

ISSN 2311-4495  
ISSN 2410-5155 (Online)  
УДК 615.4:616-092.9; 616.4-008.1:616-092.9  
<https://doi.org/10.18705/2311-4495-2025-12-6-592-608>

## Применение специфичных для человека ИФА-наборов при анализе биоматериала лабораторных животных

Н. М. Фаустова, В. М. Косман, М. В. Карлина, М. Н. Макарова,  
В. Г. Макаров

Акционерное общество «Научно-производственное объединение  
«ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская область, Россия

**Контактная информация:**

Фаустова Наталья Михайловна,  
АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»,  
ул. Заводская, д. 3, к. 245, ком. 4.34,  
Кузьмоловский г. п., Ленинградская обл.,  
Россия, 188663.  
E-mail: faustova.nm@doclinika.ru

### Резюме

**Актуальность.** Иммуноферментный анализ (ИФА) широко применяют при изучении фармакологической безопасности, фармакокинетики, фармакодинамики как оригинальных, так и воспроизведенных (биоаналогичных) лекарственных веществ; он является методом выбора для оценки различных биомаркеров при проведении клинических и доклинических исследований. Особенностью, ограничивающей применение данного метода, является его видоспецифичность. **Цель.** Статья посвящена обсуждению применения и адаптации специфичных для человека ИФА-наборов для анализа биоматериала лабораторных животных. **Материалы и методы.** Рассмотрены материалы нескольких исследований, выполненных в организации, с использованием крыс, как одной из наиболее распространенных тест-систем в доклинических исследованиях, и включавших применение ИФА-наборов для определения в крови стероидных гормонов (тестостерон, эстрадиол), гормонов стресса (кортизол, кортикостерон) и кардиомаркеров (миоглобин, тропонин I). **Результаты.** Показаны примеры использования наборов реагентов без каких-либо изменений (кортизол), после различных вариантов оптимизации (кортикостерон, тестостерон, эстрадиол). На примере кардиомаркера миоглобина представлен алгоритм выбора типа биоматериала, позволяющий расширить исходную область применения набора реагентов и унифицировать отбор биоматериала в экспериментальном исследовании, а тропонин I оказался примером непригодности набора для анализа биоматериала крыс. **Заключение.** На основании экспериментального опыта сформулированы алгоритм и схема принятия решений по апробации и адаптации ИФА-наборов реагентов, специфичных для человека, при анализе биоматериала лабораторных животных.

**Ключевые слова:** иммуноферментный анализ, адаптация наборов реагентов, видоспецифичность, плазма и/или сыворотка крови крыс, кортизол, кортикостерон, тестостерон, эстрадиол, тропонин I, миоглобин

**Для цитирования:** Фаустова Н.М., Косман В.М., Карлина М.В. и др. Применение специфичных для человека ИФА-наборов при анализе биоматериала лабораторных животных. *Трансляционная медицина*. 2025;12(6):592-608. <https://doi.org/10.18705/2311-4495-2025-12-6-592-608>; <https://elibrary.ru/XTPJUQ>

## Application of human-specific ELISA kits for the analysis of laboratory animal biomaterial

Natalia M. Faustova, Vera M. Kosman, Marina V. Karlina,  
Marina N. Makarova, Valeriy G. Makarov

Research-and-manufacturing company «HOME OF PHARMACY»  
Joint Stock Company, Leningrad Region, Russia

### Corresponding author:

Natalia M. Faustova,  
RMC «HOME OF PHARMACY» JSC,  
3 Zavodskaya str., bldg. 245, rm. 4.34,  
Kuzmolovsky Settlement, Leningrad Region,  
Russia, 188663.  
E-mail: faustova.nm@doclinika.ru

### Abstract

**Background.** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is widely used in the study of pharmacological safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics of both original and reproduced (biosimilar) drugs; it is the method of choice for the evaluation of various biomarkers in clinical and preclinical studies. A feature limiting the use of this method is its species specificity. **Objective.** The article discusses the use and adaptation of ELISA sets specific for humans for the analysis of biomaterial from laboratory animals. **Design and methods.** The materials of several studies performed in the organization using rats as one of the most common test systems in preclinical studies, and including the use of ELISA kits for the determination of steroid hormones in the blood (testosterone, estradiol), stress hormones (cortisol, corticosterone) and cardiac biomarkers (myoglobin, troponin). **Results.** Examples of using reagent kits without any changes are shown (cortisol), after various optimization options (corticosterone, testosterone, estradiol). On the myoglobin cardiomarker example an algorithm for biomaterial type choosing is presented, which allows expanding the initial field of reagent kit use and unifying the biomaterial selection in an experimental study, and troponin I turned out to be an example of the unsuitability of the kit for analyzing rat biomaterial. **Conclusion.** Based on experimental experience, an algorithm and decision-making scheme for approbation and adaptation of ELISA reagent kits specific for humans in the analysis of laboratory animal biomaterial are formulated.

**Keywords:** enzyme-linked immunosorbent assay, reagent kit adaptation, species specificity, rat plasma and/or serum, cortisol, corticosterone, testosterone, estradiol, troponin I, myoglobin

**For citation:** Faustova NM, Kosman VM, Karlina MV, et al. Application of human-specific ELISA kits for the analysis of laboratory animal biomaterial. *Translational Medicine*. 2025;12(6):592-608. (In Russ.) <https://doi.org/10.18705/2311-4495-2025-12-6-592-608>; <https://elibrary.ru/XTPJUQ>

### Введение

Иммуноферментный анализ (ИФА) — лабораторное исследование, основанное на высокой избирательности и специфичности иммунологических реакций «антиген-антитело» и направленное на выявление специфических антител с помощью специальных биохимических реакций, которые помогают определить присутствие или отсутствие антител и других аналитов и их количество. Метод ИФА позволяет определить уровень гормонов, иммуноглобулинов, иммунологических комплексов

и других биологически активных веществ, а также антител к любой инфекции. Материалом для исследования могут служить различные биологические жидкости, например, кровь, спинномозговая жидкость, содержимое стекловидного тела, околоплодные воды и т. д. ИФА широко применяют в клинических (КИ) и доклинических исследованиях (ДКИ): при изучении фармакологической безопасности, фармакокинетики, фармакодинамики как оригинальных, так и воспроизведенных (биоаналогичных) лекарственных средств; он является

методом выбора для оценки различных биомаркеров при проведении ДКИ и КИ.

Особенность применения данного метода состоит в его видоспецифичности. Так, например, ИФА-наборы, специфичные для человека, применяемые в клинике для определения различных типов биомаркеров (гормоны, сигнальные молекулы и т. п.), являющихся по природе белками и гликопептидами, не подходят при исследовании биоматериала от животных, что связано со специфичностью антител, иммобилизованных в лунках планшета для детекции требуемого аналита. В этом случае необходимо использовать наборы, специфичные для целевого вида животных, или создавать методики на основе комплекта антител, специфичных к белкам и гликопептидам этого вида животных.

Среди целевых показателей, определяемых методами ИФА, могут быть аналиты, не относящиеся к белкам или гликопептидам, а представляющие собой низкомолекулярные соединения, например, некоторые гормоны (тестостерон, эстрадиол, кортикостерон и др.), желчные кислоты и др. Часть таких молекул являются эволюционно сравнительно «древними», и их строение идентично у различных видов животных. В этом случае ИФА-наборы, разработанные для человека, могут быть пригодны для анализа биоматериала от лабораторных животных. Но, вместе с тем, возможны затруднения с применением таких наборов в ДКИ в связи со значительными отличиями уровней определяемых концентраций аналита у разных биологических видов (например, стероидных гормонов, ряда медиаторов и нейротормонов и др.).

В целом, создание любого нового ИФА-набора или методики на основе специфичных антител — достаточно длительный и дорогостоящий процесс, а разработанные для анализа биоматериала человека наборы реагентов более распространены и коммерчески доступны по сравнению с видоспецифичными наборами. Поэтому при наличии на рынке готовых реагентов целесообразно оценить возможность и адекватность их применения для решения поставленной в исследовании аналитической задачи, что может потребовать как апробации, так и адаптации методики производителя.

Целью данной статьи являлось обсуждение применения и адаптации ИФА-наборов, специфичных для человека, для анализа биоматериала лабораторных животных.

## Материалы и методы

В работе в качестве примеров рассмотрены материалы нескольких исследований (табл. 1), которые были выполнены в организации с использованием крыс, как одной из наиболее распространенных тест-систем в ДКИ, и включали применение ИФА-наборов для определения в крови стероидных гормонов, гормонов стресса (кортизол, кортикостерон) и кардиомаркеров (миоглобин, тропонин).

