



ISSN 2410- 5155 (Online), ISSN 2311- 4495 (Print)

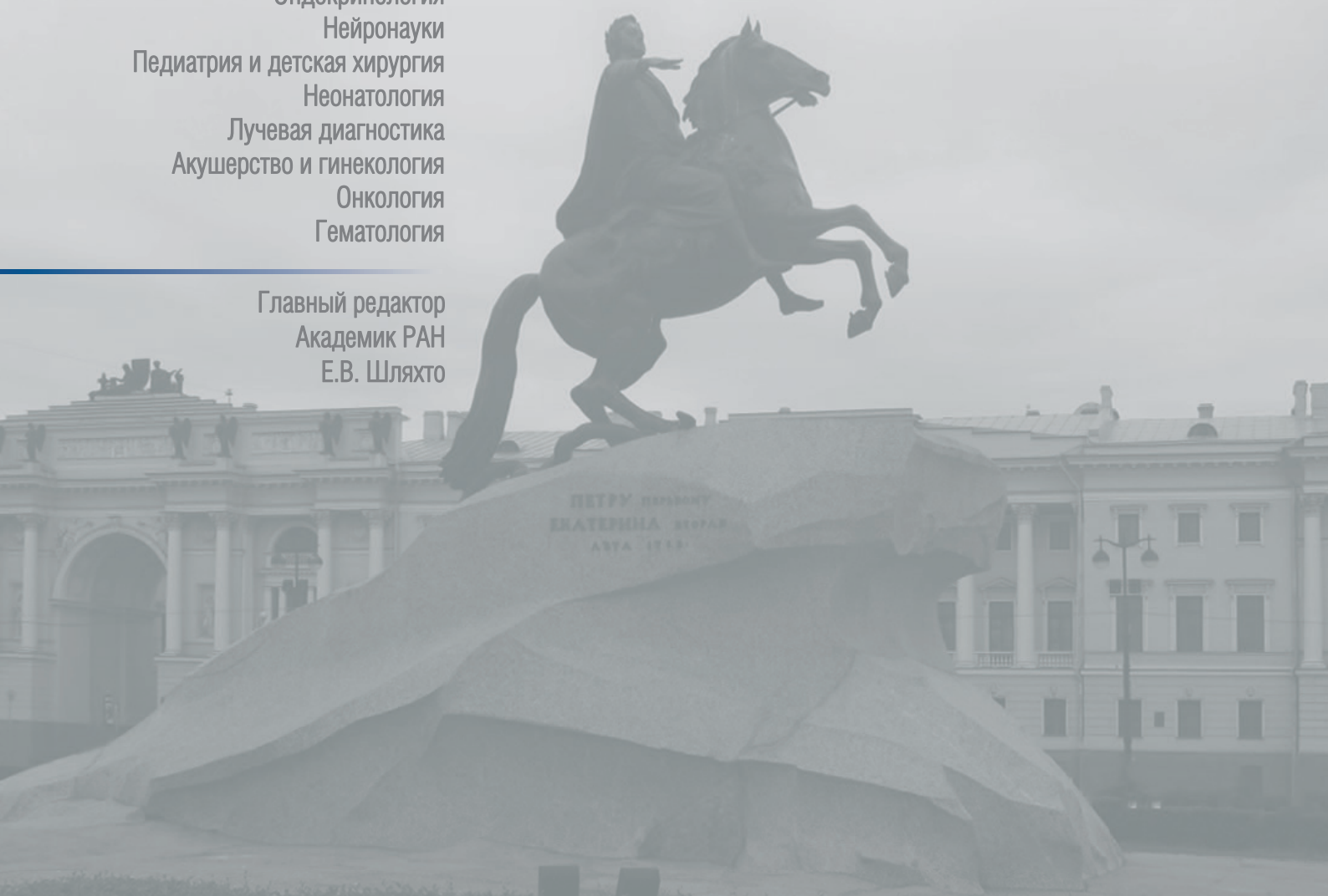
Трансляционная Медицина Translational Medicine

Научно-практический рецензируемый медицинский журнал

том 11 № 1 / 2024

Фундаментальная медицина
Сердечно-сосудистые заболевания
Эндокринология
Нейронауки
Педиатрия и детская хирургия
Неонатология
Лучевая диагностика
Акушерство и гинекология
Онкология
Гематология

Главный редактор
Академик РАН
Е.В. Шляхто





ISSN 2410-5155 (Online), ISSN 2311-4495 (Print)

Трансляционная Медицина Translational Medicine

Научно-практический рецензируемый медицинский журнал

том 11 № 1 / 2024

Фундаментальная медицина
Сердечно-сосудистые заболевания
Эндокринология
Нейронауки
Педиатрия и детская хирургия
Неонатология
Лучевая диагностика
Акушерство и гинекология
Онкология
Гематология

Главный редактор
Академик РАН
Е.В. Шляхто

**Национальный медицинский
исследовательский центр им. В. А. Алмазова
Министерства здравоохранения Российской Федерации**



ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Шляхто Е. В.

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА:

Конради А. О.

Галагудза М. М.

ISSN 2311–4495 (печатная версия)
ISSN 2410–5155 (электронная версия)

ТЕХНИЧЕСКИЙ РЕДАКТОР

Петриченко А. К.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Беленков Ю. Н. (Москва)
Вавилова Т. В. (Санкт-Петербург)
Вебер В. Р. (Великий Новгород)
Волкова Н. И. (Ростов-на-Дону)
Галявич А. С. (Казань)
Гринева (Санкт-Петербург)
Гринштейн Ю. И. (Красноярск)
Даренская М. А. (Иркутск)
Ефремушкина А. А. (Барнаул)
Захарова И. Н. (Москва)
Зенин С. А. (Новосибирск)
Королев Д. В. (Санкт-Петербург)
Кашталап В. В. (Кемерово)
Климонтов В. В. (Новосибирск)
Костарева А. А. (Санкт-Петербург)
Лебедев Д. С. (Санкт-Петербург)
Лопатин Ю. М. (Волгоград)

Макаров С. А. (Кемерово)
Малашичева А. Б. (Санкт-Петербург)
Меликян М. А. (Москва)
Моисеева О. М. (Санкт-Петербург)
Неймарк М. И. (Барнаул)
Никитина И. Л. (Санкт-Петербург)
Протасов К. В. (Иркутск)
Рыжкова Д. В. (Санкт-Петербург)
Рябов В. В. (Томск)
Савченко А. А. (Красноярск)
Садыкова Д. И. (Казань)
Самородов А. В. (Уфа)
Сироткина О. В. (Санкт-Петербург)
Троян В. Н. (Москва)
Усов В. Ю. (Томск)
Чесникова А. И. (Ростов-на-Дону)
Шаповалов К. Г. (Чита)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

Ольшанский Б. (США)
Ханссон Г. (Швеция)
Сёберг Г. (Швеция)
Керр Д. (США)
Бакс Ж. (Нидерланды)
Массард Ж. (Франция)
Орлов М. (США)
Содер О. (Швеция)
Феррари Р. (Италия)
Хельманн Р. (Германия)
Сили-Торок Т. (Нидерланды)
Сейерсен Т. (Швеция)
Вааге Я. (Норвегия)
Беркович О. А. (Санкт-Петербург)
Виллеальде С. В. (Санкт-Петербург)
Головкин А. С. (Санкт-Петербург)
Голухова Е. З. (Москва)
Гудкова А. Я. (Санкт-Петербург)
Гурьева И. В. (Москва)
Дземешкевич С. Л. (Москва)
Жлоба А. А. (Санкт-Петербург)
Зазерская И. Е. (Санкт-Петербург)
Заклязьменская Е. В. (Москва)
Звартау Н. Э. (Санкт-Петербург)
Калуев А. В. (Санкт-Петербург)
Карпенко М. А. (Санкт-Петербург)
Карпов Р. С. (Томск)
Козырев С. В. (Санкт-Петербург)
Кухарчик Г. А. (Санкт-Петербург)
Лишманов Ю. Б. (Томск)
Ломиворотов В. В. (Новосибирск)
Мазурок В. А. (Санкт-Петербург)
Маслов Л. Н. (Томск)
Мельниченко Г. А. (Москва)
Михайлов Е. Н. (Санкт-Петербург)
Мосоян М. С. (Санкт-Петербург)
Недошивин А. О. (Санкт-Петербург)
Неймарк А. Е. (Санкт-Петербург)
Поддубный И. В. (Москва)
Пузырев В. П. (Томск)
Салогуб Г. Н. (Санкт-Петербург)
Самочерных К. А. (Санкт-Петербург)
Сидоркевич С. В. (Санкт-Петербург)
Ткачук В. А. (Москва)
Труфанов Г. Е. (Санкт-Петербург)
Фадеев В. В. (Москва)
Чернявский М. А. (Санкт-Петербург)
Шевцов М. А. (Санкт-Петербург)

Журнал зарегистрирован в Государственном комитете РФ по печати.

Свидетельство о рег. ПИ № ФС77–56793 от 29.01.2014 г.

Журнал включен в Российский индекс научного цитирования

Журнал включен Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации в «Перечень российских рецензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук».

Периодичность — 6 выпусков в год. Тираж — 1100 экземпляров.

Тематическая рассылка по специалистам.

Верстка — Л. П. Попова. Корректра — А. В. Медведева

Издательство «ФОНД АЛМАЗОВА»

Адрес: 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2

Телефон издательства: +7(812)702–37–16

Отпечатано в ООО «Типография Принт24»

Санкт-Петербург, ул. Самойловой, 5

Подача рукописей и переписка с авторами, размещение рекламы и подписка —

e-mail: buleten@almazovcentre.ru

Подписка по каталогу агентства «Роспечать»: подписной индекс 57996

Архив номеров: http://www.almazovcentre.ru/?page_id=20396

http://elibrary.ru/title_about.asp?id=50986

Все права защищены. © 2024.

Полное или частичное воспроизведение материалов, опубликованных в журнале, допускается только с письменного разрешения редакции.

Редакция не несет ответственности за содержание рекламных материалов

Выход в свет 29.03.2024

18+

**V. A. Almazov National
Medical Research Centre
Ministry of Health of the Russian Federation**

**EDITOR-IN-CHIEF**

Evgeny Shlyakhto

DEPUTY EDITORS:

Alexandra Konradi

Mikhail Galagudza

ISSN 2311-4495 (printed)

ISSN 2410-5155 (online)

TECHNICAL EDITOR

Anastasia Petrichenko

EDITORIAL BOARD:

Yu. Belenkov (Moscow)	M. Neimark (Barnaul)
A. Chesnikova (Rostov-on-Don)	I. Nikitina (St. Petersburg)
M. Darenskaya (Irkutsk)	K. Protasov (Irkutsk)
A. Efremushkina (Barnaul)	V. Ryabov (Tomsk)
A. Galyavich A. S. (Kazan)	D. Ryzhkova (St. Petersburg)
E. Grineva (St. Petersburg)	D. Sadykova (Kazan)
Yu. Grinshtein (Krasnoyarsk)	A. Samorodov (Ufa)
V. Kashtalap (Kemerovo)	A. Savchenko (Krasnoyarsk)
V. Klimontov (Novosibirsk)	K. Shapovalov (Chita)
D. Korolev (St. Petersburg)	O. Sirotkina (St. Petersburg)
A. Kostareva (St. Petersburg)	V. Troyan (Moscow)
D. Lebedev (St. Petersburg)	V. Usov (Tomsk)
Yu. Lopatin (Volgograd)	T. Vavilova (St. Petersburg)
S. Makarov (Kemerovo)	N. Volkova (Rostov-on-Don)
A. Malashicheva (St. Petersburg)	V. Weber (Veliky Novgorod)
M. Melikyan (Moscow)	I. Zakharova (Moscow)
O. Moiseeva (St. Petersburg)	S. Zenin (Novosibirsk)

INTERNATIONAL EDITORIAL COUNCIL:

J. Bax (Netherlands)
R. Ferrari (Italy)
G. Hansson (Sweden)
R. Hehlmann (Germany)
D. Kerr (USA)
G. Massard (France)
B. Olshansky (USA)
M. Orlov (USA)
T. Sejersen (Sweden)
G. Sjöberg (Sweden)
O. Söder (Sweden)
T. Szili-Torok (Netherlands)
J. Vaage (Norway)
O. Berkovich (St. Petersburg)
M. Chernyavsky (St. Petersburg)
S. Dzemeshevich (Moscow)
V. Fadeev (Moscow)
A. Golovkin (St. Petersburg)
E. Golukhova (Moscow)
A. Gudkova (St. Petersburg)
I. Guryeva (Moscow)
A. Kaluev (St. Petersburg)
M. Karpenko (St. Petersburg)
R. Karpov (Tomsk)
S. Kozyrev (St. Petersburg)
G. Kukharchik (St. Petersburg)
Yu. Lishmanov (Tomsk)
V. Lomivorotov (Novosibirsk)
L. Maslov (Tomsk)
V. Mazurok (St. Petersburg)
G. Melnichenko (Moscow)
E. Mikhailov (St. Petersburg)
M. Mosoyan (St. Petersburg)
A. Nedoshivin (St. Petersburg)
A. Neumark (St. Petersburg)
I. Poddubny (Moscow)
V. Puzyrev (Tomsk)
G. Salogub (St. Petersburg)
K. Samochernykh (St. Petersburg)
M. Shevtsov (St. Petersburg)
S. Sidorkevich (St. Petersburg)
V. Tkachuk (Moscow)
G. Trufanov (St. Petersburg)
S. Villevalde (St. Petersburg)
E. Zaklyazmenskaya (Moscow)
I. Zazerskaya (St. Petersburg)
A. Zhloba (St. Petersburg)
N. Zvartau (St. Petersburg)

Journal is registered in State Committee for Publishing of the Russian Federation.

Certificate of registration. ПИ № ФС77-56793 on 29.01.2014

The Journal is included in the Russian Citation Index

The journal is listed among Russian peer-reviewed scientific journals approved by the Higher Attestation Commission of the Russian Ministry of Education and Science for the publication of major scientific results of theses for academic degrees of Doctor and Candidate of Sciences.

Periodicity — 6 issues per year. Edition 1100 copies.

Distribution to specialists.

Make-up — L. P. Popova. Proofreader — A. V. Medvedeva

Publisher «ALMAZOV FOUNDATION»

Address: 197341, Saint-Petersburg, Akkuratova str. 2

Tel.: +7(812)702-37-16

Printed by Typography Print24 LLC

5 Samoilova street, St. Petersburg

Manuscript submission and correspondence with authors,
advertising and subscription —

e-mail: bulleten@almazovcentre.ru

Subscription on catalogue of Rospechat agency: index 57996

Archive: http://www.almazovcentre.ru/?page_id=20396

http://elibrary.ru/title_about.asp?id=50986

All rights reserved. © 2024.

Full or partial reproduction of materials printed in journal is allowed by the written permission of publisher.

Editors accept no responsibility for the content of advertising materials.

Published March 29, 2024

18+

СОДЕРЖАНИЕ

АЛЛЕРГОЛОГИЯ И ИММУНОЛОГИЯ

- 6 Берг Е. Е., Кудрявцев И. В., Кудлай Д. А., Старшинова А. А.
ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ И ДИАГНОСТИКИ ХРОНИЧЕСКОГО САРКОИДОЗА

МЕДИЦИНСКАЯ ХИМИЯ

- 19 Ванг Ю., Булатова Н. Р., Клен Е. Э., Розит Г. А., Никитина И. Л., Старцева Л. В., Богданова Ю. А., Щекин В. С., Самородов А. В.
ЭФФЕКТИВНОСТЬ 4-(2-(4-НИТРОФЕНИЛ)-2-ОКСОЭТИЛ)-1-(ТИЕТАН-3-ИЛ)-1Н-1,2,4-ТРИАЗОЛ-4-ИЯ БРОМИДА НА МОДЕЛИ ТРОМБОЗА НИЖНЕЙ ПОЛОЙ ВЕНЫ У КРЫС

НАНОТЕХНОЛОГИИ

- 28 Шульмейстер Г. А., Чебуркин Ю. В., Чекменева Ю. Д., Едемская Е. В., Бондаренко А. Б., Постнов В. Н., Королев Д. В.
ПРОТОТИПЫ «ЛОВУШЕК» ВИРУСА SARS-COV-2 НА ОСНОВЕ ЭНТЕРОСОРБЕНТОВ

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА

- 45 Власова Ю. А., Клименко Е. С., Сухарева К. С., Гаврилова Л. С., Костарева А. А.
АДАПТАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИЗМЕНЕНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА В КЛЕТКАХ C2C12 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГОТОВОГО НАБОРА «MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL KIT» (SIGMA-ALDRICH)

- 55 Вахрушев Н. С., Шиленко Л. А., Черваев А. А., Карпов А. А., Галагудза М. М., Костарева А. А., Калинина О. В.
ГЕПАРИНАЗА УСТРАНЯЕТ ГЕПАРИН-АССОЦИИРОВАННОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ПРИ ОЦЕНКЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ТКАНЯХ ЛЕГКИХ

ОНКОЛОГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

- 65 Назаралиева Э. Т., Забродская Ю. М., Герасимов А. П., Шевцов М. А., Назаралиева Э. Т., Ким А. В., Джаналиев Б. Р., Самочерных К. А.
ИНТЕГРАЛЬНЫЙ НЕЙРООНКОЛОГИЧЕСКИЙ ДИАГНОЗ КАК ОСНОВА ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОГО ЛЕЧЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА (НА ПРИМЕРЕ ГЛИОМ У ДЕТЕЙ)

СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

- 77 Глушков Н. И., Фадеева Э. А., Пуздряк П. Д., Реснянская Е. Д., Каменская А. Е., Гайфуллин А. Р., Антоненко А. И., Иванов М. А., Жданович К. В.
МОЖНО ЛИ ПРЕДВИДЕТЬ ОСЛОЖНЕНИЯ ПОСЛЕ РЕКОНСТРУКТИВНЫХ ОПЕРАЦИЙ У БОЛЬНЫХ С ТРОФИЧЕСКИМИ НАРУШЕНИЯМИ НА ФОНЕ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО АТЕРОСКЛЕРОЗА В СОЧЕТАНИИ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ?

НЕВРОЛОГИЯ

- 87 Шиленко Л. А., Карпов А. А., Веретенникова Е. И., Шиленко А. А., Галагудза М. М.
ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ СЦЕНАРИИ РАЗВИТИЯ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА И ОСНОВНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ИШЕМИЧЕСКОГО КАСКАДА

АНЕСТЕЗИОЛОГИЯ И РЕАНИМАТОЛОГИЯ

- 103 Рябченко М. А., Лейдерман И. Н.
ОСНОВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ДЕЛИРИЯ У ПАЦИЕНТОВ ОТДЕЛЕНИЯ РЕАНИМАЦИИ И ИНТЕНСИВНОЙ ТЕРАПИИ: СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

МЕТОДОЛОГИЧЕСКАЯ СТАТЬЯ

- 122 Макарова М. Н., Ковалева М. А., Макаров В. Г.
ОСЛЕПЛЕНИЕ (МАСКИРОВКА) В ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ КАК ВОЗМОЖНЫЙ ИНСТРУМЕНТ ПОВЫШЕНИЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ И ТРАНСЛЯЦИОННОСТИ ДАННЫХ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)

CONTENT

ALLERGY AND IMMUNOLOGY

- 6 Elizaveta E. Berg, Igor V. Kudryavtsev, Dmitry A. Kudlay, Anna A. Starshinova
FEATURES OF THE COURSE AND DIAGNOSIS OF CHRONIC SARCOIDOSIS

MEDICINAL CHEMISTRY

- 19 Yi Wang, Nailya R. Bulatova, Elena E. Klen, Galina A. Rozit, Irina L. Nikitina, Lyudmila V. Startseva, Yulia A. Bogdanova, Vlas S. Shchekin, Aleksandr V. Samorodov
EFFICACY OF 4-(2-(4-NITROPHENYL)-2-OXOETHYL)-1-(THIETANE-3-YL)-1H-1,2,4-TRIAZOL-4 BROMIDE IN THE RAT MODEL OF INFERIOR VENA CAVA THROMBOSIS

NANOTECHNOLOGY

- 28 Galina A. Shulmeyster, Yuri V. Cheburkin, Yulia D. Chekmeneva, Elena V. Edemskaya, Andrey B. Bondarenko, Viktor N. Postnov, Dmitry V. Korolev
PROTOTYPES OF SARS-COV-2 VIRUS “TRAPS” BASED ON ENTEROSORBENTS

MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

- 45 Yulia A. Vlasova, Ekaterina S. Klimenko, Ksenia S. Sukhareva, Lidiya S. Gavrilova, Anna A. Kostareva
ADAPTATION OF THE TECHNIQUE OF DETERMINATION OF MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL CHANGE IN C2C12 CELLS USING THE READY SET “MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL KIT” (SIGMA-ALDRICH)

- 55 Nikita S. Vachrushev, Leonid A. Shilenko, Al-khalim A. Chervaev, Andrei A. Karpov, Michael M. Galagudza, Anna A. Kostareva, Olga V. Kalinina
HEPARINASE ELIMINATES HEPARIN-ASSOCIATED INHIBITION OF THE REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION WHEN ASSESSING GENE EXPRESSION IN LUNG TISSUE

CANCER

- 65 Eleonora T. Nazaralieva, Yulia M. Zabrodskaya, Aleksandr P. Gerasimov, Maksim A. Shevtsov, Ehlhura T. Nazaralieva, Aleksandr V. Kim, Bolot R. Djanaliev, Konstantin A. Samochernykh
INTEGRAL NEURO-ONCOLOGICAL DIAGNOSIS AS THE BASIS FOR PERSONALIZED TREATMENT OF BRAIN TUMORS (ON THE EXAMPLE OF GLIOMAS IN CHILDREN)

CARDIOVASCULAR MEDICINE

- 77 Nikolay I. Glushkov, Enzhe A. Fadeeva, Petr D. Puzdryak, Ekaterina D. Resnyanskaya, Anastasiia E. Kamenskaya, Aleksandr R. Gaifullin, Alisa I. Antonenko, Mikhail A. Ivanov, Kristina V. Zhdanovich
IS IT POSSIBLE TO ANTICIPATE COMPLICATIONS AFTER RECONSTRUCTIVE SURGERY IN PATIENTS WITH TROPHIC DISORDERS ON THE BACKGROUND OF PERIPHERAL ATHEROSCLEROSIS IN COMBINATION WITH DIABETES MELLITUS?

NEUROLOGY

- 87 Leonid A. Shilenko, Andrei A. Karpov, Elizaveta I. Veretennikova, Alexey A. Shilenko, Michael M. Galagudza
PATHOGENETIC SCENARIOS OF THE DEVELOPMENT OF BRAIN ISCHEMIA AND THE MAIN ELEMENTS OF THE ISCHEMIC CASCADE

PAIN, CRITICAL CARE, AND ANESTHESIA

- 103 Maksim A. Riabchenko, Ilia N. Leyderman
MAIN FEATURES OF DIAGNOSIS AND TREATMENT OF DELIRIUM IN ICU PATIENTS: A SYSTEMATIC REVIEW

METHODICS

- 122 Marina N. Makarova, Mariya A. Kovaleva, Valerii G. Makarov
BLINDING (MASKING) IN NON-CLINICAL STUDIES TO IMPROVE REPRODUCIBILITY AND TRANSLABILITY (LITERARY REVIEW)

ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ И ДИАГНОСТИКИ ХРОНИЧЕСКОГО САРКОИДОЗА

Берг Е. Е.¹, Кудрявцев И. В.⁵, Кудлай Д. А.^{2,3,4}, Старшинова А. А.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», Москва, Россия

⁵ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Старшинова Анна Андреевна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: starshinova_aa@almazovcentre.ru,
starshinova_777@mail.ru

Статья поступила в редакцию
26.02.2024, принята к печати 18.03.2024.

Резюме

Саркоидоз — системное воспалительное заболевание неизвестной этиологии с широким спектром клинических проявлений. Ежегодная заболеваемость колеблется от 1 до 15 на 100 000 населения. В связи с отсутствием специфических клинических проявлений диагностика данного заболевания все еще затруднена. Большая вариабельность клинических проявлений и органов-мишеней, а также сопутствующие заболевания сильно усложняют диагностический поиск и делают саркоидоз диагнозом исключения. В настоящей статье рассмотрен клинический случай пациента с генерализованным саркоидозом, а также проведен обзор и анализ современной литературы по данному вопросу.

На сегодня не существует биомаркеров или их комбинации, которые бы позволили надежно предсказать развитие и распространение патологического процесса. Для наиболее точной диагностики и определения прогноза необходимо существование одного серологического или визуализирующего маркера, обладающего достаточной чувствительностью и специфичностью.

Ключевые слова: биомаркеры, генерализованный саркоидоз, диагностика, хронический саркоидоз.

Для цитирования: Берг Е.Е., Кудрявцев И.В., Кудлай Д.А. и др. Особенности течения и диагностики хронического саркоидоза. Трансляционная медицина. 2024; 11(1): 6-18. DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-1-6-18. EDN: AFQHOM

FEATURES OF THE COURSE AND DIAGNOSIS OF CHRONIC SARCOIDOSIS

Elizaveta E. Berg¹, Igor V. Kudryavtsev⁵, Dmitry A. Kudlay^{2,3,4},
Anna A. Starshinova¹

¹ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

² Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

³ National Research Center — Institute of Immunology Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russia

⁴ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁵ Scientific Research Institute of Experimental Medicine,
Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Anna A. Starshinova,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.

starshinova_aa@almazovcentre.ru,
starshinova_777@mail.ru

Received 26 February 2024; accepted
18 March 2024.

Abstract

Sarcoidosis is a systemic inflammatory disease of unknown etiology with a wide range of clinical manifestations. The annual incidence ranges from 1 to 15 per 100,000 population. Due to the lack of specific clinical features, the diagnosis of this disease is still challenging. The significant variability in clinical presentations and target organs, as well as concomitant diseases, greatly complicate the diagnostic search and make sarcoidosis a diagnosis of exclusion. This article discusses a clinical case of a patient with generalized chronic sarcoidosis and provides a review and analysis of the current literature on this issue. At the moment, there is no biomarker or combination of biomarkers that would reliably predict the development and spread of the pathological process.

For the most accurate diagnosis and determination of prognosis, the existence of a single serological or imaging marker with sufficient sensitivity and specificity is necessary.

Key words: biomarkers, chronic sarcoidosis, diagnosis, generalized sarcoidosis.

For citation: Berg EE, Kudryavtsev IV, Kudlay DA, et al. Features of the course and diagnosis of chronic sarcoidosis. Translational Medicine. 2024; 11(1): 6-18. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-1-6-18. EDN: AFQHOM

Список сокращений: АПФ — ангиотензинпревращающий фермент, ЖБАЛ — жидкость бронхоальвеолярного лаважа, МРТ — магнитно-резонансная томография, МСКТ — мультиспиральная компьютерная томография, ОФВ1 — объем форсированного выдоха за одну секунду, ПЭТ — позитронно-эмиссионная томография, сАПФ — сывороточный ангиотензинпревращающий фермент, ФДГ — фтордезоксиглюкоза, ФЖЕЛ — форсированная жизненная емкость легких, ЭхоКГ — эхокардиография.

Введение

Саркоидоз является системным воспалительным заболеванием неизвестной этиологии

с широким спектром клинических проявлений и отдаленными последствиями. При саркоидозе диагностируют эпителиоидно-клеточные неказефицированные гранулемы в различных тканях и органах, преимущественно в легких и средостенных лимфоузлах. Хотя механизмы образования гранул становятся все более и более ясными, однако до настоящего времени он остается заболеванием с неизвестной этиологией.

Ежегодная заболеваемость саркоидозом колеблется от 1 до 15 на 100 000 в зависимости от исследуемого региона. Самые низкие показатели в странах Восточной Азии (0,5–1 на 100 000), выше — в Северной Америке и Австралии (5–10) и самые высокие — в странах Северной Европы

(Скандинавии) (11–15) [1]. В Российской Федерации эпидемиология саркоидоза также сильно отличается в зависимости от региона. Согласно анализу публикаций А. А. Визеля, на 2017 год наиболее высокая распространенность наблюдается в Республике Карелия (73 на 100 000) и самая низкая — в Амурской области (8,2 на 100 000) [1].

Саркоидоз чаще встречается у людей моложе 40 лет, пик заболеваемости приходится на возрастную группу от 25 до 40 лет [2].

Этиология саркоидоза

Существует большая вариабельность органов и систем, пораженных при саркоидозе, что приводит к существенным трудностям в процессе диагностики заболевания. Клиническое течение саркоидоза может быть острым, подострым и хроническим. Разрешение заболевания варьируется от спонтанной ремиссии до инвалидизирующего хронического заболевания. Наиболее серьезными осложнениями являются фиброз легких, почечная недостаточность, поражение сердца, нейросаркоидоз, ознобленная волчанка и потеря зрения из-за заднего увеита [3].

Учитывая, что клинические проявления саркоидоза зачастую неспецифичны, для установления диагноза часто требуется гистологическое исследование гранулем.

Предполагается, что саркоидоз является аутоиммунным заболеванием, а ключевое звено патогенеза — взаимодействие экзогенного или эндогенного антигена с компонентами врожденного иммунитета, такими как макрофаги и дендритные клетки [4]. Несмотря на то, что этиология саркоидоза остается недостаточно изученной, предполагается, что заболевание имеет аутоиммунный генез и инициируется одним или несколькими контактами с антигенами, которые запускают гранулематозный процесс. Триггерными факторами, запускающими неадекватный иммунный ответ, могут быть инфекционный агент, компоненты вакцин и различные неорганические вещества [5].

Хроническое течение саркоидоза

Легкие являются наиболее часто поражаемым саркоидозом органом, однако это не единственная мишень данного заболевания. Внелегочный саркоидоз наблюдается примерно в 30–50 % случаев [5].

Поражение кожи наблюдается в 15,9 % случаев и часто остается незамеченным. Главным образом это происходит из-за широкого спектра проявлений кожного саркоидоза, которые включают узловатую эритему, макуло-папулезные поражения, гипер- и гипопигментированные участки, келоид-

ные образования и подкожные узелки [6]. Кожные поражения обычно представляют собой ярко выраженные участки гранулематозного воспаления, и диагноз может быть поставлен при биопсии кожи.

Поражение глаз может предшествовать диагностике саркоидоза на годы и встречается в 11,8 % случаев [5]. Наиболее частыми проявлениями являются передний увеит с острой болью и нечеткостью зрения, тогда как светобоязнь отмечается в меньшем количестве случаев [6].

Поражение сердца при саркоидозе встречается гораздо чаще, чем предполагается клинически, и может присутствовать без поражения других органов. Тремя основными проявлениями саркоидоза сердца являются: нарушения проводимости, желудочковые аритмии и застойная сердечная недостаточность. Гранулематозная инфильтрация миокарда является причиной аритмий и кардиомиопатий [1, 4].

Нейросаркоидоз встречается в 4,6 % случаев [7]. Поражаться может любая часть нервной системы, но наиболее распространенными проявлениями считаются краниальная нейропатия и поражение мозговых оболочек. Также часто поражаются II, VII и VIII черепные нервы. Менингит составляет до 20 % случаев нейросаркоидоза, хотя частота субклинических лептоменингеальных повреждений намного выше. Паренхиматозные заболевания головного мозга встречаются реже. При этом могут наблюдаться судороги, головная боль, когнитивные или поведенческие нарушения [8].

Также довольно часто можно встретить саркоидозные гранулемы в периферических лимфатических узлах (11,3–15,2 %), печени (в 4,5–11,5 %), почках (3,1 %) и скелетно-мышечной системе (7,3 %) [5–9].

Внелегочные локализации чаще всего выявляются при диагностике легочного саркоидоза. Внелегочный саркоидоз может также предшествовать или способствовать обнаружению поражения грудной клетки. До настоящего времени диагностика хронического саркоидоза, протекающего с поражением различных органов и систем, значительно затруднена.

В связи с большим фенотипическим разнообразием течения саркоидоза его диагностика все еще затруднена. Она основывается на трех критериях: клиническая картина, гистологическое обнаружение неказеифицированных гранул в одном или нескольких образцах тканей и исключение альтернативных гранулематозных заболеваний [9].

Как и при любой другой патологии, диагностический поиск начинается со сбора клинических данных, включающих жалобы, осмотр, анамнез

заболевания и анамнез жизни. На основании полученных данных врач должен оценить вероятность саркоидоза. Если вероятность, по мнению врача, чрезвычайно низка, диагноз «саркоидоз» в дальнейшем не рассматривается. Если врач ставит вероятность диагноза под вопрос, назначаются дополнительные лабораторные и инструментальные методы диагностики, в том числе гистологическое исследование ткани, предположительно пораженной гранулематозным процессом.

Альтернативные гранулематозные заболевания, которые необходимо исключить: инфекции (особенно туберкулез, нетуберкулезные микобактериальные инфекции и гистоплазмоз), хроническую бериллиозную болезнь, гиперчувствительный пневмонит, гранулематозный талькоз, лекарственно-индуцированный гранулематоз (особенно вследствие приема антагонистов ФНО- α , ингибиторов иммунных контрольных точек, таргетной терапии и интерферонов), иммунодефицит, генетические нарушения (синдром Блэу), болезнь Крона, гранулематоз с полиангиитом, эозинофильный гранулематоз с полиангиитом и злокачественно-ассоциированный гранулематоз. Исключение лимфопролиферативных заболеваний также может быть очень сложной задачей до получения гистологического подтверждения гранулематозного воспаления.

