловый период при откорме животных на мясо основной вклад в рацион вносит силос [19].

Переход ¹³⁷Cs из кормов в молоко и мясо животных

В последнее время было выполнено несколько крупных обобщений как российских (советских), так и мировых данных по коэффициентам перехода радионуклидов в продукцию животноводства [20, 21]. Значительную долю мировых обзоров составляли данные российских исследований [22—31]. Полученные в результате анализа мировых данных параметры перехода приведены в табл. 2.

Полученные данные позволяют оценить параметры, используемые для нормирования поступления $^{137}\mathrm{Cs}$ в молоко и мясо крупного рогатого скота. Следует отметить, что коэффициенты перехода (K_Π) радионуклидов в молоко и мясо КРС, представленные в базе мировых данных, получены для существенно более широкого набора условий ведения животноводства и включают как экстенсивные, так и интенсивные технологии ведения сельского хозяйства. Этим определяются более широкие диапазоны для параметров, которые оценены на основе мировых данных.

95%-ные квантили, оцененные на основе как мировых, так и российских данных, довольно близки, причем 95%-ный квантиль K_{Π} в мясо, полученный на основе мировых данных, даже несколько больше K_{Π} , оцененного на основе российских данных (рис. 1). Это объясняется существенно большей дисперсией значений, содержащейся в базе мировых данных и, как следствие, различ-

ной формой функции плотности распределения, аппроксимирующей эти данные.

Представленные данные позволяют достаточно надежно оценить 95%-ные квантили для коэффициентов перехода 137 Сѕ из кормов в молоко и мясо крупного рогатого скота, в качестве которых можно принять 0.013 (Бк/кг)/(Бк/сут) и 0.073 (Бк/кг)/(Бк/сут), для молока и мяса крупного рогатого скота соответственно. Отметим, что эти значения, особенно для мяса, существенно больше, чем значения K_{Π} 0.01 (молоко) и 0.04 (мясо), использованные ранее для разработки нормативов КУ-94 и Ветеринарных правил (ВП 13.5.13/03—00) [18]. Соответственно, они должны приводить к более жестким требованиям по ограничениям суточного поступления радионуклидов в организм животного с кормом.

Таким образом, данные табл. 2 позволяют оценить допустимое суточное поступление ¹³⁷Сѕ из кормов в молоко и мясо крупного рогатого скота, гарантирующее "непревышение" содержания этого радионуклида в продукции животноводства на 95%-ном уровне. Эти значения составляют 7700 Бк/сут для молочного скота и примерно 2700 Бк/сут для мясного скота соответственно.

Содержание ¹³⁷Cs в кормах животных в районах Брянской области

Соотношение между концентрациями ¹³⁷Сs в кормах, производимых в районах радиоактивного загрязнения, имеет важное значение при обосновании квотирования кормов по вкладу в суточное потребление этого радионуклида животными. Отношение концентраций ¹³⁷Сs в кормах к концентрации этого радионуклида в сене, рассчитанные на основе данных за 2008—2018 гг. [32], приведены в табл. 3.

Вариабельность отношений содержания ¹³⁷Сs в зеленых кормах к сену характеризуется высокой изменчивостью при значении геометрического

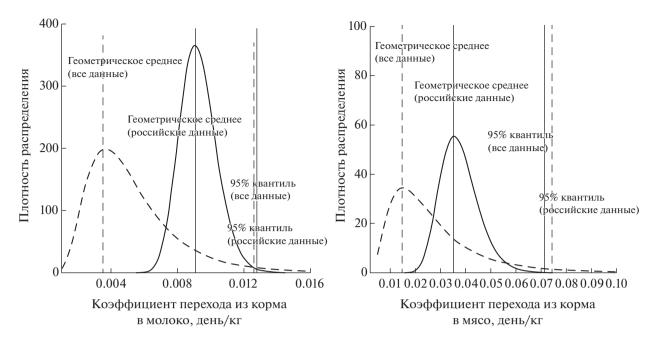


Рис. 1. Сравнение функций плотности распределения, соответствующих данным по коэффициентам перехода в молоко и мясо, содержащихся в базах мировых и российских данных.

Fig. 1. Comparison of distribution density functions corresponding to transfer coefficients to milk and meat (beef) derived from the global and Russian databases.

стандартного отклонения 2.39, при этом средняя концентрация ¹³⁷Cs в зеленых кормах достаточно близка к средней концентрации ¹³⁷Cs в сене. Это можно объяснить тем, что одни и те же угодья обычно не используются одновременно для выпаса и заготовки кормов. При выпасе животных могут использоваться неокультуренные луга, естественные угодья с низкой продуктивностью, тогда как для заготовки сена используют более высокопродуктивные сенокосы с низкими коэффициентами перехода в растительность. Существуют ограничения на выпас в поймах рек, а заготовка зеленой массы на сено или сенаж обычно проводится на мелиорированных, окультуренных угодьях с сеяными травами. В результате коэффициенты перехода радионуклидов в зеленую массу могут отличиться до 100 раз и более.

При производстве сена используется травостой различного типа, который высущивается до определенной влажности. Процент сухого вещества в травостое различного типа варьирует от 27.8 до 44% (вейнико-злаково-разнотравный травостой). Для травостоя злаково-разнотравного пастбища эта величина составляет 35.4%. После высушивания сена содержание сухого вещества увеличивается до 82-85%. Соответственно, можно ожидать, что коэффициенты перехода, рассчитанные на 1 кг сена, от 1.8 до 2.4 больше, чем коэффициенты перехода, рассчитанные на 1 кг сырой массы травы, отобранной на том же поле.

Таблица 3. Отношение концентрации ¹³⁷Cs кормах к концентрации этого радионуклида в сене по данным радиологического контроля в 2008—2018 гг. **Table 3.** Ratios of ¹³⁷Cs concentrations in feedstuffs to that in hay according to radiological monitoring data for 2008—2018

Тип рациона	Сенаж	Зеленые корма	Силос	Солома	Концентраты
N	223	439	243	253	330
Геометрическое среднее	0.27	0.67	0.24	0.36	0.18
Геометрическое	1.85	2.39	1.80	1.89	1.82
стандартное отклонение					
Арифметическое среднее	0.30	0.97	0.28	0.42	0.21
Стандартное отклонение	0.16	0.87	0.14	0.21	0.10
Минимальное	0.02	0.04	0.02	0.03	0.02
Максимальное	0.70	3.97	0.60	0.93	0.46

2							
Корма	Число проб	Содержание сухого вещества	Отношение геометрических средних	Отношение арифметических средних			
Корнеплоды	81	0.21	0.15	0.13			
Зеленая масса	401	0.20	0.79	0.85			
Vulginuality	101	0.25	0.22	0.19			

Таблица 4. Отношение коэффициентов перехода в некоторые виды кормов по отношению к сену сеяных трав **Table 4.** Ratios of transfer coefficients to some feedstuffs to that to grass hay

Таблица 5. Контрольные уровни содержания 137 Cs в кормах (KУ-2021), обеспечивающие соблюдение норматива СанПиН 2.3.2.1078-01 и СанПиН 2.3.2. 2650-10 в молоке и мясе **Table 5.** Reference levels (RLs) of 137 Cs in the feedstuffs (RL-2021) to ensure compliance with SanPiN 2.3.2.1078-01 and SanPiN 2.3.2. 2650-10 in milk and meat of cattle

	Молоко		Мясо		KY 2021/KY 2001	
Корма	расчетное значение	округленное значение	расчетное значение	округленное значение	молоко	мясо
Сено	425	400	268	250	1.00	0.63
Сенаж	115	100	72	70	1.25	0.88
Зеленые корма	202	200	75	75	2.00	0.75
Силос	102	100	72	70	1.25	0.88
Корнеплоды	85	80	_	80	1.33	1.33
Солома	153	150	97	100	0.38	0.25
Концентраты	76	70	48	50	0.35	0.25
Барда ржаная	_	100	38	35	1.54	0.54
Жом свекловичный	_	100	35	35	1.54	0.54

Похожими закономерностями характеризуются и отношения концентраций к сену и других кормов.

Радиационный контроль некоторых видов кормов, таких как кормовая свекла, барда и свекловичный жом в районах, пострадавших после аварии на ЧАЭС, проводился в ограниченном объеме. Вследствие этого для оценки отношений между содержанием радионуклидов в этих кормах и сене является использование коэффициентов перехода радионуклидов из почвы в соответствующие кормовые культуры (табл. 4).

Значения, приведенные в табл. 4, рассчитаны на основе информации, представленной в работе [20], обобщающей существующие данные по параметрам переноса радионуклидов в окружающей среде, включая поступление радионуклидов из почвы в кормовые культуры. Отметим, что эти значения пересчитаны на естественный вес в корнеплодах, зеленой массе и силосе, обеспечивая эквивалентность этой информации данным, приведенным в табл. 3.