Все процедуры, проводимые с животными, и условия их содержания соответствовали актуальным регуляторным документам по охране животных, используемых в научных целях<sup>1, 2</sup>, животные получали стандартный рацион, при клиническом осмотре было подтверждено отсутствие отклонений в состоянии их здоровья. Исследования были одобрены Биоэтической комиссией АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» (табл. 1).

Определение концентрации гормонов (тестостерона, эстрадиола, кортизола, кортикостерона), кардиомаркеров (тропонина I и миоглобина) с помощью ИФА-наборов отечественного и зарубежного производства (табл. 1) проводили согласно инструкциям производителей. Изменения, если они потребовались, рассмотрены ниже. В ходе аналитического этапа работы использовали следующее оборудование и материалы: планшетный спектрофотометр xMark™ Microplate Spectrophotometer (Bio-Rad, США), анализатор микропланшетный CLARIOstar (BMG Labtech, Германия), систему получения воды очищенной Simplicity® (Millipore, США), центрифугу лабораторную Z 216 V-2 (Hermle Labortechnik GmbH, Германия), весы лабораторные AR 2140 (Ohaus, Китай), pH-метр (Hanna HI-2211, Китай).

Для регистрации и обработки данных применяли специальное программное обеспечение использованного оборудования — Mars 4.01R2 (BMG Labtech, Германия). К полученным данным применена описательная статистика (в случае нормального распределения, критерий Шапиро-Уилка) с расчетом среднего значения (M), ошибки среднего (SEM), стандартного отклонения (SD), относительного стандартного отклонения (RSD, %). Для данных, не соответствующих закону нормального распределения, рассчитывали медиану (Me) и квартильный размах (Q1; Q3). Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения Prism 9.1.1 (GraphPad Software, США).

<sup>1</sup> Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Восьмое издание. Пер. с англ. под ред. И. В. Белозерцевой, Д. В. Блинова, М. С. Красильщиковой. М.: ИРБИС.

<sup>2</sup> Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях. / в пер. с англ. яз. М. С. Красильщиковой, И. В. Белозерцевой. СПб. 2012. 50 с.

**Таблица 1.** Краткая характеристика исследований

**Table 1.** Brief characteristics of the studies

Показатель	№ 1БЭК <sup>1</sup>	Общее количество животных в эксперименте, пол, возраст	Биоматериал (антикоагулянт; моделируемая патология)	Набор реагентов (каталожный номер, производитель)
Кортикостерон	1.60/20	Крысы линии Wistar, самцы, 40 животных в возрасте 8 недель	Плазма крови крыс (гепарин натрия; стресс)	Corticosterone: Human, Rat, Mouse (№ 1RE52211, IBL Intern, Германия)
Кортизол, кортикостерон	1.7/22	Крысы линии Wistar, самцы, 80 животных в возрасте 6–8 недель	Сыворотка крови крыс (стресс)	Кортизол-ИФА-Бест (№ 1X3964, АО «Вектор-Бест», Россия) Corticosterone ELISA (№ 1EIA-4164, DRG Instruments GmbH, Германия)
Тестостерон	1.39/22	Крысы линии Wistar, самцы, 128 животных в возрасте 8–12 недель	Сыворотка крови крыс (эректильная дисфункция)	Тестостерон-ИФА-Бест (№ 1X3972, АО «Вектор-Бест», Россия)
Тестостерон, эстрадиол	1.23/24	Крысы линии Wistar, 48 самцов и 48 самок в возрасте 10–12 недель	Сыворотка крови крыс (влияние препарата на фертильность)	Тестостерон-ИФА-Бест (№ 1X3972, АО «Вектор-Бест», Россия) Estradiol Elisa (№ 1EIA-2693, DRG Instruments GmbH, Германия)
Тропонин I	136С; 1.1/15	Аутбредные крысы, самцы, 108 животных в возрасте 14–18 недель	Сыворотка и плазма крови крыс (гепарин, ЭДТА-Na <sub>2</sub> , цитрат натрия; инфаркт миокарда)	Тропонин I-ИФА-Бест (№ 1A9106, АО «Вектор-Бест», Россия)
Миоглобин	142С; 1.1/15		Сыворотка и плазма крови крыс (гепарин натрия; инфаркт миокарда)	Миоглобин-ИФА-Бест (№ 1A9108, АО «Вектор-Бест», Россия)

*Примечание:* выполнение исследований одобрено на заседаниях Биоэтической комиссии (БЭК) организации с присвоением соответствующего шифра.

*Note:* the execution of the studies was approved at the meetings of the organization's Bioethics Committee (BEC), and a corresponding approval code was assigned.

### Результаты и обсуждение

В статье рассмотрены несколько примеров из нашей практики, иллюстрирующих применение ИФА в ходе ДКИ, возникающие при этом проблемы и возможные пути решения.

#### *Определение гормонов — маркеров стресса*

Одним из актуальных направлений ДКИ является создание экспериментальной модели, позволяющей оценивать фармакологическое действие потенциальных лекарственных препаратов (ЛП) в отношении

синдрома профессионального выгорания (СПВ) и хронического стресса, приводящего к депрессии.

В качестве возможных диагностических маркеров СПВ исследуют показатели гипоталамо-гипофиз-надпочечниковой системы, антиоксидантной системы, иммунной системы, показатели метаболических нарушений. В частности, в экспериментах на крысах было показано, что хронический непредсказуемый умеренный стресс (Chronic unpredictable mild stress, CUMS) приводит к повышению уровня кортикостерона [1–3], а у пациентов с клиническим диагнозом СПВ

уровень кортизола снижен по сравнению с уровнем этого гормона у здоровых добровольцев [4]. Поэтому в рамках соответствующих исследований актуальна оценка данных показателей у лабораторных животных. Отбор биоматериала для анализа этих гормонов важно проводить в утренние часы — в связи с наличием циркадных ритмов их секреции [5–7], в то же время необходимо учитывать, что для грызунов и человека время биологической ночи не совпадает.

Коммерчески доступны наборы реагентов для ИФА-определения кортикостерона, предназначенные для анализа биоматериала человека, крыс и мышей (Corticosterone (Human, Rat, Mouse), IBL Intern, Германия), или без указания видоспецифичности (Corticosterone ELISA, DRG Instruments GmbH, Германия), что позволило предполагать их применимость для разных биологических видов. В инструкциях к наборам производители приводят вид биоматериала (сыворотка, гепаринизированная или цитратная плазма), область линейности набора (5–240 нмоль/л), примерные нормы для здоровых мужчин и женщин (в нмоль/л и нг/мл), а также указание на необходимость разбавить пробы в случае, если определяемые значения оказываются выше верхнего предела количественного определения (ВПКО). Экспериментальная проверка работоспособности наборов, согласно критериям инструкции

производителя (типичная калибровочная зависимость, получаемая на основе анализа стандартов, и результаты анализа контрольных образцов с известным количеством аналита, входящих в состав набора реагентов), позволила подтвердить возможность их дальнейшего использования в условиях конкретной лаборатории. Подбор оптимального разведения оказался основной задачей адаптации при использовании указанных наборов, поскольку уровни кортикостерона, определяемые в биоматериале (гепаринизированной плазме, сыворотке крови) крыс (от 700 до 2000 нмоль/л) (табл. 2), оказались значительно выше, чем у человека (12–14 нмоль/л). Перед началом анализа пробы разводили 0,01М фосфатно-солевым буферным раствором (рН=7,4±0,2) в 80–150 раз — в рамках исследования БЭК 1.60/20 и в 100 раз — в рамках исследования БЭК 1.7/20. В случае определения кортизола набор реагентов российского производства (Кортизол-ИФА-Бест, АО «Вектор-Бест», Россия, аналитическая область 12,5–1200 нмоль/л), рекомендованный для анализа сыворотки крови человека, оказался применим для анализа сыворотки крови животных без дополнительной адаптации и подбора разведений.