Иммунологические особенности при саркоидозе

В патогенез саркоидоза вовлечены как врожденная, так и адаптивная иммунные системы. Из врожденной иммунной системы важную роль в патогенезе саркоидоза играют NOD-подобные рецепторы и Toll-подобные рецепторы, а также клеточные факторы, такие как дендритные клетки и макрофаги, а также лимфоциты Т-хелперы 1 (Th1), Th17, регуляторные Т (Treg) клетки и В-клетки адаптивной иммунной системы. Саркоидоз является полигенным, многофакторным заболеванием, при котором различные гены изменяют иммунные реакции на специфические антигенные стимулы [5, 8].

При саркоидозе эпителиоидно-клеточные гранулемы представляют собой хорошо сформированные структуры, компактное ядро которых состоит из макрофагов и клеток, происходящих из макрофагов (эпителиоидных и гигантских клеток), тесно связанных с CD4⁺ Т-лимфоцитами. Периферический компонент содержит лимфоциты CD8, клетки CD4⁺ FOXP3 + Treg, клетки Th17, В-лимфоциты и плазматические клетки, продуцирующие IgA. Характерной чертой — общей, но не специфичной для саркоидоза, является наличие

цитоплазматических включений, главным образом внутри многоядерных гигантских клеток [10]. Важно отметить, что саркоидные гранулемы особенно ярко выражены и имеют тенденцию к слиянию. Скопления гранул могут образовывать макроскопически видимые, но небольшие белые узелки (микроузлы) или большие массы (макроузлы) с относительной сохранностью промежуточной ткани [11].

При саркоидозе наблюдается возникновение иммунологического парадокса: признаки локального воспаления с участием Т-хелперов 1-го типа сосуществуют с периферической анергией, индуцированной Т-регуляторными клетками. Отличительной чертой активного саркоидоза является преобладающая экспрессия интерферона-гамма в пораженных органах при участии таких активных цитокинов, как IL-2, IL-12 и фактора некроза опухоли-альфа. Типичная для саркоидоза клональная амплификация CD4⁺ Т-клеток свидетельствует о том, что развитию заболевания способствует некий патогенный антиген. Развивающийся Т-клеточный альвеолит CD4⁺ служит биомаркером, отражающим усиление или снижение активности заболевания. Иммунная реакция продолжается даже после того, как потенциальный антиген/триггер исчез.

Несмотря на то, что не существует биомаркера специфичного для саркоидоза, при данном заболевании часто наблюдается поликлональная гипергаммаглобулинемия, но никогда не бывает низкого гамма-глобулина в крови при электрофорезе белков сыворотки. Также при подозрении на саркоидоз в его пользу может свидетельствовать гиперкальциемия с низким уровнем паратиреоидного гормона и нормальным или низким уровнем 25-гидроксикальциферола [12].

Некоторые исследования также указывают на значимость уровня сывороточного ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) для диагностики и определения активности статуса. АПФ может секретироваться моноцитами, макрофагами и эпителиоидными клетками и участвует в патогенезе саркоидоза как важный модулятор образования гранул, а также коррелирует с наличием гранул и радиологическими стадиями II и III [13]. Концентрации АПФ находятся под генетическим влиянием, поскольку полиморфизм инсерции/делеции в гене. У гомозиготных носителей делеции или инсерции экспрессируются самые высокие и самые низкие уровни АПФ соответственно, тогда как гетерозиготные люди имеют промежуточные уровни [14]. Низкая специфичность теста также обусловлена тем, что уровни сАПФ могут быть повышены как следствие дру-

гих воспалительных заболеваний (например, боррелиоза, гистоплазмоза, болезни Гоше и др.) [13]. Кроме того, уровни АПФ в сыворотке могут быть низкие, если пациент принимает лекарственные препараты — ингибиторы АПФ. Таким образом, вопрос, можно ли надежно использовать уровень сАПФ для диагностики саркоидоза и прогнозирования активного статуса заболевания, остается спорным, поскольку существует множество факторов, влияющих на этот показатель.

Однако Y. Zhou и соавторы в своем исследовании [15] выявили взаимосвязь между повышением показателя сАПФ и мультиорганным поражением. Уровни АПФ повышались у пациентов с поражением внегрудных лимфатических узлов, кожи, селезенки наряду с аномальным метаболизмом кальция.

Еще одним маркером, который предположительно может коррелировать с активностью заболевания, является сывороточный растворимый рецептор интерлейкина-2 (sIL-2R). После активации клетки Th1 усиливают экспрессию IL-2R на поверхности клеток и способны выделять sIL-2R в общий кровоток. Таким образом, повышенные уровни sIL-2R считаются маркером активации клеток Th1 при формировании и сохранении гранулемы [13]. Повышение уровня данного маркера не специфично для саркоидоза, так как обнаруживается и при других гранулематозных заболеваниях, гематологических злокачественных новообразованиях и различных аутоиммунных заболеваниях. Однако исследования показывают, что уровень sIL-2R может быть использован для прогноза прогрессирования или рецидива после прекращения терапии [13].

Особенности диагностики саркоидоза

Поскольку клинические проявления саркоидоза довольно разнообразны, как было описано выше, для его диагностики применяются различные инструментальные методы.

При саркоидозе легких чаще всего используют рентгенографию органов грудной клетки, на которой обнаруживаются отклонения от нормы в большинстве случаев. Также на основе данного обследования действует классификация Scadding, которая не только позволяет стадировать заболевание, но и стратифицировать риск неблагоприятного исхода. Однако рентгенография грудной клетки оказалась ненадежным предиктором нарушений функции легких при первоначальной оценке; она имеет более низкую чувствительность к паренхиматозным заболеваниям в сравнении с компьютерной томографией высокого разрешения. Компью-

терная томография обеспечивает более высокую диагностическую точность, поскольку может обнаружить малейшее поражение паренхимы, которое не проявляется на обычных рентгенограммах. Многочисленные исследования продемонстрировали значительную частоту паренхиматозных изменений на компьютерных томограммах у пациентов со стадией Scadding 0 или I [16].

Также всем пациентам с установленным или предполагаемым легочным саркоидозом необходимо выполнить исследование функций внешнего дыхания. Результаты функциональных тестов обычно коррелируют с общим процессом заболевания, но не всегда отражают рентгенологическую стадию. Ограничение легочных объемов, особенно форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ), является наиболее распространенной находкой при спирометрии. Соотношение объем форсированного выдоха за одну секунду ОФВ1/ФЖЕЛ может быть уменьшено в случае значительной бронхиальной деформации и стеноза вследствие легочного фиброза либо при диффузном бронхиальном гранулематозе, проксимальном эндобронхиальном стенозе, компрессии бронхов вследствие лимфаденопатии, гранулематозного бронхиолита или гиперреактивности бронхов [17].

Диагноз «саркоидоз» часто подтверждается по результатам анализа жидкости бронхоальвеолярного лаважа (ЖБАЛ), полученной при проведении бронхоскопии. При саркоидозе процент лимфоцитов часто увеличен. Особенно важным является лимфоцитоз $> 15\%$, а также повышение соотношения CD4/CD8 Т-клеток от 3,5 [13]. Однако эти параметры не являются специфичными для саркоидоза и не отражают тяжесть заболевания, но могут быть использованы в совокупности с другими методами исследований.

При подозрении на вовлечение сердца в патологический процесс трансторакальная эхокардиография является начальным методом визуализации, так как представляет собой наиболее доступный и неинвазивный метод. Обычно описываемые при саркоидозе эхокардиографические данные включают нарушения региональной подвижности стенок, аневризмы, истончение базальной перегородки, дилатацию левого желудочка и нарушение систолической или диастолической функции правого или левого желудочка [18]. Эти нарушения слишком неспецифичны, и нормальные результаты ЭхоКГ не могут исключать наличие саркоидоза у пациента. Однако трансторакальная эхокардиография может служить отличным методом скрининга для пациентов, имеющих саркоидные гранулемы в других органах.

Следующим методом в арсенале врача является магнитно-резонансная томография с контрастированием гадолинием. Основное преимущество МРТ сердца в диагностике саркоидоза сердца — выявление очагов позднего усиления гадолиния в миокарде [19]. Результаты могут включать регионарные аномалии движения стенок с неоднородным распределением, а также региональное увеличение интенсивности сигнала на T2 и задержку усиления гадолиния. Наиболее часто задействована межжелудочковая перегородка. Однако в процесс может быть вовлечен любой сегмент миокарда левого или правого желудочка: субэпикардиальный, трансмуральный или миокардиальный отделы [20]. Несмотря на то, что МРТ сердца является золотым стандартом диагностики саркоидоза сердца, она не позволяет отличить активное заболевание от неактивного [19]. Также стоит отметить, что магнитно-резонансная визуализация ограничена у пациентов с кардиостимуляторами или имплантируемыми кардиовертерами-дефибрилляторами, а использование гадолиния противопоказано пациентам с поздними стадиями заболеваний почек.

18F-ФДГ ПЭТ в диагностике сердечного саркоидоза имеет мало преимуществ, кроме более точного разделения активного и неактивного процессов, что важно при мониторинге эффективности терапии [20]. Однако при визуализации всего тела появляется возможность оценки экстракардиального саркоидоза, в том числе экстраторакального. Макрофаги и CD4 Т-лимфоциты экспрессируют на клеточной мембране транспортеры глюкозы, позволяющие субстратам, таким как ФДГ, проникать в клетки, которые способствуют гранулематозному воспалению при саркоидозе. В настоящий момент такие находки в основном случайны [21], так как ПЭТ является дорогостоящим исследованием.

Особенно трудно прогнозировать течение и тяжесть заболевания в дальнейшем с целью подбора терапии. В статье приведен клинический случай хронического течения саркоидоза с представлением данных иммунологического комплекса обследования после лечения и достижения условной стабилизации заболевания.

Клинический случай

Пациент Р., 33 года, предъявлял жалобы на кашель с мокротой с прожилками крови, слабость, одышку при ходьбе. В декабре 2018 года при проведении плановой флюорографии была выявлена лимфаденопатия. После чего выполнена МСКТ, по результатам которой обнаружены очаговые тени невысокой плотности по типу «матового стекла»; очаги сливаются в инфильтраты S6 пра-

вого легкого без четких контуров размерами 19 x 13 мм и 20 x 14 мм, в S3 левого легкого 11 x 11 мм и в S2 обоих легких. Был заподозрен саркоидоз II стадии, однако первоочередно необходимо было исключить диссеминированный туберкулезный процесс, поэтому пациент был направлен в противотуберкулезный диспансер по месту жительства для дообследования (рис. 1–4).

В противотуберкулезном диспансере проведено: проба с аллергеном туберкулезным рекомбинантным (отрицательная), микроскопия мокроты по Цилю-Нильсену, люминесцентная микроскопия двукратно (*M. tuberculosis* — не обнаружено). По результатам МСКТ органов грудной клетки было обнаружено расширение средостения и корней легких в обе стороны за счет увеличения лимфоузлов, во всех отделах легких выявлены многочисленные очаги и фокусы на фоне усиленного легочного рисунка с буллезными вздутиями.

Далее пациент был обследован в специализированном противотуберкулезном учреждении: выполнен ELISPO (отрицательный), фибробронхоскопия со смывами, чрезбронхиальная биопсия легких. В смывах ДНК *M. tuberculosis* не обнаружено, посевы отрицательные. По результатам биопсии выявлены эпителиоидные гранулемы без некрозов. Пациент был направлен в стационар общего профиля для дальнейшего обследования и наблюдения.

Спиральная компьютерная томография грудной клетки от 17.09.2019 выявила полигональные очаги с неровными контурами вдоль бронхососудистых пучков, в перициссуральных отделах легочных полей, сливающиеся в крупные инфильтраты, соответствующие картине саркоидоза II стадии. Увеличение внутригрудных лимфоузлов стало более выражено: паратрахеальные и трахеобронхиальные до 33 x 30 мм, слева от дуги аорты и аортального окна до 24 x 15 мм, бифуркационные до 34 x 32 x 17 мм, бронхолегочные с обеих сторон до 25 мм в наибольшем диаметре, надключичные до 9 мм в наибольшем диаметре. Жидкость в плевральных полостях не определялась. Отмечено значительное увеличение объема и интенсивности изменений в динамике. При выполнении этого исследования в верхних отделах живота было выявлено увеличение размеров печени и селезенки. После этой находки было сделано УЗИ брюшной полости: выявлена лимфаденопатия брюшной полости — лимфоузлы в воротах печени до 30 мм в диаметре, в сальнике — до 14 мм в диаметре.

Также во время этой госпитализации была выполнена бодиплетизмография: ОЕЛ — в пределах нормы, в ее структуре: ЖЕЛ в пределах нормы,

при тенденции ООЛ к снижению (в пределах условной нормы); воздушнонаполненность легких на уровне спокойного выдоха в пределах нормы, бронхиальное сопротивление при спокойном дыхании не увеличено, при оценке форсированного выдоха проходимость дыхательных путей в пределах нормы.

Повторно выполнена фибробронхоскопия с чрестрахеальной биопсией S3, S4, S5, S8 правого

легкого. Выявлены малые бугорковые изменения в бронхах диффузно, больше справа. Повторное гистологическое исследование этих образований показало многочисленные неказеофицированные гранулемы, состоящие из эпителиоидных и гигантских многоядерных клеток, местами сливающихся между собой, без некроза.

Пациент был обследован офтальмологом, кардиологом, отоларингологом. Дополни-

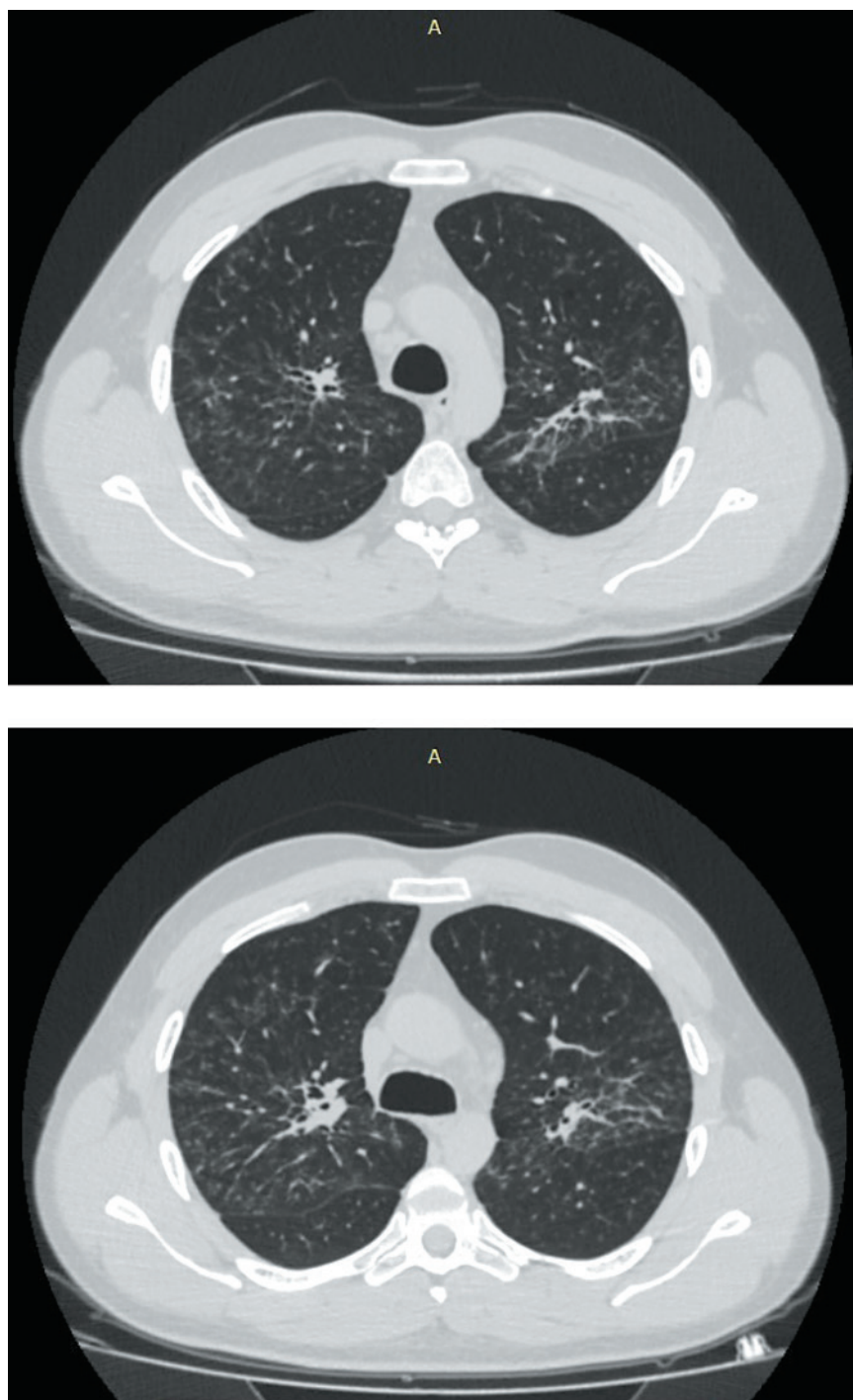


Рис. 1–2. КТ органов грудной клетки в 2018 году (диагностирован Саркоидоз II стадии)

Figure 1–2. Chest CT scan in 2018 (Sarcoidosis II st was diagnosed)

ных очагов гранулематоза не выявлено. Уровень АПФ составлял 59,90 ACE unit при норме 20–70 ACE unit. Так как данных за опухолевый процесс и туберкулез органов дыхания получено не было, по результатам комплексного обследования поставлен диагноз «генерализованный саркоидоз», гистологически верифицирован. При выписке пациенту назначен преднизолон в дозировке 5 мг четыре раза в день с постепенной отменой в течение

нескольких месяцев. Назначение данной схемы терапии согласно существующим рекомендациям не является обоснованным.

На фоне назначенного лечения отмечал положительную динамику в самочувствии — уменьшился кашель, улучшилось общее самочувствие, кровохарканье не рецидивировало. В 2020 году был госпитализирован в плановом порядке в городской стационар для обследования и подбора терапии.

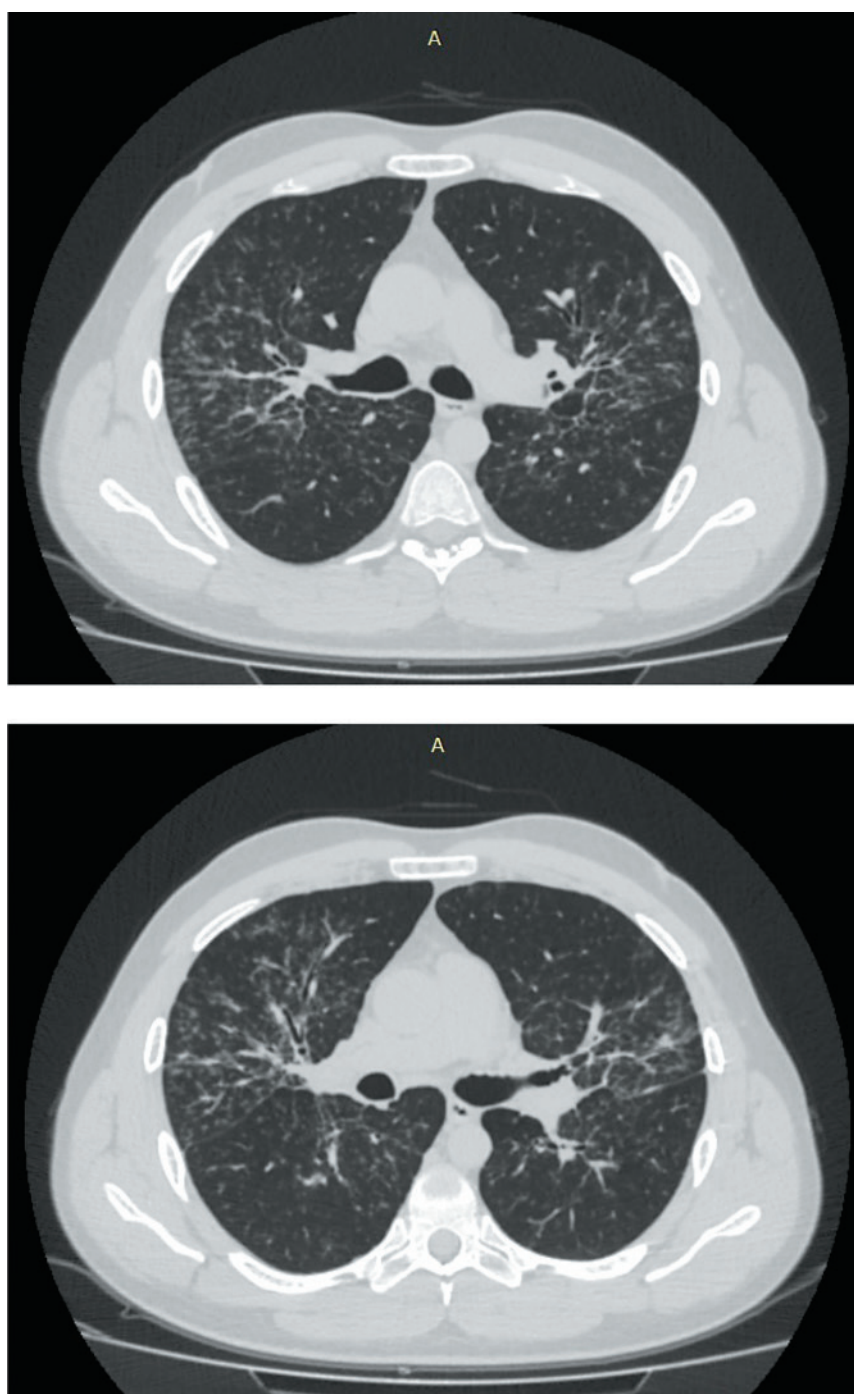


Рис. 3-4. КТ органов грудной клетки в 2018 году (диагностирован Саркоидоз II стадии)

Figure 3-4. Chest CT scan in 2018 (Sarcoidosis II st was diagnosed)

Выполнена бодиплетизмография, по результатам которой отмечено повышение потоковых показателей до пределов нормы при положительной динамике со стороны объемных и емкостных показателей: повышение ОЕЛ (+19 %) за счет повышения в ее структуре ООЛ (+6 %) и ЖЕЛ (+ 22%). МСКТ грудной клетки также показало положи-

тельную динамику течения заболевания. На МСКТ органов грудной клетки также отмечается положительная динамика (рис. 5, 6). По УЗИ брюшной полости отмечается положительная динамика: лимфоузлы в воротах печени уменьшились до 20 мм, однако гепатоспленомегалия сохраняется. Проведен курс плазмафереза с общей эксфузией 1 ОЦП.

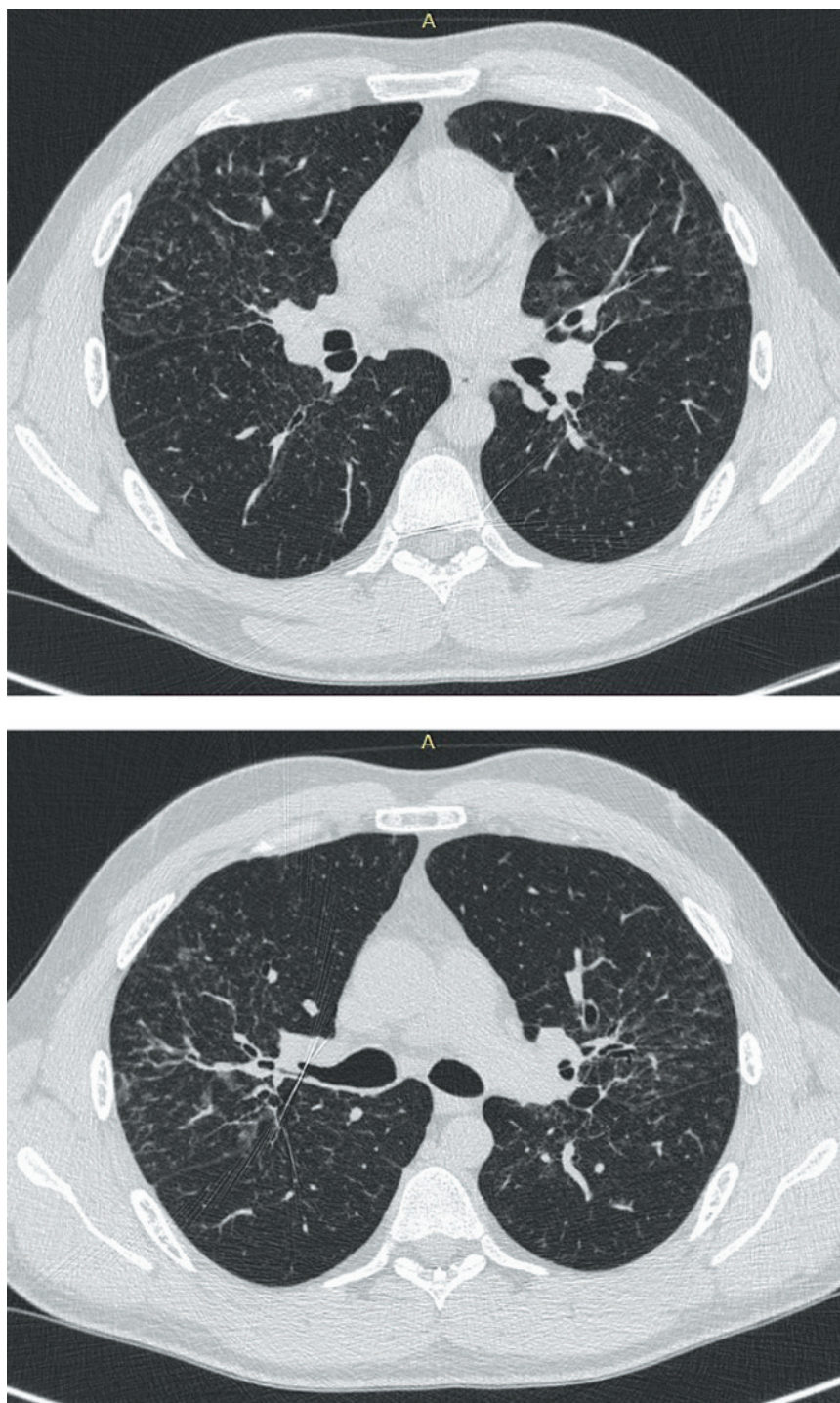


Рис. 5-6. КТ органов грудной клетки в динамике, 2019 год

Figure 5-6. Chest CT scan in dynamic, 2019

Рекомендовано продолжить прием преднизолона с постепенным снижением дозировки, повторить курс плазмафереза через 6–8 месяцев.

На фоне терапии в 2021 году продолжала наблюдаться положительная динамика. В результате выполнения КТ органов брюшной полости отмечено уменьшение печени до нормальных размеров, размеры селезенки также уменьшились. Однако сохранялась выраженная лимфаденопатия: превакцинальные лимфоузлы 8,4 x 7,4 мм, параортальные до 11 x 8,1 мм, верхние и нижние паратрахеальные до 14 x 8 мм, аксиальные лимфатические узлы 17 x 10 мм. По данным МСКТ была выставлена III стадия саркоидоза. Функции внешнего дыхания при этом сохранялись в пределах нормы. Проведен курс плазмафереза с целью коррекции и иммунокоррекции. В ноябре 2021 года пациент обратился с проявлением слабости.

В 2022 году пациент обратился повторно для контрольного обследования. Терапию не получал. Появились после перенесенной вирусной инфекции во время всплеска ковида жалобы на головокружение и периодический кашель. ПЦР на вирус SARS-CoV-2 — отрицательный. По КТ органов грудной клетки в динамике от 06.12.2022 — умень-

шение размеров внутригрудных лимфоузлов и мелкоочаговых изменений. По данным эхокардиографии от 02.12.2022 — без существенных изменений. По УЗИ органов брюшной полости вновь обнаружена спленомегалия, увеличение лимфоузлов в воротах печени до 12 мм в наибольшем диаметре. На МСКТ изменений «свежего» очагового и/или инфильтративного характера в паренхиме легких не обнаружено. Однако присутствовали признаки легочного фиброза: уплотненные и неравномерно утолщенные междольковые и внутридольковые перегородки, очаговые уплотнения линейной формы, участки фиброзной тяжистости; задние сегменты верхних долей легких несколько уменьшены в объеме. Пациенту был выполнен еще один курс плазмафереза.

В 2023 году на фоне клинического благополучия проведено комплексное обследование с включением углубленного иммунологического обследования (табл. 1).

Согласно представленным в таблице 1 данным, отмечается повышение уровня В-клеток общих (CD3-CD19+) — 29,87, а также повышение абсолютных значений Т-клеток, которые отражают наличие активного инфекционного и аутоиммунного воспалительного процесса.

Таблица 1. Результаты иммунологического исследования с определением уровня Т- и В-клеток

Table 1. Results of immunological study with determination of T- and B-cells level

Популяции и субпопуляции	Относительное количество позитивных клеток (%)		Абсолютное количество кл/л (x 10 ⁹)	
	Результат	Нормативные показатели	Результат	Нормативные показатели
В-клетки общие (CD3-CD19+)	29,87	7–17	0,345	0,111–0,376
NK (LGL) (CD3-CD16+CD56+)	8,48	8–17	0,098	0,123–0,369
Т-клетки общие (CD3+CD19-)	56,73	61–85	0,655	0,946–2,079
Т хелперы (CD3+CD4+)	20,09	35–55	0,336	0,576–1,336
Т цитотоксические (CD3+CD8+)	19,39	19–35	0,212	0,372–0,974
NKT клетки (CD16+CD56+CD3+)	10,72	0,5–6	0,124	0,007–0,165
Регуляторные Т-клетки (CD4+CD25brightCD127neg)	2,1	0,6–3,19	0,025	0,009–0,078
Расчетные показатели				
Показатель	Результат		Нормативные показатели	
Индекс соотношения (Тх/Тц)	1,04		1,5–2,6	
Контрольная сумма (Тк+Вк+NКк)	95,08		100 ± 5	

На контрольной МСКТ в 2023 году выраженной динамики не обнаружено. По УЗИ сохраняются спленомегалия и лимфаденопатия (увеличенный лимфоузел 18,5 x 7,3 мм в воротах печени без динамики), которые свидетельствуют о прогрессировании процесса. Данные обследования вполне коррелировали с иммунологическими изменениями. Полученные результаты могли быть показанием к назначению иммунотерапии с применением лефлуномида.

Заключение

Хронический саркоидоз представляет собой заболевание, характеризующееся хроническим воспалением и образованием специфических гранул, которое может затрагивать различные органы и системы организма [22, 23]. Несмотря на большое количество исследований, проведенных в данной области, многие аспекты все еще требуют дальнейшего изучения.

Особенности течения хронического саркоидоза могут различаться в зависимости от органа поражения и индивидуальных характеристик пациента. Существуют наиболее часто встречающиеся комбинации поражений органов, однако это не позволяет спрогнозировать дальнейшее развитие заболевания, а является лишь поводом более настороженно относиться к комплексному обследованию больного с впервые выявленным саркоидозом, а также к наблюдению пациента с длительно существующим поражением одного органа. Диагностика хронического саркоидоза представляет собой сложный процесс, требующий исключения других возможных причин патологических изменений.

На данный момент не существует биомаркера или комбинации биомаркеров, которые бы позволили надежно предсказать развитие и распространение патологического процесса. Для наиболее точной диагностики и определения прогноза необходимо существование одного серологического или визуализирующего маркера, обладающего достаточной чувствительностью и специфичностью. Однако точная этиология и патофизиология процесса недостаточно изучены, что затрудняет разработку такого маркера. Диагностика саркоидоза часто осложняется из-за многообразия вариантов течения и схожести с другими воспалительными и инфекционными заболеваниями.

Возможность применения данных иммунологического комплекса исследования с определением соотношения Т- и В-клеток, в том числе в сочетании с биомаркерами воспаления, может быть значимым критерием для назначения соответствующей иммунотерапии для лечения хронического саркоидоза.

Необходимо широкое применение новых методов диагностики, понимание особенностей течения саркоидоза и разработка эффективных стратегий мониторинга состояния пациентов с данным заболеванием.

Ограничения и перспективы

Очевидно, что в настоящей публикации нами предпринята попытка применить накопленный опыт иммунологического обследования больных саркоидозом для оценки хронического саркоидоза у пациента с длительным анамнезом и полученной как гормональной терапией, так и курсами плазмафереза. Без всякого сомнения, в дальнейшем необходимо проведение анализа иммунологических изменений у больных на этапе выявления и далее на всех этапах ведения, включая случаи без назначения гормональной терапии. Это бы обосновало или опровергло международное соглашение и рекомендации строго ограничить стероидную терапию (или, наоборот, обосновать ее раннее применение). Не менее интересно и значимо было бы оценить влияние плазмафереза на иммунный статус и последующую вероятность обострений.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Данные о прохождении Этического комитета

Исследование одобрено Локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ им В. А. Алмазова» Минздрава России (№ 09–02 от 02.09.2022). Пациентом подписано информированное согласие об участии в исследовании.