Отношения содержания ¹³⁷Cs в зеленой массе травы и в кукурузном силосе к его содержанию в сене, приведенные в табл. 4, близки к значениям, наблюдаемым в районах России, загрязненных после аварии на Чернобыльской АЭС, подтверждая возможность использования данных для кормовой свеклы при проведении этих оценок. Таким образом, данные табл. 4 хорошо согласуются с данными табл. 3, что позволяет их использовать для оценки контрольных уровней как для кормления лактирующих коров, так и при откорме КРС на мясо. Особое значение это имеют при обосновании КУ для кормов, таких как барда (ржаная и картофельная) и свекловичный жом, данные радиологического мониторинга о содержании ¹³⁷Cs для которых ограничены.

КОНТРОЛЬНЫЕ УРОВНИ СОДЕРЖАНИЯ ¹³⁷Cs В КОРМАХ

Контрольные уровни, рассчитанные на основе методического подхода, описанного выше, представлены в табл. 5.

Наряду с расчетными величинами приведены округленные значения, которые удобны для практического использования. Следует отметить, что в отличие от контрольных уровней 1994 г. (КУ-94) в настоящей работе предложено использовать раздельные контрольные уровни для кормов, предназначенных для молочного и мясного скота, рассчитываемые на основе формул (5) и (6).

В соответствии с предложенной методологией, в качестве оценок контрольных уровней были взяты минимальные значения, рассчитанные для всех типовых рационов, приведенных в работе [19]. Значения КУ для мясного скота были рассчитаны как для откорма молодняка, так и выбракованного взрослого скота.

Данные табл. 5 показывают, что контрольные уровни, обеспечивающие получение молока с содержанием ¹³⁷Cs, удовлетворяющим требованиям СанПиН 2.3.2. 2650-10, в 1.4-2.7 раза больше, чем аналогичный показатель для мяса. Таким образом, применение контрольных уровней по содержанию ¹³⁷Cs в мясе к кормам для молочного скота безусловно обеспечит соблюдение требований СанПиН 2.3.2.1078-01 и СанПиН 2.3.2. 2650-10. В то же время они будут неоправданно консервативны для кормления молочного скота и могут привести к дополнительным потерям кормов. Таким образом, введение раздельных контрольных уровней позволяет оптимизировать веление животноводства на загрязненных территориях и избежать возможных потерь кормов, использование которых допустимо без снижения качества продуктов питания.

Контрольные уровни, приведенные в настоящей работе, отражают соотношения между загрязнением кормов в отдаленный период после аварии на Чернобыльской АЭС и учитывают различия в кормлении молочного и мясного скота. Содержание ¹³⁷Cs в молоке и мясе при концентрациях этого радионуклида в кормах, соответствующих контрольным уровням, приведено в табл. 6.

Сравнивая контрольные уровни для кормов, полученные на основе формул (5) и (6), с аналогичными значениями ветеринарных правил ВП 13.5.13/06—01 (табл. 6), следует отметить, что они, в большинстве случаев, выше контрольных уровней ВП 13.5.13/06—01 для молока и ниже контрольных уровней, ВП 13.5.13/06—01 для мяса. Исключением являются контрольные уровни для концентратов, соломы, барды и жома. В этих случаях значения ВП 13.5.13/06-01 значительно (3—4 раза) превышают контрольные уровни, полученные в нашей работе как для молока, так и для мяса.

Данные, приведенные в табл. 6, также показывают, что контрольные уровни КУ-1994 и КУ-2001 обеспечивали соблюдение нормативов на безопас-

ность молочной продукции (ВДУ 93 (370 Бк/кг) или СанПиН 2.3.2.1078—01 (100 Бк/кг), действующие на период их использования. В то же время концентрации ¹³⁷Сѕ в кормах на уровне этих значений могли приводить к значительному превышению нормативов по содержанию этого радионуклида в мясе для большинства типовых рационов.

Это позволяет сделать вывод, что КУ-94 и КУ-2001 были в первую очередь направлены на получение молока, удовлетворяющего гигиеническим нормативам. Потенциальное превышение ¹³⁷Сѕ в мясо не велико — 10—30% и могло быть компенсировано за счет дополнительного откорма животных на чистых кормах. Контрольные уровни на содержание ¹³⁷Сѕ в барде и жоме не обеспечивали безопасности получаемого мяса и были неадекватно оценены на основе практики ведения производства в загрязненных районах.

В табл. 6 также приведены средние отношения концентрации ¹³⁷Cs в молоке при кормлении животных кормами с содержанием ¹³⁷Cs на уровне KУ-94 и $B\Pi$ 13.5.13/06—01, рассчитанные для типовых рационов кормления животных. Из таблицы видно, что средние значения отношений концентраций ¹³⁷Cs в молоке на уровне КУ-94 и ВП 13.5.13/06-01 к нормативам на допустимое содержание ¹³⁷Cs в этом продукте находятся на уровне 0.55-0.58, т.е. обеспечивают безопасность производимого молока почти с двукратным консерватизмом. Аналогичные отношения, рассчитанные для мяса, достаточно близки к единице, что подтверждает выводы, сделанные выше. Таким образом, нормативы КУ-94 и КУ-2001 могли приводить к необоснованным действиям по содержанию и кормлению лактирующих коров.

Раздельные контрольные уровни на содержание ¹³⁷Сs в кормах молочного и мясного скота, предложенные в настоящей работе, обеспечивают существенно более рациональное использование кормов, производимых на загрязненной территории. При этом средние значения отношения концентраций ¹³⁷Сs на уровне КУ-2021 к нормативам содержание ¹³⁷Сs в молоке, соответствующее СанПиН 2.3.2. 2650—01, составляет 0.76 для молока и 0.79—0.87, обеспечивая разумный консерватизм для обеспечения безопасности всего набора рационов кормления животных.

Данные табл. 6 также обеспечивают возможность оптимального подбора рационов в зависимости от уровня загрязнения территорий. Минимальное содержание в молоке при содержании ¹³⁷Cs в кормах лактирующих коров соответствует силосно-сенажному и силосно-концентратному рационам, а для скота на откорме на мясо — сенажному и силосно-сенажному рационам. Высо-

2021

Таблица 6. Содержание 137 Cs в молоке и мясе при концентрациях 137 Cs в кормах, соответствующих контрольным уровням. Значения концентраций 137 Cs в молоке или мясе, превышающие соответствующие нормативы, показаны курсивом

Table 6. ¹³⁷Cs concentrations in milk and meat calculated for the ¹³⁷Cs concentrations in feedstuffs corresponding the reference levels. Values of ¹³⁷Cs concentrations in fodder resulting in exceeding the standards for foodstuffs are shown in Italics

Тип рациона	КУ-1994	КУ-2001	КУ-2021
Молочный	и́ скот — молоко		
Травяной	148	46	99
Сенной	276	72	93
Смешанный	210	66	83
Силосный	210	56	76
Силосный	162	36	42
Силосно-сенажный	288	58	69
Силосно-концентратный	207	48	67
Среднее отношение к допустимой концентрации	0.58	0.55	0.76
Мясной	і скот – мясо		
Откорм молодняка			
Травяной (Зеленые корма – 40 кг)	592	160	198
Травяной (Зеленые корма — $35 \mathrm{kr}$)	602	168	197
Травяной (содержание зеленых кормов 27 кг)	640	188	196
Сенажно-силосный	696	136	153
Сенажный	504	72	106
Силосный (А)	820	179	195
Силосный (Б)	583	122	151
Откорм на барде	1066	192	110
Откорм на жоме	1080	165	114
Среднее отношение к допустимой концентрации	$0.99(0.86^1)$	$0.96^2 (0.76^1)$	0.79
Откорм выбракованного взрослого крупного рогатого ск	кота	1	
Травяной (содержание зеленых кормов 40 кг)	640	160	198
Силосно-сенажный	720	106	151
Силосный	816	144	180
Откорм на барде	1774	237	190
Откорм на жоме	1526	201	166
Среднее отношение к допустимой концентрации	$1.5(0.98^1)$	$0.96 (0.76^1)$	0.87

¹ Без учёта рационов на барде и свекловичном жоме.

² Для ВДУ в мясе 160 Бк/кг.

кое содержание ¹³⁷Cs в молоке соответствует рационам с повышенным содержанием кукурузного силоса (28–30 кг). Наибольшие концентрации ¹³⁷Cs в молоке характерны для травяных рационов, т.е. при выпасе животных на пастбище, что требует особого внимания при организации контроля кормов для животных в летний период.