Результаты, полученные в рамках эксперимента БЭК 1.60/20 (табл. 2), позволили подтвердить применимость выбранного набора реагентов для анализа

**Таблица 2.** Концентрация гормонов — маркеров стресса в биоматериале интактных и стрессированных крыс, нмоль/л

**Table 2.** Concentration of stress marker hormones in the biomaterial of intact and stressed rats, nmol/L

Группы	Концентрация гормона стресса, нмоль/л	
	1-й день	21-й день
Кортикостерон (гепаринизированная плазма, БЭК 1.60/20, Me(Q1;Q3), n=10) <sup>1</sup>		
Интактные (без стресса)	785 (464;1406)	841 (513;1356)
Стрессированные	728 (500;1043)	908 (528;1051)
Кортикостерон (сыворотка, БЭК 1.7/22, M±SEM, n=12)		
Интактные (без стресса)	593±70,6	542±79,3
Стрессированные	784±47,4	1566±242 <sup>1, 2</sup>
Кортизол (сыворотка, БЭК 1.7/22, M±SEM, n=12)		
Интактные (без стресса)	29,6±3,3	25,6±1,3
Стрессированные	32,2±2,8	53,1±8,7 <sup>1, 2</sup>

*Примечания:* <sup>1</sup> статистически значимые отличия от интактной группы (критерий Тьюки, p<0,05);

<sup>2</sup> статистически значимые отличия от исходных значений (1-й день) (критерий Тьюки, p<0,05).

*Notes:* <sup>1</sup> statistically significant differences from the intact group (Tukey’s test, p<0.05);

<sup>2</sup> statistically significant differences from baseline values (day 1) (Tukey’s test, p<0.05).

биоматериала крыс и оценить уровень кортикостерона у этого вида животных. В эксперименте получены данные, отличающиеся значительным разбросом, что, вероятно, связано с индивидуальной вариабельностью животных, а также не выявлено значимых отличий для животных, подвергшихся стрессорным воздействиям (CUMS формировали трехкратным в течение 21 дня воздействием семи стрессорных факторов: переполнение клетки содержания (весь эксперимент), депривация сна, мокрый подстил, водная и пищевая депривация в течение 24 ч., наклон стандартной клетки содержания на 45° в течение 22 ч., фиксация животного в рестрейнере на 2 ч.) по сравнению с интактной группой. В рамках другого эксперимента (БЭК 1,7/22) (табл. 2) на модели CUMS у крыс (аналогичные стрессорные воздействия после предварительного приучения животных к манипуляциям по нахождению в рестейнере, отбору крови и др.) фиксировали изменения уровня кортикостерона и кортизола (повышение примерно в 1,7–2 раза), сопровождавшие и подтверждавшие развитие стресса к 21-му дню эксперимента (период стрессовых воздействий на животных) и обратимый характер этих изменений — после отмены стрессорных воздействий к 29-му дню эксперимента уровень маркерных гормонов возвращался к исходному и не отличался у животных, подвергнутых (стрессированных) и не подвергнутых стрессу (интактных). На основании полученных данных можно также утверждать, что апробированные наборы применимы для количественного определения кортикостерона как в гепаринизированной плазме, так и сыворотке крови крыс, кортизола — в сыворотке крови крыс, то есть в тех же видах биоматериала, которые рекомендованы для анализа проб человека (пациентов). Определение гормонов — маркеров стресса является примером сравнительно простой адаптации и успешного применения наборов реагентов, рекомендованных для человека, при ИФА-анализе биоматериала иных биологических видов.

#### *Определение стероидных гормонов*

Уровень стероидных (половых) гормонов является важным маркером при изучении влияния разрабатываемых препаратов на репродуктивную систему животных, как в аспекте оценки их фармакологического действия (например, в модели эректильной дисфункции на фоне сахарного диабета, индуцированного стрептозоцином [8–12]), так и в аспекте оценки их безопасности (например, при изучении фертильности и влияния на эмбриональное развитие). Среди значимых для количественной оценки соединений этой группы можно выделить половые гормоны тестостерон и эстрадиол.

Для оценки уровня тестостерона доступен набор реагентов российского производства (Тестостерон-ИФА-Бест, АО «Вектор-Бест», Россия), рекомендованный для анализа сыворотки человека. Согласно данным производителя набора реагентов, уровень тестостерона у здоровых мужчин составляет 4,5–34,5 нмоль/л, у здоровых женщин — до 3,5 нмоль/л; биоматериал необходимо собирать утром (предпочтительнее в интервале 9–11 ч.). После подтверждения работоспособности набора реагентов в условиях лаборатории в ходе пилотных экспериментов с биоматериалом крыс выявлено, что многие измеряемые значения находились вне аналитической области методики (0,5–60 нмоль/л) или вблизи нижнего предела количественного определения (НПКО). Поэтому были рассмотрены возможности его снижения по сравнению с рекомендованным производителем. Для решения этой проблемы введен дополнительный концентрационный уровень при построении калибровочной зависимости (0,25 нмоль/л, что в 2 раза ниже минимального уровня, рекомендованного производителем, — 0,5 нмоль/л), и увеличен объем биоматериала, вносимого в лунку при выполнении анализа (40 мкл вместо рекомендованных 20 мкл). Суммарно эти изменения позволили расширить аналитическую область методики, снизить НПКО до 0,13 нмоль/л и адаптировать ее для решения конкретной задачи.

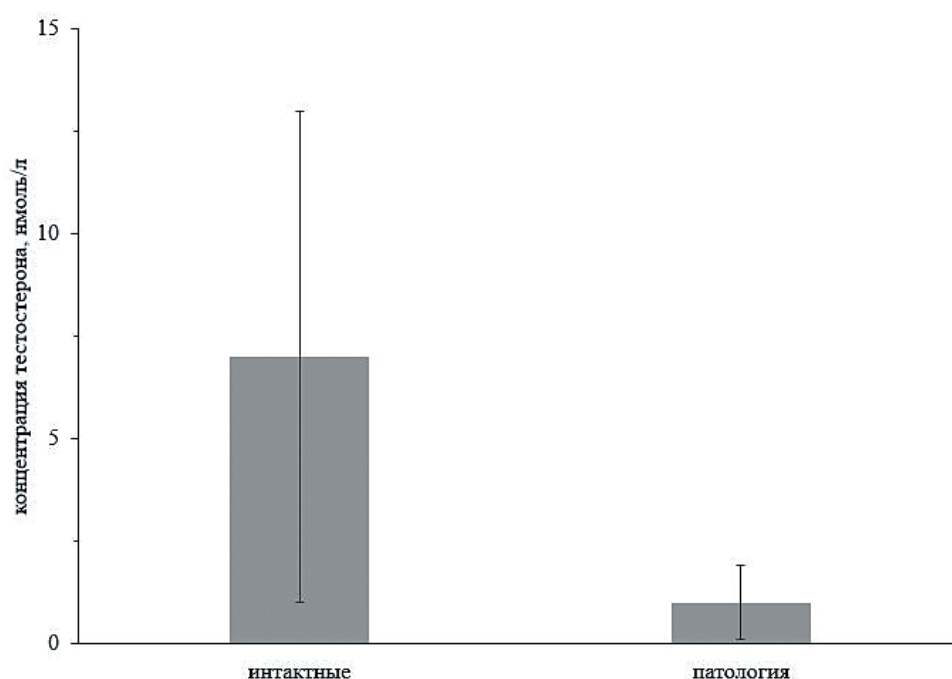
В связи с внесенными изменениями была выполнена частичная валидация методики, включавшая проверку корректности результатов для низких уровней концентраций (0,5; 1,0 и 3,0 нмоль/мл) при увеличении объема биоматериала в два раза и выполнении анализа в условиях, предусмотренных производителем (табл. 3). Увеличение объема биоматериала в два раза по сравнению с указанным в инструкции производителя не искажало получаемых результатов (при условии содержания тестостерона в исходных образцах менее 3,0 нмоль/л), что подтвердило возможность применения рассматриваемого приема адаптации набора реагентов.

Оценка уровня тестостерона использована, как один из критериев для подтверждения формирования патологии эректильной дисфункции на фоне стрептозоцин-индуцированного диабета (БЭК 1.39/22) (рис. 1).

В другом исследовании (БЭК 1.23/24) у интактных животных оценивали уровень тестостерона у самцов и эстрадиола — у самок крыс. Для определения эстрадиола выбран набор реагентов Estradiol Elisa (DRG Instruments GmbH, Германия, рекомендован для анализа сыворотки, плазмы крови с гепарином, ЭДТА или цитратом), при его апробации установлено, что, как и в случае с тестостероном, определяемые значения у некоторых крыс находились ниже НПКО, предусмотренного производителем.