Список литературы / References

1. Visel AA, Visel IYu, Amirov NB. Epidemiology of sarcoidosis in the Russian Federation. The Bulletin of Contemporary Clinical Medicine. 2017; 10 (5): 66–73. In Russian [Визель А.А., Визель И.Ю., Амиров Н.Б. Эпидемиология саркоидоза в Российской Федерации. Вестник современной клинической медицины. 2017; 10(5):66–73] DOI: 10.20969/VSKM.2017.10(5).66-73.
2. Inaoka PT, Shono M, Kamada M, Espinoza JL. Host-microbe interactions in the pathogenesis and clinical course of sarcoidosis. J Biomed Sci. 2019; 26(1):45. DOI:10.1186/s12929-019-0537-6.
3. Schupp JC, Freitag-Wolf S, Bargagli E, et al. Phenotypes of organ involvement in sarcoidosis. Eur Respir J. 2018; 51(1):1700991. DOI: 10.1183/13993003.00991-2017.
4. Newman LS, Rose CS, Bresnitz EA, et al. A case control etiologic study of sarcoidosis: environmental

- and occupational risk factors. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(12):1324–30. DOI: 10.1164/rccm.200402-249OC.
5. Starshinova A, Zinchenko Y, Malkova A, et al. Sarcoidosis and Autoimmune Inflammatory Syndrome Induced by Adjuvants. *Life (Basel)*. 2023;13(4):1047. DOI: 10.3390/life13041047.
6. Polverino F, Balestro E, Spagnolo P. Clinical Presentations, Pathogenesis, and Therapy of Sarcoidosis: State of the Art. *J Clin Med*. 2020; 9(8):2363. DOI: 10.3390/jcm9082363.
7. Starshinova AA, Malkova AM, Zinchenko YuS, et al. Autoimmune component in the etiology of sarcoidosis. *uberculosis and Lung Diseases*, 2020, Vol. 98, No. 5, P. 54–62. In Russian [Старшинова А.А., Малкова А.М., Зинченко Ю.С. и др. Аутоиммунная составляющая в этиологии саркоидоза. *Туберкулез и болезни легких*. 2020; 98(5):54–62]. DOI: 10.21292/2075-1230-2020-98-5-54-62.
8. Gavrilova N, Zinchenko Y, Belyaeva E, et al. Small Fiber Neuropathy in Sarcoidosis. *Pathophysiology*. 2021; 28(4):544–550. DOI: 10.3390/pathophysiology28040035.
9. Crouser ED, Maier LA, Wilson KC, et al. Diagnosis and Detection of Sarcoidosis. An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020; 201(8):e26–e51. DOI: 10.1164/rccm.202002-0251ST.
10. Akao K, Minezawa T, Yamamoto N, et al. Flow cytometric analysis of lymphocyte profiles in mediastinal lymphadenopathy of sarcoidosis. *PLoS One*. 2018; 13(11):e0206972. DOI: 10.1371/journal.pone.0206972.
11. Obi ON, Saketkoo LA, Russell AM, et al. Sarcoidosis: Updates on therapeutic drug trials and novel treatment approaches. *Front Med (Lausanne)*. 2022; 9:991783. DOI: 10.3389/fmed.2022.991783.
12. Jeny F, Bernaudin JF, Cohen Aubart F, et al. Diagnosis issues in sarcoidosis. *Respir Med Res*. 2020; 77:37–45. DOI: 10.1016/j.resmer.2019.09.002.
13. Kraaijevanger R, Janssen Bonás M, Vorselaars ADM, et al. Biomarkers in the Diagnosis and Prognosis of Sarcoidosis: Current Use and Future Prospects. *Front Immunol*. 2020; 11:1443. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01443.
14. Ramos-Casals M, Retamozo S, Sisó-Almirall A, et al. Clinically-useful serum biomarkers for diagnosis and prognosis of sarcoidosis. *Expert Rev Clin Immunol*. 2019; 15(4):391–405. DOI: 10.1080/1744666X.2019.1568240.
15. Zhou Y, Chen X, Zhao M, et al. SACE and IL-2R as serum biomarkers for evaluation of multi-organ involvement and prognosis of sarcoidosis. *Respir Res*. 2023; 24(1):219. DOI: 10.1186/s12931-023-02524-0.
16. Levy A, Hamzeh N, Maier LA. Is it time to scrap Scadding and adopt computed tomography for initial evaluation of sarcoidosis? *F1000Res*. 2018; 7:F1000 Faculty Rev-600. DOI: 10.12688/f1000research.11068.1.
17. Sève P, Pacheco Y, Durupt F, et al. Sarcoidosis: A Clinical Overview from Symptoms to Diagnosis. *Cells*. 2021; 10(4):766. DOI: 10.3390/cells10040766.
18. Ramirez R, Trivieri M, Fayad ZA, et al. Advanced Imaging in Cardiac Sarcoidosis. *J Nucl Med*. 2019; 60(7):892–898. DOI: 10.2967/jnumed.119.228130.
19. Al Hayja MA, Vinjamuri S. Cardiac sarcoidosis: the role of cardiac MRI and 18F-FDG-PET/CT in the diagnosis and treatment follow-up. *Br J Cardiol*. 2023; 30(1):7. DOI: 10.5837/bjc.2023.007.
20. Strambu IR. Challenges of cardiac sarcoidosis. *Front Med (Lausanne)*. 2023; 10:999066. DOI: 10.3389/fmed.2023.999066.
21. Vender RJ, Aldahham H, Gupta R. The role of PET in the management of sarcoidosis. *Curr Opin Pulm Med*. 2022; 28(5):485–491. DOI: 10.1097/MCP.0000000000000892.
22. Kim J, Dwivedi G, Boughton BA, et al. Advances in cellular and tissue-based imaging techniques for sarcoid granulomas. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2024; 326(1):C10–C26. DOI: 10.1152/ajpcell.00507.2023.
23. Tana C, Donatiello I, Caputo A, et al. Clinical Features, Histopathology and Differential Diagnosis of Sarcoidosis. *Cells*. 2021 Dec 26;11(1):59. DOI: 10.3390/cells11010059.

Информация об авторах:

Берг Елизавета Евгеньевна, студент 6 курса медицинского факультета ИМО ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Кудрявцев Игорь Владимирович, к.б.н., заведующий лабораторией клеточной иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»;

Кудлай Дмитрий Анатольевич, д.м.н., член-корреспондент РАН, профессор кафедры фармакологии Института фармации ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет); профессор кафедры фармакогнозии и промышленной фармации факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО МГУ им. М. В. Ломоносова; ведущий научный сотрудник лаборатории персонализированной медицины и молекулярной иммунологии № 71 ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России;

Старшинова Анна Андреевна, д.м.н., профессор кафедры факультетской терапии с клиникой, начальник Управления научными исследованиями ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Authors information:

Elizaveta E. Berg, 6-th year student, medical faculty, Almazov National Medical Research Centre;

Igor V. Kudryavtsev, PhD., Head of laboratory, laboratory of cellular immunology, Institute of Experimental Medicine;

Dmitry A. Kudlay, DMedSci, MD, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, Professor of the Department of Pharmacology, Institute of Pharmacy, Sechenov First Moscow State Medical University, (Sechenov University); Professor of the Department of Pharmacognosy and Industrial Pharmacy, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University; Leading Researcher, Laboratory of Personalized Medicine and Molecular Immunology, NRC Institute of Immunology FMBA of Russia;

Anna A. Starshinova, DMedSci, MD, pulmonologist, Head of the research department of the Almazov National Medical Research Centre.

EFFICACY OF 4-(2-(4-NITROPHENYL)-2-OXOETHYL)-1-(THIETANE-3-YL)-1H-1,2,4-TRIAZOL-4 BROMIDE IN THE RAT MODEL OF INFERIOR VENA CAVA THROMBOSIS

Yi Wang¹, Nailya R. Bulatova², Elena E. Klen³, Galina A. Rozit³,
Irina L. Nikitina³, Lyudmila V. Startseva³, Yulia A. Bogdanova³,
Vlas S. Shchekin³, Aleksandr V. Samorodov³

Corresponding author:

Aleksandr V. Samorodov,
Bashkir State Medical University,
Lenina str., 3, Ufa, Russia, 450008.
E-mail: AVSamorodov@gmail.com

¹ Hangzhou Normal University, Hangzhou, China

² The University of Jordan, Amman, Jordan

³ Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

Received 17 November 2023; accepted
27 November 2023.

Abstract

Introduction. According to WHO, acute disorders of cerebral circulation are anticipated to become a predominant contributor to the global disease burden by 2030. The comprehensive management of vascular depression entails not only the use of antidepressants but also fundamental interventions. The development of a novel molecule based on thietane-containing heterocycles, merging the attributes of an antidepressant and an antiplatelet agent, holds promise for enhancing therapeutic efficacy in patients with acute cerebrovascular accidents through multimodal action.

Objective is to conduct a preclinical assessment of 4-(2-(4-nitrophenyl)-2-oxoethyl)-1-(thietane-3-yl)-1H-1,2,4-triazole-4-th bromide concerning model thrombosis in rats.

Materials and Methods. The investigation involved the evaluation of thrombosis processes and the haemostasis system in rats subjected to complete occlusion of the inferior vena cava within 24 hours post-thrombosis induction. Techniques employed included thromboelastography, Born aggregometry, standard clotting assays to appraise the coagulation facet of haemostasis, and morphological examinations.

Results. The results demonstrate that 4-(2-(4-nitrophenyl)-2-oxoethyl)-1-(thietane-3-yl)-1H-1,2,4-triazole-4-th bromide mitigates thrombosis mass, restores platelet hyper aggregation, and counters hypercoagulation observed in acute inferior vena cava thrombosis in rats. Comparative analysis with reference drugs substantiates the superior effectiveness of the chosen compound in thrombosis prevention.

Conclusion. The preclinical investigation of 4-(2-(4-nitrophenyl)-2-oxoethyl)-1-(thietane-3-yl)-1H-1,2,4-triazole-4-th bromide unveils a fusion of established antidepressant and antithrombotic activities, laying groundwork for further drug development endeavours.

Key words: antithrombotic activity, haemostasis system, pharmacological activity, thietane-containing heterocycles.

For citation: Wang Yi, Bulatova NR, Klen EE, et al. Efficacy of 4-(2-(4-nitrophenyl)-2-oxoethyl)-1-(thietane-3-yl)-1h-1,2,4-triazol-4 bromide in the rat model of inferior vena cava thrombosis. *Translational Medicine*. 2024; 11(1): 19-27. DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-1-19-27. EDN: AMKUTB

ЭФФЕКТИВНОСТЬ 4-(2-(4-НИТРОФЕНИЛ)-2-ОКСОЭТИЛ)-1-(ТИЕТАН-3-ИЛ)-1Н-1,2,4-ТРИАЗОЛ-4-ИЯ БРОМИДА НА МОДЕЛИ ТРОМБОЗА НИЖНЕЙ ПОЛОЙ ВЕНЫ У КРЫС

Ванг Ю.¹, Булатова Н. Р.², Клен Е. Э.³, Розит Г. А.³, Никитина И. Л.³,
Старцева Л. В.³, Богданова Ю. А.³, Щекин В. С.³, Самородов А. В.³

¹ Ханчжоуский педагогический университет, Ханчжоу, Китай

² Иорданский университет, Амман, Иордания

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Уфа, Россия

Контактная информация:

Самородов Александр Владимирович,
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России,
ул. Ленина, д. 3, Уфа, Россия, 450008.
E-mail: avsamorodov@gmail.com

Статья поступила в редакцию
17.11.2023, принята к печати 27.11.2023.

Резюме

Введение. По прогнозам ВОЗ, к 2030 году острые нарушения мозгового кровообращения будут занимать лидирующие позиции среди причин бремени болезней в глобальном масштабе. Комплексная терапия сосудистой депрессии включает не только антидепрессанты, но и базисные средства для коррекции последствий нарушений мозгового кровотока, в том числе с антиагрегантной активностью. В этой связи разработка новой молекулы на основе тиетансодержащих гетероциклов, сочетающей в себе свойства антидепрессанта и антиагреганта, позволит качественно усилить эффективность терапии пациентов с острым нарушением мозгового кровообращения за счет мультимодального действия.

Цель работы. Провести доклиническую оценку 4-(2-(4-нитрофенил)-2-оксоэтил)-1-(тиетан-3-ил)-1Н-1,2,4-триазол-4-ия бромида в отношении модельного тромбоза у крыс.

Материалы и методы. Изучены процессы тромбообразования и система гемостаза крыс, подвергшихся полной окклюзии нижней полой вены на первые сутки после тромбоза. Проводились тромбоэластография, агрегатометрия по Born, стандартные клоттинговые тесты по оценке коагуляционного звена гемостаза и морфологические исследования.

Результаты. Установлено, что 4-(2-(4-нитрофенил)-2-оксоэтил)-1-(тиетан-3-ил)-1Н-1,2,4-триазол-4-ия бромида снижает массивность тромбоза, нормализует показатели гиперагрегации тромбоцитов и гиперкоагуляции, возникающие при остром тромбозе нижней полой вены у крыс. Сопоставление с препаратами сравнения подтверждает высокую эффективность выбранного соединения в качестве средства профилактики тромбоза.

Заключение. Таким образом, в результате доклинических исследований 4-(2-(4-нитрофенил)-2-оксоэтил)-1-(тиетан-3-ил)-1Н-1,2,4-триазол-4-ия бромида установлено сочетание ранее определенной антидепрессивной и антитромботической активности, что может послужить основой для дальнейшей разработки лекарственных препаратов.

Ключевые слова: антитромботическая активность, производные 3-замещенных тиетанов, система гемостаза, фармакологическая активность.

Для цитирования: Ванг Ю., Булатова Н.Р., Клен Е.Э. и др. Эффективность 4-(2-(4-нитрофенил)-2-оксоэтил)-1-(тиетан-3-ил)-1Н-1,2,4-триазол-4-ия бромида на модели тромбоза нижней полой вены у крыс. Трансляционная медицина. 2024; 11(1): 19-27. (In English). DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-1-19-27. EDN: AMKUTB

Introduction

By 2030, acute cerebral vascular accidents (ACVA) are projected to emerge as a leading cause of global disease burden, according to WHO forecasts [1, 2]. A hallmark manifestation of vascular brain damage is the onset of depressive disorders, which accompany both acute and chronic disorders of cerebral circulation. This depressive state not only diminishes the patient's quality of life but also complicates the treatment of underlying vascular diseases, elevating the risks of stroke and mortality [3]. Epidemiological data indicate that one in every three stroke survivors experiences a clinically significant decrease in mood [4]. Combining antidepressants with fundamental methods of correcting impaired cerebral blood flow can notably augment their therapeutic efficacy, enhancing cognitive functions and alleviating behavioural and psychological symptoms [5, 6]. However, the effectiveness of antidepressants in treating vascular depression tends to be somewhat lower compared to conventional depression. Moreover, a greater severity of accompanying cognitive disorders serves as a predictive factor for an inadequate response to therapy. Consequently, the comprehensive management of vascular depression encompasses not only antidepressants but also basic interventions to rectify the consequences of cerebral blood flow disorders, including those with antiplatelet activity [7]. In this context, the development of a novel molecule based on thietane-containing heterocycles, amalgamating the attributes of an antidepressant and an antiplatelet agent, promises to significantly enhance therapy effectiveness for ACVA patients through its multimodal action. The synthesis of analogues and derivatives of established drugs represents a contemporary trend in the realm of new drug development. Earlier investigations targeting potential antiplatelet agents among newly synthesised 3-substituted thietanes have revealed pronounced antiplatelet activity in select compounds of this series *in vitro* [8]. This paper delineates the therapeutic and prophylactic efficacy findings of 4-(2-(4-nitrophenyl)-2-oxoethyl)-1-(thietane-3-yl)-1H-1,2,4-triazol-4-bromide [4] (referred to as compound I) and drugs utilised in clinical practice concerning diurnal thrombosis of the inferior vena cava in rats.

Materials and Methods

Experimental procedures adhered to the guidelines outlined in the "Guidelines for the preclinical study of new pharmacological substances". The study involved 84 adult male rats of white non-linear strain, aged between 3.5 and 4.0 months. The animals were housed under standard vivarium conditions with a tempera-

ture of 21 ± 1.5 °C, humidity ranging from 57 % to 60 %, and exposed to natural lighting. Prior to experimentation, the rats underwent a 24-hour fasting period with continuous access to water [9]. All experimental protocols complied with the International Recommendations of the European Convention for the Protection of Vertebrates for Experimental Animals, the regulations of laboratory practices during preclinical studies in the Russian Federation, and adhered to the Ministry of Health and Social Development of Russia Order No. 708n dated 23.08.2010, known as the "Rules of Laboratory Practice" (GLP). Ethical approval for the study was obtained from the ethics committee of the Bashkir State Medical University (protocol No. 2, dated November 12, 2020).

Rats were stratified into specific experimental groups, each comprising 20 individuals: intact rats, sham-operated rats (subjected solely to anaesthesia and median laparotomy), saline-treated rats, rats treated with pentoxifylline, rats treated with acetylsalicylic acid, rats treated with sodium enoxaparin, and rats treated with compound I. Considering the principle of chemical similarity and the potential application of compound I in depression management associated with cerebral circulation disorders, 3,7-dimethyl-1-(5-oxohexyl)xanthine was selected as an analogue drug at this stage of the study ("Pentoxifylline," JSC "Dalkhimpharm," Russia) [10].

Intravenous administration of the test substance and comparator drugs was conducted one hour prior to modelling thrombosis of the inferior vena cava, following established protocols [11]. Dosages were equimolar to the dose of pentoxifylline, which suppresses platelet aggregation in intact rats by 50 % with intravenous administration ($ED_{50} = 40.0$ mg/kg). The control group received an appropriate volume of sterile 0.9 % sodium chloride solution (500 ml infusion solution, B. Brown Medical, Russia, series N 22530629, valid until: 06.2024).

Following the conclusion of the experiments, the efficacy of preventive measures was assessed by measuring the masses of blood clots and evaluating haemostasis system indicators. Under general anaesthesia, blood samples were collected from the jugular vein through venesection [12]. A 3.8 % sodium citrate solution (stabiliser) was used for venous blood collection.

Platelet aggregation function was assessed using the Born method [13] on an aggregometer "AT-02" (LLC "NPF Meditsina-Tekhnika," Russia). Adenosine diphosphate (ADP) at a concentration of 20 µg/ml and collagen at 5 mg/ml were employed as inducers of platelet aggregation at various stages of the study.

The effect on the coagulation component of haemostasis (activated partial thromboplastin time (APTT),

prothrombin time (PT), fibrinogen levels), D-dimer levels, and antithrombin III (ATIII) activity were measured using an automated selective haemostasis analyser STA-Compact (F. Hoffmann-La Roche Ltd., France) with original reagent kits manufactured by Roche Diagnostics (F. Hoffmann-La Roche Ltd., France) [14].

Thromboelastography was performed using a TEG 5000 device (Haemoscope Corporation, USA) to analyse thromboelastograms, determining parameters such as clotting tendency (R), platelet and fibrinogen functional activity (MA, Angle), fibrinolysis activity (CLT), and physicomechanical properties of clots (G) [15, 16].

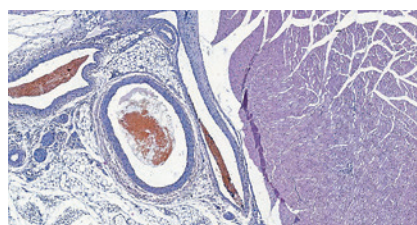
Under general anaesthesia, rats underwent surgical access to the abdominal cavity to extract formed thrombi from the inferior vena cava. Thrombus mass was measured immediately post-extraction, with dry thrombus mass determined after 7 days of drying at 37 °C.

Post-experiment, tissue sampling was conducted for morphological studies. Cross-sections of the substance were incised at intervals of 0.5 cm, with fragments featuring visible thrombosis of the inferior vena cava selected for histological processing. Tissues were fixed in 10 % buffered neutral formalin, underwent standard histological treatment, embedded in paraffin, and sectioned to a thickness of 4 microns for staining with haematoxylin-eosin.

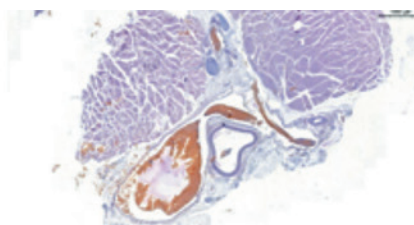
To mitigate the uncontrolled influence of local temperature on chemical and biochemical processes, all laboratory procedures were performed under infrared monitoring of local temperature dynamics using a ThermoTracer TH9100XX thermal imager (NEU, USA), with ambient temperatures maintained between 24–25 °C. Temperature range for thermal imaging camera was set at 25–36 °C [17–19].

Comparison drugs used in the experiments included: pentoxifylline (solution for injection 20 mg/ml-5 ml, JSC “Borisovsky Plant of medicines” (Belarus, Borisov), series N 290918, valid until: 08.2023), acetylsalicylic acid (Pharmaceutical factory Shandong Xinhua Pharmaceutical Co., LTD, China, series N 10L18, valid until: 06.2024), and enoxaparin sodium (“Kleksan”®, solution for injection 40 mg/ml-1 ml, Sanofi-Aventis France, France, series N 5LM42, valid until 11.2023).

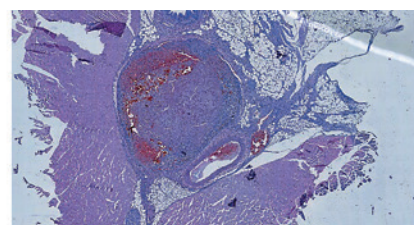
Statistical analysis of study results was performed using the Statistica 10.0 statistical package (StatSoft Inc, USA). Normality of data distribution was assessed using the Shapiro-Wilk criterion. Descriptive statistics were presented as median and interquartile interval. Analysis of variance was conducted using the Kraskel-Wallis criterion (for independent observations) and Friedman test (for repeated observations), with a critical significance level set at $p < 0.05$ [20].



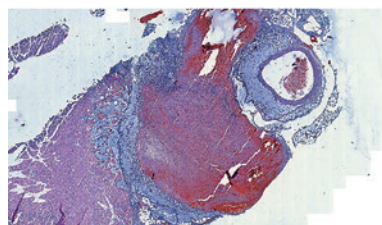
A



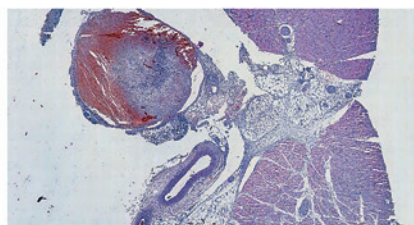
B



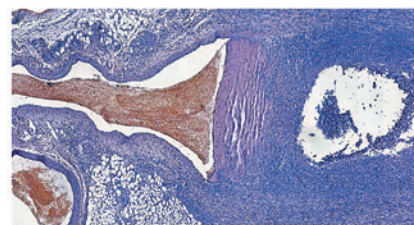
C



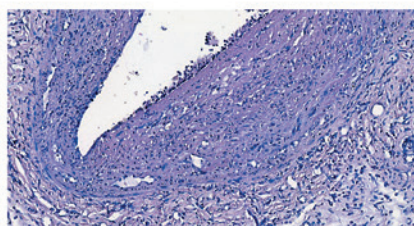
D



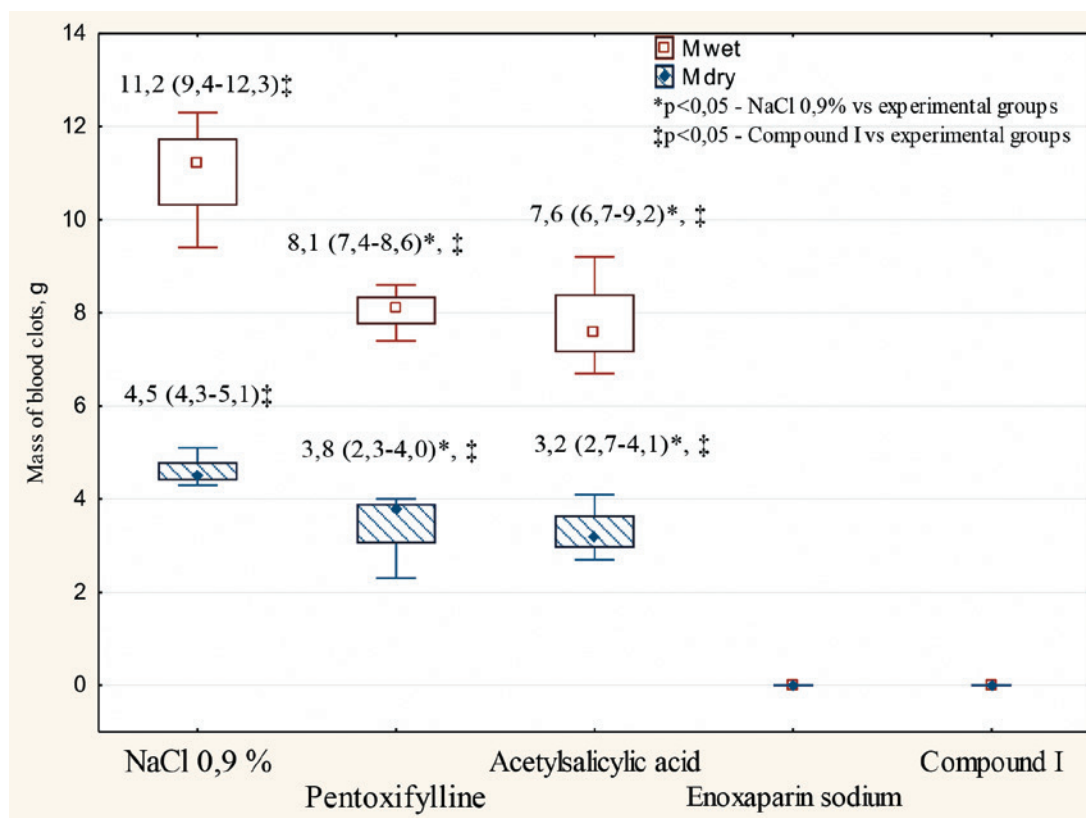
E



F



G



H

Figure 1. Sections of the inferior vena cava of the intact rats (A) and group of falsely operated rats (B), Saline Solution group (C), Pentoxifylline (D), Acetylsalicylic acid (E), Enoxaparin sodium (F) and Compound I (G) and results of weighing blood clots from the inferior vena cava (H):

A, B — Transverse section microphotos represented by the inferior vena cava, aorta, nerve bundles, and surrounding soft tissues, Stained Hematoxylin-Eosin. $\times 20$; C–D — Transverse section of the inferior vena cava and aorta. Venous-type vessel with mixed thrombus of layered architecture and foci of organisation. Intima is thickened due to mucoid swelling, media is represented by 2–3 layers of smooth myocytes, adventitia is made by fibrous connective tissue. Particularly, Figure D shows pronounced perivascular plasmatic tissue impregnation, Stained Hematoxylin-Eosin. $\times 50$; E–F — there is visually thickened wall of the inferior vena cava. In the vicinity there is an enlarged lymphoid nodocity with purulent cells in the centre. Stained Hematoxylin-Eosin. $\times 20$. Figure G show the wall of the vena cava with residual agglutinated platelets and leukocytes along the intima of the vessel. No thrombotic masses are visualised in the lumen, Stained Hematoxylin-Eosin. $\times 200$.

Рис. 1. Срезы нижней полой вены intactных крыс (A), группы ложнооперированных крыс (B), группы физиологического раствора (C), пентоксифиллина (D), ацетилсалициловой кислоты (E), эноксапарина натрия (F), соединения I (G) и результаты взвешивания тромбов нижней полой вены (H):

A, B — микрофотографии поперечного сечения, представленные нижней полой веной, аортой, нервными пучками и окружающими мягкими тканями, окрас гематоксилин-эозин $\times 20$; C–D — поперечный срез нижней полой вены и аорты. Сосуд венозного типа со смешанным тромбом слоистой архитектуры и очагами организации. Интима утолщена за счет слизистой оболочки, медиа представлена 2–3 слоями гладких миоцитов, адвентиция представлена волокнистой соединительной тканью. В частности, на рисунке D показана выраженное периваскулярное плазматическое пропитывание ткани, окрас гематоксилин-эозин. $\times 50$; E–F — визуально утолщена стенка нижней полой вены. Рядом — увеличенный лимфоидный узелок с гнойными клетками в центре. Окрас гематоксилин-эозин $\times 20$. На рисунке G представлена стенка полой вены с остаточными агглютинированными тромбоцитами и лейкоцитами по интима сосуда. В просвете тромботические массы не визуализируются. Окрас гематоксилин-эозин, $\times 200$.

Results

The study revealed that in the group of falsely operated rats, no blood clot formation occurred in the intact inferior vena cava. Median values of fresh and dry blood clot masses in rats treated with saline solution were 11.2 g and 4.5 g, respectively (Table 1). Treatment with acetylsalicylic acid and pentoxifylline significantly reduced the mass of fresh blood clots by 1.5 times ($p < 0.05$) compared to the control. Administration of sodium enoxaparin or compound I effectively prevented blood clot formation under conditions of complete occlusion, as no thrombosis was observed upon visual examination of the inferior vena cava.

Macroscopic assessments were corroborated by histological examinations. On the first day of the experiment, histological analysis in the control groups revealed parietal thrombosis of the inferior vena cava accompanied by interstitial tissue oedema (Figure 1). Conversely, no blood clots were detected in rats treated with compound I or enoxaparin sodium.

D-dimer levels in the saline solution group increased significantly to 6.4 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$), while antithrombin III (ATIII) activity decreased by 31.5 % ($p < 0.05$) compared to intact rats, reflecting increased

consumption in the thrombosis area. Pentoxifylline and acetylsalicylic acid reduced ATIII activity by an average of 20.4 % ($p < 0.05$) relative to intact rats, with D-dimer levels comparable to the saline solution group. Conversely, D-dimer and ATIII levels in the enoxaparin sodium and compound I groups corresponded to those of intact animals.

Platelet aggregation normalisation to intact levels was observed with pentoxifylline, acetylsalicylic acid, and enoxaparin sodium treatments. Compound I significantly reduced platelet aggregation by 1.3 times ($p < 0.05$) compared to intact animals for ADP and collagen.

Thromboelastography of rats in the physiological control group indicated haemostasis system activation towards coagulation system and fibrinolysis activation (Table 2). Platelet functional activity, represented by maximum amplitude (MA), increased by 1.3 times ($p < 0.05$), while the coagulation enzymatic component (R) decreased by 2.2 times ($p < 0.05$). The clotting potential index (CI) was 3.6 ($p < 0.05$), indicative of pronounced hypercoagulation. Clot strength remained consistent with control values.

Thromboelastography data for pentoxifylline and acetylsalicylic acid demonstrated effective correction

Table 1. Indicators of antithrombotic activity of compound I and comparison drugs in the simulation of inferior vena cava thrombosis in rats, Me [0.25–0.75]

Таблица 1. Показатели антитромботической активности соединения I и препаратов сравнения при моделировании тромбоза нижней полой вены у крыс, Me [0,25–0,75]

№	Group	ADP, mm	Collagen, mm	AT (III), %	D-dimers, $\mu\text{g/ml}$
1	Intact rats	44,8 (43,9–54,2)	44,1 (42,7–46,9)	96,1 (94,8–97,1)	2,3 (1,8–2,5)
2	A group of falsely operated rats	46,5 $\ddagger$ (43,2–56,9)	43,4 $\ddagger$ (40,2–44,8)	95,9 (94,8–98,2)	2,8 (2,3–2,9)
3	NaCl 0,9 %	67,4*, $\ddagger$ (58,2–71,9)	64,5*, $\ddagger$ (59,2–71,8)	65,8*, $\ddagger$ (64,4–77,1)	6,4*, $\ddagger$ (5,8–6,6)
4	Pentoxifylline	47,8 $\ddagger$ (46,3–54,1)	42,9 $\ddagger$ (40,8–44,5)	76,5*, $\ddagger$ (74,7–80,5)	6,3*, $\ddagger$ (5,9–6,8)
5	Acetylsalicylic acid	48,2 $\ddagger$ (45,1–52,6)	43,6 $\ddagger$ (38,7–45,9)	76,8*, $\ddagger$ (73,1–78,4)	5,7*, $\ddagger$ (5,5–6,2)
6	Enoxaparin sodium	42,8 $\ddagger$ (41,4–49,1)	42,4 $\ddagger$ (40,3–45,6)	96,2 (93,7–97,1)	2,7 (2,5–2,9)
7	Compound I	36,8* (34,6–38,5)	37,4* (34,3–39,4)	94,9 (93,8–96,9)	3,3 (2,2–4,0)

Note: * $p < 0,05$ — group of intact rats vs experimental groups, $\ddagger p < 0,05$ — compound I vs experimental groups. M is the mass of blood clots.

of hypercoagulation and platelet hyper aggregation induced by thrombosis, returning values to those of intact animals. Enoxaparin sodium treatment led to parameters indicative of decreased coagulation component activity, with lengthened K and R parameters ($p < 0.05$) and reduced MA ($p < 0.05$). Compound I prophylactic administration normalised thromboelastography parameters, decreasing MA by 46.9 % ($p < 0.05$) compared to the saline solution group and by 31.0 % ($p < 0.001$) compared to intact rats. Coagulation index (CI) values indicated a shift towards hypo coagulation and its value lies in range of -0.8/-1.3.