Определенное внимание должно уделяться и определению удельной активности ¹³⁷Cs в барде и свекловичном жоме. В то же время эти корма производятся на предприятиях по переработке, что снижает потенциальную погрешность оценки содержания радионуклидов в продукции животноводства, связанную с отбором этих проб.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые предложен метод оценки контрольных уровней в кормах крупного рогатого скота, основанный на учете вероятностного характера параметров перехода ¹³⁷Cs в корма и продукцию животноводства. Особенностями этого метода является логичный алгоритм обоснования контрольных уровней и введение раздельных контрольных уровней для кормов, используемых для содержания молочного и мясного скота. Использование этих контрольных уровней обеспечивает получение безопасной продукции животноводства для всех типовых рационов содержания животных. Использование предложенных контрольных уровней позволяет оптимизировать технологии ведения животноводства в районах Российской Федерации, загрязненных после аварии на ЧАЭС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Авария на Чернобыльской АЭС и ее последствия // Информация, подготовленная для совещания экспертов МАГАТЭ (25—29 августа 1986 г., Вена). М.: ГКАЭ СССР, 1986. 57 с. [Avariya na Chernobyl'skoj AEHS i eye posledstviya // Informatsiya, podgotovlennaya dlya soveshhaniya ehkspertov MAGATE (25—29 avgusta 1986 goдa, Vena). М.: GKAEH SSSR, 1986. 57 р. (In Russian)]
- 2. *Ильин Л.А.*, *Павловский О.А*. Радиологические последствия аварии на Чернобыльской АЭС и меры, предпринятые с целью их смягчения // Атомная энергия. 1988. Т. 65. Вып. 2. С. 119—129. [*Il'in L.A.*, *Pavlovskij O.A*. Radiologicheskie posledstviya avarii na CHernobyl'skoj AEHS i mery, predprinyatye s tsel'yu ikh smyagcheniya // Atomnaya ehnergiya. 1988. V. 65. Vyp. 2. P. 119—129. (In Russian)]
- 3. Environmental consequences of the Chernobyl accident and their remediation: twenty years of experience. Report of the UN Chernobyl Forum Expert Group "Environment" (EGE). IAEA: Vienna, 2006. 166 p.
- International Advisory Committee, International Chernobyl Project: Technical Report. IAEA: Vienna, 1991. 740 p.
- 5. Alexakhin R.M., Fesenko S.V., Sanzharova N.I. Serious radiation accidents and the radiological impact on agriculture // Radiat. Prot. Dosim. 1996. V. 64. P. 37–42.
- 6. Alexakhin R.M., Sanzharova N.I., Fesenko S.V. et al. Chernobyl radionuclide distribution, migration, and environmental and agricultural impacts // Health Phys. 2007. V. 93. № 5. P. 418–426.
- Balonov M. et al. Harmonization of standards for permissible radionuclide activity concentrations in food-stuffs in the long term after the Chernobyl accident // J. Radiol. Prot. 2018. V. 38. P. 854–867.
- 8. Нормы радиационной безопасности НРБ-76 и Основные санитарные правила работы с радиоактивными веществами и другими источниками ионизирующих излучений. 2-е изд.; перераб. и доп. М.:

- Энергоиздат, 1981. 79 с. [Normy radiatsionnoj bezopasnosti NRB-76 i Osnovnye sanitarnye pravila raboty s radioaktivnymi veshhestvami i drugimi istochnikami ioniziruyushhikh izluchenij. 2-e izd.; pererab. i dop. M.: Energoizdat, 1981. 79 p. (In Russian)]
- 9. Временные нормативы допустимого содержания радиоактивных веществ в продуктах питания в случае аварии ядерного реактора атомной станции (Утв. Министром здравоохранения СССР 3 мая 1986 г.) М.: Минздрав СССР, 1986. [Vremennye normativy dopustimogo soderzhaniya radioaktivnykh veshhestv v produktakh pitaniya v sluchae avarii yadernogo reaktora atomnoj stantsii (Utv. Ministrom zdravookhraneniya SSSR 3 maya 1986 g.) М.: Minzdrav SSSR, 1986 (In Russian)]
- 10. Временное допустимое содержание радиоактивного йода в питьевой воде и пищевых продуктах на период ликвидации последствий аварии (Утв. 6 мая 1986 г. № 4104—86) М.: Минздрав СССР, 1986. 2 с. [Vremennoe dopustimoe soderzhanie radioaktivnogo joda v piťevoj vode i pishhevykh produktakh na period likvidatsii posledstvij avarii (Utv. 6 maya 1986 g. №4104-86) М.: Minzdrav SSSR, 1986. 2 р. (In Russian)]
- 11. ВДУ содержания радиоактивных веществ в продуктах питания, питьевой воде, лекарственных травах (суммарная бета-активность). № 129—252/ДСП. 30 мая 1986. М.: Минздрав СССР, 1986. 5 с. [VDU soderzhaniya radioaktivnykh veshhestv v produktakh pitaniya, pit'evoj vode, lekarstvennykh travakh (summarnaya beta-aktivnost'). № 129-252/DSP. 30 maya 1986. Minzdrav SSSR: M.; 1986. 5 р. (In Russian)]
- 12. Временные допустимые уровни содержания цезия-137 и стронция-90 в пищевых продуктах и питьевой воде, устанавливаемые в связи с аварией на Чернобыльской АЭС (ВДУ-91), утверждены 22 января 1991 г. главным санитарным врачом СССР А.И. Кондрусевым. М.: Минздрав СССР, 1991. 2 с. [Vremennye dopustimye urovni soderzhaniya tseziya-137 i strontsiya-90 v pishhevykh produktakh i pit'evoj vode, ustanavlivaemye v svyazi s avariej na CHernobyl'skoj AEHS (VDU-91) utverzhdeny 22 yanvarya 1991 g. glavnym sanitarnym vrachom Kondrusevym. M.: Minzdrav SSSR, 1991. 2 p. (In Russian)]
- 13. ВДУ 93. Временные допустимые уровни содержания радионуклидов цезия-134, -137 и стронция-90 в пищевых продуктах. М.: Минздрав РФ, 1993. 2 с. [VDU 93. Vremennye dopustimye urovni soderzhaniya radionuklidov tseziya-134, -137 i strontsiya-90 v pishhevykh produktakh. М.: Minzdrav RF, 1991. 2 p (In Russian)]
- 14. Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов. Санитарные правила и нормы. СанПиН 2.3.2.560-96. М., 1997. [Gigienicheskie trebovaniya k kachestvu i bezopasnosti prodovol'stvennogo syr'ya i pishhevykh produktov. Sanitarnye pravila i normy. SanPiN 2.3.2.560-96. М., 1997. (In Russian)]
- 15. Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых про-

- дуктов. Санитарные правила и нормы. СанПиН 2.3.2.1078—01. [Gigienicheskie trebovaniya k kachestvu i bezopasnosti prodovol'stvennogo syr'ya i pishhevykh produktov. Sanitarnye pravila i normy. SanPiN 2.3.2.1078-01. (In Russian)]
- 16. СанПиН 2.3.2.2650—10. Дополнения и изменения N 18 к санитарно-эпидемиологическим правилам и нормативам СанПиН 2.3.2.1078—01 "Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов (июнь 2010). М., 2010. С. 105. [SanPiN 2.3.2.2650-10. Dopolneniya i izmeneniya N 18 k sanitarno-ehpidemiologicheskim pravilam i normativam SanPiN 2.3.2.1078-01 "Gigienicheskie trebovaniya bezopasnosti i pishhevoj tsennosti pishhevykh produktov (iyun' 2010). М., 2010, 105 р. (In Russian)]
- 17. КУ-94. Контрольные уровни содержания радионуклидов цезия-134, -137 и стронция-90 в кормах и кормовых добавках. М.: Минсельхозпрод России, 1994. 2 с. [KU-94. Kontrol'nye urovni soderzhaniya radionuklidov tseziya-134, -137 i strontsiya-90 v kormakh i kormovykh dobavkakh. M.: Minsel'khozprod Rossii, 2 p. (In Russian)]
- 18. ВП 13.5.13/03-00. Государственная система ветеринарного нормирования Российской Федерации. Радиационная безопасность. Ветеринарные правила обеспечения радиационной безопасности животных и продукции животного происхождения (Утв. Главным государственным ветеринарным инспектором РФ 25.05.2001). М.: Минсельхозпрод России, 2000. 7 с. [VP 13.5.13/03-00. Gosudarstvennaya sistema veterinarnogo normirovaniya Rossijskoj Federatsii. Radiatsionnaya bezopasnost'. Veterinarnye pravila obespecheniya radiatsionnoj bezopasnosti zhivotnykh i produktsii zhivotnogo proiskhozhdeniya (Utv. Glavnym gosudarstvennym veterinarnym inspektorom RF 25.05.2001). М.: Minsel'khozprod Rossii, 2000. 7 p. (In Russian)]
- 19. *Томмэ М.Ф.* Типовые рационы для крупного рогатого скота, свиней и овец по зонам страны. М.: "Колос", 1971. 612 с. [*Tommeh M.F.* Tipovye ratsiony dlya krupnogo rogatogo skota, svinej i ovets po zonam strany. М.: "Kolos", 1971. 612 s. (In Russian)]
- Handbook of parameter values for the prediction of radionuclide transfer in terrestrial and fresh-water environments. IAEA Technical Reports Series № 472. Vienna: IAEA.
- Howard B.J., Beresfor N.A., Barnett C.L., Fesenko S. Radionuclide transfer to animal products: revised recommended transfer coefficient values // J. Environ. Radioact. 2009. V. 100. P. 263–273.
- 22. *Fesenko S. et al.* Review of Russian language studies on radionuclide behaviour in agricultural animals: 2. Transfer to milk // J. Environ. Radioact. 2007. V. 98. P. 104–136. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2015.01.015
- 23. Fesenko S. et al. Review of Russian language studies on radionuclide behaviour in agricultural animals: 3. Transfer to muscle // J. Environ. Radioact. 2009.