Рассмотренные ранее приемы (введение дополнительного калибровочного уровня и увеличение объема биоматериала) оказались неприемлемы для данного набора реагентов. В этом случае был применен иной подход, основанный на внесении одинаковой добавки аналита во все анализируемые пробы и часто используемый в инструментальном анализе (метод стандартной добавки [13–15]). Это позволило повысить суммарный определяемый уровень и привести его к соответствию с аналитическим диапазоном методики (12,5–2000 пг/мл). Анализировали «холостые» пробы, содержащие только добавку аналита известной концентрации (точность определения внесенного количества составила от 89,8 до 110,2 %, находилась в пределах 80–120 % и соответствовала регуляторным

критериям приемлемости), и экспериментальные пробы сыворотки крыс после внесения в них такой же добавки, затем по разности рассчитывали исходное содержание аналита в каждой пробе. Такой прием позволил успешно применить набор реагентов для определения эстрадиола в сыворотке крови крыс. Уровень стероидных гормонов интактных животных в этом исследовании составил для тестостерона  $6,01 \pm 5,06$  нмоль/л (самцы,  $n=51$ , согласуется с данными исследования БЭК 1.39/22), эстрадиола —  $16,46 \pm 11,82$  пг/мл (самки,  $n=16$ ). Отметим, что для уровня тестостерона у лабораторных животных также характерны циркадные ритмы [16, 17], которые необходимо принимать во внимание, планируя манипуляции по отбору биоматериала в ДКИ, предусматривающих определение этого показателя.



**Рис. 1.** Уровень тестостерона у крыс как показатель формирования диабетической эректильной дисфункции (интактные  $n=12$ , патология  $n=52$ )

*Примечания:* эректильную дисфункцию на фоне сахарного диабета, вызванного однократным внутривенным введением стрептозоцина в дозе 65 мг/кг, моделировали у 145 самцов крыс линии Wistar. Гибель животных после введения индуктора в период формирования экспериментальной патологии составила 44,8 % (65 крыс). Из выживших животных (80 самцов) во второй этап исследования были включены 52 самца (65 %), у которых была подтверждена патология согласно заявленным в исследовании критериям.

**Figure 1.** Testosterone levels in rats as an indicator of the development of diabetic erectile dysfunction (intact  $n=12$ , pathology  $n=52$ )

*Notes:* erectile dysfunction against the background of diabetes mellitus, induced by a single intraperitoneal administration of streptozotocin at a dose of 65 mg/kg, was modeled in 145 male Wistar rats. Animal mortality following administration of the inducer during the formation of the experimental pathology was 44.8 % (65 rats). From the surviving animals (80 males), 52 males (65 %) were included in the second stage of the study, in whom the pathology was confirmed according to the criteria specified in the research.

**Таблица 3.** Оценка влияния изменения объема пробы на точность методики определения концентрации тестостерона, нмоль/л**Table 3.** Assessment of the effect of sample volume change on the accuracy of the testosterone concentration determination method, nmol/L

Уровень концентрации тестостерона, нмоль/мл	Концентрация тестостерона, полученная согласно методике производителя (M±SD, нмоль/л)	Точность, %	Концентрация тестостерона, полученная при увеличении объема биоматериала (M±SD, нмоль/л)	Точность, % <sup>1</sup>
0,5	0,50±0,08	100,4	1,06±0,09	95,1
1,0	1,17±0,35	116,7	2,03±0,17	98,9
3,0	3,00±0,01	100,0	6,79±0,60	88,7

*Примечание:* <sup>1</sup> для расчета точности использовано значение номинальной концентрации с учетом увеличения объема биоматериала.

*Note:* <sup>1</sup> the nominal concentration value, adjusted for the increase in biomaterial volume, was used to calculate the accuracy.

#### *Определение кардиомаккеров тропонина I и миоглобина*

Кардиомаккеры представляют собой специфические белки, которые высвобождаются в кровь из разрушенных клеток сердца. Среди них наиболее важными являются сердечные тропонин I и тропонин T, миоглобин и белок, связывающий жирные кислоты [18, 19].

Миоглобин — железо- и кислородсвязывающий белок скелетных мышц и миокарда. Миоглобин скелетных мышц и миоглобин миокарда незначительно различаются по аминокислотной последовательности. В практической медицине этот факт используют для диагностики инфаркта миокарда по появлению специфического «сердечного» изоформа миоглобина в крови. В нормальных условиях, в отсутствие повреждения или воспаления мышечной ткани, миоглобин в кровь не попадает [19–21].

Комплекс тропонинов (I, T, C) входит в состав сократительной системы миоцитов и участвует в кальций-зависимой регуляции сокращения мышечных волокон. Тропоины содержатся в клетках в структурно-организованной форме, и лишь небольшая их часть может находиться в цитоплазме в свободном виде. Известны три изоформы тропонина I, одна из которых присутствует только в кардиомиоцитах, а две — в поперечно-полосатой мускулатуре. Кардиальная изоформа тропонина I имеет молекулярную массу около 22,5 кДа и существенно отличается по своей структуре от изоформ, локализирующихся в скелетной мускулатуре. Тропонин I является высокоспецифическим внутриклеточным миокардиальным

протеином. Выраженная, но кратковременная ишемия без повреждения кардиомиоцитов не приводит к повышению уровня тропонина, и только развитие некроза сопровождается поступлением тропонина I в периферический кровоток [23, 24].

Наборы реагентов для ИФА-анализа «Миоглобин-ИФА-Бест» и «Тропонин-I-ИФА-Бест» созданы для определения содержания миоглобина и тропонина I в биологических жидкостях человека. Специфические ИФА-наборы российского производства для животных на указанные маркеры отсутствуют, а зарубежные аналоги являются более дорогими, их применение осложнено проблемами логистики и длительности поставки. Поэтому актуальна проверка пригодности человеческих наборов российского производства. Данных, подтверждающих возможность использовать подобные наборы для диагностики уровня миоглобина и тропонина I в крови животных, в доступной литературе не обнаружено. В связи с этим необходимо проверить их применимость для анализа биоматериала лабораторных животных — крыс, при необходимости адаптировать и валидировать.

Согласно спецификации к этим наборам, они предназначены для анализа сыворотки, вместе с тем аналогичные наборы реагентов (например, Human Myoglobin ELISA Kit, GenWay, США; Myoglobin Rat ELISA Kit, Human Cardiac Troponin I ELISA Kit, Abcam, США) допускают возможность использования как сыворотки, так и плазмы крови. Это позволяет предположить возможность использования плазмы крови (с различными антикоагулянтами) для определения концентрации миоглобина и тропонина I

с помощью выбранных наборов реагентов российского производства.

Экспериментальная проверка работоспособности выбранных наборов, согласно требованиям инструкций производителя, подтвердила адекватность их использования в условиях лаборатории (табл. 4) и позволила перейти к дальнейшей апробации для работы с биоматериалом крыс.

Для выбора типа биологического материала определяли нативное содержание миоглобина и тропонина I в сыворотке крови крыс, а также анализировали плазму крови крыс, полученную с применением различных антикоагулянтов (гепарин, ЭДТА и цитрат натрия). Критериями выбора являлись близость показателей к значениям концентрации миоглобина и тропонина I в сыворотке крови и низкое значение относительного

стандартного отклонения, полученное при усреднении результатов. Концентрация миоглобина, обнаруженная в плазме крови с использованием гепарина в качестве антикоагулянта (512±9 нг/мл), наиболее близка к значениям, обнаруженным в сыворотке крови крыс (521±22 нг/мл), в то время как применение в качестве антикоагулянтов ЭДТА и цитрата натрия приводило к занижению определяемой концентрации миоглобина более чем в 2 раза (256±1 и 126±0 нг/мл соответственно). Эти результаты позволили обосновать выбор типа биоматериала (плазмы крови с добавлением в качестве антикоагулянта гепарина) для дальнейшей работы по анализу миоглобина.