Discussion

The emergence of organic depression in recent years, often linked with vascular brain diseases, necessitates a multimodal approach to treating patients with cerebral circulatory disorders. This approach involves not only antidepressants but also antiplatelet agents. The development of novel drugs based on thietane-containing heterocycles, with both antiaggrega-

tional and antidepressant properties, represents a contemporary trend in pharmacology due to their broad pharmacological activity and high safety profile. Notably, some newly synthesised 3-substituted thietanes have exhibited significant antiaggregational activity in vitro [13].

In this study, 4-(2-(4-nitrophenyl)-2-oxoethyl)-1-(thietane-3-yl)-1H-1,2,4-triazole-4-bromide (compound I), possessing antidepressant activity, demonstrated notable antithrombotic efficacy in a rat model of inferior vena cava thrombosis. Both therapeutic and prophylactic administrations of compound I resulted in substantial reductions in platelet aggregation and improvements in thromboelastography parameters compared to pentoxifylline, acetylsalicylic acid, and enoxaparin sodium. Considering its chemical structure affinity, it is plausible to hypothesise that compound I's antiplatelet activity may be akin to other xanthine derivatives, potentially involving platelet adenosine receptors and cyclic AMP concentration regulation [21]. However, further investigations employing recep-

Table 2. Evaluation of the effectiveness of compound I and comparison drugs to prevent thrombosis of the inferior vena cava according to thromboelastography, Me [0.25–0.75]

Таблица 2. Оценка эффективности соединения I и препаратов сравнения для профилактики тромбоза нижней полой вены по данным тромбоэластографии, Me [0,25–0,75]

Indicator	Control (intact)	S. NaCl 0,9 %	Pentoxifylline	Acetylsalicylic acid	Enoxaparin sodium	Compound I
R, min	12,1 (10,8–13,3)	5,6* (4,5–7,1)	12,7 (10,2–14,1)‡	11,4 (9,7–13,2)‡	6,7 (6,1–7,5)*	7,4 (6,8–7,7)
K, m	4,5 (4,2–5,7)	5,2 (3,3–6,1)	5,6 (5,2–6,4)	4,7 (4,3–5,7)	6,8* (6,3–7,4)	4,6 (4,1–5,9)
Angle, deg	44,2 (42,1–45,8)	71,2* (71,4–75,4)	42,3 (41,0–44,9)	44,8 (41,5–46,9)	38,5 (37,2–42,1)	42,3 (39,6–43,4)
MA, mm	56,1 (52,4–57,9)	72,8*, ‡ (69,4–73,5)	52,4‡ (49,6–54,1)	55,1‡ (49,1–57,3)	52,9‡ (49,7–54,7)	38,7* (31,6–41,5)
G, dyne/cm ²	6,2 (5,8–6,5)	6,3‡ (5,7–7,1)	5,4‡ (5,1–7,2)	6,1‡ (5,4–7,1)	3,6* (3,3–4,7)	4,3* (3,7–4,8)
CL30, %	92,8 (88,4–94,5)	100,0 (100,0–100,0)	95,3 (91,4–98,2)	91,4 (89,5–93,1)	86,5 (84,4–92,3)	82,7 (81,6–91,4)
LY30, %	28,7 (27,3–30,5)	84,1* (83,7–93,5)	28,5 (27,5–32,1)‡	25,2 (21,6–27,4)	32,7 (29,8–34,1)	28,7 (27,5–30,4)
CLT, min	46,2 (44,5–47,1)	27,5*, ‡ (23,4–28,4)	46,4‡ (45,2–49,4)	45,8‡ (44,2–47,7)	30,2* (23,2–38,1)	31,4* (29,6–33,1)
CI	0,4 (0,2–0,7)	3,6*, ‡ (2,8–4,1)	0,5‡ (0,4–0,6)	0,4‡ (0,3–0,6)	- 1,2‡ (-1,0/-1,4)	-1,2 (-0,8/-1,3)

Note: * $p < 0,05$ — group of intact rats vs experimental groups, ‡ $p < 0,05$ — compound I vs experimental groups. M is the mass of blood clots.

tor tropicity determination techniques are warranted to elucidate the precise mechanism of action.

Conclusion

Intravenous administration of compound I effectively prevented thrombosis in our experiment, surpassing comparison drugs in key haemostasis system markers. These findings suggest that 4-(2-(4-nitrophenyl)-2-oxoethyl)-1-(thietane-3-yl)-1H-1,2,4-triazole-4-bromide holds promise as a highly effective antithrombotic agent.

Финансирование / Funding

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00144 (<https://rscf.ru/project/23-25-00144>). / The research was carried out at the expense of a grant from the Russian Science Foundation No. 23-25-00144 (<https://rscf.ru/project/23-25-00144>). /

Список литературы / References

1. Saini V, Guada L, Yavagal DR. Global Epidemiology of Stroke and Access to Acute Ischemic Stroke Interventions. *Neurology*. 2021; 97(20):6–16. DOI: 10.1212/WNL.00000000000012781.
2. Feigin VL, Brainin M, Norrving B, et al. World Stroke Organization (WSO): Global Stroke Fact Sheet 2022. *Int J Stroke*. 2022; 17(1):18–29. DOI: 10.1177/17474930211065917.
3. Medeiros GC, Roy D, Kontos N, et al. Post-stroke depression: A 2020 updated review. *Gen Hosp Psychiatry*. 2020; 66:70–80. DOI: 10.1016/j.genhosppsych.2020.06.011.
4. Robinson RG, Jorge RE. Post-Stroke Depression: A Review. *Am J Psychiatry*. 2016; 173(3):221–31. DOI: 10.1176/appi.ajp.2015.15030363.
5. Almeida OP, Jones J, Hankey GJ, et al. Boon or bane? Using antidepressants after stroke. *Maturitas*. 2021; 153:68–70. DOI: 10.1016/j.maturitas.2021.02.005.
6. Villa RF, Ferrari F, Moretti A. Post-stroke depression: Mechanisms and pharmacological treatment. *Pharmacol Ther*. 2018; 184:131–144. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2017.11.005.
7. Guo J, Wang J, Sun W, et al. The advances of post-stroke depression: 2021 update. *J Neurol*. 2022; 269(3):1236–1249. DOI: 10.1007/s00415-021-10597-4.
8. Khaliullin FA, Klen EE, Nikitina IL, et al. Synthesis and antidepressant activity of thietane-containing 4-(2-oxo-2-phenylethyl)-1H-1,2,4-triazol-4-ium bromides. *Chemical-pharmaceutical journal*. 2022; 56(12): 27–34. DOI: 10.1007/s11094-023-02832-1.
9. Kiani AK, Pheby D, Henehan G, et al. INTERNATIONAL BIOETHICS STUDY GROUP. Ethical considerations regarding animal experimentation. *J Prev Med Hyg*. 2022; 63(2 Suppl 3): 255–E266. DOI: 10.15167/2421-4248/jpmh2022.63.2S3.2768.
10. Trental. Product monography. Sanofi-aventis Canada Inc. www.sanofi.ca/products/en/trental (16 December 2008.)
11. Zhou J, May L, Liao P, et al. Inferior vena cava ligation rapidly induces tissue factor expression and venous thrombosis in rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009; 29(6):863–9. DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.185678.
12. Wang L, Guo J, Zhong X, et al. Repetitive Blood Sampling from the Subclavian Vein of Conscious Rat. *J Vis Exp*. 2022; 9(180). DOI: 10.3791/63439.
13. BORN GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 1962; 194:927–9. DOI: 10.1038/194927b0.
14. Burton AG, Jandrey KE. Use of Thromboelastography in Clinical Practice. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2020; 50(6): 1397–1409. DOI: 10.1016/j.cvsm.2020.08.001.
15. Chen F, Zhang L, Bai X, et al. Clinical Application of Thromboelastography in Acute Ischemic Stroke. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2022 Jan-Dec;28:10760296221131801. DOI: 10.1177/10760296221131801.
16. Bellesini M, Robert-Ebadi H, Combescure C, et al. D-dimer to rule out venous thromboembolism during pregnancy: A systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost*. 2021; 19(10):2454–2467. DOI: 10.1111/jth.15432.
17. Kander T, Schött U. Effect of hypothermia on haemostasis and bleeding risk: a narrative review. *J Int Med Res*. 2019; 47(8):3559–3568. DOI: 10.1177/0300060519861469.
18. Keith MT, Chalifoux NV, Buriko Y. The effect of analytical temperature on thromboelastography tracings in dogs. *J Vet Diagn Invest*. 2022; 34(1): 10–14. DOI: 10.1177/10406387211042922.
19. Yazar H, Özdemir F, Köse E. Effect of Centrifuge Temperature on Routine Coagulation Tests. *Acta Haematol*. 2018; 139(3):158–163. DOI: 10.1159/000486271.
20. Murakami Y, Takeuchi Y. [Medical Statistics as a Foundation of Biomedical Research]. *Brain Nerve*. 2022; 74(4): 341–351. DOI: 10.11477/mf.1416202041.
21. Kubacka M, Mogilski S, Bednarski M, et al. Antiplatelet Effects of Selected Xanthine-Based Adenosine A2A and A2B Receptor Antagonists Determined in Rat Blood. *Int J Mol Sci*. 2023;24(17):13378. DOI:10.3390/ijms241713378.

Authors information:

Yu Wang, PhD, Professor, Hangzhui Normal University, Institute of Pharmacy; Nailya R. Bulatova, PhD, MD, Professor of Pharmacology and Therapy, Department of Biopharmacy and Clinical Pharmacology, Institute of Pharmacy, University of Jordan;

Elena E. Klen, Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor, Head of the Department of Pharmaceutical Chemistry with a course in Analytical and Toxicological Chemistry, Bashkir State Medical University;

Galina A. Rozit, Head of the Laboratory of Small Targeted Molecules, Bashkir State Medical University;

Irina L. Nikitina, Doctor of Medical Sciences, Professor of the Department of Pharmacology with a course of Clinical Pharmacology, Bashkir State Medical University;

Lyudmila V. Startseva, Candidate of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor of the Department of Pharmacology with a course of Clinical Pharmacology, Bashkir State Medical University;

Yulia A. Bogdanova, Candidate of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor of the Department of Pharmacology with a course of Clinical Pharmacology, Bashkir State Medical University;

Vlas S. Shchekin, Head of the scientific and morphological laboratory, Bashkir State Medical University;

Aleksandr V. Samorodov, Doctor of Medical Sciences, Head of the Department of Pharmacology with a Course of Clinical Pharmacology, Bashkir State Medical University.

Информация об авторах:

Ванг Юи, PhD, профессор Ханчжоуского педагогического университета, Институт фармации;

Булатова Наиля Рафаэлевна, PhD, MD, профессор фармакологии и терапии, кафедра биофармации и клинической фармакологии Института фармации Иорданского университета;

Клен Елена Эдмундовна, д.фармацевт.н., профессор, заведующая кафедрой фармацевтической химии с курсом аналитической и токсикологической химии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России;

Розит Галина Анатольевна, заведующая лабораторией малых таргетных молекул ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России;

Никитина Ирина Леонидовна, д.м.н., профессор кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России;

Старцева Людмила Викторовна, к.фармацевт.н., доцент кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России;

Богданова Юлия Альбертовна, к.фармацевт.н., доцент кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России;

Щекин Влас Сергеевич, заведующий научно-морфологической лабораторией ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России;

Самородов Александр Владимирович, д.м.н., заведующий кафедрой фармакологии с курсом клинической фармакологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России.

ПРОТОТИПЫ «ЛОВУШЕК» ВИРУСА SARS-COV-2 НА ОСНОВЕ ЭНТЕРОСОРБЕНТОВ

Шульмейстер Г. А.¹, Чебуркин Ю. В.¹, Чекменева Ю. Д.²,
Едемская Е. В.², Бондаренко А.Б.^{1,5}, Постнов В. Н.^{1,3},
Королев Д. В.^{1,4}

Контактная информация:

Едемская Елена Владимировна,
СПбГЭТУ «ЛЭТИ»,
ул. Профессора Попова, д. 5, лит. Ф,
Санкт-Петербург, Россия, 197022.
E-mail: evedemskaya@stud.etu.ru

Статья поступила в редакцию 11.12.2023
и принята к печати 24.03.2024.

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр
имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский
государственный электротехнический университет «ЛЭТИ»
имени В. И. Ульянова (Ленина)», Санкт-Петербург, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский
государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет имени академика
И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

⁵ Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский
государственный педиатрический медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Санкт-Петербург, Россия

Резюме

Актуальность. Несмотря на продолжающиеся мутации вируса SARS-CoV-2, возбудителя заболевания COVID-19, его механизм проникновения в клетку остается неизменным, что можно использовать для создания «ловушек» вируса. Лекарственные препараты с внутривенным введением усугубляют симптомы заболевания. Альтернативными средствами борьбы с вирусом могут стать энтеросорбенты, синтезированные на наноразмерных носителях, перехватывающие SARS-CoV-2 непосредственно в месте его внедрения в организм, а именно в органах желудочно-кишечного тракта. **Цель.** Изучение и отработка методов синтеза различных видов спейсера на поверхности наночастиц аэросила, иммобилизация модельного белка с возможностью использования соединений в качестве энтеросорбента вируса SARS-CoV-2. **Материалы и методы.** В качестве наночастиц-носителей использовался аэросил марки А-200. Химический состав полученных соединений изучался с помощью ИК-Фурье спектроскопии. Спектры поглощения образцов исследовались спектрофотометрически. Размеры нанобъектов определялись методом динамического рассеяния света. Общее содержание аминокислот определялось титриметрическим способом и по емкости флуоресцентного красителя — индоцианина зеленого, количество меркаптогрупп определялось аргентометрией и с помощью метода Кункеля, Баркли и Горина. Проведено качественное

и количественное определение хемосорбции белка на синтезированных частицах. **Полученные результаты.** Разработаны прототипы энтеросорбентов вируса SARS-CoV-2 на частицах аэросила. Синтезированы аминок-, меркапто- и тозилый спейсеры, способные связываться с разными функциональными группами белков, изучены физико-химические свойства модифицированных наночастиц. Эффективность спейсеров проверена на модельном белке — альбумине. **Заключение.** Дальнейшие исследования могут быть направлены на разработку перорального препарата, уменьшающего вирусную нагрузку SARS-CoV-2 на органы желудочно-кишечного тракта.

Ключевые слова: белки-«ловушки», иммобилизация белка, синтез спейсера, энтеросорбент, SARS-CoV-2.

Для цитирования: Шульмейстер Г.А., Чебуркин Ю.В., Чекменева Ю.Д. и др. Прототипы «ловушек» вируса SARS-CoV-2 на основе энтеросорбентов. Трансляционная медицина. 2024; 11(1): 28-44. DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-1-28-44. EDN: AQPOQR

PROTOTYPES OF SARS-COV-2 VIRUS “TRAPS” BASED ON ENTEROSORBENTS

Galina A. Shulmeyster¹, Yuri V. Cheburkin¹, Yulia D. Chekmeneva²,
Elena V. Edemskaya², Andrey B. Bondarenko^{1,5},
Viktor N. Postnov^{1,3}, Dmitry V. Korolev^{1,4}

¹ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg Electrotechnical University “LETI”, Saint Petersburg, Russia

³ Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

⁴ Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

⁵ Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Elena V. Edemskaya,
Saint Petersburg Electrotechnical University
“LETI”,

Professor Popov str., 5-F, Saint Petersburg,
Russia, 197022.

E-mail: evedemskaya@stud.etu.ru

Received 11 December 2023; accepted
24 March 2024.

Abstract

Background. Despite the ongoing mutations of the SARS-CoV-2 virus, the causative agent of the COVID-19 disease, its mechanism of entry into the cell remains unchanged, which can be used to create virus “traps”. Intravenous medications aggravate the symptoms of the disease. An alternative means of combating the virus could be enterosorbents synthesized on nanosized carriers that intercept SARS-CoV-2 directly at the site of its introduction into the body, namely in the gastrointestinal tract. **Objective.** To study and refine the methods of synthesis of different spacer types on the surface of aerosil nanoparticles, immobilization of model protein with the possibility of using the compounds as enterosorbents of SARS-CoV-2 virus. **Design and method.** Aerosil A-200 grade was used as carrier nanoparticles. The chemical composition of the obtained compounds was studied by FTIR spectroscopy. The absorption spectra of the samples were studied using a spectrophotometer. The dimensions of nano-objects were determined by dynamic light scattering. Qualitative and quantitative determination of protein chemisorption on the synthesized particles was carried out. **Results.** Prototypes of SARS-CoV-2 enterosorbents on aerosil particles were developed. The efficacy of the spacers was tested on the model protein, albumin. **Conclusion.** Further research may be directed to the development of an oral drug that reduces the viral load of SARS-CoV-2.

Key words: enterosorbents, protein immobilization, SARS-CoV-2, spacer synthesis, trap proteins.

For citation: Shulmeyster GA, Cheburkin YuV, Chekmeneva YuD, et al. Prototypes of SARS-CoV-2 virus "traps" based on enterosorbents. Translational Medicine. 2024; 11(1): 28-44. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-1-28-44. EDN: AQPQQR

Список сокращений: АПТЭС — (3-аминопропил)триэтоксисилан, НЧК (SiNP) — наночастицы кремнезема, ACE2 — Angiotensin-converting enzyme 2/ангиотензинпревращающий фермент-2, COVID-19 — Coronavirus Disease 2019/заболевание, вызванное коронавирусом, DPP4 — дипептидилпептидаза-4, SARS-CoV-2 — Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2/тяжелый острый респираторный синдром, связанный с коронавирусом, TMPRSS2 — Transmembrane protease, serine 2/мембраносвязанная сериновая протеаза, продукт гена TMPRSS2.

Введение

Причиной развития инфекции COVID-19 является вирус SARS-CoV-2 из рода бетакоронавирусов, относящегося к семейству коронавирусов. SARS-CoV-2, как и родственные ему SARS-CoV и MERS-CoV, способен вызывать тяжелое заболевание, сопровождающееся дыхательной недостаточностью и атипичной формой респираторного дистресс-синдрома у взрослых, тогда как другие бетакоронавирусы — HKU1, NL63, OC43 и 229E — связаны с легким течением респираторной инфекции [1]. Для проникновения в клетку-мишень вирус SARS-CoV-2 связывается с экстрацеллюлярными доменами клеточных рецепторов, например, ACE2 (ангиотензинпревращающий фермент-2, АПФ-2) и DPP4 (дипептидилпептидаза-4, CD26), расположенных на поверхностных мембранах альвеолярного эпителия легких, а также клеток других органов, включая сердце, почки и тонкую кишку. Фермент ACE2 важен для регуляции уровня ангиотензина-II, связанного с контролем артериального давления. Белок DPP4 участвует в некоторых важных физиологических процессах, например, в регуляции метаболизма глюкозы, в апоптозе и в клеточных сигнальных каскадах [2, 3].

Другим важным участником процесса внедрения вируса в клетку являются внеклеточные протеазы: TMPRSS2 и FURIN (фурин). TMPRSS2 и фурин — трансмембранные сериновые протеазы, экспрессирующиеся во многих тканях и органах и участвующие в протеолизе различных белков, в том числе и вирусных. Оба этих фермента способны активировать гликопротеин-S «шипа»

вируса SARS-CoV-2 путем протеолитического расщепления, что позволяет вирусу связаться с поверхностным рецептором ACE2 и проникнуть внутрь клетки-мишени [4, 5].

Из данных литературы известно, что ACE2 является пептидазой, способной расщеплять несколько пептидов ренин-ангиотензиновой системы, а также другие субстраты. ACE2 почти не присутствует в свободном кровотоке, зато широко представлен в органах, например, почках, желудочно-кишечном тракте, а также легких, хотя и с невысоким уровнем экспрессии [6, 7].

Экстрацеллюлярный домен ACE2 ранее был идентифицирован как рецептор для S-белка «шипа» SARS-CoV [8], а в 2019 г. и для SARS-CoV-2 [9]. Новый коронавирус эволюционно связан с коронавирусом летучих мышей, который также использует мембраносвязанный ACE2 в качестве рецептора [10]. Растворимая форма ACE2 не имеет связи с мембраной и в небольших количествах циркулирует в крови [11]. Было сделано предположение, что свободную форму внеклеточной части ACE2 можно использовать в качестве конкурентного перехватчика некоторых эволюционно близких коронавирусов, предотвращая связывание вирусной частицы с поверхностно-связанным полноценным рецепторным белком ACE2 [12, 13].

Проведенные исследования *in vitro* показали, что репликация SARS-CoV-2 блокируется растворимой формой ACE2 в клеточной линии почек обезьяны Vero-E6 [14, 15]. Более того, сообщалось, что химерный ACE2, несущий молекулу с Fc-частью иммуноглобулина, нейтрализует SARS-CoV-2 *in vitro* [16], а SARS-CoV-2 способен связываться с ACE2 с высокой аффинностью [17, 18].

Другим, не менее интересным белком из ряда потенциальных «ворот» для входа вируса SARS-CoV-2 в клетку является рецептор DPP4 (дипептидилпептидаза-4, или CD26), который ранее был идентифицирован как «ворота» для коронавирусов других типов [3]. При сравнении структуры гликозилирования гликопротеинов SARS-CoV-2 и SARS-CoV (патоген Ближневосточного респираторного синдрома (MERS)) было установлено, что у этих двух вирусных штаммов существует ряд подобных консервативных сайтов гликозилиро-

вания, что предполагает схожую тропность к одной и той же мишени. Однако у вируса COVID-19 имеется несколько уникальных сайтов гликозилирования по сравнению с гликопротеином «шипа» SARS-CoV [19]. Не исключено, что подобные различия в гликановом маскирующем паттерне белков «шипа» обоих вирусов могут определять разницу в иммунном ответе хозяина, а их сходство — в способности проникать в клетку, используя одни и те же рецепторные «входные ворота» [20]. Известно, что рецептор CD26 (DPP4) клетки-хозяина действует как ключевой иммунорегляторный фактор при вирусных инфекциях [21].

Потенциальные молекулярные взаимодействия между спайковым белком вируса SARS-CoV-2 и человеческим DPP4 были изучены на вычислительной модели с использованием серверов Cluspro protein docking (www.cluspro.bu.edu) и Frodock (frodock.chaconlab.org), а затем валидированы в трехмерной модели структур этих белков. Комплексная модель S-гликопротеина SARS-CoV-2 и DPP4 показала большую зону взаимодействия между обоими белками, что подразумевает возможный тесный контакт между петлями домена S1 в моделируемой структуре и поверхностью DPP4. Исследования связывания DPP4 показали, что некоторые аминокислотные остатки контактируют с белком «шипа» вируса Bat-CoV (возбудителя MERS). Можно предположить, что SARS-CoV-2 может иметь общие способы заражения с SARS-CoV (возбудитель TORS) и MERS-CoV (возбудитель MERS) [19, 22, 23].

Представленные выше литературные данные определили наш выбор в качестве основных ловушек для перехвата вируса SARS-CoV-2 рецепторных доменов белков ACE2 и DPP4, которые взаимодействуют с N-концевыми доменами S-гликопротеина «шипа», что в первую очередь и обеспечивает перенос коронавируса внутрь клетки-мишени. Однако для связывания с экстрацеллюлярными доменами ACE2 или DPP4 недостаточно обыкновенной ко-локализации белков вируса и рецептора. По аналогии с уже хорошо изученными вирусами гриппа белок «шипа» коронавируса должен быть праймирован (далее: активирован) ферментами клетки-мишени [24].

Хотя SARS-CoV-2 очень похож по структуре и патогенности на близкородственный ему SARS-CoV, однако самые важные структурные белки, S-гликопротеины «шипа», у этих вирусов различаются [1]. Присутствие фуриноподобного сайта расщепления (детерминанты вирулентности, называемой polybasic cleavage site) в SARS-CoV-2 облегчает активацию S-белка и может повысить эффективность распространения SARS-CoV-2

по сравнению с другими бета-коронавирусами [25]. Этот сайт распознавания (S1/S2) — консервативный участок белка, расположенный между S1 и S2 субъединицами белка «шипа» коронавируса и состоящий всего из 4–7 аминокислот (SPRRAR↓S) [26]. Функциональная роль: место расщепления вирусного белка протеазами — фурином (FURIN) и TMPRSS2, с последующей его активацией [27, 28]. Эксперименты с SARS-CoV показали, что расщепление фурином на стыке S1/S2 усиливает межклеточные взаимоотношения, не влияя на проникновение вируса [29].

Попытки использовать рекомбинантный ACE2 для перехвата вируса были начаты сразу, как только стало известно о его аффинности к S-гликопротеину вируса [12, 16, 30]. В связи с тем, что вирус показал способность эффективно ускользать от нейтрализующих антител с помощью быстрого накопления мутаций S-гликопротеина, использование рекомбинантного растворимого ACE2 в качестве перехватывающей ловушки вызвало пристальный интерес многих научных групп [31–33]. Однако в результате проведенного в 2021 г. международного мультицентрового рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого клинического исследования II фазы по изучению эффективности и безопасности человеческого рекомбинантного растворимого ACE2 для лечения больных с COVID-19 было обнаружено повышение показателей системного воздействия препарата на организм, что проявлялось стойким снижением уровня ангиотензина-II и повышением ангиотензина(1–7) и ангиотензина(1–5), а также высоким уровнем побочных явлений. Смертность в группе исследуемого препарата и вовсе оказалась выше, чем в группе плацебо [34].

Учитывая изложенные выше сложности, с которыми столкнулись исследователи влияния рекомбинантного ACE2 на организм больного, нами было принято решение уйти от разработки рекомбинантной «ловушки» для внутривенного введения и использовать схему перехвата SARS-CoV-2 непосредственно в месте внедрения вируса, а именно в просвете кишечника.

Целью являлась отработка метода синтеза различных видов спейсера на поверхности наночастиц аэросила и иммобилизация модельного белка с перспективой использования в качестве энтеросорбента SARS-CoV-2.

Материалы и методы

Исходные наночастицы

В качестве исходных наночастиц использовался аэросил марки А-200 (НЧК, SiNP) производства фирмы Degussa, Германия.

Был выбран именно аэросил, потому что во многих странах он разрешен как самостоятельный энтеросорбент.

Синтез спейсера, заканчивающегося аминогруппой

В грушевидную колбу емкостью 50 мл помещали навеску 1 г аэросила А-200, заливали 23,75 мл сухого бензола и 1,25 мл модификатора — (3-аминопропил)триэтоксисилана (АПТЭС, APTES, Sigma-Aldrich, США).

Реактор помещали в термостатируемую ячейку, подключенную к циркуляционному термостату (LT-105a, Loip, Санкт-Петербург, РФ), и оставляли кипятиться с обратным холодильником в течение 2 ч. при температуре кипения бензола.

Синтез спейсера, заканчивающегося меркаптогруппой

Синтез спейсера заканчивающегося меркаптогруппой, проводили аналогично аминспейсеру. В качестве модификатора использовался 3-меркаптопропилтриметоксисилан (МПМС, MPMS, Sigma-Aldrich, США), в качестве растворителя — бензол либо о-ксиллол, а реакционная смесь барбатиновалась инертным газом аргоном.

Синтез спейсера, заканчивающегося тозильной группой

Синтез спейсера, заканчивающегося тозильной группой, проводился в три этапа.

На первом этапе 1 г аэросила помещался в круглодонную трехгорлую колбу, заливались 24 мл сухого бензола и добавлялся 1 мл 3-хлорпропилтрихлорсилана (ХПХС, CPCS, Sigma-Aldrich, США). Смесь кипятилась с обратным холодильником в течение 2 ч. при подаче инертного газа аргона с использованием колбонагревателя DZTW 100MI (Китай). В третий отвод колбы вставляли термометр. Затем смесь промывалась пятикратно циклогексаном, замораживалась и лиофилизировалась при помощи лиофильной сушилки VaCo-2 (ZirBus, Германия).

На втором этапе полученный лиофилизат подвергался гидролизу в псевдокипящем слое в токе азота парами воды.

На третьем этапе полученный продукт помещался в круглодонную трехгорлую колбу, заливался раствором 1 г пара-толуолсульфонилхлорида (p-Toluenesulfonyl chloride, Sigma-Aldrich, США) в 14 мл дихлорметана. Смесь кипятилась с обратным холодильником в течение 2 ч. при подаче инертного газа аргона с использованием колбонагревателя DZTW 100MI (Китай). В третий отвод

колбы вставляли термометр. Затем смесь промывалась пятикратно циклогексаном, замораживалась и лиофилизировалась при помощи лиофильной сушилки VaCo-2 (ZirBus, Германия).

Физико-химические свойства

ИК-спектр был снят на приборе Shimadzu FTIR-8400S (Shimadzu, Япония) с использованием следующих параметров: аподизация — Happ-Genzel, число сканирований — 45, разрешение — $4,0\text{ см}^{-1}$. Спектры получали в диапазоне волновых чисел от 7500 до 300 см^{-1} , проба готовилась с сухим КВг. При анализе спектров выбирался наиболее информативный участок.

Спектры поглощения образцов исследовались на двухлучевом спектрофотометре Unico 2802S (Unico Sys, США).

Размеры нанообъектов определялись методом динамического рассеяния света (DLS) на приборе Zeta Sizer Ultra (Malvern, США).

Определение емкости спейсеров

Общее содержание аминогрупп в образце определяли титрометрическим способом. К полученным частицам приливали 1 мл 0,1 н соляной кислоты и оставляли на 15 мин. для взаимодействия с аминогруппами на их поверхности, периодически встряхивая. Затем полученная суспензия центрифугировалась в течение 5 мин. на скорости 3000 мин^{-1} для отделения надосадочной жидкости, которую далее титровали щелочью (0,1 н NaOH) с кислотно-основным индикатором метилоранжем 0,1 мг/мл. По количеству этой щелочи рассчитывалось конечное содержание аминогрупп.

Общее содержание аминогрупп не дает информации о том, сколько действующего вещества можно сорбировать на модифицированную аминспейсерами поверхность, поэтому проводилось определение количества доступных аминогрупп по емкости флуоресцентного красителя — индоцианина зеленого (ИЦЗ). Для этого к 50 мг аэросила, покрытого оболочкой с аминспейсером, приливали 4 мл раствора ИЦЗ, концентрацией 1 мг/мл. Для сорбции суспензию оставляли на 1 ч. на орбитальном шейкере LS-220 (ЛОИП, РФ) с частотой вращения 300 мин^{-1} . Затем пятикратно промывали от излишков ИЦЗ центрифугированием.

Для определения иммобилизованного индоцианина проводили десорбцию, залив 10 мл 0,1 н раствора NaOH к промытому осадку и оставив на 15 мин. на шейкере. После чего центрифугированием осаждали частицы, а для анализа с по-

мощью спектрофотометра брали надосадочную жидкость, которую разбавляли, чтобы максимум относительной оптической плотности был не более 1 на длине волны 700 нм [35].

Определение общего количества меркапто-групп определялось аргентометрией (вариант косвенного титрования). В 15 мл воды растворяли исследуемое вещество. Добавляли 1 мл 0,04 % (0,4 мг/мл) бромтимолового синего и перемешивали. Затем заливали 5 мл 0,1М нитрата серебра, перемешивали. Далее начинали титрование 0,1М раствором гидроксида натрия, разбавленным в 10 раз для удобства, от желтого цвета надосадочного раствора до достижения не исчезающего зеленого (pH = 7). Один мл 0,1М раствора натрия гидроксида соответствует 11,42 мг препарата [36].

Для определения количества доступных для хемосорбции меркаптогрупп на поверхности аэросила использовался метод Кункеля, Бакли и Горина. Готовили дитизонат серебра. В мерную колбу на 100 мл засыпали 0,01 г дитизона и заливали четыреххлористый углерод. По возможности растворяли краситель и получали раствор темно-зеленого цвета, при этом водный раствор дитизона ярко-розового оттенка [37]. Далее, растворив в 50 мл воды 0,5 г нитрата серебра, в коническую колбу на 250 мл поместили эти два раствора, при смешивании ничего не происходило, поскольку это две несмешивающиеся жидкости. Затем добавляли 2,5 мл 5М H_2SO_4 и интенсивно перемешивали 5–10 мин., получали слой красно-оранжевой маслянистой жидкости внизу и воду сверху, а на границе раздела сред скапливались нерастворенные и непрореагировавшие вещества. Далее с помощью делительной воронки промывали водой дитизонат серебра: сливали тяжелую красно-оранжевую жидкость (дитизонат серебра), удаляли остатки, заливали чистую воду к дитизонату серебра и повторяли так 3 раза. Получившийся дитизонат серебра, объемом менее 100 мл, хранили в холодильнике. Для проведения измерений получившийся дитизонат серебра разбавляли в 5 раз, получая его максимум показателя оптической плотности относительно CCl_4 близким к единице на спектрофотометре с кварцевыми кюветами при nm [38].

Иммобилизация белка

Иммобилизация модельного белка альбумина проводилась следующим образом. В конические пробирки, емкостью 15 мл, помещали 50 мг модифицированных НЧК и добавляли 1 мл водного раствора альбумина определенной концентрации. После чего образцы перемешивались с помощью

орбитального шейкера с частотой 300 мин.⁻¹ на протяжении 2 ч. при комнатной температуре. Затем растворы промывали дистиллированной водой с помощью центрифугирования. Надосадочная жидкость каждого образца после первой процедуры промывки анализировалась спектрофотометрическим методом на содержание альбумина.