- V. 100. P. 215–231. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2008.12.003
- Fesenko S. et al. Review of Russian language studies on radionuclide behaviour in agricultural animals: Transfer to animal tissues // J. Environ. Radioact. 2018. V. 192. P. 233–249. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2018.06.012
- Fesenko S. et al. Review of Russian language studies on radionuclide behaviour in agricultural animals: part 1. Gut absorption // J. Environ. Radioact. 2007. V. 98. P. 85–103. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2007.02.011
- Fesenko S. et al. Review of Russian-language studies on radionuclide behaviour in agricultural animals: part 4. Transfer to poultry // J. Environ. Radioact. 2009. V. 100. P. 815–822. https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2009.06.009
- 27. Fesenko S.V. et al. The dynamics of the transfer of caesium-137 to animal fodder in areas of Russia affected by the Chernobyl accident and doses resulting from the consumption of milk and milk products // Radiat. Prot. Dosim. 1997. V. 69. № 4. P. 289—299. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.rpd.a031916
- 28. Fesenko S.V., Colgan P.A., Sanzharova N.I. et al. The dynamics of the transfer of caesium-137 to animal fodder is areas of Russia affected by the Chernobyl accident and resulting doses from the consumption of milk and milk products // Radiat. Prot. Dosim. 1997. V. 69. № 4. P. 289–299.
- 29. *Fesenko S.V. et al.* Twenty years' application of agricultural countermeasures following the Chernobyl accident: lessons learned // J. Radiol. Prot. 2006. V. 26. P. 351–359.
- 30. Fesenko S.V., Alexakhin R.M., Spiridinov S.I., Sanzharova N.I. Dynamics of ¹³⁷Cs concentration in agricultural products in areas of Russia subjected to contamination after the accident at the Chernobyl nuclear power plant // Radiat. Prot. Dosim. 1995. V. 60. № 2. P. 155–166.
- 31. Fesenko S.V., Jacob P., Alexakhin R. et al. Important factors governing exposure of the population and countermeasure application in rural settlements of the Russian Federation in the long term after the Chernobyl accident // J. Environ. Radioact. 2001. № 56. P. 77–98.
- 32. Панов А.В., Прудников П.В., Титов И.Е. и др. Радиоэкологическая оценка сельскохозяйственных земель и продукции юго-западных районов Брянской области, загрязненных радионуклидами в результате аварии на Чернобыльской АЭС // Радиац. гигиена. 2019. Т. 12. № 1. С. 25—33. [Panov A.V., Prudnikov P.V., Titov I.E. et al. Radioehkologicheskaya otsenka sel'skokhozyajstvennykh zemel' i produktsii yugo-zapadnykh rajonov Bryanskoj oblasti, zagryaznennykh radionuklidami v rezul'tate avarii na Chernobyl'skoj AEHS// Radiatsionnaya gigiena. 2019. V. 12. № 1. Р. 25—33. (In Russian)]

Radiological Justification of Reference Levels of ¹³⁷Cs Concentrations in Fodder of Agricultural Animals

S. V. Fesenko^{a,#}, N. N. Isamov^a, P. V. Prudnikov^b, and E. S. Emlyutina^a

^a Russian Research Institute of Radiology and Agroecology, Obninsk, Russia
 ^b Bryanskagrokhim Radiology, Bryansk, Russia
 [#]E-mail: Corwin 17@mail.ru

An approach to the justification of the ¹³⁷Cs reference levels in animal fodders based on consideration of a stochastic nature of parameters of ¹³⁷Cs transfer to fodders, milk and meat of cattle is presented. It is shown that ¹³⁷Cs concentrations in milk and meat when this concentration of ¹³⁷Cs in the fodder are at the reference' levels adopted in the Russian Federation being ensured milk safety but does not guaranteed meeting of hygienic limits for ¹³⁷Cs concentrations in meat for most types of animal diets. The comparative analysis of the world and Russian data on the parameters of ¹³⁷Cs transfer from fodder to animal products has been carried out. Based on the approach presented the ¹³⁷Cs reference levels in fodders used for keeping dairy and meat cattle in the contaminated territory after the Chernobyl accident have been suggested. The application of these reference levels ensures obtaining of safe animal products for typical animal feeding rations. The implementation of the suggested reference levels may allow optimization of livestock technologies in the areas of the Russian Federation contaminated after the Chernobyl accident.

Keywords: Chernobyl accident, ¹³⁷Cs, reference levels, cattle, milk, meat, coefficients of transfer from feed to livestock products

——— РАДИОЭКОЛОГИЯ ———

УДК 504.064.2:544.58:614.876

К ВОПРОСУ ОБ ОЦЕНКЕ СОБЛЮДЕНИЯ КВОТЫ НА ОБЛУЧЕНИЕ НАСЕЛЕНИЯ ОТ ГАЗОАЭРОЗОЛЬНЫХ ВЫБРОСОВ АЭС

© 2021 г. С. И. Спиридонов^{1,*}, Р. А. Микаилова¹, В. Э. Нуштаева¹

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии, Обнинск, Россия *E-mail: spiridonov.si@gmail.com

Поступила в редакцию 23.01.2020 г. После доработки 22.07.2021 г. Принята к публикации 01.09.2021 г.

Цель работы заключается в оценке парциальных дозовых нагрузок на население при газоаэрозольных выбросах ядерно-энергетических объектов от радионуклидов, поступающих в различные компоненты окружающей среды. Расчеты выполнены для объектов с перспективными реакторами различного типа — ВВЭР-1200 и БРЕСТ-ОД-300 (с предприятиями пристанционного ЯТЦ). В качестве расчетного "инструмента" использовалось интегрированное программное средство СRОМ, рекомендованное МАГАТЭ. Выполнено ранжирование парциальных дозовых нагрузок, формирующих суммарную дозу от газоаэрозольных выбросов. Показано, что контролируемые радионуклиды в перечне Санитарных правил проектирования и эксплуатации атомных электростанций не являются основными дозообразующими для рассматриваемых объектов. В свою очередь, в Методических указаниях по организации радиоэкологического мониторинга агроэкосистем также не уделяется внимание некоторым радионуклидам, вносящим существенный вклад в дозовую нагрузку. Результаты расчетов, представленные в статье, могут быть использованы при формировании программ мониторинга, нацеленного на оценку соблюдения квот на облучение населения от выбросов новых ядерно-энергетических объектов.

Ключевые слова: атомная электростанция, радионуклиды, атмосферные выбросы, парциальная дозовая нагрузка, квота на облучение населения, радиоэкологический мониторинг

DOI: 10.31857/S0869803121060114

Стратегическое направление развития ядерной энергетики России — создание замкнутого топливного цикла с быстрыми реакторами [1]. На площадке Сибирского химического комбината строится реактор БРЕСТ-ОД-300 со свинцовым теплоносителем и смешанным нитридным уранплутониевым топливом. В состав пристанционного ядерного топливного цикла (ПЯТЦ) на этой площадке входят модуль фабрикации/рефабрикации (МП) ядерного топлива и модуль переработки отработавшего топлива (МФ). В рамках другой концепции рассматривается включение в систему с реакторами на тепловых нейтронах (ВВЭР-1200) быстрых реакторов с натриевым теплоносителем — БН-1200.

Необходимым условием функционирования ядерно-энергетических объектов является соблюдение нормативных ограничений по дозовой нагрузке на население. В Санитарных правилах проектирования и эксплуатации атомных электростанций установлены квоты на облучение населения от радиоактивных выбросов и сбросов АЭС [2]. Так, для газоаэрозольных выбросов строящейся или проектируемой АЭС, независи-

мо от количества энергоблоков на промышленной площадке, квота для газоаэрозольных выбросов составляет 50 мкЗв/год. В качестве нижней границы дозы облучения населения в режиме нормальной эксплуатации АЭС принимается значение 10 мкЗв в год.