С помощью апробированного набора реагентов не удалось обнаружить фоновое содержание тропонина I как в сыворотке, так и в гепаринизированной плазме

**Таблица 4.** Соответствие экспериментальных данных техническим характеристикам наборов для определения миоглобина и тропонина I

**Table 4.** Conformity of experimental data with the technical characteristics of the kits for the determination of myoglobin and troponin I

Наименование показателя	Характеристика и нормы	Результаты эксперимента
<b>Миоглобин</b>		
Соотношение оптических плотностей калибровочных образцов	$D_{ст 0} < D_{ст 50} < D_{ст 100} < D_{ст 250} < D_{ст 500} < D_{ст 1000}$	0,054 < 0,33 < 0,722 < 1,595 < 2,03 < 2,3
D калибровочного образца 0 нг/мл	Не более 0,1	0,054
D калибровочного образца 1000 нг/мл	Не менее 1,0	2,3
Концентрация миоглобина в контрольном образце, нг/мл	102–156	128±2
RSD, %	Не более 8	1,9
<b>Тропонин I</b>		
Соотношение оптических плотностей калибровочных образцов	$D_{ст 0} < D_{ст 0,1} < D_{ст 0,3} < D_{ст 1,0} < D_{ст 3,0} < D_{ст 6,0}$	0,020 < 0,029 < 0,78 < 0,203 < 0,604 < 1,364
D калибровочного образца 0 нг/мл	Не более 0,1	0,020
D калибровочного образца 6,0 нг/мл	Не менее 1,0	1,364
Концентрация тропонина в контрольном образце (контрольной сыворотке), нг/мл	0,27–0,46	0,39±0,01
RSD, %	Не более 8	2,4–2,6

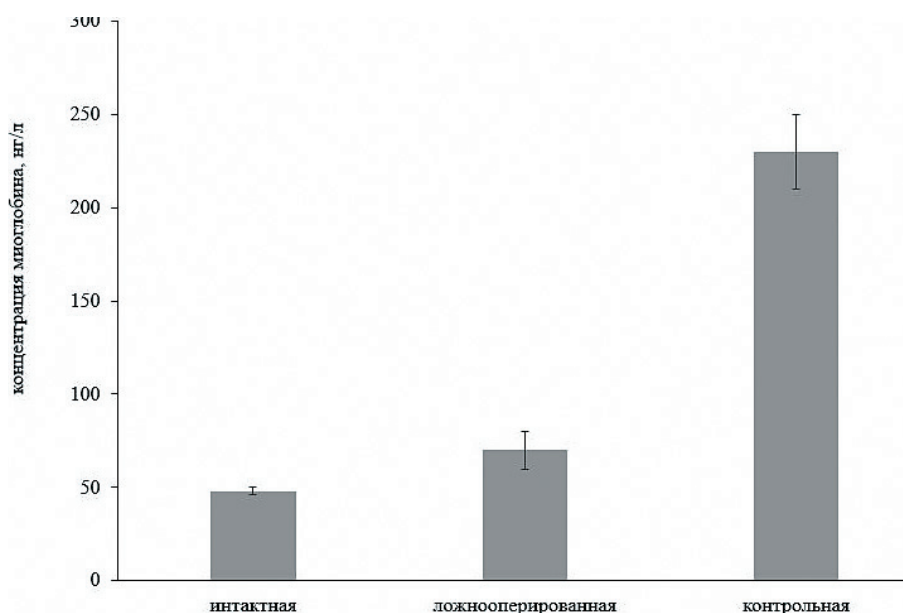
*Примечание:*  $D_{ст x}$  — оптическая плотность (опт. ед.) калибровочных образцов с указанием их концентрации (0, 50, 100, 250, 500, 1000 нг/мл для миоглобина и 0, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 6,0 нг/мл для тропонина I).

*Note:*  $D_{std x}$  — optical density (arb. units) of calibration samples indicating their concentration (0, 50, 100, 250, 500, 1000 ng/mL for myoglobin and 0, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 6.0 ng/mL for troponin I).

крови интактных крыс: аналитический сигнал во всех проанализированных образцах был меньше предела обнаружения методики. В литературе [25] содержится информация о 93%-ном сходстве в структуре сердечного тропонина I между людьми и крысами, однако пространственные структуры этого белка у человека и животных имеют отличия. По литературным данным [26], тропонин I в крови интактных крыс-самцов практически отсутствует или обнаруживается в следовых количествах (меньше 0,03 нг/мл). Через 30 мин. после формирования инфаркта миокарда начинает увеличиваться содержание тропонина I и достигает максимальной концентрации в среднем 20,5 нг/мл через 3 ч. Поэтому было принято решение проанализировать плазму крови нескольких крыс до и после формирования инфаркта миокарда (полученную в ходе исследования № 1БЭК 1.1/15), чтобы окончательно

решить вопрос о пригодности или непригодности апробируемого набора для определения концентрации данного аналита в крови животных. В образцах плазмы крови крыс, полученных через 5 и 24 ч. после формирования инфаркта миокарда, тропонин I также не был обнаружен. Таким образом, набор реагентов «Тропонин-I-ИФА-Бест», разработанный для человека, не подходит для анализа биоматериала крыс, поскольку антитела, иммобилизованные в лунках планшета, не имеют перекрестной специфичности с аналогичным белком крыс.

Методика определения миоглобина в гепаринизированной плазме крыс была валидирована в диапазоне 50–500 нг/мл согласно действующим регуляторным документам<sup>3, 4, 5</sup> по показателям: специфичность, линейность, НПКО, правильность и прецизионность, с получением удовлетворительных результатов



**Рис. 2.** Содержание миоглобина в крови крыс через 5 ч. после индукции патологии (интактная группа — без патологии; ложнооперированная группа — оперативный доступ без моделирования патологии; контрольная группа — с патологией, введение плацебо (инертный носитель), без лечения)

**Figure 2.** Myoglobin content in the blood of rats 5 hours after pathology induction (intact group — without pathology; sham-operated group — surgical access without pathology modeling; control group — with pathology, placebo administration (inert carrier), no treatment)

<sup>3</sup> Guidance for Industry: Bioanalytical method for validation. Rockville, MD, U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for veterinary medicine, 2018. 41 p.

<sup>4</sup> Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP192217/2009, London, Committee for medicinal products for human use (CHMP), 2011. 22 p.

<sup>5</sup> Решение Совета ЕЭК № 185 от 03.11.2016 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» (Приложение № 16 «Требования к валидации биоаналитических методик испытаний и анализу исследуемых биологических образцов»).

по всем проверенным критериям. Отдельно необходимо отметить результаты оценки стабильности аналита при хранении — концентрация миоглобина в плазме крови крыс с гепарином стабильна в течение 2 суток при хранении при  $-20\pm 2^\circ\text{C}$ , не стабильна при более длительном хранении даже при более низкой температуре (в жидком азоте). Сыворотку крови человека, согласно рекомендациям производителя, допустимо хранить при температуре  $-20\pm 5^\circ\text{C}$  не более 60 дней. Предположительно, существенное сокращение сроков хранения образцов плазмы крови связано с влиянием гепарина натрия.

Апробация определения концентрации миоглобина была выполнена на модели острого экспериментального инфаркта миокарда у крыс (рис. 2). Статистический анализ данных с применением однофакторного анализа (ANOVA) выявил межгрупповые статистически значимые различия показателя миоглобина через 5 ч. после индукции патологии (критерий Тьюки,  $p < 0,05$ ); уровень миоглобина в контрольной группе животных статистически значимо превышал таковой у интактной и ложнооперированной групп в среднем в 4,5 раза.

Увеличение данного показателя в группах с формированием патологии соответствовало динамике других кардиомаркеров (увеличение активности АСТ, ЛДГ, креатинфосфокиназы). Полученные результаты подтверждают пригодность набора реагентов «Миоглобин-ИФА-Бест» для анализа биоматериала крыс.

В заключительной таблице (табл. 5) представлены сводные данные о применимости ряда ИФА-наборов, специфичных для человека, для анализа биоматериала лабораторных животных в целях определения гормонов, кардиомаркеров и других показателей, полученные нами за последние 15 лет. Необходимо отметить, что наиболее частой проблемой при применении указанных в таблице наборов для анализа биоматериала животных является выход концентрации анализируемых показателей за пределы аналитического диапазона методики. В этом случае в процессе адаптации набора для биоматериала животных необходимо подобрать оптимальный коэффициент разведения пробы при концентрации анализируемого вещества выше ВПКО или, в случае более низких концентраций — рассмотреть возможности снижения НПКО.