Качественное и количественное определение белка

Для качественного определения хемосорбированного альбумина брали 20 мг модифицированных НЧК, в полипропиленовой пробирке емкостью 15 мл смешивали с 2 мл 2%-ного водного раствора альбумина. Пробирку оставляли на 30 мин. на орбитальном шейкере LS 220 при частоте вращения 300 мин.⁻¹. Затем проводили трехкратную промывку по следующей схеме. Центрифугировали на скорости 2000 мин.⁻¹ в течение 2 мин. Супернатант сливали, а полученный осадок снова разбавляли водой до 6 мл. Для проведения нингидринового теста небольшое количество осадка смешивали с 2%-ным раствором нингидрина в ацетоне и нагревали на водяной бане в течение 10 мин. О наличии сорбированного белка судили по изменению цвета раствора с прозрачного на синий [39].

Определение содержания белка альбумина в процессе работы проводилось с помощью красителя бромкрезолового зеленого (БКЗ) [40]. Изначально предполагалось, что в пробе не находилось веществ, которые могли бы помешать анализу [41].

Для приготовления цитрата натрия в колбу на 500 мл помещали 10,508 г лимонной моноводной кислоты, 100 мл NaOH и доводили до объема 500 мл водой. Далее в колбе 100 мл смешивали 61,1 мл цитрата натрия и 38,9 мл NaOH, тщательно перемешивали. В стакан 250 мл помещали полученную смесь, 10 мкл ПАВ (ТВИН 80) и 18 мг бромкрезолового зеленого (БКЗ). Смесь перемешивали до растворения красителя, далее для ускорения процесса подогревали на водяной бане до 70 °C с интенсивным перемешиванием. Получали раствор чайного цвета.

Для проб брали по 0,5 мл полученного раствора (надосадочной жидкости) и 4,5 мл буфера. Наставляли раствор в течение 10 мин. и измеряли спектры поглощения против буфера с БКЗ. Измерения проводились на длине волны 628 нм в трех повторностях, и вычислялось среднее квадратическое отклонение, которое было минимально.

Получение изотерм адсорбции

Исследование изотермы адсорбции альбумина проводилось следующим образом. В пробирки

конической формы емкостью 15 мл помещали по 50 мг исследуемых наночастиц кремнезема с каждым из привитых спейсеров. Затем в каждую пробирку добавляли 2 мл ЧСА, постепенно убывающей концентрации, после чего ставили на орбитальный шейкер и перемешивали образцы в течение 2 ч. при частоте 300 мин⁻¹. По окончании перемешивания к образцам добавляли 2 мл дистиллированной воды и с помощью центрифугирования (3000 мин.⁻¹ в течение 4 мин.) сепарировали образцы, надосадочную жидкость которых сливали в отдельную пробирку и доводили ее до 10 мл.

Для проведения анализа 0,5 мл полученной надосадочной жидкости добавляли к 4,5 мл цитратного буфера, настаивали 10 мин. и снимали значения оптической плотности относительно цитратного буфера. Для определения содержания альбумина пользовались калибровочной кривой, при построении которой проводился анализ наличия альбумина в аналогичных растворах альбумина без испытаний с наночастицами.

Результаты и их обсуждение

Общая концепция иммобилизации белков

Аминоспейсер потенциально может связывать моноаминодикарбоновые аминокислоты аспаргат, глутамат (частота в белках 5,49 и 6,42 соответственно [42]), имеющие дополнительную карбоксильную группу и проявляющие функциональность в боковой цепи белков (рис. 1а). Меркаптоспейсер может связывать цистеин (рис. 1б, частота в белках 1,38), содержащий сульфгидридную функциональную группу. Тозильный спейсер может связывать диаминомонокрбоновые: лизин, аргинин (рис. 1в, частота в белках 5,19 и 5,78 соответственно), имеющие дополнительную аминогруппу. Указанные аминокислоты легче всего иммобилизуются, если имеют терминальное положение.

Для иммобилизации белков на поверхности наночастиц был отработан синтез всех трех спейсеров, изучены физико-химические характеристики модифицированных наночастиц и проведена иммобилизация белков.

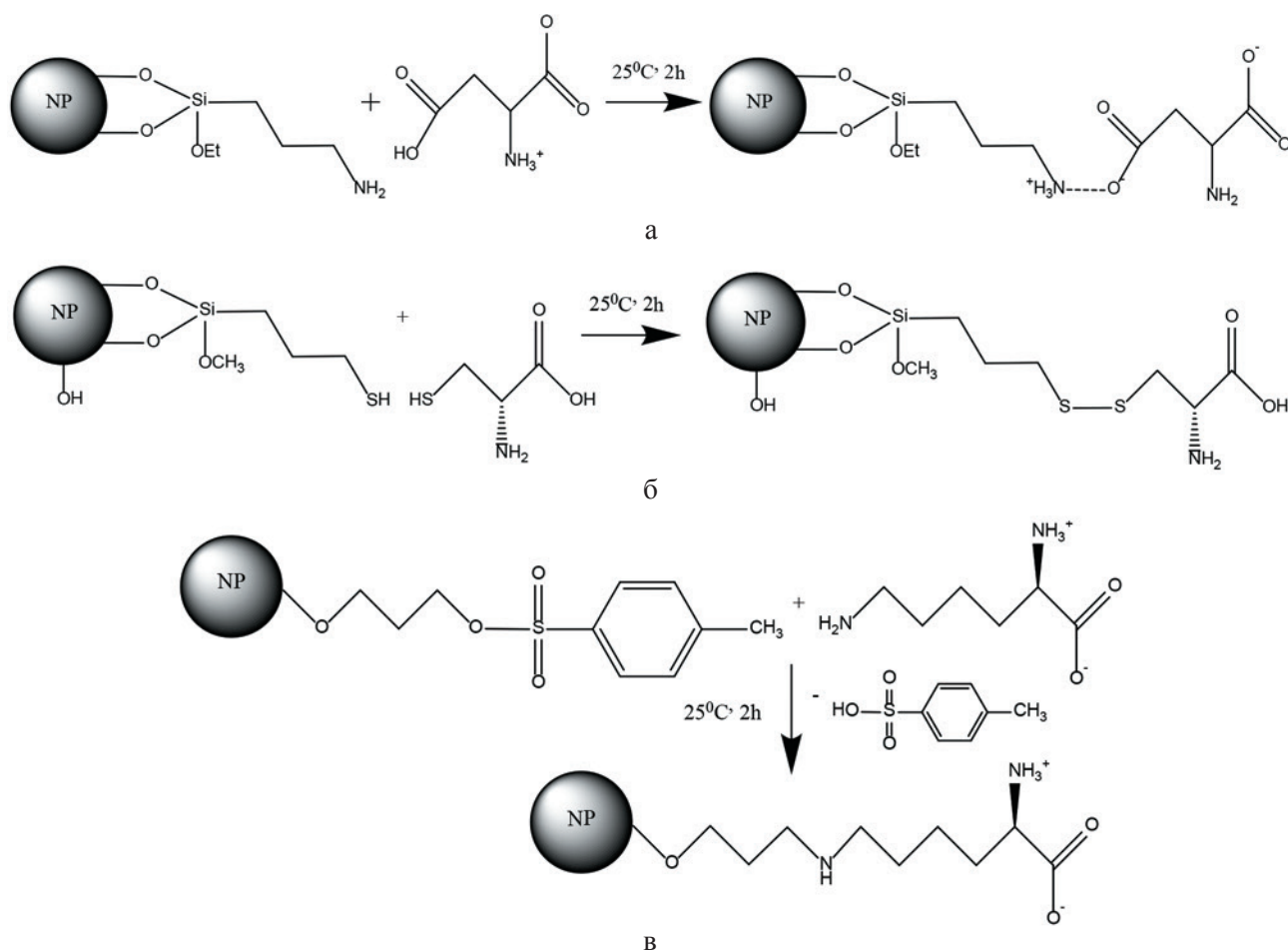


Рис. 1. Варианты иммобилизации аминокислот на различных спейсерах: а — аминоспейсер—аспарагиновая кислота; б — меркаптоспейсер—цистеин; в — тозилый спейсер—лизин

Figure 1. Options for immobilization of amino acids on various spacers: a — amino spacer—aspartic acid; b — mercapto-spacer—cysteine; c — tosyl spacer—lysine

Аминоспейсер

Большинство спейсеров можно синтезировать на поверхности твердых наночастиц, в том числе и НЧК за счет гидроксированной поверхности последней, которая при взаимодействии с этоксилированной группой модификатора образует ковалентную связь, отщепляя соответствующий спирт. Традиционно для синтеза на поверхности наночастиц спейсера, заканчивающегося аминогруппой, используется (3-аминопропил)триэтоксисилан (АПТЭС) [43–45]. При этом синтез может осуществляться из различных растворителей: бензол, толуол, циклогексан, этанол или изопропанол. Схема реакции АПТЭС с НЧК показана на рисунке 2.

Меркаптоспейсер

Для синтеза меркаптоспейсера можно использовать (3-меркаптопропил)триметоксимилан (рис. 3). Некоторые авторы утверждают, что реакцию эту лучше проводить в ксилоле при продувке инертным газом аргоном [46, 47]. Поэтому реакцию проводили в бензоле и в ксилоле. Никаких различий в конечном продукте обнаружено не было.

Тозильный спейсер

Изначально для первой стадии синтеза спейсера был взят вариант реакции гидроксильной группы наночастицы с 3-хлор-1-пропанолом для

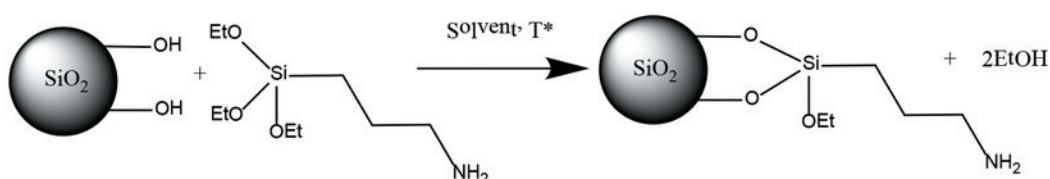


Рис. 2. Синтез спейсера, заканчивающегося аминогруппой

Figure 2. Synthesis of a spacer ending with an amino group

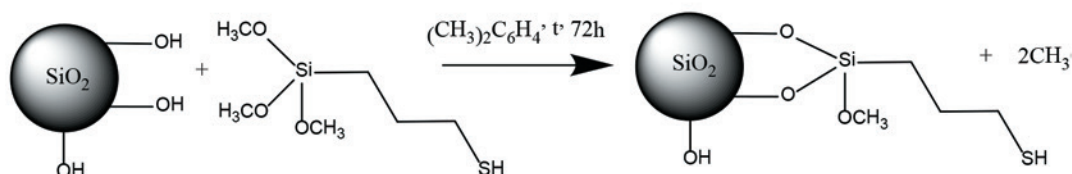


Рис. 3. Синтез спейсера, заканчивающегося меркаптогруппой

Figure 3. Synthesis of a spacer ending with an mercapto group

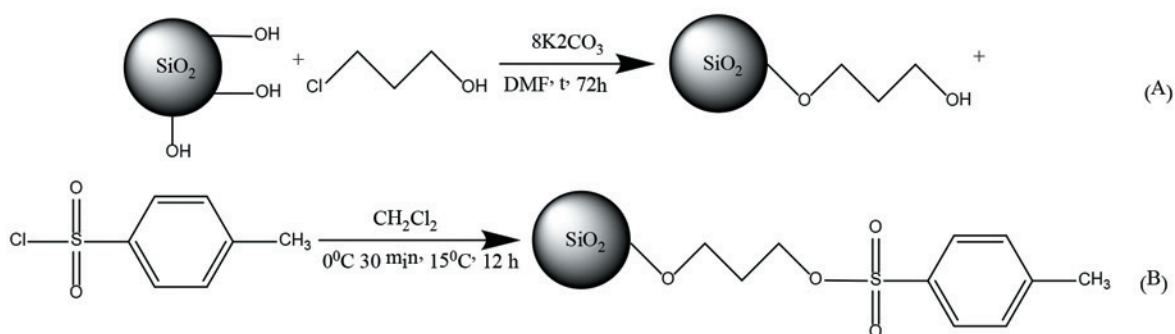


Рис. 4. Предположительный механизм реакции гидроксированной наночастицы с 3-хлор-1-пропанолом

Figure 4. Proposed mechanism of the reaction of hydroxylated nanoparticles with 3-chloro-1-propanol

наночастиц диоксида титана [48, 49] (рис. 3). Для наночастиц кремнезема эта схема оказалась неприемлемой ввиду восьмикратного избытка щелочи, которая растворяет НЧК до геля.

Таким образом, для синтеза было решено использовать три стадии (рис. 5):

- реакция гидроксильных групп с (3-хлорпропил)трихлорсиланом, аналогично методикам синтеза amino- и меркаптоспейсеров;
- гидролиз хлоридной группы;
- реакция гидроксильной группы с паратолуолсульфонилхлоридом.

Физико-химические характеристики модифицированных наноматериалов

Концентрация функциональных групп в образцах аминированных наночастиц составила 0,84 ммоль/г (табл. 1). Это согласуется с полученными ранее результатами в другой работе [36]. Полная концентрация меркаптогрупп, определенная методом аргентометрии, практически не отличается для обоих растворителей (бензола и о-ксилола) и на порядок ниже количества функциональных аминогрупп. Скорее всего, это связано не с методом определения их количества, а с активностью самого модификатора.

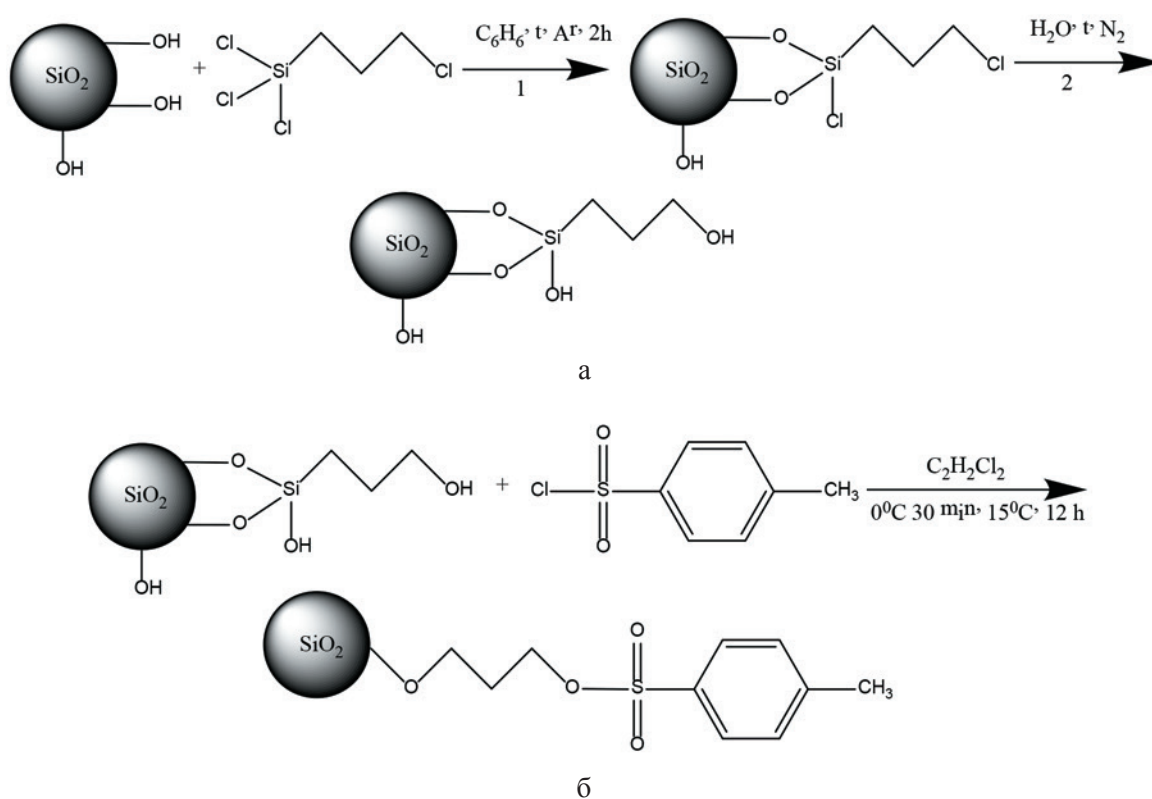


Рис. 5. Схема синтеза тозильного спейсера

Figure 5. Scheme for the synthesis of a tosyl spacer

Таблица 1. Общее содержание функциональных групп в образцах

Table 1. Total content of functional groups in samples

Тип частиц	НЧК-NH ₂	НЧК-SH в бензоле	НЧК-SH в о-ксилоле
Концентрация функциональных групп, ммоль/г	0,841 ± 0,001	0,079 ± 0,001	0,081 ± 0,001

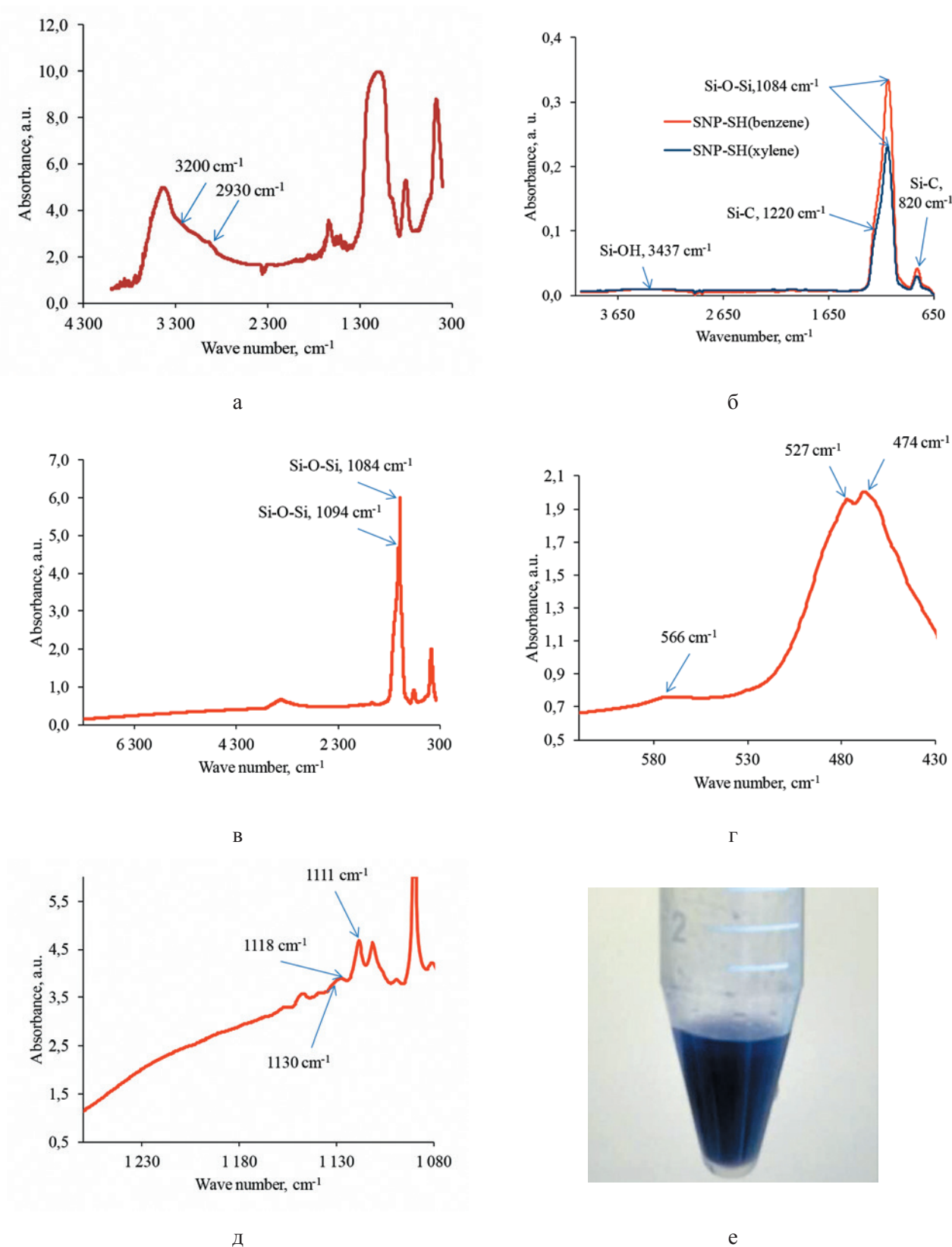


Рис. 6. ИК-Фурье спектры полученных образцов: а — аминокспейсер; б — меркаптоспейсер; в, г, д — тозилый спейсер

Figure 6. IR spectra of the obtained samples: a — amino spacer; б — mercapto spacer; в, г, д — tosyl spacer

Ввиду сложности определения количества и емкости тозильного спейсера проводилось лишь его качественное определение при помощи ИК-Фурье спектроскопии и емкость по модельному белку из изотермы адсорбции.

Количество доступных аминогрупп для образцов с аминспейсером составило 0,059 ммоль/г, то есть почти на порядок ниже, чем общее их содержание в образце. Это согласуется с результатами, полученными ранее авторами для наночастиц магнетита [36]. Количество доступных меркаптогрупп, полученных для модифицированных наночастиц в бензоле, составило 0,025 ммоль/г, в о-ксилоле — 0,051 ммоль/г. Как видно, порядок этих величин соответствует порядку величины для аминспейсера, что говорит о том, что емкость одинаковая, но есть пространственные затруднения для аминогруппы.

При анализе ИК-Фурье спектров образцов со спейсерами, заканчивающимися аминогруппой, были обнаружены линии, которые согласно [50] можно отнести к валентным колебаниям аминов в диапазоне 2000–3000 см⁻¹ и деформационным колебаниям 1460–1600 см⁻¹ (рис. 6а).

Согласно [51] меркаптогруппы имеют очень слабо выраженные линии на ИК-Фурье спектрах. Поэтому о наличии модификатора на поверхности наночастиц можно судить только по косвенным признакам, то есть по наличию других линий связей этого модификатора. Так, согласно [52, 53] были обнаружены линии связей Si-O-Si (1084 см⁻¹) и Si-OH (рис. 6б). Это говорит о том, что модификация действительно протекает согласно схеме, показанной на рисунке 3, и образуется связь Si-O-Si, но часть -ОН групп не реакционноспособна. Также присутствуют колебания связи Si-C модификатора.

При анализе ИК-Фурье спектра тозильного спейсера его можно сравнивать с различными участками концевой группы — пара-толуолсульфонилхлорида из хранилища SpectraBase [54, 55]. На общем спектре (рис. 6в) можно выделить также колебания Si-O-Si. В других участках спектра, более укрупненных (рис. 6г, д), можно выделить линии различных связей тозилата (474, 527, 566, 1111, 1116 см⁻¹).

Водная суспензия аэросила, в том числе и модифицированного любым из трех рассматриваемых спейсеров, является практически прозрачной опалесцирующей жидкостью. Нингидриновая реакция для всех трех спейсеров показала хорошую иммобилизацию белка по фиолетовому цвету окраски (рис. 6е).

Средний гидродинамический диаметр агломератов наночастиц кремнезема составляет 200 нм (см. рис. 7а, б). Этот показатель значительно увеличивается при реакции с АПТЭС и составляет 500 нм. Во-видимому, имеет место образование ассоциатов ввиду активности аминогруппы. И, напротив, размер практически не увеличивается при реакции с МПМС. При этом в реакции с МПМС в бензоле имеется большое количество агломератов, что, по-видимому, свидетельствует об образовании некоторого количества полимера из модификатора. Зета-потенциал возрастает по модулю при введении меркаптогруппы с -20 до -33 мВ, что делает коллоидный раствор более стабильным. При обработке НЧК АПТЭС зета-потенциал практически не изменяется и составляет -22 мВ. При обработке НЧК ХПХС средний размер наночастиц слегка возрастает с 200 до 230 нм, что свидетельствует о средней толщине оболочки модификатора. Затем при проведении гидролиза и тозилации средний размер частиц возрастает еще до 270 нм. При этом на первой стадии зета-потенциал возрастает по модулю до -30 мВ, а затем падает до -22 мВ. При этом коллоидный раствор все равно остается устойчивым в течение длительного времени.

Количественное определение иммобилизованного белка и изотермы адсорбции

Как видно из графиков на рисунке 8, при содержании альбумина 4–6 % в первоначальной пробе степень адсорбции (емкость по белку) меняется очень слабо для всех трех спейсеров и составляет около единицы (50 мг белка на 50 мг частиц). Затем происходит рост степени адсорбции, которая достигает 5-кратного значения, то есть на 50 мг модифицированных наночастиц частиц А-200 сорбируется 250 мг белка, а в случае тозильного спейсера это количество возрастает 11-кратно. Нам не удалось достигнуть максимальной емкости. По виду зависимости можно судить о принадлежности изотермы адсорбции к III типу в классификации, предложенной Брунауэром [56]. Такая зависимость характерна для полимолекулярной адсорбции на непористых адсорбентах с малой энергией взаимодействия между адсорбентом и адсорбатом. Поэтому наблюдается рост степени адсорбции при приближении к максимальному содержанию альбумина в жидкой фазе. Можно рекомендовать для практических целей использовать концентрацию белка 4–6 %.

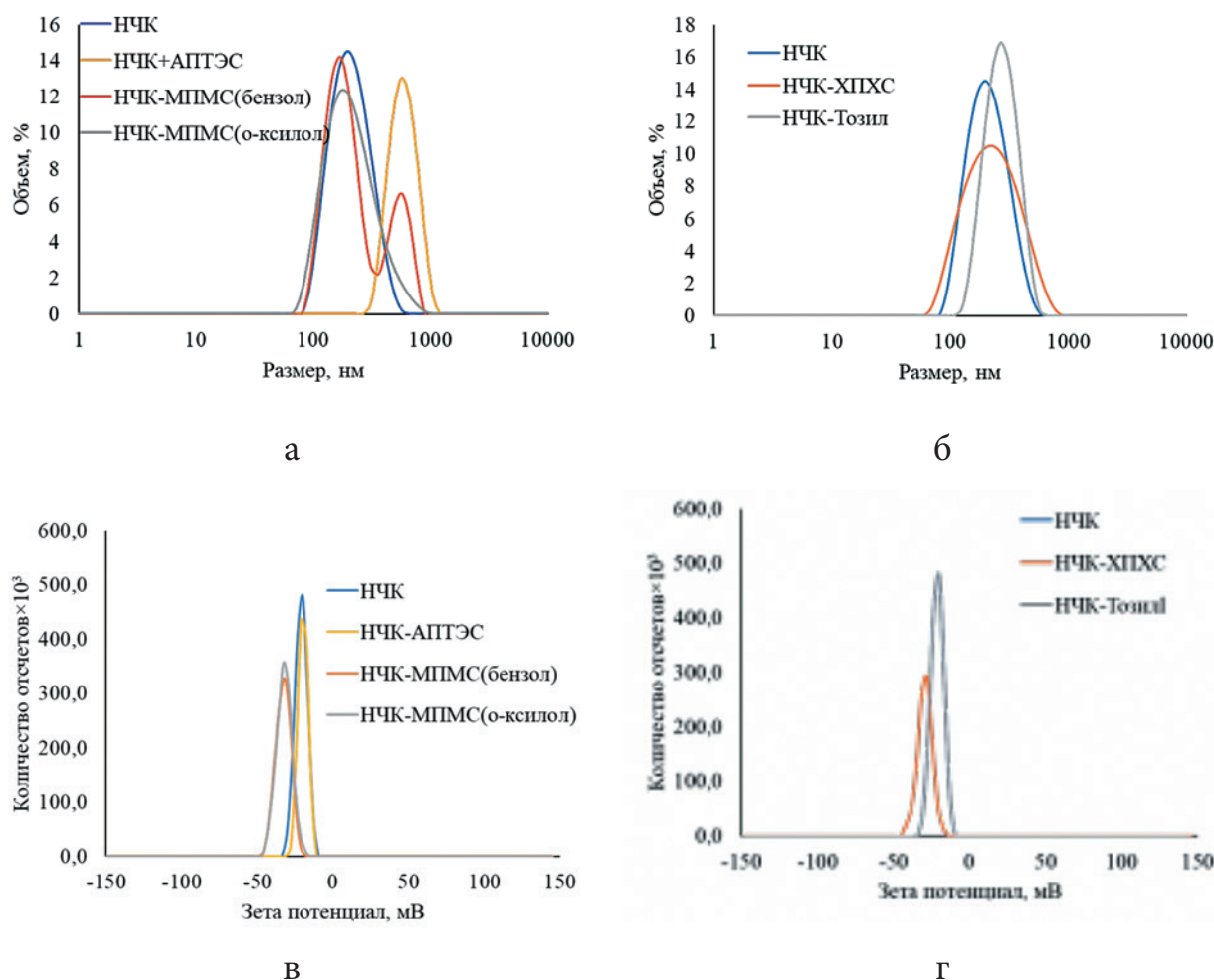


Рис. 7. Гидродинамический диаметр и зета-потенциал образцов

Figure 7. Hydrodynamic diameter and zeta potential of samples

Таблица 2. Степень адсорбции белка при его максимальной концентрации (20 %)

Table 2. Degree of protein adsorption at its maximum concentration (20 %)

Тип спейсера	Аминоспейсер	Меркаптоспейсер	Тозильный спейсер
Степень адсорбции, мг/мг	$5,0 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,1$	$12,0 \pm 0,1$

В таблицу 2 сведены данные о степени адсорбции белка на различные виды спейсеров. Аминоспейсер и меркаптоспейсер проявляют одинаковую эффективность $5,0 \pm 0,1$ мг/мг. Тозильный спейсер — более чем в два раза ($12,0 \pm 0,1$ мг/мг). Скорее всего, это связано с координационно-ионной иммобилизацией белка на аминоспейсер, дисульфидной — на меркаптоспейсер. Тозильный спейсер образует с белком ковалентную связь.

Выводы

Еще недавно высококонтагиозный вирус SARS-CoV-2 погрузил население Земли в пандемию COVID-19, что заставило лучшие умы научных институтов и фармацевтических компаний искать эффективные и безопасные средства борьбы с этой инфекцией. Одновременно по всему миру огромные усилия были направлены на разработку нейтрализующих антител, различных вакцин и иных препара-

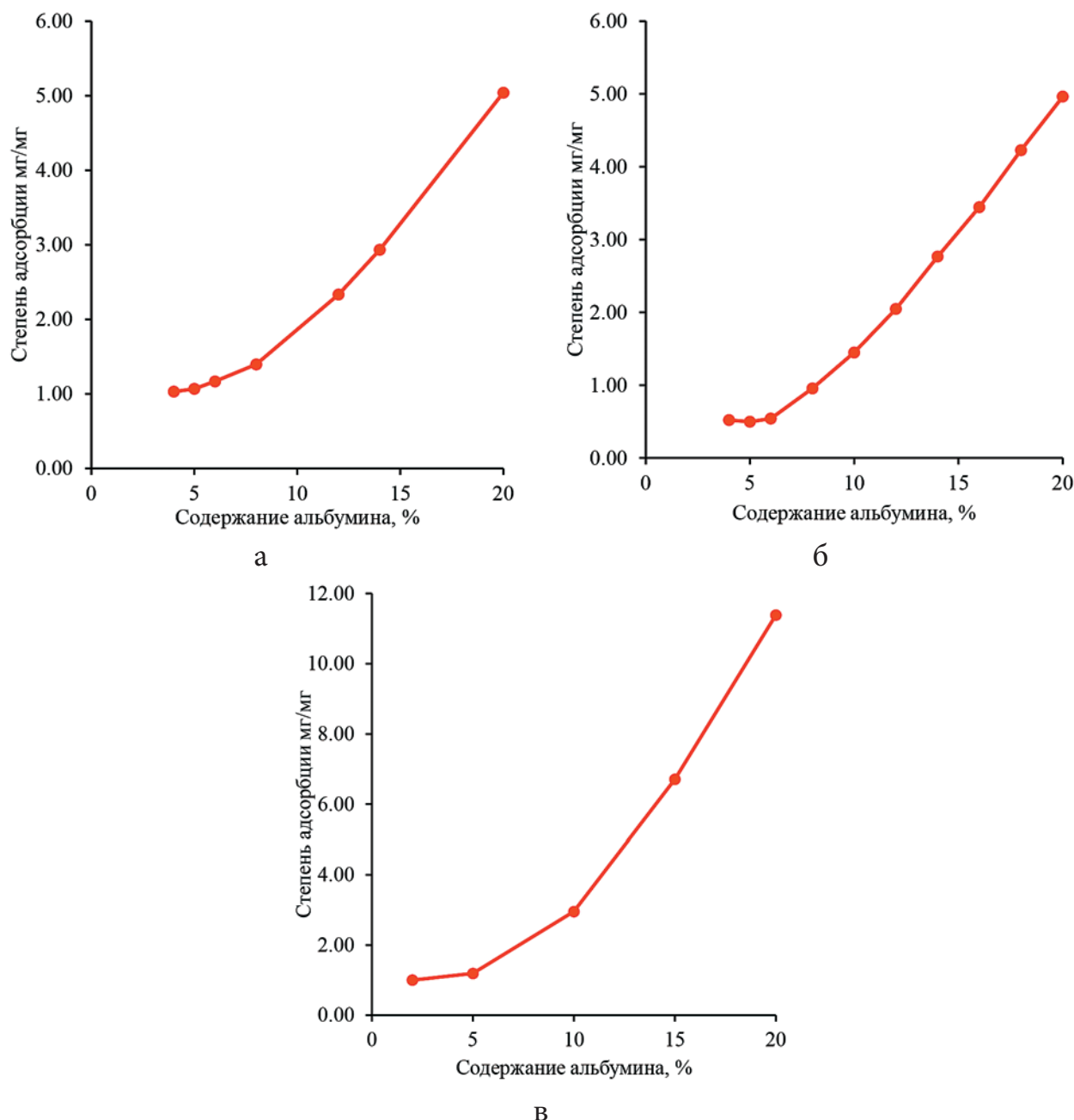


Рис. 8. Изотермы адсорбции на различные виды спейсеров: а — аминокспейсер; б — меркаптоспейсер; в — тозилый спейсер

Figure 8. Adsorption isotherms for various types of spacers: a — amino spacer; b — mercapto spacer; c — tosyl spacer

тов для профилактики и лечения COVID-19. В том числе было предложено использовать для этих целей рекомбинантные растворимые белки ACE2. Однако известно, что свободный растворенный белок гораздо более подвержен деградации, чем иммобилизованный на наночастицах [16, 57].