Оценка соблюдения дозовой квоты выполняется на основе данных о радиоактивных выбросах при эксплуатации ядерно-энергетического объекта. Учет всех основных дозообразующих радионуклидов при расчете суммарной дозовой нагрузки является необходимым условием такой оценки. В нормативном документе [2] допустимые выбросы радиоактивных аэрозолей и газов в атмосферу установлены только для ¹³¹I, ¹³⁴Cs, ¹³⁷Cs, ⁶⁰Со и суммарного количества ИРГ. В выбросах европейских АЭС контролируется большее количество радионуклидов. Максимальное количество контролируемых параметров – в Швеции (93) и Испании (54) [3]. Расчеты дозы облучения населения на основе неполных данных по составу радиоактивных выбросов могут привести к недооценке суммарной дозовой нагрузки [4].

В документе [5] представлен перечень из 15 радионуклидов, для которых устанавливаются нормативы по выбросам. Этот перечень сформирован по результатам оценки вкладов в дозовую нагрузку от газоаэрозольных выбросов реакторов РБМК-1000, ВВЭР-1000 и БН-800 [6]. Согласно данным [6], вклады отдельных радионуклидов для реакторных установок разного типа существенным образом различаются. В этой связи определение основных дозообразующих радионуклидов для новых ядерно-энергетических объектов является важным элементом их радиоэкологического обоснования.

При оценке соблюдения дозовой квоты можно использовать не только данные по выбросам, но и результаты радиоэкологического мониторинга (РЭМ), характеризующие содержание радионуклидов в компонентах окружающей среды (ОС) на прилегающей к АЭС территории. Расчет суммарной дозы облучения населения от "станционных" радионуклидов по данным РЭМ является сложной задачей. Для ее решения необходимо:

- определить содержание естественных и техногенных радионуклидов в объектах ОС при обследовании региона расположения АЭС до начала ее эксплуатации (фоновое обследование);
- учесть в ходе мониторинговых исследований все основные дозообразующие радионуклиды, выбрасываемые АЭС, для полновесной оценки суммарной дозовой нагрузки.

При проведении мониторинговых работ в аграрных экосистемах в районах расположения ядерно-энергетических объектов основное внимание уделяется определению содержания ¹³⁷Сs и ⁹⁰Sr, которые имеют, прежде всего, глобальное, а в некоторых случаях, чернобыльское происхождение. Вклады ¹³⁷Сs и ⁹⁰Sr "станционного" происхождения существенно меньше вкладов других радионуклидов в суммарную дозу облучения населения от выбросов большинства функционирующих в настоящее время российских АЭС [7].

Согласно регламенту радиоэкологического мониторинга агроэкосистем в зоне воздействия АЭС [8] в состав определяемых в почве радионуклидов входят ⁵¹Сг, ⁵⁴Мп, ^{58,60}Со, ⁵⁹Fe, ⁹⁵Zr + ⁹⁵Nb, ⁹⁰Sr, ^{134,137}Сs, ¹³¹I. В то же время для новых ядерноэнергетических объектов значительный вклад в облучение населения могут вносить другие радионуклиды. Так, оценки доз облучения населения от планируемых газоаэрозольных выбросов Опытного демонстрационного энергокомплекса (ОДЭК) с реактором БРЕСТ-ОД-300 показали, что значимыми дозообразующими радионуклидами, кроме продуктов деления, являются ¹⁴С, ³Н, изотопы Ри и ²¹⁰Ро [9].

Таким образом, обоснованная проверка соблюдения квоты на облучение населения [2] при

эксплуатации АЭС (ядерно-энергетического объекта) по данным радиоактивных выбросов или РЭМ возможна только при полновесной оценке суммарной дозы [10]. Перечень основных дозообразующих радионуклидов целесообразно формировать для каждого объекта, планируемого к вводу в эксплуатацию. Активности этих радионуклидов в составе фактических выбросов представляют собой входные данные для расчета дозовых нагрузок на население. Если "мониторинг источника" планируется проводить на основе данных РЭМ, целесообразно определить компоненты ОС, в которых накапливаются основные дозообразующие радионуклиды.

Целью работы, результаты которой изложены в настоящей статье, является оценка вкладов отдельных радионуклидов, распределенных по компонентам окружающей среды, в суммарную дозовую нагрузку от газоаэрозольных выбросов перспективных ядерно-энергетических объектов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Для оценки парциальных дозовых нагрузок на население в системе "компонент ОС—радионуклид" выбраны два ядерно-энергетических объекта, существенно различающихся по своим характеристикам, — ОДЭК с быстрым реактором БРЕСТ-ОД-300 и АЭС с реакторами на тепловых нейтронах ВВЭР-1200. Характеристики газоаэрозольных выбросов ОДЭК приведены в [9], годовые выбросы АЭС с тепловыми реакторами взяты из [11, 12].

Для расчета дозовых нагрузок использовали программный пакет CROM (версия 8.2.5), разработанный на основе моделей, описанных в документе МАГАТЭ [13]. Следует отметить, что эти модели рекомендованы для оценки доз облучения населения от радиоактивных выбросов в атмосферу в документе [14], посвященном разработке программ радиоэкологического мониторинга. Программный пакет CROM рассматривается в качестве справочного кода (reference code) для моделей МАГАТЭ [15].

Дозовые нагрузки от ³H и ¹⁴C рассчитывались с использованием моделей, основанных на допущении о равновесии между радионуклидом и его стабильным изотопом во всех компонентах природной среды [13]. Парциальные дозы облучения населения от употребления различных продуктов питания, содержащих эти радионуклиды, определяли согласно долям водорода и углерода в общей массе продукции.

Консервативная оценка дозовых нагрузок осуществлялась в точке, где человек может получить максимальную годовую дозу. С целью сопоставления влияния двух объектов (ОДЭК с БРЕСТ-ОД-300 и АЭС с ВВЭР-1200) на рейтинг парциальных до-

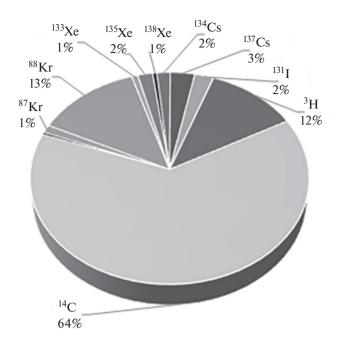


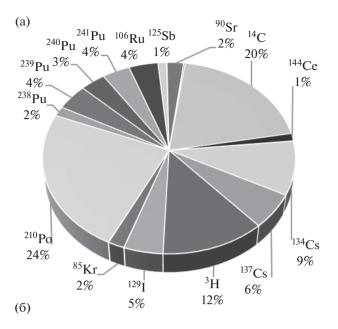
Рис 1. Вклад отдельных радионуклидов в суммарную дозу облучения населения от газоаэрозольных выбросов ВВЭР-1200.

Fig. 1. Contribution of individual radionuclides to the total radiation dose of the population from VVER-1200 gas aerosol emissions.

зовых нагрузок радиоэкологические параметры принимались одинаковыми. В качестве компонентов ОС рассматривали почву (П), воздух (В) и продукты местного производства, употребляемые в пищу населением — растительная продукция (Пр1), мясо с.-х. животных (Пр2) и молоко КРС (Пр3).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖЛЕНИЕ

По результатам расчета выделены вклады отдельных радионуклидов в дозовую нагрузку на население от газоаэрозольных выбросов рассматриваемых ядерно-энергетических объектов для определения наиболее значимых вкладчиков (рис. 1, 2). При расчетах учитывали 50-летний период работы предприятий. Рейтинг основных дозообразующих радионуклидов для ВВЭР-1200 за указанный период практически не меняется. Наибольший вклад в дозовую нагрузку от выбросов ВВЭР-1200 (~90%) могут вносить: ¹⁴С (64%), ⁸⁸Kr (13%) и ³H (12%). Следует подчеркнуть, что этот радионуклидный состав существенным образом отличается от списка контролируемых радионуклидов, включающего ¹³¹I, ¹³⁴Cs, ¹³⁷Cs, ⁶⁰Co и суммарное количество ИРГ согласно Санитарным правилам [2]. Вклад указанных четырех радионуклидов в суммарную дозу облучения населения не превышает 7%, а с учетом ИРГ -23%.



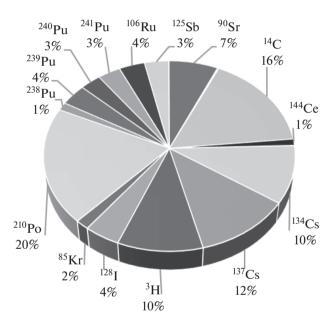


Рис. 2. Вклад отдельных радионуклидов в суммарную дозу облучения населения от газоаэрозольных выбросов предприятий ОДЭК на 1-й (а) и 50-й (б) годы работы.

Fig. 2. Contribution of individual radionuclides to the total radiation dose of the population from gas-aerosol emissions from the ODEK enterprises for the 1st (a) and 50th (b) years of operation.