**Таблица 5.** Сводные данные о применимости ИФА-наборов, специфичных для человека, для анализа биоматериала лабораторных животных

**Table 5.** Summary data on the applicability of human-specific ELISA kits for the analysis of laboratory animal biomaterial

Показатель	Набор	Аналитический диапазон	Виды животных для апробации (тип биоматериала)	Применимость для анализа биоматериала животных
Гормоны — маркеры стресса				
Кортикостерон	1. Corticosterone (Human, Rat, Mouse) (№ IRE52211, IBL Intern, Германия); 2. Corticosterone ELISA (№ 1EIA-4164, DRG Instruments GmbH, Германия)	5–240 нмоль/л	крысы, мыши, кролики, обезьяны (сыворотка крови)	Применим для всех исследованных видов животных
Кортизол	Кортизол-ИФА-Бест (№ 1X3964, АО «Вектор-Бест», Россия)	12,5–1200 нмоль/л	крысы, кролики, обезьяны (сыворотка крови; моча)	Применим для всех исследованных видов животных
Стероидные гормоны				
Тестостерон	Тестостерон-ИФА-Бест (№ 1X3972, АО «Вектор-Бест», Россия)	1–60 нмоль/л	крысы, мыши, кролики, карликовые свиньи, морские свинки, хорьки (сыворотка крови)	Применим для всех исследованных видов животных
Прогестерон	Прогестерон-ИФА-БЕСТ (№ 1X-3978, АО «Вектор-Бест», Россия)	1–100 нмоль/л		
Эстрадиол	Estradiol Elisa (№ 1EIA-2693, DRG Instruments GmbH, Германия)	0,09–7,34 нмоль/л (25–2000 пг/мл)		
5 $\alpha$ -дигидро-тестостерон	DHT-optimized ELISA (№ 1EIA-5761, DRG Instruments GmbH, Германия)	25–1500 пг/мл	крысы, морские свинки, хорьки (сыворотка крови)	

Показатель	Набор	Аналитический диапазон	Виды животных для апробации (тип биоматериала)	Применимость для анализа биоматериала животных
Стероидные гормоны				
Дигидроэпиандростерон	Dehydroepiandrosterone (DHEA) ELISA kit (№ 1CAN-DH-490, Diagnostics Biochem Canada Inc., Канада)	0,2–40 нг/мл	крысы (сыворотка крови)	Применим для исследованного вида животных
Кардиомаркеры				
Тропонин I	Тропонин I-ИФА-БЕСТ (№ 1A-9106, АО «Вектор-Бест», Россия)	0,1–6,0 нг/мл	крысы (сыворотка/ плазма крови)	Нет перекрестной специфичности, не применим для исследованного вида животных
Миоглобин	Миоглобин-ИФА-БЕСТ (№ 1A-9108, АО «Вектор-Бест», Россия)	50–500 нг/мл	крысы (сыворотка/ плазма крови)	Применим для исследованного вида животных
Гормоны щитовидной железы				
Тиреотропный гормон (ТТГ)	ТТГ-Люмо-Бест (№ 1X-3912, АО «Вектор-Бест», Россия)	0,05–100 мМЕ/л	карликовые свиньи (сыворотка крови)	Не рекомендован к применению для этого вида животных: у большинства животных уровень ТТГ ниже предела обнаружения
Трийодтиронин (Т3)	Т3 общий-ИФА-БЕСТ (№ 1X-3954, АО «Вектор-Бест», Россия)	0,5–9 нмоль/л	крысы, карликовые свиньи (сыворотка крови)	Применим для исследованных видов животных
Тироксин (Т4)	Т4 общий-ИФА-БЕСТ (№ 1X3956, АО «Вектор-Бест», Россия)	10–400 нмоль/л	крысы, карликовые свиньи (сыворотка крови)	Применим для исследованных видов животных
Различные показатели				
Эритропоэтин	Эритропоэтин-ИФА-БЕСТ (№ 1A-8776, АО «Вектор-Бест», Россия)	16–1600 пг/мл	крысы, мыши, кролики, карликовые свиньи, морские свинки, хорьки, обезьяны (яванские макаки, игрунки) (сыворотка/ плазма крови)	Применим для анализа крови хорьков. Есть частичная перекрестная специфичность для биоматериала яванских макак
Простагландины E2, F2a, PGI2	1. Prostaglandin E2 Elisa Kit-Monoclonal (№ 1514010, Cayman Chemical, США); 2. Elisa Kit for Prostaglandin E2 (PGE2) (№ 1CEA538Ge, Cloud-Clone Corp., Китай)	7,8–1000 пг/мл 0,91–666,67 пг/мл	крысы, кролики (гомогенаты желудков); мыши (плазма крови)	Применимы для исследованных видов животных
	Prostaglandin F2α Elisa Kit-Monoclonal (№ 1516011, Cayman Chemical, США)	3,9–500 пг/мл	крысы (гомогенаты желудков)	
	ELISA Kit for Prostacyclin (PGI2) (№ 1CEA727Ge, Cloud Clone Corp., Китай)	24,69–2000 пг/мл	крысы, (гомогенаты желудков)	
Общие желчные кислоты	Total Bile Acids (TBA) Assay kit (colorimetric) (№ 1MAK382, Sigma-Aldrich, США)	12–120 пмоль/лунке (0,24 мМ–2,4 мМ)	крысы, мыши, кролики, карликовые свиньи, морские свинки, хорьки (сыворотка крови / желчь)	Применим для всех исследованных видов животных
Хондроитина сульфат	ELISA Kit for Chondroitin Sulfate (№ 1CEA723Ge, Cloud Clone Corp., Китай)	0,02–10 нг/мл	крысы, кролики (сыворотка крови, гомогенаты хрящевой ткани)	Применим для исследованных видов животных

*Алгоритм апробации и адаптации*

Обобщая накопленный нами опыт, можно сформулировать следующий алгоритм и схему принятия решений по апробации и адаптации ИФА-наборов реагентов, специфичных для человека, при анализе биоматериала лабораторных животных (рис. 3).

Проверка работоспособности набора в условиях конкретной лаборатории. Критерии работоспособности обычно приведены в инструкции производителя и предполагают:

- построение калибровочной зависимости, вид которой должен соответствовать типовой зависимости, представленной в инструкции;
- оценку соответствующего ей коэффициента корреляции ( $r$ ), значение которого обычно должно быть не менее 0,98;
- соответствие оптических плотностей бланк-пробы (не содержащей аналита) и калибровочного стандарта уровня ВПКО установленным значениям;
- соответствие результата анализа контрольных образцов одного или двух уровней (норма и патология) установленному диапазону концентраций.

2. Оценка применимости набора к анализу биоматериала животных. Анализ с помощью данного набора реагентов биоматериала интактных животных. Целесообразно предусмотреть выборку не менее 10 особей одного или каждого пола (в зависимости от задачи исследования или при наличии предпосылок половых различий), а также несколько видов биоматериала (сыворотка, плазма крови с различными антикоагулянтами). Рекомендуется при принятии решения о применимости ИФА-набора для анализа биоматериала животных учитывать сопоставимость с литературными данными по уровню анализируемого показателя (при наличии такой возможности). Выбор вида биоматериала и возможность его изменения важны для практического применения, поскольку позволяют унифицировать отбор биоматериала для определения большого числа различных показателей, обычно предусмотренных в комплексном исследовании, и привести его в соответствие с объемами, которые можно отобрать у одного животного (необходимо принимать во внимание размеры и объем циркулирующей



Рис. 3. Алгоритм и схема принятия решений по апробации и адаптации ИФА-наборов реагентов, специфичных для человека, при анализе биоматериала лабораторных животных

Figure 3. Algorithm and decision-making scheme for the testing and adaptation of ELISA kits of reagents specific to humans in the analysis of biomaterial of laboratory animals

крови (ОЦК) планируемого вида лабораторных животных [27, 28], которые обычно значительно меньше, чем у человека).

3. Адаптация набора к анализу биоматериала животных. Данная стадия может не потребоваться или оказаться необходимой в связи с разными уровнями определяемых показателей у человека и животных. В случае более высоких определяемых уровней необходимо подобрать оптимальное разведение, в случае более низких — рассмотреть возможности снижения НПКО. Важно также принимать во внимание вариабельность параметра и ожидаемые его изменения в ДКИ (например, при моделировании патологии).

4. Валидация (частичная валидация, ревалидация) методики. Очевидно, что рассматриваемые методики относятся к биоаналитическим, а смена матрицы (биологического вида) обуславливает необходимость валидации<sup>6</sup>. Процедура является достаточно ресурсозатратной и трудоемкой, поэтому целесообразность полной валидации (как это необходимо для методик, используемых при оценке биоэквивалентности) для методик, применяемых в ДКИ, дискуссионна. Необходимо исходить из принципа разумности и достаточности: в англоязычной литературе в отношении аналитических методик определения биомаркеров в биологических матрицах можно встретить термины *context of use* — контекст использования и *fit-for-purpose* — соответствие назначению [29], подразумевающие необходимость провести тот объем валидационных испытаний, подтверждающий адекватность методики, который соответствует ее дальнейшему применению. Подробное рассмотрение этих вопросов (см. [30]) выходит за рамки данной работы, но минимальный набор испытаний (ревалидации), с нашей точки зрения, должен включать проверку аналитической области, минимально необходимого разведения и линейности разведения пробы, правильности, прецизионности (как минимум в рамках одного аналитического цикла), а также оценку стабильности аналита/показателя (объем и условия испытаний целесообразно выбирать в зависимости от особенностей аналита, дизайна предполагаемого биологического эксперимента и других факторов).