К сожалению, при отсутствии специфического механизма полной биологической ликвидации комплекса нанопрепарат–патоген, остается риск за-

ражения при высвобождении патогена в процессе биодеградации самой наночастицы. Поскольку этот вопрос особенно актуален при производстве наноловушек, предназначенных для перехвата вируса в просвете бронхолегочного тракта, М. Chen и соавторы в 2021 г. предложили дополнительно функционализировать поверхность наночастиц (липосом) молекулами фосфатидилсерина, который является специфической приманкой для макрофагов. После

образования наноконплекса с SARS-CoV-2, фосфатидилсерин запускал последующий фагоцитоз биоразлагаемых нанолушек и, одновременно, связанных с ними вирусных частиц [58].

В нашей работе мы исходили из того, что разрабатываемый энтеросорбент, предназначенный для связывания вируса SARS-CoV-2 в просвете желудочно-кишечного тракта, в течение относительно короткого периода времени так или иначе будет подвержен естественному клиренсу. Поэтому дополнительные меры, как, например, стимуляция фагоцитоза или тому подобные, в нашем случае не принесут заметного повышения эффективности препарата. Таким образом, нами разработаны прототипы энтеросорбентов, где в качестве наносферы был взят широко известный энтеросорбент — аэросил, обладающий достоверно высоким уровнем биосовместимости и биобезопасности у человека и активно применяемый в практической медицине. На его основе были синтезированы три типа спейсеров, способных связываться с разными функциональными группами белков. Эффективность спейсеров проверена на модельном белке — альбумине. При достаточном количестве рекомбинантного белка ACE2 (а также вспомогательных протеаз TMPRSS2 или фурина), можно продолжить разработку перорального препарата, предназначенного для уменьшения вирусной нагрузки SARS-CoV-2 в желудочно-кишечном тракте, обезвреживания и элиминации вирусных частиц из организма больного. В случае успеха подобный подход послужит основой в создании платформенных решений для борьбы с другими опасными вирусами, патогенез которых эволюционно связан с алиментарным путем заражения.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Финансирование / Funding

Работа выполнена в рамках государственного задания Минздрава РФ № 121031100284–7. / The work is performed within the State task of the Ministry of Health of the Russian Federation № 121031100284–7.

Список литературы / References

1. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, et al. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat. Med.* 2020; 26: 450–452. DOI: 10.1038/s41591-020-0820-9.
2. Zheng YY, Ma YT, Zhang JY, et al. COVID-19 and the cardiovascular system. *Nat. Rev. Cardiol.* 2020; 17: 259–260. DOI: 10.1038/s41569-020-0360-5.
3. Raj VS, Mou H, Saskia L, et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature.* 2013; 495: 251–254. DOI: 10.1038/nature12005.
4. Coutard B, Valle C, de Lamballerie X, et al. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res.* 2020; 176: 104742. DOI: 10.1016/j.antiviral.2020.104742.
5. Bestle D, Heindl MR, Limburg H, et al. TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells. *Life Sci. Alliance.* 2020; 3(9). DOI: 10.26508/lsa.202000786.
6. Serfozo P, Wysocki J, Gulua G, et al. Ang II (angiotensin II) conversion to angiotensin-(1-7) in the circulation is pop (prolyloligopeptidase)-dependent and ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2)-independent. *Hypertension.* 2020; 75: 173–182. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14071.
7. Hamming I, Timens W, Bulthuis ML, et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J. Pathol.* 2004; 203: 631–637. DOI: 10.1002/path.1570.
8. Du L, He Y, Zhou Y, et al. The spike protein of SARS-CoV-a target for vaccine and therapeutic development. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009; 7: 226–236. DOI: 10.1038/nrmicro2090.
9. Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: Implications for virus origins and receptor binding. *Lancet.* 2020; 395: 565–574. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
10. Menachery VD, Yount BL, Debbink K, et al. A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nat. Med.* 2015; 21: 1508–1513. DOI: 10.1038/nm.3985.
11. Wysocki J, Ye M, Rodriguez E, et al. Targeting the degradation of angiotensin II with recombinant angiotensin-converting enzyme 2: Prevention of angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension.* 2010; 55: 90–98. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.138420.
12. Hofmann H, Geier M, Marzi A. Susceptibility to SARS coronavirus S protein-driven infection correlates with expression of angiotensin converting enzyme 2 and infection can be blocked by soluble receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 319(4): 1216–1221. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.05.114.
13. Batlle D, Wysocki J, Satchell K. Soluble angiotensin-converting enzyme 2: a potential approach for coronavirus infection therapy? *Clin. Sci. (Lond.).* 2020; 134(5): 543–545. DOI: 10.1042/CS20200163.
14. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature.* 2003; 426: 450–454. DOI: 10.1038/nature02145.

15. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 1953–1966. DOI: 10.1056/NEJMoa030781.
16. Lei C, Qian K, Li T, et al. Neutralization of SARS-CoV-2 spike pseudotyped virus by recombinant ACE2-Ig. *Nat. Commun.* 2020; 11(1): 2070. DOI: 10.1038/s41467-020-16048-4.
17. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science.* 2020; 367(6483): 1260–1263. DOI: 10.1126/science.abb2507.
18. Wan Y, Shang J, Graham R, et al. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J. Virol.* 2020; 94(7). DOI: 10.1128/JVI.00127-20.
19. Vankadari N, Wilce JA. Emerging WuHan COVID-19 coronavirus: glycan shield and structure prediction of spike glycoprotein and its interaction with human CD26. *Emerg. Microbes. Infect.* 2020; 9(1): 601–604. DOI: 10.1080/22221751.2020.1739565.
20. Watanabe Y, Bowden TA, Wilson IA, et al. Exploitation of glycosylation in enveloped virus pathobiology. *Biochim. Biophys. Acta. Gen. Subj.* 2019; 1863(10): 1480–1497. DOI: 10.1016/j.bbagen.2019.05.012.
21. Morimoto C, Schlossman SF. The structure and function of CD26 in the T-cell immune response. *Immunol. Rev.* 1998; 161: 55–70. DOI: 10.1111/j.1600-065x.1998.tb01571.x.
22. Wang Q, Qi J, Yuan Y, et al. Bat origins of MERS-CoV supported by bat coronavirus HKU4 usage of human receptor CD26. *Cell Host & Microbe.* 2014; 16(3): 328–337. DOI: 10.1016/j.chom.2014.08.009.
23. Xu X, Chen P, Wang J, et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Sci. China Life Sci.* 2020; 63(3): 457–460. DOI: 10.1007/s11427-020-1637-5.
24. Gohrbandt S, Veits J, Breithaupt A, et al. H9 avian influenza reassortant with engineered polybasic cleavage site displays a highly pathogenic phenotype in chicken. *J. Gen. Virol.* 2011; 92: 1843–1853. DOI: 10.1099/vir.0.031591-0.
25. Rabaan AA, Al-Ahmed Shamsah H, Haque S, et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: A comparative overview *Infez Med.* 2020; 28(2): 174–184.
26. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell.* 2020; 181(2): 281–292. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
27. Nao N, Yamagishi J, Miyamoto H, et al. Genetic predisposition to acquire a polybasic cleavage site for highly pathogenic avian influenza virus hemagglutinin. *MBio.* 2017; 8(1). DOI: 10.1128/mBio.02298-16.
28. Jaimes JA, Millet JK, Whittaker GR. Proteolytic Cleavage of the SARS-CoV-2 Spike Protein and the Role of the Novel S1/S2 Site. *IScience.* 2020; 23(6): 101212. DOI: 10.1016/j.isci.2020.101212.
29. Follis KE, York J, Nunberg JH. Furin cleavage of the SARS coronavirus spike glycoprotein enhances cell–cell fusion but does not affect virion entry. *Virology.* 2006; 350(2): 358–69. DOI: 10.1016/j.virol.2006.02.003.
30. Monteil V, Kwon H, Prado P, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 infections in engineered human tissues using clinical-grade soluble human ACE2. *Cell.* 2020; 181(4): 905–913. DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.004.
31. Cheburkin YV, Sonin DL, Polozov AS, et al. The role of membrane and circulating forms of ACE 2 in pathological processes in COVID19 infection. *Arterial'naya Gipertenziya = Arterial Hypertension.* 2021; 27(6):608–616. In Russian [Чебуркин Ю.В., Сонин Д.Л., Полозов А.С. и др. Роль мембранной и циркулирующей форм ACE 2 в развитии различных патологических процессов на фоне COVID-19. Артериальная гипертензия. 2021; 27(6):608–616. DOI:10.18705/1607-419X-2021-27-6-608-616].
32. Zhang G, Pomplun S, Loftis A, et al. Investigation of ACE2 N-terminal fragments binding to SARS-CoV-2 Spike RBD. *BioRxiv.* 2020. [Preprint]. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.03.19.999318>.
33. Baum A, Fulton B, Wloga E, et al. Antibody cocktail to SARS-CoV-2 spike protein prevents rapid mutational escape seen with individual antibodies. *Science.* 2020; 369(6506): 1014–1018. DOI: 10.1126/science.abd0831.
34. Clinical Trial NCT04335136. Recombinant Human Angiotensin-converting Enzyme 2 (rhACE2) as a Treatment for Patients with COVID-19 (APN01-COVID-19). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04335136>.
35. Zorin VN, Naumisheva EB, Postnov VN, et al. Magnetic nanoparticles for medical application with a coating deposited with various methods. *J. Phys. Conf. Series. IOP Publishing,* 2018; 1124(3). DOI: 10.1088/1742-6596/1124/3/031009.
36. Ivanovskaya AM, Voronin AV, Seryakova AN. Quantitative analysis of drugs of organic nature. Samara: Insoma-press, 2018. P. 88. In Russian [Ивановская А.М., Воронин А.В., Серякова А.Н. Количественный анализ лекарственных средств органической природы. Самара: Инсома-пресс, 2018. С. 88].
37. Murashova VI, Tananaeva AN, Khovyakova RF. Qualitative chemical fractional analysis. M.: Khimiya, 1976. P. 279. In Russian [Мурашова В.И., Тананаева А.Н., Ховякова Р.Ф. Качественный химический дробный анализ. М.: Химия, 1976. С. 279].
38. Siggia S. Instrumental methods for the analysis of functional groups of organic compounds. M.: Mir, 1974. P. 464. In Russian [Сиггия С. Инструментальные методы анализа функциональных групп органических соединений. М.: Мир, 1974. С. 464].

39. Mahler GR, Cordes JG. Fundamentals of biological chemistry. Transl. from Eng. M.: Mir, 1970. P. 568. In Russian [Малер Г.Р., Кордес Ю.Г. Основы биологической химии. Пер. с англ. М.: Мир, 1970. С. 568].
40. Doumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. Clin. Chim. Acta. 1971; 31: 87–96. DOI: 10.1016/s0009-8981(96)06447-9.
41. Narang AS, Varia S. Role of tumor vascular architecture in drug delivery. Adv. Drug. Deliv. Rev. 2011; 63(8): 640–658. DOI: 10.1016/j.addr.2011.04.002.
42. Kozłowski LP. Proteome-pI: proteome isoelectric point database. Nuc. Acids Res. 2017; 45(D1): D1112–D1116. DOI: 10.1093/nar/gkw978.
43. Gareev KG, Babikova KY, Postnov VN, et al. Fluorescence imaging of the nanoparticles modified with indocyanine green. J. Phys. 2017: Conf. Series 917 042008. DOI: 10.1088/1742-6596/917/4/042008.
44. Korolev DV, Evreinova NV, Zakharova EV, et al. Phosphocreatine immobilization of the surface of silica and magnetite nanoparticles for targeted drug delivery. Russian Chemical Bulletin. 2019; 68(5): 1096–1101. DOI: 10.1007/s11172-019-2525-0.
45. Korolev DV, Postnov VN, Evreinova NV, et al. Synthesis of Magnetic Nanoparticles with Radiopaque Marker. Rus. J. Gen. Chem. 2018; 88(12): 2698–2701. DOI: 10.1134/S1070363218120381.
46. Han H, Wang Q, Liu X, et al. Polymeric ionic liquid modified organic-silica hybrid monolithic column for capillary electrochromatography/ J. Chromatogr. A. 2012; 1246: 9–14. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.12.029.
47. Lee BY, Li Z, Clemens DL, et al. Redox-triggered release of moxifloxacin from mesoporous silica nanoparticles functionalized with disulfide snap-tops enhances efficacy against pneumonic tularemia in mice. Small. 2016; 12(27): 3690–3702. DOI: 10.1002/smll.201600892.
48. Klesiewicz K, Karczewska E, Budak A, et al. Anti-Helicobacter pylori activity of some newly synthesized derivatives of xanthone. The Journal of antibiotics. 2016; 69(11): 825–834. DOI: 10.1038/ja.2016.36.
49. Sahudin MA, Su'ait MS, Tan LL, et al. Schiff base complex/TiO₂ chemosensor for visual detection of food freshness level. Spectrochimica Acta Part A: Mol. Biomolec. Spectr. 2021; 248: 119129. DOI: 10.1016/j.saa.2020.119129.
50. Kim J, Cho J, Seidler PM, et al. Investigations of chemical modifications of amino-terminated organic films on silicon substrates and controlled protein immobilization. Langmuir. 2010; 26(4): 2599–608. DOI: 10.1021/la904027p.
51. Li H, Pan J, Gao C, et al. Mercapto-functionalized porous organosilica monoliths loaded with gold nanoparticles for catalytic application. Molecules. 2019; 24(23): 4366. DOI: 10.3390/molecules24234366.
52. Senkevich JJ, Mitchell CJ, Yang GR, et al. Surface chemistry of mercaptan and growth of pyridine short-chain alkoxy silane molecular layers. Langmuir. 2002; 18(5): 1587–1594. DOI: 10.1021/la010970f.
53. Kocyigit A. Properties of silicon–ZnO hybrid nanoparticles. In: Silicon-Based Hybrid Nanoparticles: Fundamentals, Properties, and Applications. 2022: 65–88. DOI: 10.1016/B978-0-12-824007-6.00001-0.
54. SpectraBase p-Toluenesulfonyl chloride 630–430 cm⁻¹ wave number. <https://spectrabase.com/spectrum/LNTt3QsvohK>.
55. SpectraBase p-Toluenesulfonyl chloride 1260–1080 cm⁻¹ wave number. <https://spectrabase.com/spectrum/AODKWz6bA9P>.
56. Brunauer S, Deming LS, Deming WE, et al. On a theory of the van der Waals adsorption of gases. J. Amer. Chem. Soc. 1940; 62: 1723–1732. DOI: 10.1021/ja01864a025.
57. Yu M, Wu J, Shi J, Farokhzad OC. Nanotechnology for protein delivery: Overview and perspectives. J Control Release. 2016; 240: 24–37. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.10.012.
58. Chen M, Rosenberg J, Cai X, et al. Nanotraps for the containment and clearance of SARS-CoV-2. Matter. 2021; 4(6): 2059–2082. DOI: 10.1016/j.matt.2021.04.005.

Информация об авторах:

Шульмейстер Галина Анатольевна, младший научный сотрудник НИЛ нанотехнологий, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Чебуркин Юрий Владимирович, к.м.н., заведующий НИЛ инфекционных патогенов и биомолекулярных наноструктур, старший научный сотрудник НИО микроциркуляции и метаболизма миокарда, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Чекменева Юлия Дмитриевна, студент СПбГЭТУ «ЛЭТИ»;

Едемская Елена Владимировна, студент СПбГЭТУ «ЛЭТИ»;

Бондаренко Андрей Борисович, младший научный сотрудник НИЛ инфекционных патогенов и биомолекулярных наноструктур, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; старший преподаватель кафедры медицинской биологии ФГБОУ ВО «СПбГПМУ» Минздрава России;

Постнов Виктор Николаевич, к.х.н., доцент кафедры химии твердого тела Института химии ФГБОУ ВО СПбГУ; старший научный сотрудник НИЛ нанотехнологий, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Королёв Дмитрий Владимирович, д.х.н., заведующий НИЛ нанотехнологий, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; научный сотрудник ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова Минздрава России.

Authors information:

Galina A. Shulmeyster, Junior Research Assistant of the Research Laboratory of Nanotechnologies, Almazov National Medical Research Centre;

Yuri V. Cheburkin, MD, PhD, Head of Research Laboratory of Infectious Pathogens and Biomolecular Nanostructures, Senior Research Scientist of Microcirculation and Myocardial Metabolism, Almazov National Medical Research Centre;

Yulia D. Chekmeneva, Student of Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI";

Elena V. Edemskaya, Student of Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI";

Andrey B. Bondarenko, junior research assistant, Research Laboratory of Infectious Pathogens and Biomolecular Nanostructures, Almazov National Medical Research Centre; senior lecturer of Department of Medical Biology, the Saint Petersburg State Pediatric Medical University;

Viktor N. Postnov, MD, PhD, Assistant Professor of the Institute of Chemistry of Saint Petersburg State University; Senior Researcher of the Research Laboratory of Nanotechnologies, Almazov National Medical Research Centre;

Dmitry V. Korolev, PhD, Head of the Research Laboratory of Nanotechnologies, Almazov National Medical Research Centre; Researcher of the Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University.

АДАПТАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИЗМЕНЕНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА В КЛЕТКАХ C2C12 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГОТОВОГО НАБОРА «MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL KIT» (SIGMA-ALDRICH)

Власова Ю. А., Клименко Е. С., Сухарева К. С.,
Гаврилова Л. С., Костарева А. А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Власова Юлия Александровна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Акkuratова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: vlasova_yua@almazovcentre.ru

Статья поступила в редакцию 20.12.2023
и принята к печати 15.01.2024.

Резюме

В статье представлены результаты адаптации методики определения изменений митохондриального мембранного потенциала (ММП) в клетках C2C12 с использованием готового набора «Mitochondrial membrane Potential Kit» производства Sigma-Aldrich (каталожный номер MAK159) для исследования на микропланшетном ридере и флуоресцентном микроскопе. Подобраны условия для проведения измерения, необходимые разведения для получения оптимальной концентрации для измерения ММП в клетках мышечных миобластов C2C12. Проведено сравнение правильности выполнения исследования с использованием флуоресцентного красителя TMRE (этилового эфира тетраметилпродамина).

Актуальность. При использовании готового набора «Mitochondrial membrane Potential Kit» (Sigma-Aldrich) мы столкнулись с тем, что в руководстве пользователя производитель не указывает концентрацию JC-10 и дает лишь общие рекомендации по использованию красителя, не учитывающие тип клеток, размер, плотность, разницу во времени инкубации для различных культур клеток.

Цель работы. Адаптировать методику определения ММП (митохондриальный мембранный потенциал) в клетках C2C12 с использованием набора для исследования на микропланшетном ридере и электронном микроскопе.

Материалы и методы. ММП в клетках C2C12 измерялся двумя методами: с помощью флуоресцентной микроскопии (Zeiss, программа Zen) и с использованием планшетного флуориметра (CLARIOstar (BMG LABTECH)). В качестве флуоресцентных зондов использовались красители JC-10, TMRE (Sigma-Aldrich).

Результаты. Были подобраны оптимальные условия для регистрации изменения митохондриального мембранного потенциала в клетках C2C12. Достоверные и воспроизводимые результаты были получены при 100-кратном разведении раствора красителя для загрузки JC-10 (Dye Loading Solution) и замене стандартного буфера производителя на стандартный натрий-фосфатный буфер (pH = 7,4).

Заключение. При использовании готовых наборов для измерения ММП методика, предложенная производителем, может не подходить для выбранной клеточной линии. В нашем случае при исследовании мышечных миобластов линии C2C12 оптимальным оказалось разведение красителя для загрузки в 100 раз по сравнению с рекомендованным производителем.

Ключевые слова: клеточная линия C2C12, митохондриальный мембранный потенциал (MMP), JC-10, TMRE.

Для цитирования: Власова Ю.А., Клименко Е.С., Сухарева К.С. и др. Адаптация методики определения изменения митохондриального мембранного потенциала в клетках C2C12 с использованием готового набора «Mitochondrial membrane Potential Kit» (Sigma-Aldrich). Трансляционная медицина. 2024; 11(1): 45-54. DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-1-45-54. EDN: AXQBHV

ADAPTATION OF THE TECHNIQUE OF DETERMINATION OF MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL CHANGE IN C2C12 CELLS USING THE READY SET “MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL KIT” (SIGMA-ALDRICH)

Yulia A. Vlasova, Ekaterina S. Klimenko, Ksenia S. Sukhareva,
Lidiya S. Gavrilova, Anna A. Kostareva

Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Yulia A. Vlasova,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.
E-mail: vlasova_yua@almazovcentre.ru

Received 20 December 2023; accepted
15 January 2024.

Abstract

Background. We used the “Mitochondrial Membrane Potential Kit” (Sigma-Aldrich) to detect MMP but encountered difficulties by applying this kit because in manual there not JC-10 concentration and it not allowing for account cell type, size, density, differences in incubation time for different cell cultures. **Objective.** Adaptation of the method for determining MMP (mitochondrial membrane potential) in C2C12 cells using in microplate reader and electron microscope. **Design and methods.** MMP in C2C12 cells was measured by two way, using fluorescence microscopy (Zeiss, Zen program) and using a plate fluorimeter (CLARIOstar (BMG LABTECH)). JC-10 and TMRE dyes (Sigma-Aldrich) were used as fluorescent probes. **Results.** Optimal conditions for detection changes in mitochondrial membrane potential in C2C12 cells were selected. 100- fold dilution of the dye JC-10 (Dye Loading Solution) and replacement of the manufactured buffer to PBS led to repeatability and reproducibility results. **Conclusion.** When using ready-made kits for measuring MMP, the method proposed by the manufacturer may not be suitable for the selected cell line. In our study to mouse myoblasts of the C2C12 line, a dilution of the dye for loading was required 100 times compared to that recommended by the manufacturer.

Key words: cell line C2C12, JC-10, mitochondrial membrane potential (MMP), TMRE.

For citation: Vlasova YuA, Klimenko ES, Sukhareva KS, et al. Adaptation of the technique of determination of mitochondrial membrane potential change in C2C12 cells using the ready set “Mitochondrial membrane Potential Kit” (Sigma-Aldrich). Translational Medicine. 2024; 11(1): 45-54. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-1-45-54. EDN: AXQBHV

Измерение митохондриального мембранного потенциала (ММР, $\Delta\Psi$) является важным инструментом для мониторинга функционального состояния клеток, так как он напрямую связан со способностью митохондрий генерировать АТФ. Вместе с концентрационной компонентой (ΔpH) $\Delta\Psi$ составляет трансмембранный потенциал ионов водорода ($\Delta\mu H^+$), который характеризует энергетическую емкость митохондрий, расходуемую АТР-синтазным комплексом на синтез АТФ [1]. При снижении ММР митохондрии могут убиквитироваться и подвергаться процессу ауто/митофагии. Кроме того, ММР участвует в регуляции уровня активных форм кислорода, как в самой митохондрии, так и в клетке в целом, участвует в транспорте катионов, а также катионных пептидов и белков внутрь митохондрий [1]. Таким образом, ММР может рассматриваться как важный показатель здоровья или повреждения клеток.

Для измерения ММР широко используются различные флуоресцентные красители. Обычно они представляют из себя катионные молекулы, которые накапливаются в матриксе митохондрий, обратно пропорционально ММР. Мы исследовали изменение ММР на клетках линии мышечных миобластов C2C12. Данная линия является классической моделью для изучения процессов функционирования мышечной ткани и моделирования различных патологических состояний, например, миопатий и миодистрофий. Исследование мембранного потенциала митохондрий мышечных клеток важно для понимания механизмов развития нейромышечных заболеваний и других врожденных и приобретенных заболеваний человека, в частности, митохондриальных. Данное исследование также может помочь в разработке новых методов лечения этих патологий, например, путем коррекции нарушений дыхательной цепи или увеличения уровня мембранного потенциала с помощью специальных препаратов.

Для изучения ММР в клетках C2C12 был выбран митохондриальный краситель JC-10, который используется для измерения мембранного потенциала митохондрий *in vivo* и *in vitro*. JC-10 представляет собой флуоресцентный зонд, у которого, в отличие от монохроматических красителей (TMRM, TMRE, Rh123), спектры излучения при его агрегации в митохондриях смещаются от зеленого к красному. Принцип работы JC-10 основан не на эффекте гашения, а на спектральном сдвиге, вызванном агрегацией зонда (флуоресценция в красном свете) в митохондриях при сохранном уровне ММР, а также на формировании пула неагрегированной формы красителя (флуоресценция

в зеленом свете) в митохондриях при деполяризации (рис. 1). При этом нахождение красителя в цитоплазме всегда наблюдается в форме мономеров, давая, соответственно, только зеленую флуоресценцию. Такой принцип работы красителя позволяет проводить двухцветную (зеленый/красный) и логарифмическую полуколичественную оценку степени поляризации митохондриальной мембраны. Однако при использовании JC-10 (как и JC-1) необходимо учитывать, что зонд может быть чувствительным к концентрации и времени загрузки, кроме того, он является светочувствительным. В доступной литературе нам не встретилось данных относительно JC-10, но есть сведения, касающиеся его аналога JC-1, которые свидетельствуют о том, что краситель проникает в митохондрии достаточно медленно. Определенные сложности в интерпретации результатов вызывает и тот факт, что агрегаты, образующиеся внутри митохондрий, не могут быстро уравниваться мономерами [2]. Мономерная (зеленая) форма красителя уравнивается примерно за то же время, что и TMRE (около 15 минут), в то время как для достижения равновесия в кардиомиоцитах агрегатам (красные) необходимо около 90 минут [3].

Предпосылками к проведению данной методической работы являлись наши пилотные исследования с попыткой использовать краситель JC-10 для регистрации ММР в митохондриях клеток мышечных миобластов линии C2C12. Изначально при изучении ММР в данном типе клеток с применением готового набора «Mitochondrial membrane Potential Kit» производства Sigma-Aldrich (каталожный номер MAK159) и рекомендованных производителем концентраций и периодов инкубации мы получили результаты, противоречащие заявленным и ожидаемым. Так, при добавлении FCCP — разобщителя дыхательной цепи — количество митохондриальных агрегатов (флуоресценция в красном цвете) значительно увеличивалось, что должно было бы свидетельствовать об увеличении ММР. Однако FCCP является протонофором, вызывает деполяризацию митохондрий за счет увеличения проницаемости мембраны для протонов, что должно приводить к снижению ММР и, соответственно, преобладанию внутри митохондрий мономерной формы JC-10 с флуоресценцией в зеленом свете. Мы предположили, что данный феномен был связан не с истинным значением ММР, а с тем, что концентрация красителя является слишком высокой, что не позволяет красителю нормально перераспределяться между клеточными компартментами для достижения равновесия. Из-за большой разницы между соотношением площадь/объем

матрикса митохондрии у внутренней мембраны митохондрии по отношению к границе клеточной мембраны с цитоплазмой, краситель мог покидать матрикс митохондрии значительно медленнее, чем покидать цитоплазму (выходить из клетки). Мы предположили, что данный феномен может нарушать внутриклеточное распределение красителя и снижать информативность его использования. Для адаптации данной методики на клетках линии C2C12 нами была проведена серия экспериментов с определением оптимальной концентрации, красителя JC-10 и временных периодов для оценки его флуоресценции в клетках. Целью данной работы было определение необходимого разведения раствора красителя для загрузки JC-10 (Dye Loading Solution, набор «Mitochondrial membrane Potential Kit» производства Sigma-Aldrich (каталожный номер MAK159)) для детекции ММР в клетках мышечных миобластов C2C12 с использованием микропланшетного ридера и электронного микроскопа,

а также сравнение результатов измерения ММР, полученных с использованием JC-10, с результатами измерений, полученных с использованием флуоресцентного красителя TMRE. Мы показали, что рекомендуемые производителем концентрации не являются оптимальными для использования с линией мышечных миобластов C2C12, а также определили наиболее информативные значения концентрации путем титрования имеющегося раствора красителя для загрузки.

Материалы и методы

Культивирование клеток. Клетки линии мышечных миобластов C2C12 были посажены в 96-луночные планшеты, плотность 2000 клеток/луночка. Инкубировались в течение 24 часов в среде ДМЕМ с добавлением 10 % сыворотки плодов коровы, 1 % L-глутамина, 1 % антибиотика (пенициллин/ампициллин) при 37 °C в инкубаторе в атмосфере 5 % CO₂.

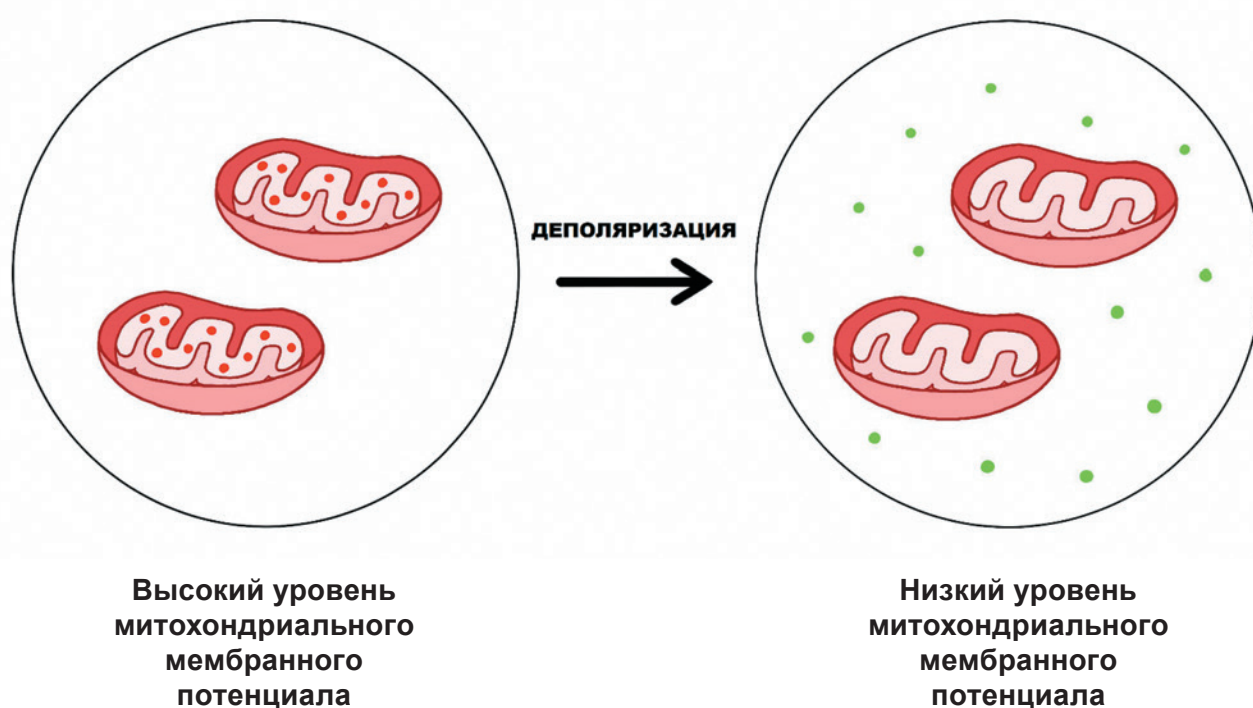


Рис. 1. Распределение красителя JC-10 в митохондриях и цитоплазме, в зависимости от уровня митохондриального мембранного потенциала. Красные агрегаты JC-10 накапливаются в матриксе митохондрий, при падении митохондриального мембранного потенциала краситель выходит из митохондрий и в цитоплазме находится в виде мономеров зеленого цвета.

Figure 1. Distribution of JC-10 dye in mitochondria and cytoplasm, depending on the level of mitochondrial membrane potential. Red aggregates JC-10 accumulate in the mitochondrial matrix, when the mitochondrial membrane potential falls, the dye leaves the mitochondria and in the cytoplasm is in the form of green monomers.