Все значимые радионуклиды для ВВЭР-1200 (рис. 1) входят в общий перечень, приведенный в [5, 6], однако наблюдается существенное отличие от списка основных вкладчиков в дозовую нагрузку для ВВЭР-1000 [6].

Анализируя рейтинг основных дозообразующих радионуклидов, выбрасываемых в атмосферу

Таблица 1. Ранжирование парциальных дозовых нагрузок, формирующих 95% суммарной дозы от газоаэрозольных выбросов реактора ВВЭР-1200

Table 1. Ranking of partial doses forming 95% of the total dose from gas-aerosol emissions from a VVER-1200 reactor

Радионуклид — компонент ОС	Вклад в суммарную дозу, %
¹⁴ C – Πp1	37.9
$^{14}\mathrm{C}-\Pi\mathrm{p}2$	14.1
88 Kr $-$ B	13.4
$^{14}C - \Pi p3$	12.4
$^{3}H-\Pi p2$	5.9
$^{3}H-\Pi p1$	3.3
$^{3}H-\Pi p3$	2.5
$^{131}I - \Pi p3$	1.6
87 Kr $-$ B	1.2
$^{131}I - \Pi p2$	0.4

реактором БРЕСТ-ОД-300 и предприятиями, входящими в состав ПЯТЦ, можно выделить две особенности. Во-первых, проектный состав радионуклидов, формирующих 95% дозовой нагрузки, существенно шире, по сравнению с ВВЭР-1200. Во-вторых, по истечении 50 лет с начала работы предприятий вклады радионуклидов меняются. Это обусловлено, в частности, накоплением в почве с течением времени ¹³⁷Сѕ и ⁹⁰Ѕг.

Наибольший вклад в дозовую нагрузку от предприятий ОДЭК (до 70%) в 1-й год вносят: ²¹⁰Po (24%), ¹⁴C (20%), ³H (12%), ¹³⁴Cs (9%) и ¹³⁷Cs (6%), в 50-й год — ²¹⁰Po (20%), ¹⁴C (16.5%), ¹³⁷Cs (12%), ³H (10%) и ¹³⁴Cs (10%). Среди перечисленных радионуклидов ²¹⁰Ро и ³Н присутствуют только в выбросах реактора БРЕСТ-ОД-300, а ¹⁴С и наибольшее количество изотопов Cs выбрасывается модулем переработки отработавшего топлива (MП). Модуль фабрикации (M Φ) является источником выброса изотопов Ри, которые вносят заметный вклад (до 13%) в дозовую нагрузку. Вклад контролируемых радионуклидов, согласно [2] (включая ИРГ), в суммарную дозу облучения населения в 1-й год функционирования ОДЭК составляет 17%, а в 50-й год -29%.

В рамках более детализированного подхода установлены парциальные дозовые нагрузки на население при газоаэрозольных выбросах ядерно-энергетических объектов от радионуклидов, содержащихся в различных компонентах окружающей среды. В табл. 1—3 представлены результаты ранжирования полученных значений с ис-

Таблица 2. Ранжирование парциальных дозовых нагрузок, формирующих 95% суммарной дозы от газоаэрозольных выбросов в 1-й год работы предприятий ОДЭК **Table 2.** Ranking of partial doses that form 95% of the total dose from gas-aerosol emissions in the 1st year of operation of ODEK enterprises

Радионуклид — компонент ОС	Вклад в суммарную дозу, %
²¹⁰ Po – Πp1	15.6
$^{14}C-\Pi p1$	11.6
$^{3}H - \Pi p2$	6.2
$^{210}{ m Po} - \Pi{ m p3}$	5.9
$^{14}{ m C} - { m \Pip2}$	4.5
$^{14}\mathrm{C}-\Pi\mathrm{p}3$	3.8
$^3\mathrm{H}-\Pi\mathrm{p}1$	3.4
134 Cs $ \Pi$ p2	3.3
$^{3}H-\Pi p3$, $^{134}Cs-\Pi p3$, $^{239}Pu-B$	2.5-2.6
210 Po $ \Pi$ p2, 137 Cs $ \Pi$ p2, 241 Pu $-$ B, 106 Ru $ \Pi$ p2, 134 Cs $ \Pi$ p1, 240 Pu $-$ B, 85 Kr $-$ B	2.0-2.3
$^{129}I - \Pi p2, ^{239}Pu - \Pi p1, ^{137}Cs - \Pi p3, \\ ^{241}Pu - \Pi p1, ^{106}Ru - \Pi p1, ^{137}Cs - \Pi p1, \\ ^{129}I - \Pi p3$	1.5–1.9
240 Pu $ \Pi$ p1, 129 I $ \Pi$ p1, 90 Sr $ \Pi$ p1, 144 Ce $ \Pi$ p1, 134 Cs $ \Pi$, 238 Pu $-$ B	1.0-1.4

пользованием приведенных выше обозначений компонентов ОС. В таблицы включены парциальные дозовые нагрузки, формирующие 95% суммарной дозы от выбросов теплового реактора ВВЭР-1200 и быстрого реактора БРЕСТ-ОД-300 вместе с МП и МФ. Следует подчеркнуть, что квоты на облучение населения установлены для строящихся или проектируемых АЭС без указания типа реакторной установки и не зависят от количества энергоблоков на площадке [2]. В этой связи совместно рассматривались и предприятия ПЯТЦ.

Анализ данных табл. 1 показывает, что при мониторинговых работах в регионе расположения реакторов ВВЭР-1200 для оценки дозовой нагрузки от газоаэрозольных выбросов целесообразно сфокусироваться на определении содержания ¹⁴С и ³Н в продуктах питания, производимых в этом регионе. Основную трудность представляет опре-

Таблица 3. Ранжирование парциальных дозовых нагрузок, формирующих 95% суммарной дозы от газоаэрозольных выбросов в 50-й год работы предприятий ОДЭК **Table 3.** Ranking of partial doses that form 95% of the total dose from gas-aerosol emissions in the 50st year of operation of ODEK enterprises

Радионуклид — компонент ОС	Вклад в суммарнун дозу, %
²¹⁰ Po — Πp1	13.0
$^{14}\mathrm{C}-\Pi$ p1	9.6
$^{3}H-\Pi p2$	5.2
$^{210}{ m Po} - \Pi{ m p3}$	4.9
$^{137}\mathrm{Cs}-\Pi$	4.7
$^{14}\mathrm{C}-\Pi$ p2	3.7
$^{14}\mathrm{C}-\Pi\mathrm{p}3$	3.2
137 Cs $ \Pi$ p2	3.2
$^{125}\text{Sb} - \Pi$, $^{134}\text{Cs} - \Pi$ p2, $^{3}\text{H} - \Pi$ p1, $^{90}\text{Sr} - \Pi$ p3, $^{134}\text{Cs} - \Pi$	2.6-3.0
137 Cs $- \Pi$ p3, 134 Cs $- \Pi$ p3, 90 Sr $- \Pi$ p2, 3 H $- \Pi$ p3, 239 Pu $- $ B	2.1-2.4
$^{210}Po - \Pi p2, ^{241}Pu - B, ^{106}Ru - \Pi p2, \\ ^{34}Cs - \Pi p1, ^{90}Sr - \Pi p1, ^{240}Pu - B, ^{240}Pu - B, \\ ^{85}Kr - B, ^{129}I - \Pi p2, ^{239}Pu - \Pi p1$	1.5-1.9
$^{137}\text{Cs} - \Pi p1, ^{241}\text{Pu} - \Pi p1, ^{129}\text{I} - \Pi p1, ^{129}\text{I} - \Pi p1, ^{129}\text{I} - \Pi p3, ^{106}\text{Ru} - \Pi p1$	1.2-1.4

деление значимого с точки зрения дозообразования 88 Kr в воздухе. Измерение содержания 88 Kr с использованием метода низкотемпературной сорбции ИРГ [16] представляется затруднительным в силу малого периода полураспада этого радионуклида — 2.84 ч. Оценка дозовых нагрузок от радиоактивного облака может быть выполнена расчетным путем с использованием фактических данных о содержании 88 Kr и 87 Kr в газоаэрозольных выбросах.

Парциальные дозы облучения населения от атмосферных выбросов реактора БРЕСТ-ОД-300, МФ и МП, образующих ПЯТЦ, существенным образом отличаются от парциальных дозовых нагрузок для ВВЭР-1200. Наибольший вклад в суммарную дозовую нагрузку вносят дозы внутреннего облучения от ²¹⁰Ро и ¹⁴С, поступающих в организм человека при употреблении в пищу растительной продукции. С течением времени

вклады некоторых радионуклидов и путей облучения в регионе расположения ОДЭК изменяются. Так, вклад в дозовую нагрузку внешнего облучения от 137 Cs, 125 Sb и 134 Cs, содержащихся в почве, увеличивается.