### Заключение

Рассмотрены потенциальные возможности применения и варианты адаптации ИФА-наборов реагентов, специфичных для человека, при анализе биоматериала лабораторных животных (на примере крыс). Показаны примеры использования таких наборов без каких-либо

изменений (на примере кортизола), после оптимизации разведения в случае более высоких определяемых уровней аналита (кортикостерон) или снижения НПКО за счет увеличения объема пробы и введения дополнительного калибровочного уровня (тестостерон), или при применении метода добавки (эстрадиол) в случае более низких уровней, чем рекомендовано производителем набора реагентов. На примере кардиомакера миоглобина рассмотрен алгоритм выбора типа биоматериала, позволяющий расширить исходную область применения набора реагентов и унифицировать отбор биоматериала в экспериментальном исследовании, а тропонин I оказался примером непригодности набора для анализа биоматериала крыс.

На основании экспериментального опыта, включающего показатели, относящиеся к маркерам стресса, стероидным гормонам, кардиомакерам, гормонам щитовидной железы и др. применительно к различным видам лабораторных животных (крысы, мыши, кролики, обезьяны, карликовые свиньи, морские свинки, хорьки), сформулированы алгоритм и схема принятия решений по апробации и адаптации ИФА-наборов реагентов, специфичных для человека, при анализе биоматериала лабораторных животных. Применение предложенного алгоритма может способствовать расширению спектра аналитов в ДКИ, повышению качества, прогностической и трансляционной способности исследований на животных при создании лекарственных препаратов для медицинского применения у человека.

### Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

### Соответствие нормам этики / Compliance with ethical principles

Исследование одобрено локальным этическим комитетом. / The study was approved by the Local Ethics Committee.

Авторы заявляют об отсутствии использования генеративного искусственного интеллекта. / The authors declare no use of Generative AI in the preparation of this manuscript.

### Благодарности / Acknowledgement

Авторы благодарят сотрудников отдела технологии, кинетики и анализа лекарственных средств АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» Барыбину Т. Н.

<sup>6</sup> Решение Совета ЕЭК № 185 от 03.11.2016 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» (Приложение № 16 «Требования к валидации биоаналитических методик испытаний и анализу исследуемых биологических образцов»).

и Романенко А. Ю. за помощь при анализе биоматериала крыс на содержание кортикостерона и эстрадиола. / The authors thank researchers of the Department of Technology, Kinetics and Analysis of Medicines Barybina T. N. and Romanenko A. Yu. for their help in analysing rat biomaterial for the concentration of corticosterone and estradiol.

### Список литературы / References

1. Cox BM, Alsawah F, McNeill PC, et al. Neurochemical, hormonal, and behavioral effects of chronic unpredictable stress in the rat. *Behavioural Brain Research*. 2011;220(1):106–111. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.01.038>
2. Pereira VH, Marques F, Lages V, et al. Glucose intolerance after chronic stress is related with downregulated PPAR- $\gamma$  in adipose tissue. *Cardiovascular Diabetology*. 2016;15(1):114. <https://doi.org/10.1186/s12933-016-0433-2>
3. López AL, Villanueva ME, Padilla MB, et al. Chronic unpredictable mild stress progressively disturbs glucose metabolism and appetite hormones in rats. *Acta endocrinologica*. 2018;14(1):16–23. <https://doi.org/10.4183/aeb.2018.16>
4. Oosterholt BG, Maes JHR, Van der Linden D, et al. Burnout and cortisol: Evidence for a lower cortisol awakening response in both clinical and non-clinical burnout. *Journal of Psychosomatic Research*. 2015;78(5):445–451. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2014.11.003>
5. Меркулов В. М., Климова Н. В., Меркулова Т. И. Внутрисуточный ритм секреции глюкокортикоидов и динамика генного ответа. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015;19(2):214–221. <https://doi.org/10.18699/VJ15.027>
6. Merkulov VM, Klimova NV, Merkulova TI. The ultradian rhythm of glucocorticoid secretion and the time course of target gene regulation. *Vavilov Journal of Genetics and selection*. 2015;19(2):214–221. (In Russ.) <https://doi.org/10.18699/VJ15.027>
7. Morris CJ, Aeschbach D, Scheer FA. Circadian system, sleep and endocrinology. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;349(1):91–104. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.003>
8. Lightman SL, Wiles CC, Atkinson HC et al. The significance of glucocorticoid pulsatility. *European journal of pharmacology*. 2008;583(2–3):255–262. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.11.073>
9. Nunes KP, de Oliveira AA, Szasz T et al. Blockade of toll-like receptor 4 attenuates erectile dysfunction in diabetic rats. *J. Sex. Med*. 2018;15(9):1235–1245. <https://doi.org/10.1016/j.jsxm.2018.07.005>
10. Al-Oanzi ZH. Erectile dysfunction attenuation by naringenin in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Food Biochem*. 2019;43(7):e12885. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12885>
11. Yang BB, Hong ZW, Zhang Z, et al. Epalrestat, an aldose reductase inhibitor, restores erectile function in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int. J. Impot. Res*. 2019;31(2):97–104. <https://doi.org/10.1038/s41443-018-0075-x>
12. Yang R, Wang J, Chen Y, et al. Effect of caffeine on erectile function via up-regulating cavernous cyclic guanosine monophosphate in diabetic rats. *J. Androl*. 2008;29(5):586–591. <https://doi.org/10.2164/jandrol.107.004721>
13. Luo L, Dai DZ, Cheng YS, et al. Sildenafil improves diabetic vascular activity through suppressing endothelin receptor A, iNOS and NADPH oxidase which is comparable with the endothelin receptor antagonist CPU0213 in STZ-injected rats. *J. Pharm. Pharmacol*. 2011;63(7):943–951. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2011.01268.x>
14. Зенкевич И. Г., Климова И. О. Применение метода стандартной добавки для количественного хроматографического анализа. *Журнал аналитической химии*. 2006;61(10):1048–1054. <https://doi.org/10.1134/S1061934806100042>
15. Zenkevich IG, Klimova IO. Use of standard addition method in quantitative chromatographic analysis. *J. of Analyt. Chem*. 2006; 61(10):967–972. (In Russ.) <https://doi.org/10.1134/S1061934806100042>
16. Зенкевич И. Г., Морозова Т. Е. Особенности метода стандартной добавки для количественного определения аналитов в сложных смесях, обладающих сорбционными свойствами. *Аналитика и контроль*. 2010;14(3):164–171.
17. Zenkevich IG, Morozova TE. Features of the method of standard addition for quantitation of analytes in complex mixtures with sorption properties. *Analytics and Control*. 2010;14(3):164–171. (In Russ.)
18. Зенкевич И. Г., Бархатова Д. Д., Бельшева М. Н. и др. Сравнительная характеристика различных вариантов количественного хроматографического анализа методом двойной стандартной добавки. *Аналитика и контроль*. 2021;25(2):146–154. <https://doi.org/10.15826/analitika.2021.25.2.010>
19. Zenkevich IG, Barkhatova DD, Belysheva MN, et al. Comparative characterization of different kinds of chromatographic quantification using the double standard addition method. *Analytics and Control*. 2021;25(2):146–154. (In Russ.) <https://doi.org/10.15826/analitika.2021.25.2.010>
20. Матичин А. А., Фаустова Н. М., Каргопольцева Д. Р. и др. Циркадианные колебания уровня тестостерона в плазме крови половозрелых самцов крыс. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2020;2:36–42. <https://doi.org/10.29296/2618723X-2020-02-04>
21. Matichin AA, Faustova NM, Kargopolceva DR, et al. Circadian fluctuation in plasma testosterone levels in adult male rats. *Laboratory Animals for Science*. 2020;2:36–42. (In Russ.) <https://doi.org/10.29296/2618723X-2020-02-04>
22. Begemann K, Rawashdeh O, Olejniczak I, et al. Endocrine regulation of circadian rhythms. *Biol Timing Sleep*. 2025;2:10. <https://doi.org/10.1038/s44323-025-00024-6>
23. Дымова О. В. Современные биомаркеры в кардиологии. *Медицинский совет*. 2018;(16):118–123. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2018-16-118-123>
24. Dymova OV. Modern biomarkers in cardiology. *Meditsinskij sovet*. 2018;(16):118–123. (In Russ.) <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2018-16-118-123>
25. Vittorini S, Clerico A. Cardiovascular biomarkers: increasing, impact of laboratory medicine in cardiology practice.

- Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2008;46(6):748–763. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2008.188>
20. Сапрыгин Д. Б. Кардиоспецифические тропонины: значение в диагностике, стратификации риска и прогнозе острого коронарного синдрома. 1. Диагностическое значение традиционных и современных маркеров миокардиального повреждения. *Международный журнал интервенционной кардиоангиологии*. 2003;2:65–70.
- Saprygin DB. Cardiospecific troponins: their significance in the diagnosis, risk stratification, and prognosis of acute coronary syndrome. 1. Diagnostic value of traditional and modern markers of myocardial damage. *International Journal of Interventional Cardioangiology*. 2003;2:65–70. (In Russ.)
21. Vanek T, Kohli A. Biochemistry, myoglobin. StatPearls Treasure Island: StatPearls Publishing; 2025.
22. Ordway GA, Garry DJ. Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. *J. Exp. Biol*. 2004;207(Pt20):3441–3446. <https://doi.org/10.1242/jeb.01172>.
23. Катруха И. А. Тропониновый комплекс сердца человека. Структура и функции. *Успехи биологической химии*. 2013; 53:149–194.
- Katruha IA. Human cardiac troponin complex. Structure and functions. *Uspekhi Biologicheskoi Khimii*. 2013; 53:149–194. (In Russ.)
24. Морроу Д., Кэннон К. П., Джесс Р. Л. и др. Руководство национальной академии клинической биохимии по лабораторной медицинской практике: Клинические характеристики и использование биохимических маркеров при острых коронарных синдромах. *Лабораторная диагностика*. 2008.1(17):16–24.
- Morrou D, Kennon KP, Dzhes RL, et al. Guidelines of the National Academy of Clinical Biochemistry for laboratory medicine practice: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. *Laboratory Diagnostics*. 2008.1(17):16–24. (In Russ.)
25. Kolmanová E, Bartořová L, Khazneh E, et al. Comparison of the specificity of cardiac troponin I and creatine kinase MB in isoproterenol-induced cardiotoxicity model in rats. *Acta Veterinaria Brno*. 2015;84(4):343–350. <https://doi.org/10.2754/avb201584040343>
26. Clements P, Brady S, York M, et al. Time course characterization of serum cardiac troponins, heart fatty acid-binding protein, and morphologic findings with isoproterenol-induced myocardial injury in the rat. *Toxicologic Pathology*. 2010;38:703–714. <https://doi.org/10.1177/0192623310374969>
27. Березкин В. А., Бондарева Е. Д., Добрянская С. С. и др. Технологические процессы в доклинических исследованиях. Риск-ориентированный подход. Консультант GLP-Planet 2022. Мнение фармацевтической отрасли. Санкт-Петербург: Акционерное общество «Научно-производственное объединение «ДОМ ФАРМАЦИИ»; 2022. С. 152–173. <https://doi.org/10.57034/978-5-6048955-0-4-s7>
- Berezkin VA, Bondareva ED, Dobryanskaya SS, et al. Technological processes in preclinical studies. A risk-based approach. Consultant GLP-Planet 2022. Pharmaceutical industry opinion. Saint Petersburg: Research-and-manufacturing company «HOME OF PHARMACY» Joint Stock Company; 2022. P. 152–173. (In Russ.) <https://doi.org/10.57034/978-5-6048955-0-4-s7>
28. Болсуновская Ю. Р., Енгальчева Г. Н., Ивкин Д. Ю. и др. Дизайн фармакологического эксперимента. Внедрение принципов ARRIVE в работу исследовательских центров. Консультант GLP-Planet 2022. Мнение фармацевтической отрасли. Санкт-Петербург: Акционерное общество «Научно-производственное объединение «ДОМ ФАРМАЦИИ»; 2022. С. 52–71. <https://doi.org/10.57034/978-5-6048955-0-4-s3>
- Bolsunovskaya YuR, Engalycheva GN, Ivkin DYU, et al. Design of a pharmacological experiment. Implementation of the ARRIVE principles in research center operations. Consultant GLP-Planet 2022. Pharmaceutical industry opinion. Saint Petersburg: Research-and-manufacturing company «HOME OF PHARMACY» Joint Stock Company, 2022. P. 52–71. (In Russ.) <https://doi.org/10.57034/978-5-6048955-0-4-s3>
29. Piccoli SP. Points to consider document: scientific and regulatory considerations for the analytical validation of assays used in the qualification of biomarkers in biological matrices [Internet]. Biomarker Assay Collaborative Evidentiary Considerations Writing Group; 2019 [cited 2025 Apr 30]. Available from: <https://media.c-path.org/wp-content/uploads/20240427170639/evidconsid-whitepaper-analyticalsectionv2019.pdf>
30. Косман В. М., Карлина М. В., Фаустова Н. М. и др. Вопросы валидации биоаналитических методик количественного определения биомаркеров: обзор нормативных документов. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(5):550–564
- Kosman VM, Karlina MV, Faustova NM, et al. Validating bioanalytical methods for biomarker quantitation: a regulatory document review. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(5):550–564. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-766>

#### Информация об авторах:

Фаустова Наталья Михайловна — кандидат химических наук, заместитель руководителя отдела технологии, кинетики и анализа лекарственных средств, АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл., Кузьмоловский г. п., Россия, [faustova.nm@doclinika.ru](mailto:faustova.nm@doclinika.ru), <https://orcid.org/0000-0002-6866-5741>;

Косман Вера Михайловна — кандидат фармацевтических наук, заместитель руководителя отдела технологии, кинетики и анализа лекарственных средств, ведущий научный сотрудник, АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл., Кузьмоловский г. п., Россия, [kosman.vm@doclinika.ru](mailto:kosman.vm@doclinika.ru), <https://orcid.org/0000-0001-9690-1935>;

Карлина Марина Валерьевна — кандидат биологических наук, руководитель отдела технологии, кинетики и анализа лекарственных средств, АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл., Кузьмоловский г. п., Россия, [karlina.mv@doclinika.ru](mailto:karlina.mv@doclinika.ru), <https://orcid.org/0000-0002-6292-8934>;

Макарова Марина Николаевна — доктор медицинских наук, директор, АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл., Кузьмоловский г. п., Россия, makarova.mn@doclinika.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>;

Макаров Валерий Геннадиевич — доктор медицинских наук, профессор, научный руководитель, АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская обл., Кузьмоловский г. п., Россия, makarov.vg@doclinika.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>.

**Вклад авторов:**

Фаустова Н. М. — сбор и анализ данных, подготовка текста публикации, схема принятия решений; Косман В. М. — систематизация результатов, формулировка алгоритма; Карлина М. В. — обсуждение результатов и текста публикации; Макаров В. Г. — критический разбор научной рукописи; Макарова М. Н. — проверка и правка научной рукописи.

**Authors information:**

Natalia M. Faustova, PhD, deputy of head of department of technology, kinetics and analysis of drugs, RMC «HOME OF PHARMACY»; Kuzmolovsky Settlement, Leningrad Region, Russia, faustova.nm@doclinika.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6866-5741>;

Vera M. Kosman, PhD, deputy of head of department of technology, kinetics and analysis of drugs, leader researcher, RMC «HOME OF PHARMACY», Kuzmolovsky Settlement, Leningrad Region, Russia, kosman.vm@doclinika.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9690-1935>;

Marina V. Karlina, PhD, head of department of technology, kinetics and analysis of drugs, RMC «HOME OF PHARMACY», Kuzmolovsky Settlement, Leningrad Region, Russia, karlina.mv@doclinika.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6292-8934>;

Marina N. Makarova, PhD, DSc, director, RMC «HOME OF PHARMACY», Kuzmolovsky Settlement, Leningrad Region, Russia, makarova.mn@doclinika.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>;

Valery G. Makarov, PhD, DSc, Professor, Scientific Supervisor, RMC «HOME OF PHARMACY», Kuzmolovsky Settlement, Leningrad Region, Russia, makarov.vg@doclinika.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>.

**Contribution of the authors:**

Faustova N. M. — data collection and analysis, manuscript text preparing; Kosman V. M. — results systematization, algorithm formulation; Karlina M. V. — study results discussion; Makarov V. G. — critical revision of the content of the article and approval of the final version of the article for publication; Makarova M. N. — manuscript and illustrations critical revision.

---

Поступила в редакцию / Received: 28.05.2025

Принята к публикации / Accepted: 19.01.2026

---