Определение митохондриального мембранного потенциала (MMP)

Краситель TMRE. 1) MMP определялся с использованием красителя TMRE (87917, Sigma-Aldrich) согласно инструкции производителя. Клетки высаживались за 24 часа до начала эксперимента. После дважды промывались фосфатно-солевым буфером (pH = 7,4), подогретым до 37 °C и инкубировались с 1мкМ TMRE в течение 45 минут. В качестве контроля в клетки добавлялся 10 мкМ FCCP, инкубация с ним длилась 15 минут. Далее клетки дважды промывались фосфатно-солевым буфером, нагретым до 37 °C. Результаты регистрировались при длине волн 540/590 нм с использованием микропланшетного ридера CLARIOstar (BMG LABTECH).

2) Клетки высаживались за 24 часа до начала эксперимента. После дважды промывались фосфатно-солевым буфером (pH = 7,4), подогретым до 37 °C, и инкубировались с 1мкМ TMRE в течение 45 минут. После этого измерялась флуоресценция на длине волн 540/590 нм с использованием флуоресцентного микроскопа (Zeiss, программа

Zen). После этого добавлялся 10 мкМ FCCP, спустя 15 минут повторно измерялась флуоресценция.

Краситель JC-10. 1) Клетки высаживались за 24 часа до начала эксперимента. После дважды промывались фосфатно-солевым буфером (pH = 7,4), подогретым до 37 °C, и инкубировались с раствором красителя для загрузки (Dye Loading Solution, набор «Mitochondrial membrane Potential Kit», MAK159, Sigma-Aldrich), приготовленным согласно инструкции производителя и разведенным в 2, 10, 50, 100, 200 раз, в течение 1 часа. В качестве контроля в клетки добавлялся 10 мкМ FCCP, инкубация с ним длилась еще 15 минут. Далее клетки дважды промывались фосфатно-солевым буфером, нагретым до 37 °C. Флуоресценция регистрировалась на длинах волн 490/523 нм и 540/590 нм с использованием микропланшетного ридера CLARIOstar (BMG LABTECH).

2) Клетки высаживались за 24 часа до начала эксперимента. Затем дважды промывались фосфатно-солевым буфером (pH = 7,4), подогретым до 37 °C, и инкубировались с раствором краси-

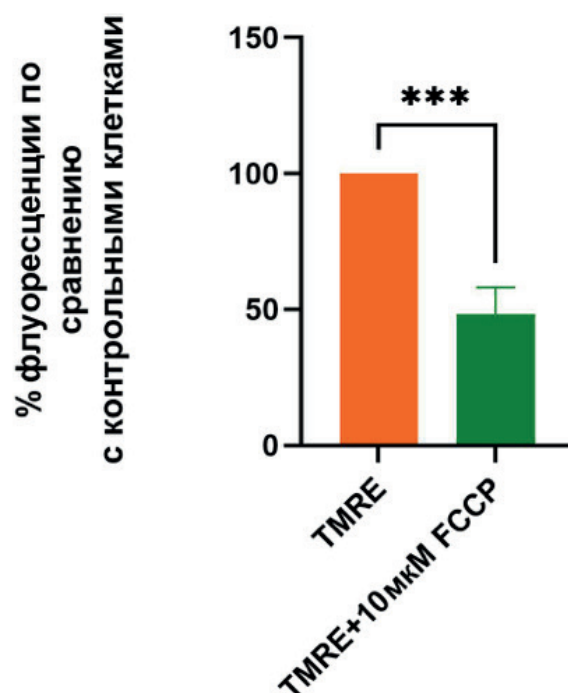


Рис. 2. Инкубация клеток C2C12 с 1 мкМ красителя TMRE. Добавление 10 мкМ FCCP достоверно снижает флуоресценцию. Данные представлены как процент от флуоресценции клеток, не подвергнутых действию FCCP.

***— различия достоверны по t-критерию Стьюдента, $p < 0,05$.

Figure 2. C2C12 cell incubation with 1 μ M of TMRE dye. The addition of 10 μ M FCCP reliably reduces fluorescence. The data are presented as a percentage of the fluorescence of cells not affected by FCCP.

***— the differences are valid by the t-criterion of the Student, $p < 0.05$.

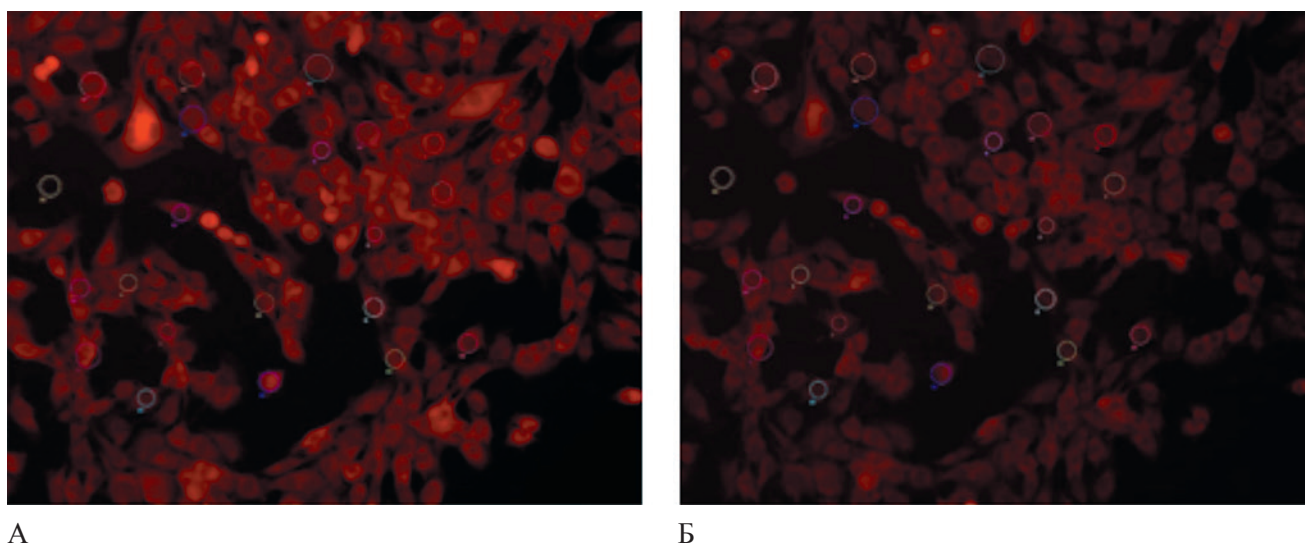


Рис. 3. А — Клетки C2C12 инкубация с 1 мкМ TMRE. Б — После добавления 10 мкМ FCCP наблюдается снижение уровня флуоресценции.

Figure 3. A — C2C12 cells incubate with 1 μ M TMRE. B — After adding 10 μ M FCCP, fluorescence is reduced.

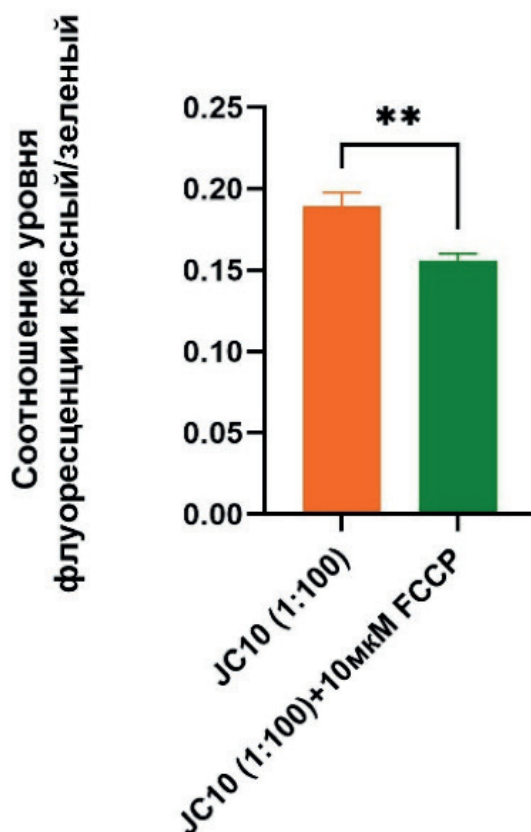


Рис. 4. Разведение в 100 раз раствора красителя JC-10 для загрузки (JC10 (1:100). При добавлении 10 мкМ FCCP достоверно снижается флуоресценция.

**— различия достоверны по t-критерию Стьюдента, $p < 0,05$.

Figure 4. Dilution 100 times the JC-10 dye solution for loading (JS10 (1:100). After adding 10 mM FCCP, fluorescence is authentically reduced.

**— the differences are valid by the t-criterion of the Student, $p < 0.05$.

теля для загрузки (Dye Loading Solution, набор «Mitochondrial membrane Potential Kit», MAK159, Sigma-Aldrich), приготовленным согласно инструкции производителя и разведенным в 2, 10, 50, 100, 200 раз, в течение 1 часа. После этого измерялась флуоресценция на длине волн 490/523 нМ и 540/590 нМ с использованием флуоресцентного микроскопа (Zeiss, программа Zen).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью программы Microsoft Office Excel. Для оценки значимости различия показателей использовался t-критерий Стьюдента. Значимыми считали различия при $p < 0.05$.

Результаты

Нами было протестировано несколько концентраций раствора для загрузки красителя JC-10 (без разведения, с разведением в 10, 50, 100 и 200 раз).

Для контроля полученных результатов в качестве референтного метода оценки MMP нами был использован монохромный краситель TMRE. На рисунке 2 представлены результаты эксперимента с использованием 1 мкМ TMRE после воздействия FCCP в концентрации 10 мкМ. Данный эксперимент подтвердил информативность и валидность используемой нами методики детекции и клеточной модели для регистрации MMP.

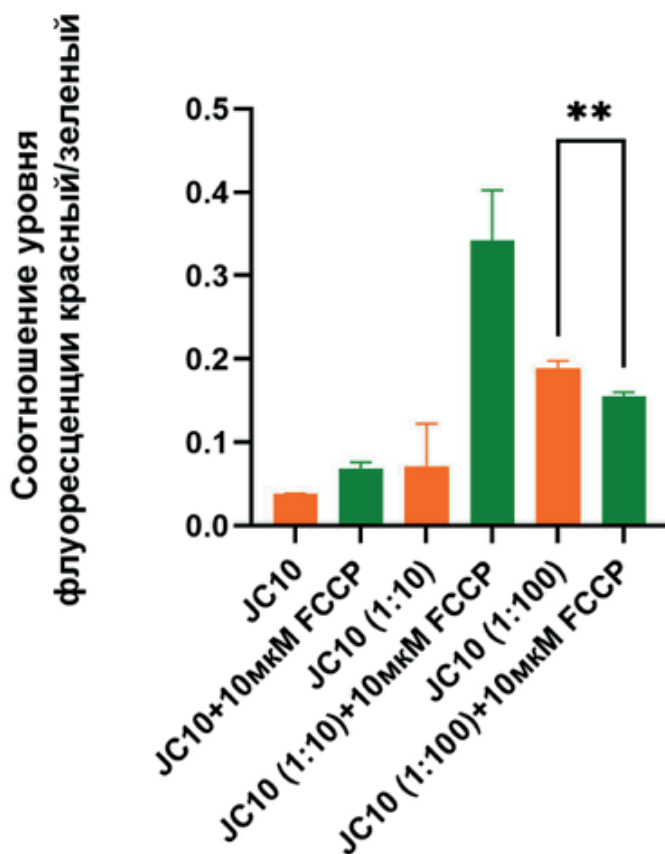


Рис. 5. Раствор красителя JC-10 для загрузки без разведения и с разведением в 10 и 100 раз (JC-10 (1:10) и JC-10 (1:100) соответственно). Данные представлены как соотношение уровня флуоресценции красный (агрегаты)/зеленый (мономеры) при использовании разных разведений JC-10. При добавлении 10 мкМ FCCP флуоресценция достоверно снижается при разведении 1:10, 1:100.

**— различия достоверны по t-критерию Стьюдента, $p < 0,05$.

Figure 5. Dye solution JC-10 for loading without dilution and diluted 10 and 100 times (JC-10 (1:10) and JC-10 (1:100) respectively). The data are presented as the fluorescence level ratio red (aggregates)/green (monomers) using different dilutions JC-10. When added 10 μ M to the FCCP, fluorescence is authentically reduced at 1:10, 1:100.

**— the differences are valid according to the t-criterion of the Student, $p < 0.05$.

При регистрации результатов инкубации клеток с красителем TMRE с использованием флуоресцентного микроскопа Zeiss мы получили следующие результаты: инкубация с монохромным красителем увеличивала флуоресценцию в клетках C2C12 (рис. 3А), добавление FCCP приводило к снижению интенсивности флуоресценции, что соответствует падению ММР (рис. 3Б).

После серии экспериментов нами было показано, что оптимальным является разведение раствора в 100 раз по сравнению с рекомендованным в соответствии с инструкцией производителя (рис. 4). В этом случае нами наблюдалось снижение интенсивности флуоресценции агрегатов красителя красного цвета, образовавшихся в матриксе митохондрий, что означает деполяризацию митохондрий и снижение митохондриального мембранного потенциала. Для сравнения на рисунке 5 представлены результаты экспериментов, в которых использовался раствор красителя для загрузки без разведения и с разведением в 10 и 100 раз.

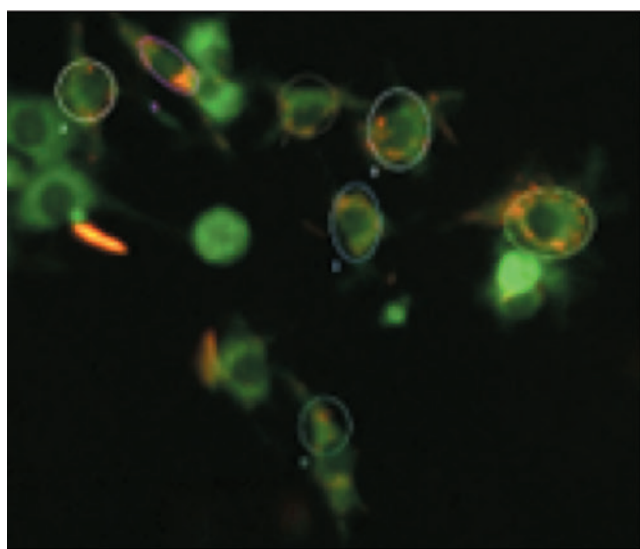
Также мы изучали влияние разных концентраций раствора красителя JC-10 для загрузки с регистрацией изменения флуоресценции с использованием флуоресцентного микроскопа Zeiss и программного обеспечения для обработки ви-

деосигнала Zen. На рисунке 6А представлены результаты эксперимента с разведением красителя в 100 раз и последующим добавлением 10 мкМ FCCP (рис. 6А).

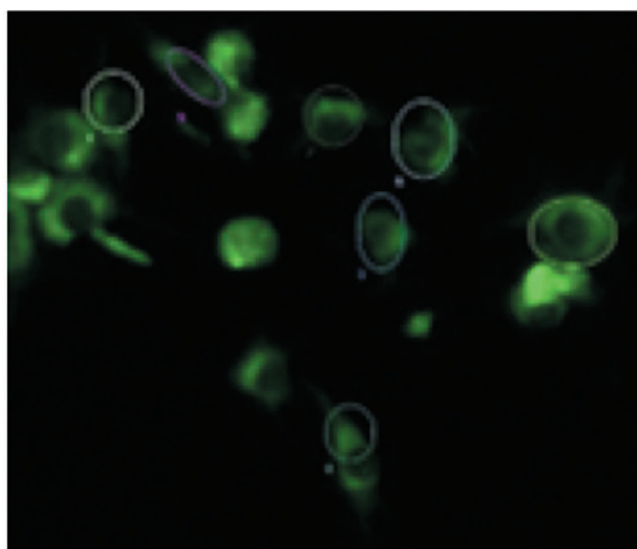
Обсуждение

Для изучения ММР применяются различные методы, в том числе и с использованием флуоресцентных красителей. Среди них наиболее популярными являются метиловый (TMRM) и этиловый (TMRE) эфиры тетраметилродамина, родамин 123 (Rhod123), DiOC6(3) (3,3'-дигексилоксакарбоцианин йодид) и JC-1 (5,5',6,6'-тетрахлор-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолилкарбоцианин йодид). Как положительно заряженные молекулы, при условии, что используются соответствующие условия анализа, красители будут накапливаться в митохондриях клеток, что соответствует увеличению уровня флуоресценции красителя. При действии агентов, вызывающих деполяризацию митохондрий, будет снижаться накопление красителя в митохондриях и падать уровень флуоресценции по сравнению с интактными клетками, имеющими поляризованные митохондрии.

У каждого красителя есть определенные достоинства и недостатки. Так, TMRE и TMRM прямо



А



Б

Рис. 6. А — При инкубации клеток C2C12 с 100-кратно разведенным раствором красителя JC-10 для загрузки внутри митохондрий образуются агрегаты красного цвета. Б — Добавление 10 мкМ FCCP приводит к деполяризации и дальнейшему выходу красителя из митохондрий, что проявляется как снижение вплоть до полного исчезновения красной флуоресценции.

Figure 6. A — When C2C12 cells are incubated, red aggregates are formed inside the mitochondria with a 100-fold diluted solution of JC-10 dye for loading. B — The addition of 10 μM FCCP results in depolarization and further release of the mitochondrial dye, which manifests as a decrease to the point of total disappearance of red fluorescence.

пропорционально концентрации способны оказывать ингибирующее действие на дыхательную цепь митохондрий, но в их низких концентрациях этим эффектом можно пренебречь. Оба красителя достаточно быстро уравниваются, что делает их достаточно удобными для исследований. При загрузке красителя в инкубационную среду, через какое-то время наблюдается прекращение увеличения флуоресценции. Это состояние рассматривается как достижение равновесия, при котором дальнейшее изменение флуоресценции будет являться следствием и отражать изменение ММР.

Помимо TMRE и TMRM для измерения ММР может быть использован JC-1 или его аналог JC-10. Для данных красителей характерно то, что мономерная (зеленая) форма обычно точно соответствует ММР, в то время как агрегатная (красная) флуоресценция может формироваться и независимо от ММР, например, при действии АФК или неправильно подобранной концентрации красителя. В зависимости от локализованных концентраций красителя в поляризованных митохондриях, можно увидеть как красную, так и зеленые формы красителя, что, с одной стороны, может отражать реальные локальные различия в ММР, а с другой — разные скорости достижения равновесия и, следовательно, разные скорости образования агрегатов. Таким образом, для правильного окрашивания необходимо учитывать несколько важных факторов, которые могут повлиять на загрузку красителя, распределение и достижение равновесия.

Концентрация красителя в митохондриях зависит от: концентрации красителя в среде инкубации, ММР, размера и массы митохондрий, времени загрузки. Если зонд длительное время остается в среде инкубации, то ММР может продолжать увеличиваться со временем, и тогда не будет достигнуто устойчивое равновесие. Это может происходить по нескольким причинам: слишком высокие концентрации красителя, слишком высокая плотность клеток, в результате чего трудно достичь необходимого насыщения зондом. Для устранения этих проблем нужно или снизить концентрацию красителя, как в первом случае, или уменьшить концентрацию клеток. В то же время для некоторых клеточных культур может быть характерна другая ситуация: краситель загружается слишком медленно, не достигая равновесных концентраций. Часто это указывает на наличие переносчиков множественной лекарственной устойчивости, особенно в опухолевых клетках. Используя готовый набор для определения ММР (MAK159, Sigma-Aldrich), мы адаптировали его применение для клеточной линии мышечных миоцитов

C2C12. Количество красителя JC-10 в рекомендуемом производителем растворе для загрузки оказалось высоким для нашего исследования, что не позволяло достичь концентрационного равновесия, необходимого для правильной интерпретации результатов эксперимента, в то время как стократное разведение позволило достичь необходимого эффекта. Достоверность полученных результатов была подтверждена серией экспериментов с красителем TMRE, который, в отличие от JC-10, является мономерным красителем, способным быстро достигнуть равновесной концентрации. В результате нами было показано, что, несмотря на кажущуюся сложность использования JC-10 и влияние многочисленных факторов на достоверность результатов, данный краситель может быть применен и обладает информативностью в клеточной линии C2C12, так как при подобранных концентрациях позволяет получить точные характеристики ММР и отследить его в динамике [4].

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Финансирование / Funding

Грант РНФ 20-15-00271П. / RGNF grant 20-15-00271П.

Список литературы / References

1. Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EJ, et al. Functional Significance of the Mitochondrial Membrane Potential. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A*. 2018; (12): 20–26. DOI: 0.1134/S1990747818010129.
2. Perry SW, Norman JP, Barbieri J, et al. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques*. 2011;50(2):98–115. DOI: 10.2144/000113610.
3. Mathur A, Hong Y, Kemp BK, et al. Evaluation of fluorescent dyes for the detection of mitochondrial membrane potential changes in cultured cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2000;46(1):126–38. DOI: 10.1016/S0008-6363(00)00002-X.
4. Buckman JF, Reynolds JJ. Spontaneous changes in mitochondrial membrane potential in cultured neurons. *J Neurosci*. 2001;21(14):5054–65. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-14-05054.2001.

Информация об авторах:

Власова Юлия Александровна, к.б.н., старший научный сотрудник НИЛ молекулярного и клеточного моделирования и генной терапии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Клименко Екатерина Сергеевна, младший научный сотрудник НИЛ молекулярного и клеточного моделирования и генной терапии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Сухарева Ксения Сергеевна, PhD, младший научный сотрудник НИЛ молекулярного и клеточного моделирования и генной терапии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Гаврилова Лидия Сергеевна, магистрант Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Костарева Анна Александровна, д.м.н., директор Института молекулярной биологии и генетики, профессор кафедры факультетской терапии с клиникой Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Authors information:

Yulia A. Vlasova, Cand. Sc. (Biology), Senior researcher, Research Laboratory of Molecular and Cellular Modeling and Gene Therapy, Almazov National Medical Research Centre;

Ekaterina S. Klimenko, Junior Researcher, Research Laboratory of Molecular and Cellular Modeling and Gene Therapy, Almazov National Medical Research Centre;

Ksenia S. Sukhareva, PhD, Junior Researcher, Research Laboratory of Molecular and Cellular Modeling and Gene Therapy, Almazov National Medical Research Centre;

Lidiya S. Gavrilova, Master's student at the Institute of Medical Education of the Almazov National Medical Research Centre;

Anna A. Kostareva, MD, PhD, Director of the Institute of Molecular Biology and Genetics, Professor of the Department of Faculty Therapy with the Clinic of the Institute of Medical Education of the Almazov National Medical Research Centre.

ГЕПАРИНАЗА УСТРАНЯЕТ ГЕПАРИН-АССОЦИИРОВАННОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ПРИ ОЦЕНКЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ТКАНЯХ ЛЕГКИХ

Вахрушев Н. С.¹, Шиленко Л. А.¹, Черваев А. А.¹, Карпов А. А.^{1,2},
Галагудза М. М.¹, Костарева А. А.¹, Калинина О. В.^{1,3}

Контактная информация:

Вахрушев Никита Сергеевич,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: drabrikos@gmail.com

Статья поступила в редакцию
11.01.2024, принята к печати 25.03.2024.

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский
государственный электротехнический университет «ЛЭТИ»
имени В. И. Ульянова (Ленина)», Санкт-Петербург, Россия

³ Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-
Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека,
Санкт-Петербург, Россия

Резюме

Актуальность. При изучении патологий часто используют гистологические и молекулярно-генетические методы исследования. Для предотвращения загрязнения элементами крови гистологических препаратов проводят перфузию микроциркуляторного русла раствором гепарина, что ведет к его накоплению в ткани образца. Известно, что гепарин является ингибитором полимеразной цепной реакции (ПЦР) за счет блокирования сайтов связывания ДНК-полимеразы с ДНК-мишенью. **Цель.** Изучить возможность предотвращения влияния нефракционированного гепарина (НФГ), используемого при перфузии органов, на результат оценки уровня экспрессии генов в образцах легких крыс методом ОТ-ПЦР за счет предварительной обработки гепариназой препаратов РНК. **Материалы и методы.** Перфузию сосудистого русла крыс проводили НФГ в концентрациях 50 МЕ/мл ($n = 3$) и 500 МЕ/мл ($n = 3$) либо раствором хлорида натрия ($n = 3$) в качестве контроля. Тотальную РНК выделяли из образцов левого легкого крыс, после чего обрабатывали гепариназой. Оценку уровня относительной экспрессии пяти генов: s18, HPRT, Actin β , GAPDH, Vim до и после обработки гепариназой препаратов выделенной РНК проводили на основе абсолютного значения порогового цикла (Ct), полученного методом ОТ-ПЦР. **Результаты.** Данные показали, что НФГ повышает уровень порогового цикла в ОТ-ПЦР. Обработка образцов гепариназой не оказывает воздействие на количество и качество РНК, при этом статистически значительно снижает уровень порогового цикла по сравнению с необработанными гепариназой образцами. **Заключение.** При планировании исследования необходимо учитывать искажения результатов генетического исследования, возникающие из-за перфузии органа раствором гепарина. Использование гепариназы эффективно устраняет гепарин-ассоциированное ингибирование ОТ-ПЦР, не влияя на качество и количество исходной РНК.

Ключевые слова: гепарин, ОТ-ПЦР, перфузия тканей, РНК.

Для цитирования: Вахрушев Н.С., Шиленко Л.А., Черваев А.А. и др. Гепариназа устраняет гепарин-ассоциированное ингибирование полимеразной цепной реакции в реальном времени при оценке экспрессии генов в тканях легких. Трансляционная медицина. 2024; 11(1): 55-64. DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-1-55-64. EDN: CFKQDB

HEPARINASE ELIMINATES HEPARIN-ASSOCIATED INHIBITION OF THE REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION WHEN ASSESSING GENE EXPRESSION IN LUNG TISSUE

Nikita S. Vachrushev¹, Leonid A. Shilenko¹,
Al-Khalim A. Chervaev¹, Andrei A. Karpov^{1,2},
Michael M. Galagudza¹, Anna A. Kostareva¹, Olga V. Kalinina^{1,3}

¹ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI", Saint Petersburg, Russia

³ Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Nikita S. Vachrushev,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.

E-mail: drabrikos@gmail.com

Received 11 January 2024; accepted
25 March 2024.

Abstract

Background. Histological and genetic methods are often used in the study of pathologies. To prevent contamination of histological preparations with blood, the microvasculature is perfused with a heparin, which leads to its accumulation in the tissue. Heparin is an inhibitor of the polymerase chain reaction (PCR). **Objective.** To study the possibility of preventing the influence of unfractionated heparin (UFH), used in perfusion, on the result of gene expression in rat lung samples using RT-PCR by pretreatment RNA with heparinase. **Design and methods.** Perfusion of the rats' vasculature was performed with UFH at concentrations of 50 IU/mL (n = 3) and 500 IU/mL (n = 3), or with a sodium chloride (n = 3) as a control. RNA was isolated from left lung samples and treated with heparinase. The relative expression of five genes (s18, HPRT, Actin β , GAPDH, Vim) before and after heparinase treatment of isolated RNA preparations was assessed based on the absolute value of the threshold cycle (Ct) obtained by RT-PCR. **Results.** UFH increases the threshold cycle level. Treatment of samples with heparinase does not affect the quantity and quality of RNA, but reduce the Ct compared to samples not treated with heparinase. **Conclusion.** While planning a study, it is necessary to consider alterations in the results of genetic research that arise due to organ perfusion with a heparin solution. The use of heparinase effectively eliminates heparin-associated RT-PCR inhibition.

Key words: heparin, RNA, RT-PCR, tissue perfusion.

For citation: Vachrushev NS, Shilenko LA, Chervaev AA, et al. Heparinase eliminates heparin-associated inhibition of the real-time polymerase chain reaction when assessing gene expression in lung tissue. Translational Medicine. 2024; 11(1): 55-64. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-1-55-64. EDN: CFKQDB

Список сокращений: НФГ — нефракционированный гепарин, ПЦР — полимеразная цепная реакция, ОТ-ПЦР — ПЦР с обратной транскрипцией, Ct — пороговый цикл.

Введение

За последние десятилетия полимеразная цепная реакция (ПЦР), позволяющая амплифицировать определенный фрагмент ДНК, стала одним из основных инструментов в медико-биологических исследованиях. Изобретатель ПЦР Кэрри Мюллис сказал: «ПЦР позволяет вам выбрать фрагмент ДНК, который вас интересует, и иметь столько, сколько вы хотите» [1]. Полимеразная цепная реакция включает три этапа: денатурацию двойной спирали ДНК, присоединение (отжиг) специфических праймеров и элонгацию (синтез дочерней цепи ДНК), которая обеспечивается 3'-5' активностью фермента термостабильной ДНК-полимеразы. На эффективность ПЦР влияют многие факторы, в частности ингибирование ДНК-полимеразы за счет снижения ее активности или полного ее разрушения [2], что приводит к ошибкам в оценке абсолютного и относительного количества целевой матрицы. Гепарин, представляющий собой полисахарид семейства гликозамингликанов, широко используемый в клинической практике как антикоагулянтное средство прямого действия, является одним из ингибиторов ПЦР [3]. Молекулярный механизм ингибирования ПЦР гепарином точно не установлен. Показано, что он влияет на процесс элонгации в цикле ПЦР, а также на процесс обратной транскрипции, при котором происходит синтез кДНК на матрице РНК [4]. Предположительно, гепарин за счет отрицательного заряда, обусловленного наличием сульфатных и карбоксильных групп, взаимодействует с положительно заряженными молекулами магния, образующими комплекс с ДНК-полимеразой, тем самым снижая или полностью блокируя функционирование ДНК-полимеразы [5]. Была показана линейная зависимость между концентрацией гепарина и степенью ингибирования ПЦР, что подтверждает наличие конкуренции гепарина с ионами магния за субстрат [6].

Достоверно установлено, что присутствие гепарина в пробирках для взятия образцов периферической крови [7] или в образцах периферической крови пациентов, которым системно вводили гепарин [8], ингибирует ПЦР. Более того, системное введение гепарина оказывает негативное влияние на результат ПЦР, проводимой на ДНК/РНК, выделенной не только из образцов крови или плазмы, но и из различных органов.

Х. Н. Ваи и соавторы (2000 г.) [9], изучая экспрессию цитокинов при трансплантации легких у крыс, обнаружили, что системное введение гепарина ингибирует ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и снижает экспрессию гена *Actinβ* в образцах легких при исследовании продуктов ПЦР методом электрофореза в агарозном геле. Гепарин сохраняется в образцах при выделении нуклеиновых кислот даже методом фенол-хлороформной экстракции, более того, ни повторная преципитация этанолом, ни сдвиг pH не могут этого предотвратить [10]. Рядом авторов было предложено для устранения или снижения ингибирования ПЦР гепарином использовать ДНК-полимеразы, устойчивые к гепарину [11], или предварительно обработать образцы ферментом *heparinase I* (гепариназа) [12]. Гепариназа является эндо-β-D-глюкуронидазой, которая разрушает гликозидные связи между уроновой кислотой и ацетил-глюкозаминном, составляющими основную структуру молекулы гепарина. Гидролиз гликозидных связей гепарина приводит к образованию более коротких фрагментов, которые теряют способность к ингибированию ПЦР. Кроме того, в протокол пробоподготовки материала для гистологического исследования часто входит использование раствора гепарина для предотвращения загрязнения препарата эритроцитами и сгустками тромбов. Если сосудистые структуры являются важной составной частью исследования, перфузия гепарином обеспечивает свободное прохождение растворов фиксаторов и других обрабатывающих веществ по сосудам и капиллярам, что дает более точные данные о микроциркуляции [13]. Ярким примером этого служит подготовка ткани легкого для гистологического анализа при изучении различных форм легочной гипертензии [14, 15].

Цель данной работы — проанализировать влияние нефракционированного гепарина, используемого при перфузии малого круга кровообращения крыс, на результат оценки уровня экспрессии генов *s18*, *HPRT*, *Actinβ*, *GAPDH*, *Vim* в образцах легких крыс методом ОТ-ПЦР.

Материал и методы исследования

Животные

В работе использованы 9 крыс-самцов породы Wistar конвенциональной категории массой 224 ± 30 г. Все животные содержались в стандартных условиях, имели доступ к полнорационному гранулированному корму и воде *ad libitum*. Эксперименты были проведены в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (публикация Национального

института здоровья, 8-е изд., 2011 г.). Процедуры с животными были рассмотрены и утверждены биоэтической комиссией ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет» Минздрава России (протокол № Rats-05.2022-5 от 23.05.2022).

Раствор гепарина

В эксперименте для отмывки сосудистого русла легких использовался нефракционированный гепарин (НФГ) в двух концентрациях: низкой (50 МЕ/мл) и высокой (500 МЕ/мл). Указанные растворы были получены из коммерческого реагента НФГ 5000 МЕ/мл (B Braun, Германия) путем добавления соответствующего объема 0,9 % раствора хлорида натрия (NaCl).

Протокол эксперимента

Были сформированы следующие группы:

Контроль (n = 3) — перфузию сосудистого русла легких проводили 10 мл 0,9 % раствора NaCl;

НФГ 50 (n = 3) — перфузию сосудистого русла легких проводили 10 мл раствора НФГ в концентрации 50 МЕ/мл;

НФГ 500 (n = 3) — перфузию сосудистого русла легких проводили 10 мл раствора НФГ в концентрации 500 МЕ/мл.