Следует отметить, что дозовую нагрузку (95%) от предприятий ОДЭК формирует значительное количество "вкладчиков" — радионуклидов в компонентах ОС (более 30), в отличие от ВВЭР-1200 (10). При оптимизации мониторинговых исследований на территории, прилегающей к ОДЭК, на основе данных табл. 2—3 можно выделить реперные радионуклиды для пробоотбора и измерения. Таким образом, информация, представленная в табл. 1—3, может быть использована при разработке подходов к мониторингу рассматриваемых ядерно-энергетических объектов ("мониторинг источника" [14]).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполнены прогностические оценки дозовых нагрузок на население с использованием данных о планируемых газоаэрозольных выбросах АЭС с перспективными реакторами различного типа -ВВЭР-1200 и БРЕСТ-ОД-300 (в комплексе с предприятиями ПЯТЦ). Расчеты проведены на основе программного средства, принятого в качестве справочного кода (reference code) для моделей МАГАТЭ, и подходов, представленных в документе SRS № 19 [13]. Установлено, что радионуклидов, рекомендуемых к контролированию в Санитарных правилах проектирования и эксплуатации атомных электростанций [2], недостаточно для оценки соблюдения дозовой квоты, установленной в этом документе. Все основные дозообразующие радионуклиды для ВВЭР-1200 входят в перечень документа [5], однако для БРЕСТ-ОД-300 и предприятий ПЯТЦ можно выделить значимые с точки зрения дозообразования радионуклиды, не представленные в этом перечне.

Для полновесной оценки соблюдения квоты на облучение населения от радиоактивных выбросов АЭС [2] можно опираться на данные, полученные в ходе радиоэкологического мониторинга прилегающей территории. Продемонстрирована значимость агропродукции местного производства, употребляемой в пищу населением, с точки зрения формирования дозовой нагрузки. Необходимо подчеркнуть, что консервативные оценки дозовых нагрузок на население от ¹⁴С и ³Н выполнены согласно подходу [13]. Для учета доли местных продуктов питания в рационе питания населения следует использовать подход, представленный в публикациях [17, 18].

При оптимальной организации РЭМ важно сочетать экспериментальные и расчетные методы. Если измерение содержания радионуклидов в

компонентах ОС является затруднительным (например, короткоживущих изотопов), оценка дозовых нагрузок может быть выполнена на основе данных по радиоактивным выбросам. Таким образом, результаты исследований, представленные в настоящей статье, могут быть использованы при формировании программ РЭМ, нацеленного на проверку соблюдения дозовых квот для объектов ядерной энергетики.

Следует отметить, что жесткие нормативные значения для дозовых нагрузок установлены с учетом беспороговой концепции действия ионизирующего излучения на человека, принятой в настоящее время. Однако необходимость соблюдения нормативов на облучение населения от ядерно-энергетических объектов требует проведения соответствующих оценок.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (соглашение № 18-19-00016).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Адамов Е.О., Алексахин Р.М., Большов Л.А. и др. Проект "Прорыв" технологический фундамент для крупномасштабной ядерной энергетики // Изв. РАН. Энергетика. 2015. № 1. С. 5—12. [Adamov E.O., Alexakhin R.M., Bolshov L.A. et al. "Breakthrough" project technological basement for large-scale nuclear energy // Proc. RAS. Power Eng. 2015. №1. Р. 5—12. (In Russian)]
- 2. Санитарные правила проектирования и эксплуатации атомных станций (СП АС-03). Санитарные правила и гигиенические нормативы СанПин 2.6.1.24-03. М.: Минздрав России, 2003. 41 с. [Sanitarnye pravila proektirovaniya i ekspluatatsii atomnyh stantsii (SP AS-03). Sanitarnye pravila i gigienicheskie normativy SanPin 2.6.1.24-03. М.: Minzdrav Rossii, 2003. 41 s. (In Russian)]
- 3. *Екидин А.А.*, *Жуковский М.В.*, *Васянович М.Е.* Идентификация основных дозообразующих радионуклидов в выбросах АЭС // Атомная энергия. 2016. Т. 120. Вып. 2. С. 106—108. [*Ekidin A.A.*, *Zhukovskii M.V.*, *Vasyanovich M.E.* Identification of the main dose-forming radionuclides in NPP emissions // Atomic Energy. 2016. V. 120. №2. P. 134—137 (English version)]
- 4. Спиридонов С.И., Карпенко Е.И., Шарпан Л.А. Ранжирование радионуклидов и путей облучения по вкладу в дозовую нагрузку на население, формирующуюся в результате атмосферных выбросов атомных электростанций // Радиац. биология. Радиоэкология. 2013. Т. 53. № 4. С. 401—410. [Spiridonov S.I., Karpenko E.I., Sharpan L.A. Ranking of radionuclides and pathways according to their contribution to the dose burden to the population resulting from NPP releases // Radiats. Biol. Radioecol. 2013. V. 53. № 4. P. 401—410. (In Russian)]

- 5. Разработка и установление нормативов предельно допустимых выбросов радиоактивных веществ атомных станций в атмосферный воздух. Методика. МТ 1.2.2.15.1176-2016. АО "Концерн Росэнергоатом", 2016. 76 с. [Razrabotka i ustanovlenie normativov predel'no dopustimyh vybrosov radioaktivnyh veshchestv atomnyh stantsii v atmosfernyi vozduh. Metodika. МТ 1.2.2.15.1176-2016. АО "Kontsern Rosenergoatom", 2016. 76 s. (In Russian)]
- 6. Контроль и анализ данных о выбросе радионуклидов АЭС. Отчет № 335/11-16. Екатеринбург: АЭБ "Альфа-Х91", 2016. 40 с. [Kontrol' i analiz dannyh o vybrose radionuklidov AES. Otchet № 335/11-16. Ekaterinburg: AEB "Al'fa-X91", 2016. 40 s. (In Russian)]
- Vasyanovich M., Ekidin A., Vasilyev A. et al. Determination of radionuclide composition of the Russian NPPs atmospheric releases and dose assessment to population // J. Environ. Radioactiv. 2019. V. 208–209. P. 106006.
- 8. МУ 13.5.13-00. Организация государственного радиоэкологического мониторинга агроэкосистем в зоне воздействия радиационно-опасных объектов: Методические указания (Утв. Министерством сельского хозяйства РФ 7 августа 2000 г.). М., 2000. 28 с. [МU 13.5.13-00. Organizatsiya gosudarstvennogo radioekologicheskogo monitoringa agroekosistem v zone vozdeistviya radiatsionno-opasnyh ob"ektov: Metodicheskie ukazaniya (Utv. Ministerstvom sel'skogo hozyaistva RF 7 avgusta 2000 g.). М., 2000. 28 s. (In Russian)]
- 9. Спирин Е.В., Алексахин Р.М., Бажанов А.А. Структура дозы облучения населения при эксплуатации предприятий опытного демонстрационного энергокомплекса // Атомная энергия. 2018. Т. 124. Вып. 3. С. 169—173. [Spirin E.V., Alexakhin R.M., Bazhanov A.A. Structure of the public irradiation dose during operation of experimental-demonstration power complex enterprises // Atomic Energy. 2018. V. 124. № 3. P. 203—209. (English version)]
- 10. Спиридонов С.И., Кузнецов В.К., Панов А.В., Титов И.К. К вопросу об оптимизации радиоэкологического мониторинга в регионах размещения
 предприятий ядерного топливного цикла // Радиация и риск. 2019. Т. 28. № 4. С. 44—53. [Spiridonov S.I., Kuznetsov V.K., Panov A.V., Titov I.K. To the
 question of optimisation of radioecological monitoring
 in the vicinity of nuclear fuel cycle enterprises // Radiation and Risk. 2019. V. 28. № 4. P. 44—53. (In Russian)]
- 11. Материалы оценки воздействия на окружающую среду Ленинградская АЭС-2. LN20. E.110. 077.GZ.0001. СПб.: АО "Атомпроект", 2015. Т. 2. 414 с. [Materialy otsenki vozdeistviya na okruzhayushchuyu sredu Leningradskaya AES-2. LN20. E.110. 077.GZ.0001. S.-Peterburg: AO "Atomproekt", 2015. Т. 2. 414 s. (In Russian)]
- 12. International peer review of the environmental impact assessment performed for the licence application of the Baltic-1 nuclear power plant, Kaliningrad, Russian Federation. Vienna: IAEA, 2017. P. 22.

- 13. Generic models for use in assessing the impact of discharges of radioactive substances to the environment. Safety Reports Series No. 19. Vienna: IAEA, 2001. 229 p.
- 14. Programmes and systems for source and environmental radiation monitoring. Safety Reports Series No. 64. Vienna: IAEA, 2010. 232 p.
- 15. Stocki T.J., Telleria D.M., Bergman L. et al. Reference methodologies for radioactive controlled discharges an activity within the IAEA's program environmental modelling for radiation safety II (EMRAS II) // Radioprot. 2011. V. 46. № 6. P. S687–S693.
- 16. Дубасов Ю.В., Окунев Н.С. Содержание радионуклидов ⁸⁵Кг и Хе в атмосферном воздухе Северо-Западного региона России в 2006—2008 гг. // Тр. Радиевого ин-та им. В.Г. Хлопина. СПб.: ФГУП "НПО "Радиевый институт им. В.Г. Хлопина"", 2011. Т. XV. С. 141—167. [Dubasov Yu.V., Okunev N.S. Soderzhanie radionuklidov ⁸⁵Kr i Xe v atmosfernom vozduhe Severo-Zapadnogo regiona Rossii v 2006—

- 2008 gg. // Trudy Radievogo instituta im. V.G. Hlopina. S.-Peterburg: FGUP «NPO "Radievyi institut im. V.G. Hlopina"», 2011. T. XV. S. 141–167. (In Russian)]
- 17. Крышев А.И., Крышев И.И., Васянович М.Е. и др. Оценка дозы облучения населения от выброса 14С АЭС с РБМК-1000 и ЭПГ-6 // Атомная энергия. 2020. Т. 128. Вып. 1. С. 46–52. [Kryshev A.I., Kryshev I.I., Vasyanovich M.E. et al. Population irradiation dose assessment for 14C emissions from NPP with RBMK-1000 and EGP-2 reactors // Atomic Energy. 2020. V. 128. № 1. P. 53–59. (English version)]
- 18. *Крышев А.И., Васянович М.Е., Екидин А.А. и др.* Поступление трития в атмосферу с выбросами АЭС с ВВЭР и оценка дозы облучения населения // Атомная энергия. 2020. Т. 128. Вып. 6. С. 333—337. [*Kryshev A.I., Vasyanovich M.E., Ekidin A.A. et al.* Tritium entry into the atmosphere with emissions from NPP-VVER and population irradiation dose assessment // Atomic Energy. 2020. V. 128. № 6. P. 362—367. (English version)]

About the Assessment of Radiation Doses for the Population from NPP Atmospheric Releases within the Compliance with the Dose Constraint for a Single Facility

S. I. Spiridonov^{a,#}, R. A. Mikailova^a, and V. E. Nushtaeva^a

^a Russian Research Institute of Radiology and Agroecology, Obninsk, Russia [#]E-mail: spiridonov.si@gmail.com

The purpose of the research is to estimate the partial radiation doses to the population from radionuclides contained in various environmental components due to gas-aerosol releases of nuclear power facilities. The calculations were carried out for facilities with promising reactors of two different types — VVER-1200 and BREST-OD-300 in the complex with the enterprises of the stationary nuclear fuel cycle. The CROM code recommended by the IAEA was used as an assessment tool. The ranking of partial radiation doses forming the total dose from atmospheric releases was made. It is shown that the controlled radionuclides in the list of Sanitary rules for the design and operation of nuclear power plants are not the main dose-forming radionuclides for the facilities under consideration. The Methodological guidelines for the organisation of radioecological monitoring of agroecosystems in the area of impact of radiation hazardous facilities also do not pay attention to radionuclides, which are significant in terms of dose formation. The results of the calculations presented in the article can be used in the development of radioecological monitoring programmes aimed at assessing of public exposure from atmospheric releases within the compliance with dosimetric constraints (quotas) for the considered nuclear power facilities.

Keywords: nuclear power plant, radionuclides, atmospheric emissions, partial dose load, quota for public exposure, radioecological monitoring

_____ ХРОНИКА **____**

ПАМЯТИ ВИКТОРА АЛЕКСЕЕВИЧА БУДАРКОВА

DOI: 10.31857/S0869803121060072



8 августа 2021 г. ушел из жизни Виктор Алексеевич Бударков, замечательный человек и ученый, доктор биологических наук (1978), профессор (1988), член Международного общества радиоэкологии (1995), заслуженный деятель науки Российской Федерации (1996).

В.А. Бударков родился 3 марта 1941 г. в г. Бугульма республики Татарстан. В 1963 г. окончил ветеринарный факультет Казанского ветеринарного института им. Н.Э. Баумана, являлся учеником основателя Казанской школы ветеринарных радиобиологов проф. В.А. Киршина. После окончания аспирантуры до 1979 г. работал в должности младшего, а затем старшего научного сотрудника Казанского ветеринарного института, а в 1979 г. был избран на должность заведующего лабораторией изотопных методов исследований Федерального исследовательского центра вирусологии и микробиологии (ФИЦ ВиМ, пос. Вольгинский Владимирской обл.), в котором проработал до мая настоящего года.

Основные направления его исследований — патогенез радиационных поражений животных внешними и внутренними источниками радиации, инфекция и иммунитет при воздействии ионизирующих излучений на организм, фармакологическая противолучевая защита животных,

использование радионуклидов и ионизирующих излучений в вирусологии и микробиологии, изучение миграции радионуклидов по пищевым цепочкам сельскохозяйственных животных.

Казанский период творческой биографии Виктора Алексеевича был связан с изучением функциональных и биохимических изменений у кур и их потомства при воздействии инкорпорированных радионуклидов – стронция-90 и йода-131. Приобретенный в эти годы опыт и высокий профессионализм Виктора Алексеевича позволили ему возглавить уникальный радиологический комплекс на базе ФИЦ ВиМ, созданный в соответствии с решениями правительства страны, для оценки последствий воздействия поражающих факторов ядерного взрыва на сельскохозяйственных животных. В радиобиологических исследованиях, выполненных под научным руководством В.А. Бударкова на жвачных сельскохозяйственных животных (крупный рогатый скот, овцы) и моногастричных лабораторных животных и свиньях, были установлены закономерности острого радиационного поражения животных инкорпорированными труднорастворимыми радиоактивными частицами, содержащими в своем составе молодые продукты ядерного деления. Скрупулезный анализ полученных результатов позволил В.А. Бударкову и его любимому ученику А.С. Зенкину (в настоящее время – профессор Мордовского государственного университета) классифицировать радиационное поражение животных инкорпорированными в ЖКТ радиоактивными частицами как радиационный язвенный гастроэнтероколит и выделить четыре степени радиационного поражения в зависимости от величины перорально поступившей активности, а затем и от поглощенных доз в очагах язвенного поражения (совместно с Г.В. Козьминым). Под руководством В.А. Бударкова и А.С. Зенкина были разработаны методы лечения радиационных поражений ЖКТ и испытана эффективность препаратов с различными механизмами действия: повышающих естественную резистентность, оказывающих местное ранозаживляющее действие, солевое слабительное, холиномиметики.

В.А. Бударков – участник ликвидации последствий аварии на ЧАЭС в агропромышленной сфере. В первые годы после аварии силами возглавляемой им лаборатории были проведены

уникальные полевые исследования на пострадавших территориях, позволившие установить зависимость частоты проявления радиационных патологий щитовидной железы у сельскохозяйственных животных от дозы облучения и содержания стабильного йода в рационе кормления. Совместно с сотрудниками Федерального медицинского биофизического центра им. А.И. Бурназяна (проф. И.Я. Василенко др.) также была проведена оценка эффективности различных ферроцинсодержащих препаратов для сорбции радионуклидов в содержимом пишеварительного тракта человека и сельскохозяйственных животных. Полученные результаты имели важное прикладное значение и нашли применение в специальных противорадиационных мероприятиях, проводимых до настоящего времени на загрязненных радионуклидами территориях.

В.А. Бударков — автор более чем 250 научных трудов, в том числе 12 монографий, и учебных пособий. Под его научным руководством защитили диссертации пять докторов и 23 кандидата биологических наук.

В разные годы Виктор Алексеевич являлся членом ветеринарного фармакологического совета при Департаменте ветеринарии Министерства сельского хозяйства, членом экспертного совета ВАК по медицинским и ветеринарным специальностям, председателем секции "Радиобиология" при Отделении ветеринарной медицины Россельхозакадемии, членом специализированных советов по присуждению ученых степеней кандидата и доктора наук при ВНИИ радиологии и агроэкологии и ФИЦ ВиМ. Награжден медалью "За трудовую доблесть".

Светлая память о Викторе Алексеевиче навсегда останется в наших сердцах. За более чем полувековой период научно-исследовательской и организационной работы В.А. Бударков внес неоценимый вклад в различные области ветеринарной радиобиологии. Являясь профессионалом в науке, он был яркой личностью, широко эрудированным человеком. Всем были известны его абсолютная бескорыстность и готовность помочь людям, оказавшимся в трудной жизненной ситуации. Мы безмерно скорбим об ушедшем Викторе Алексеевиче Бударкове — классике радиобиологии и прекрасном человеке.