В ходе проведения эксперимента животным в качестве наркоза внутримышечно вводили Золетил 100 (Virbac, Франция) и Ксилазин 2 % (Interchemie Werken «de Adelaar» BV, Нидерланды). Крысы размещались на подогреваемом столике (TCAT-2LV controller, Physitemp Instruments Inc., Clifton, NJ, США) в положении на спине и получали искусственную вентиляцию легких через интубацию трахеи с помощью аппарата искусственной вентиляции легких SAR — 830/AP (CWE Inc., США). После вскрытия грудной клет-

ки нижнюю полую вену пересекали на уровне диафрагмы со стороны грудной клетки с одновременной пункцией правого желудочка (ПЖ) кубитальным катетером Vasofix Certo 20G (B Braun, Германия), через который перфузировали сосудистое русло раствором гепарина в разных концентрациях или 0,9 % раствором NaCl. После завершения процедуры отмывки сосудистого русла легких выполняли эвтаназию животного с помощью введения в левый желудочек сердца 10 % хлорида калия с последующим изъятием левого легкого для молекулярно-генетического анализа. Извлеченное левое легкое фрагментировали и мгновенно замораживали в жидком азоте. Образцы хранили при –80 °С.

Выделение тотальной РНК

К замороженным образцам ткани легкого добавляли Extract RNA reagent (Evrogen), после чего образцы подвергали гомогенизации на аппарате TissueLyzer (QIAGEN) в течение 5 минут при частоте 50 Гц. Далее выделение РНК проводили согласно инструкции производителя. После отмывки 70 % спиртом подсушенный осадок растворяли в 20 мкл воды. Количество и чистоту выделенной РНК оценивали с использованием NanoDrop 3300 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Качество РНК оценивали на основании электрофореза в агарозном геле.

Обработка гепариназой

Обработку гепариназой препаратов РНК, выделенной из образцов легких крыс, проводили, используя протокол, описанный Кондратовым и соавторами [16]. Предварительно концентрацию РНК во всех образцах нормировали MQ водой до 1000 нг/мкл. Далее 7,5 мкл образца РНК в концентрации 1000 нг/мкл смешивали с 7,5 мкл

Таблица 1. Последовательность праймеров

Table 1. Primer sequences

Название праймера	Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера
Vim	TGCCAACCGGAACAACGAT	ACTGCACCTGTCTCCGGTA
HPRT	GTCCCAGCGTCGTGATTAGT	CTTGCCGCTGTCTTTTAGGC
Prs18	CGCCATGTCCCTAGTGATCC	ACTTCCCATCCTTCACGTCC
Actinβ	CCCGCGAGTACAACCTTCTT	AACACAGCCTGGATGGCTAC
GAPDH	CGGTGTGAACGGATTTGGC	TTGAGGTCAATGAAGGGGTGC

рабочего раствора гепариназы (0,084 МЕ/мкл Heparinase I (Sigma-Aldrich), 0,5 МЕ/мкл Rnase Inhibitor (Thermo Fisher), 10 ммоль/л Tris HCl pH 7,5, 2 ммоль/л CaCl₂, 25 ммоль/л NaCl), инкубировали в течение 3 часов при 25 °С, охлаждали и хранили при –80 °С. Качество целостности обработанной гепариназой РНК оценивали при помощи электрофореза в агарозном геле на основании фрагментов РНК, соответствующих S18 и S28.

Оценка относительной экспрессии генов

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием случайных олигонуклеотидных праймеров Random (dN)10-primer (Evrogen) и фермента MMLV RT kit (Evrogen). Экспрессию генов оценивали на основе значения Ct для каждого гена: s18, HPRT, Actin β , GAPDH, Vim. ПЦР в режиме реального времени осуществляли со специфическими праймерами для каждого гена (табл. 1) и набором реагентов SybrGreen Low ROX (Evrogen) на приборе Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System при следующих условиях: 10 мин. при 95 °С, 15 сек. при 95 °С и 1 мин. при 60 °С.

Статистический анализ

Анализ данных выполняли с помощью программного обеспечения R 4.2.2. Факторы, влияющие на уровень порогового цикла (Ct), определяли на основании трехфакторного дисперсионного анализа с фиксированием случайного эффекта для каждого образца. Для оценки статистически достоверной разницы между группами использовали Т-критерий Стьюдента с поправкой Бонферони. Данные представляли в виде медианы (Me) с указанием межквартильного интервала (25–75 %).

Результаты

Количество выделенной РНК статистически значимо не отличалось между группами независимо от концентрации гепарина, используемого при перфузии сосудов легких крыс (рис. 1). Спектральный анализ, выполненный с использованием NanoDrop 3300 SpectroPhotometer, свидетельствовал об отсутствии примесей во всех образцах выделенной РНК. Независимо от концентрации гепарина, используемого для перфузии легких, и обработки гепариназой во всех образцах легких

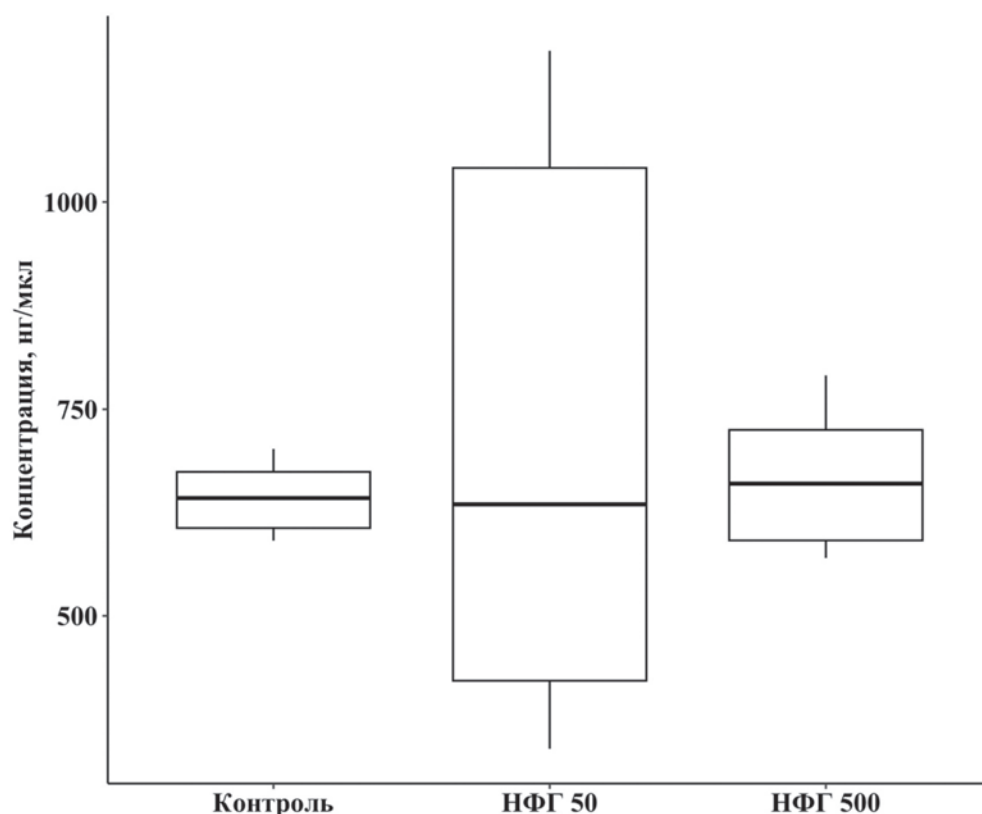


Рис. 1. Концентрация РНК, выделенной из образцов легких крыс после перфузии изотоническим раствором хлорида натрия (контроль), 1 % (НФГ 50) или 10 % (НФГ 500) раствором гепарина

Figure 1. Concentration of RNA isolated from rat lung samples after perfusion with isotonic sodium chloride solution (control), 1 % (UFH 50) or 10 % (UFH 500) heparin solution

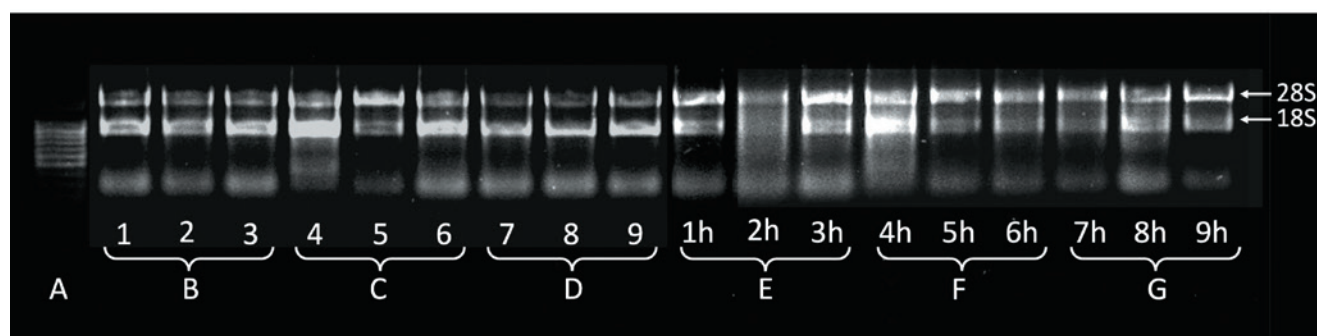


Рис. 2. Электрофореграмма образцов РНК, выделенных из ткани легких крыс, в агарозном геле

Верхние бэнды соответствуют 28S РНК (4,5 кб), нижние бэнды соответствуют 18S РНК (1,9 кб). А — молекулярный маркер. В и Е — легкие перфузировались изотоническим раствором хлорида натрия. С и F — легкие перфузировались 1 % раствором гепарина. D и G — легкие перфузировались 10 % раствором гепарина. В, С, D — группы, необработанные гепариназой. Е, F, G — группы, обработанные гепариназой. Номера образцов до обработки гепариназой: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и после: 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 8h, 9h.

Figure 2. Electropherogram of RNA samples isolated from rat lung tissue in agarose gel

The upper bands correspond to 28S RNA (4.5 kb), the lower bands correspond to 18S RNA (1.9 kb). A — molecular marker. B and E — the lungs were perfused with isotonic sodium chloride solution. C and F — lungs were perfused with 1% heparin solution. D and G — the lungs were perfused with 10 % heparin solution. B, C, D — groups not treated with heparinase. E, F, G — groups treated with heparinase. Sample numbers before treatment with heparinase: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and after: 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 8h, 9h.

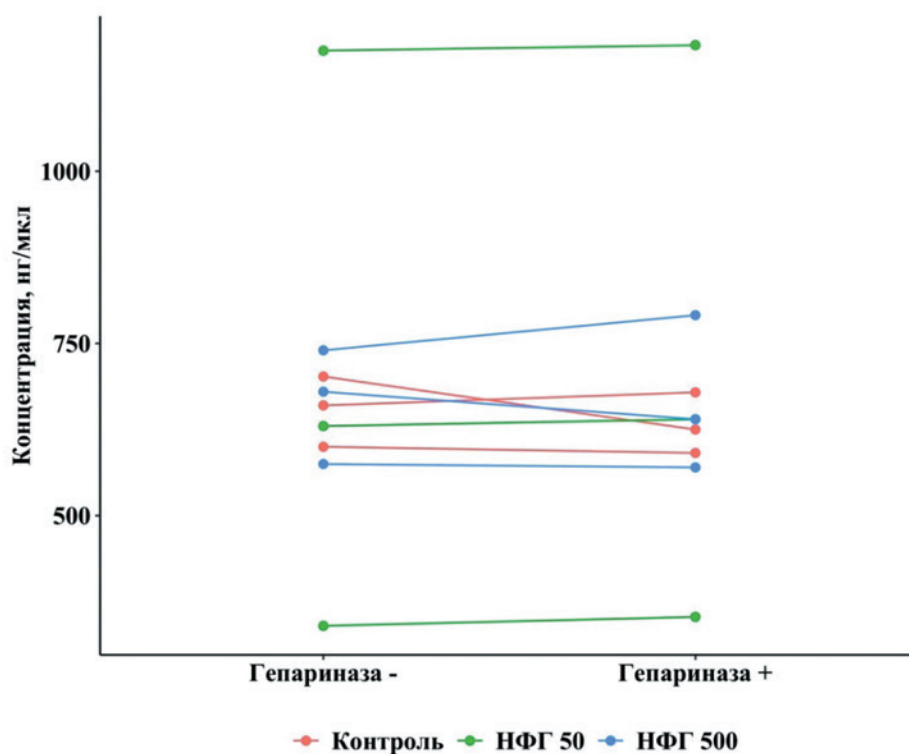


Рис. 3. Концентрация РНК нг/мкл в зависимости от обработки препаратов гепариназой

Figure 3. RNA concentration ng/μl depending on the treatment with heparinase

крыс присутствовали два пула РНК, по электрофореграмме соответствующих 28S и 18S рибосомальной РНК (рис. 2). Обработка гепариназой статистически значимо не влияла на концентрацию РНК в образцах легких крыс во всех исследуемых группах (рис. 3).

Обработка гепариназой образцов выделенной РНК статистически значимо влияла на уровень порогового цикла в обеих экспериментальных группах, в которых перфузию сосудов легких проводили 1 % или 10 % раствором гепарина (рис. 4С и 4В). В то же время разницы между уровнем Ct в зависимости от обработки гепариназой РНК, выделенной из образцов контрольной группы, в которой перфузию легких проводили изотоническим раствором хлорида натрия, не наблюдалось (рис. 4А).

Анализ значений порогового цикла ОТ-ПЦР показал, что изменение уровня Ct из-за ингибирующего воздействия гепарина на ОТ-ПЦР отлича-

лось для каждого исследуемого гена (рис. 5). Для двух, s18 (p-value = 0,031) и HPRT (p-value = 0,034), из пяти анализируемых генов установлена статистически значимая разница изменения уровня Ct в зависимости от обработки гепариназой препаратов РНК, выделенной из образцов легких крыс после перфузии 10 % раствором гепарина. В образцах легких крыс после перфузии 1 % раствором гепарина отмечена тенденция на снижение уровня Ct для тех же генов s18 (p-value = 0,139) и HPRT (p-value = 0,324) в зависимости от обработки гепариназой препаратов РНК, однако статистически значимой разницы не обнаружено.

Полученные результаты позволили выявить статистически значимые факторы, влияющие на уровень порогового цикла ОТ-ПЦР: обработка гепариназой (p-value < 0,0000), экспрессия определенного гена (p-value < 0,0000), а также обработка гепариназой в зависимости от концентрации гепарина при перфузии легких (p-value < 0,0000). Ис-

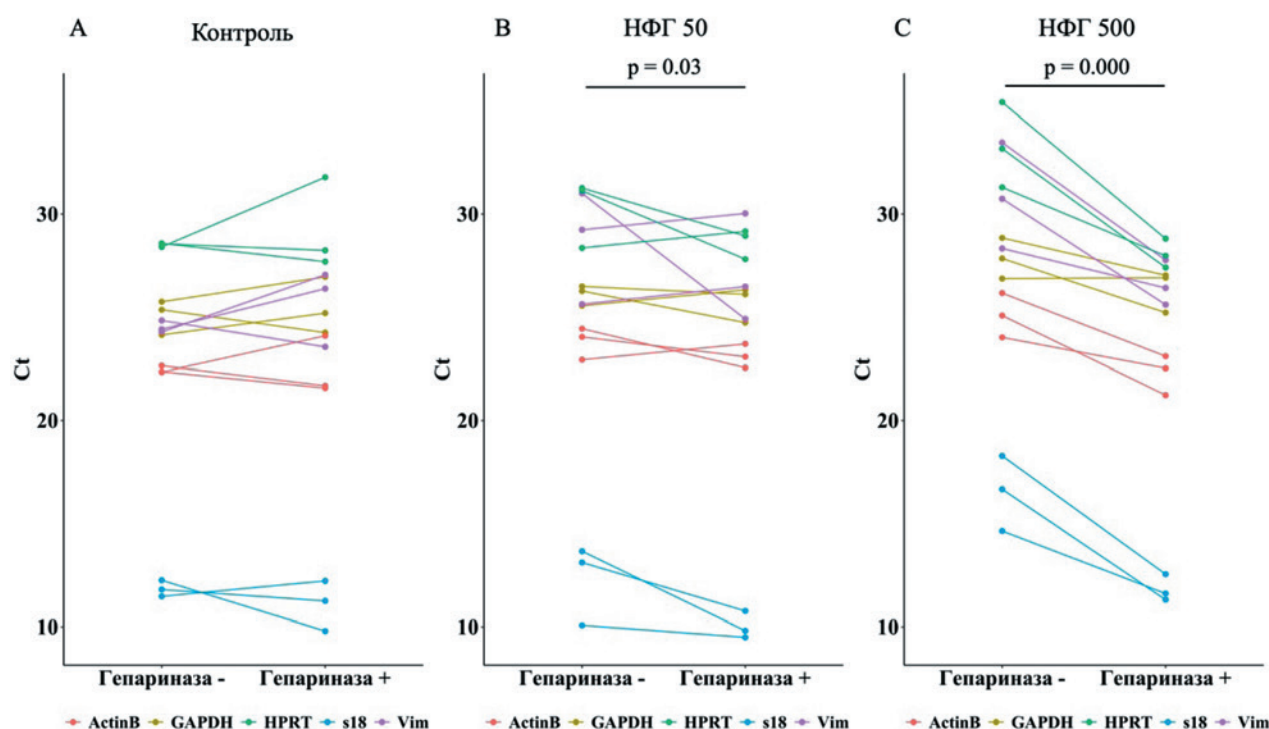


Рис. 4. Изменение абсолютного значения пороговых циклов ОТ-ПЦР в каждой исследуемой группе в зависимости от раствора, использованного для перфузии легких крыс, и последующей обработки гепариназой препаратов выделенной РНК. А — перфузия легких изотоническим раствором хлорида натрия (контроль), В — перфузия легких 1 % раствором гепарина (НФГ50), С — перфузия легких 10 % раствором гепарина (НФГ500).

Figure 4. Change in the absolute value of RT-PCR threshold cycles in each study group depending on the solution used for perfusion of rat lungs and subsequent treatment of isolated RNA with heparinase. А — perfusion of the lungs with isotonic sodium chloride solution (control), В — perfusion of the lungs with 1 % heparin solution (UFH50), С — perfusion of the lungs with 10 % heparin solution (UFH500).

пользование гепарина для перфузии легких приводило к увеличению уровня порогового цикла.

Обсуждение

В настоящее время в биомедицинских исследованиях одновременно используется множество способов анализа изучаемых явлений. Комплексный подход, включающий в себя молекулярно-генетический анализ методом ПЦР, функциональное тестирование, гистологическое исследование и т. д., нередко встречается в рамках одного исследования. При планировании исследований важно учитывать возможное негативное влияние раствора гепарина, используемого в клинических целях или при заборе биологических образцов, на получение

достоверных результатов молекулярно-генетическими методами, в частности ОТ-ПЦР. Так, перфузия трансплантата раствором гепарина широко используется при трансплантации легких [17], что должно быть учтено при последующих молекулярно-генетических исследованиях. Интраназальные инъекции раствора гепарина, в качестве терапевтического агента, применяют при различных инфекционных заболеваниях, что может влиять на выявление генома возбудителя методом ПЦР [18].

Несмотря на то, что уже давно известно об ингибирующем эффекте гепарина на результаты ПЦР, до сих пор постоянно продолжают разрабатываться новые способы его деградации в биологических образцах [19]. Следует отметить, что

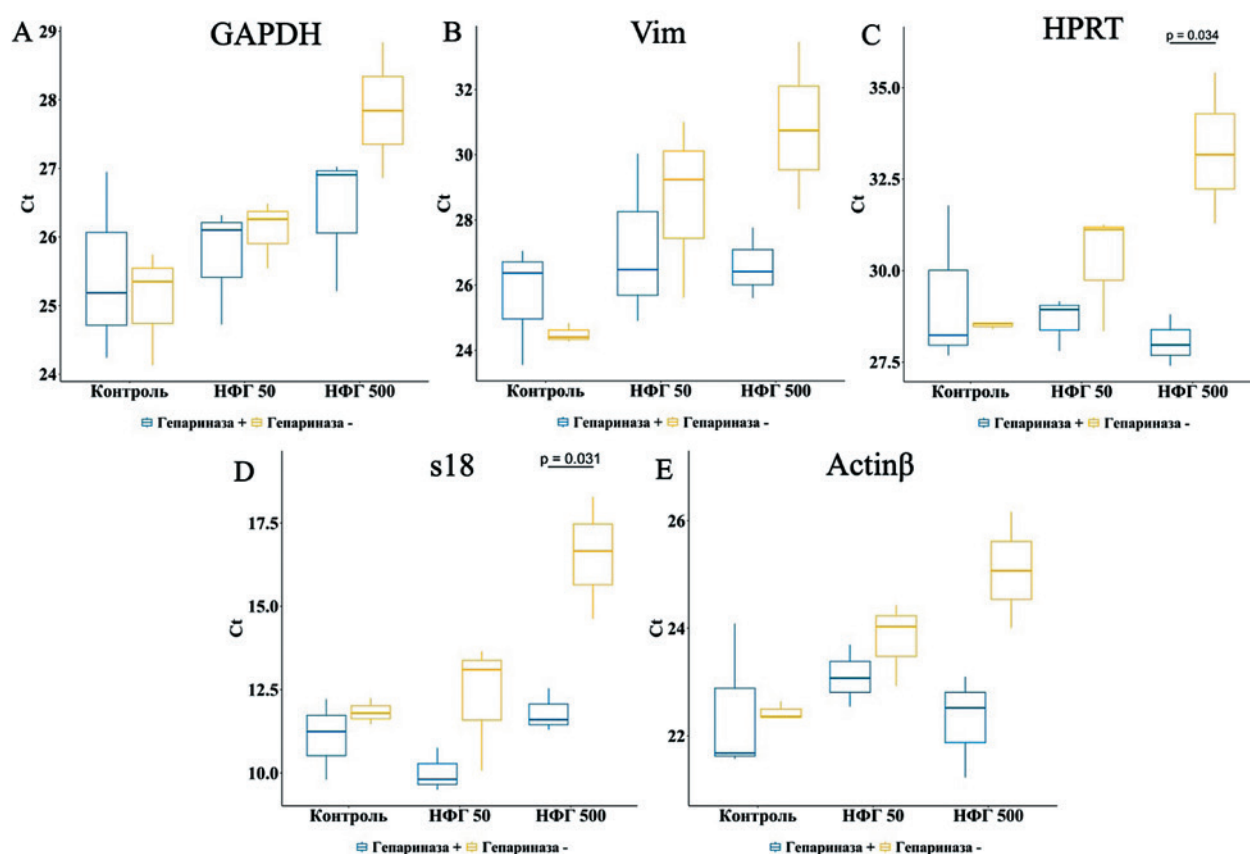


Рис. 5. Изменение абсолютного значения порогового цикла ОТ-ПЦР для каждого анализируемого гена GAPDH (A), Vim (B), HPRT (C), s18 (D), Actinβ (E) в зависимости от раствора, использованного для перфузии легких крыс, и последующей обработки гепариназой препаратов выделенной РНК. Контроль — перфузия легких изотоническим раствором хлорида натрия, НФГ50 — перфузия легких 1 % раствором гепарина, НФГ500 — перфузия легких 10 % раствором гепарина.

Figure 5. Change in the absolute value of the RT-PCR threshold cycle for each analyzed gene GAPDH (A), Vim (B), HPRT (C), s18 (D), Actinβ (E) depending on the solution used for perfusion of rat lungs and subsequent treatment of isolated RNA with heparinase. Control — perfusion of the lungs with isotonic sodium chloride solution, UFH50 — perfusion of the lungs with 1 % heparin solution, UFH 500 — perfusion of the lungs with 10 % heparin solution.

помимо гепарина есть целый ряд соединений, которые искажают результаты ПЦР, в частности гемоглобин, иммуноглобулин G и лактоферрин [20], что указывает на важность преаналитического этапа исследования, необходимость оценки потенциального ингибирующего эффекта соединений на результаты молекулярно-генетического анализа и способов их устранения.

В данной работе мы продемонстрировали, что перфузия тканей раствором гепарина для очистки сосудистого русла от форменных элементов крови, являющаяся необходимым этапом подготовки образцов к гистологическому исследованию, негативно влияет на результаты последующего молекулярно-генетического исследования методом ОТ-ПЦР. При этом обработка гепариной препаратов выделенной РНК позволяет предотвратить ингибирующий эффект гепарина на результаты ОТ-ПЦР. Мы показали, что обработка образцов РНК раствором гепарины в течение трех часов не повреждает РНК и не влияет на ее качество и количество. Это согласуется с наблюдениями других авторов, исследовавших влияние гепарины на целостность как общей РНК, так и микроРНК [9, 16].

Снижение порогового цикла при обработке гепариной препаратов РНК в обеих экспериментальных группах НФГ500 и НФГ50 было статистически значимо по сравнению с исходными препаратами РНК, соответственно. Полученные результаты свидетельствовали о дозозависимом ингибировании ОТ-ПЦР гепарином.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что обработка гепариной препаратов выделенной РНК перед проведением молекулярно-генетических исследований, основанных на методе ПЦР, устраняет ингибирующий эффект гепарина, который необходимо учитывать независимо от способа его контакта с биообразцом: системное введение в организм, перфузия раствором гепарина микроциркуляторного русла на этапе гистологического исследования или хранение биообразца в контейнерах, содержащих гепарин.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Финансирование / Funding

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-75-10122, <https://rscf.ru/project/23-75-10122> / The research was

carried out at the expense of a grant from the Russian Science Foundation No. 23-75-10122, <https://rscf.ru/project/23-75-10122>

Список литературы / References

1. Mullis KB. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Sci Am.* 1990; 262(4):56–65. DOI: 10.1038/scientificamerican0490-56.
2. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, et al. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol.* 2012; 113(5):1014–26. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x.
3. Oduah EI, Linhardt RJ, Sharfstein ST. Heparin: Past, Present, and Future. *Pharmaceuticals.* 2016; 9(3):38. DOI: 10.3390/ph9030038.
4. Yokota M, Tatsumi N, Nathalang O, et al. Effects of heparin on polymerase chain reaction for blood white cells. *J Clin Lab Anal.* 1999; 13(3):133–40. DOI: 10.1002/(sici)1098-2825(1999)13:3<133::aid-jcla8>3.0.co;2-0.
5. Satsangi J, Jewell DP, Welsh K, et al. Effect of heparin on polymerase chain reaction. *The Lancet.* 1994; 343(8911):1509–10. DOI: 10.1016/s0140-6736(94)92622-0.
6. Al-Soud WA, Rådström P. Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(2):485–93. DOI: 10.1128/JCM.39.2.485-493.2001.
7. Vaughan-Shaw PG, Walker M, Ooi L, et al. A simple method to overcome the inhibitory effect of heparin on DNA amplification. *Cell Oncol.* 2015; 38(6):493–5. DOI: 10.1007/s13402-015-0250-8.
8. Coelho-Lima J, Mohammed A, Cormack S, et al. Overcoming Heparin-Associated RT-qPCR Inhibition and Normalization Issues for microRNA Quantification in Patients with Acute Myocardial Infarction. *Thromb Haemost.* 2018; 118(07):1257–69. DOI: 10.1055/s-0038-1660437.
9. Bai X hui, Fischer S, Keshavjee S, et al. Heparin interference with reverse transcriptase polymerase chain reaction of RNA extracted from lungs after ischemia-reperfusion. *Transpl Int.* 2000; 13(2):146–50. DOI: 10.1007/s001470050306.
10. Jung R, Lübcke C, Wagener C, et al. Reversal of RT-PCR Inhibition Observed in Heparinized Clinical Specimens. *BioTechniques.* 1997; 23(1):24–8. DOI: 10.2144/97231bm03.
11. Kermekchiev MB, Kirilova LI, Vail EE, et al. Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37(5):e40–e40. DOI: 10.1093/nar/gkn1055.
12. Izreli S, Pfeleiderer C, Lion T. Detection of gene expression by PCR amplification of RNA derived from frozen heparinized whole blood. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19(21):6051–6051. DOI: 10.1093/nar/19.21.6051.

13. Davenport ML, Sherrill TP, Blackwell TS, et al. Perfusion and Inflation of the Mouse Lung for Tumor Histology. *J Vis Exp*. 2020; (162):10.3791/60605. DOI: 10.3791/60605.

14. Steffes LC, Kumar ME. Chronic Daily House Dust Mite Exposure in Mice is an Effective Model to Quantify the Effect of Pharmacologic Agents on Discrete Stages of Artery Remodeling in Pulmonary Hypertension. *Bio Protoc*. 2022; 12(1):e4273. DOI: 10.21769/BioProtoc.4273.

15. Karpov AA, Vachrushev NS, Shilenko LA, et al. Sympathetic Denervation and Pharmacological Stimulation of Parasympathetic Nervous System Prevent Pulmonary Vascular Bed Remodeling in Rat Model of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2023; 10(2):40. DOI: 10.3390/jcdd10020040.

16. Kondratov K, Kurapeev D, Popov M, et al. Heparinase treatment of heparin-contaminated plasma from coronary artery bypass grafting patients enables reliable quantification of microRNAs. *Biomol Detect Quantif*. 2016; 8:9–14. DOI: 10.1016/j.bdq.2016.03.001.

17. Gao P, Li C, Ning Y, et al. Improvement of surgical techniques for orthotopic single lung transplantation in rats. *Ann Transl Med*. 2022; 10(12):673. DOI: 10.21037/atm-22-2018.

18. Lee LYY, Suryadinata R, McCafferty C, et al. Heparin Inhibits SARS-CoV-2 Replication in Human Nasal Epithelial Cells. *Viruses*. 2022 24; 14(12):2620. DOI: 10.3390/v14122620.

19. Alinezhad P, Staji H, Sani RN. Comparison of three methods including temperature, H₂O₂/ascorbic acid/sonication, and nitrous acid treatments for overcoming the inhibitory effect of heparin on DNA amplification in realtime-PCR. *Int J Biol Macromol*. 2022; 209:1298–1306. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.04.113.

20. Sidstedt M, Rådström P, Hedman J. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS-mechanisms and solutions. *Anal Bioanal Chem*. 2020; 412(9):2009–2023. DOI: 10.1007/s00216-020-02490-2

Информация об авторах:

Вахрушев Никита Сергеевич, аспирант кафедры клеточной биологии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Шиленко Леонид Алексеевич, ординатор 1 года кафедры факультетской терапии с клиникой, лаборант-исследователь НИЛ патологии малого круга кровообращения ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Черваев Аль-Халим Амирович, ординатор 1 года кафедры нейрохирургии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Карпов Андрей Александрович, к.м.н., заведующий НИЛ патологии малого круга кровообращения, доцент кафедры патологии Института медицинского образо-

вания ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; ведущий научный сотрудник отдела «Технологии сильного искусственного интеллекта в физиологии и медицине» СПбГЭТУ «ЛЭТИ»;

Галагудза Михаил Михайлович, д.м.н., профессор и член-корреспондент РАН, директор Института экспериментальной медицины, заведующий кафедрой патологии Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Костарева Анна Александровна, д.м.н., директор Института молекулярной биологии и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Калинина Ольга Викторовна, д.б.н., профессор кафедры лабораторной медицины и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Authors information:

Nikita S. Vachrushev, PhD student of the Department of Cellular Biology, Almazov National Medical Research Centre;

Leonid A. Shilenko, first-year resident of the Department of Faculty Therapy with a clinic, Laboratory Assistant of Laboratory of Pulmonary Vascular Disease, Almazov National Medical Research Centre;

Al-Khalim A. Chervaev, first-year resident of the Department of Neurosurgery, Almazov National Medical Research Centre;

Andrei A. Karpov, PhD, Head of Laboratory of Pulmonary Vascular Disease, Associate Professor of the Department of Pathology, Almazov National Medical Research Centre; Leading Researcher of the Department of “Strong Artificial Intelligence Technologies in Physiology and Medicine”, Saint Petersburg Electrotechnical University “LETI”;

Michael M. Galagudza, MD, DSc, Professor and Corresponding Member of the Russian Academy of Science, Director of Institute of Experimental Medicine, Head of the Department of Pathology, Almazov National Medical Research Centre;

Anna A. Kostareva, DSc in Medicine, Director of the Institute of Molecular Biology and Genetics, Almazov National Medical Research Centre;

Olga V. Kalinina, DSc in Biology, Professor of the Department of Laboratory Medicine and Genetics, Almazov National Medical Research Centre.

ИНТЕГРАЛЬНЫЙ НЕЙРООНКОЛОГИЧЕСКИЙ ДИАГНОЗ КАК ОСНОВА ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОГО ЛЕЧЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА (НА ПРИМЕРЕ ГЛИОМ У ДЕТЕЙ)

Назаралиева Э. Т.¹, Забродская Ю. М.¹, Герасимов А. П.¹,
Шевцов М. А.^{2,3}, Назаралиева Э. Т.⁴, Ким А. В.³,
Джаналиев Б. Р.⁴, Самочерных К. А.¹

Контактная информация:

Назаралиева Элеонора Тууганбаевна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: neleonora@yandex.ru

¹ Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт имени профессора А. Л. Поленова — филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт цитологии Российской академии наук», Санкт-Петербург, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Научный центр мирового уровня «Центр персонализированной медицины», Санкт-Петербург, Россия

⁴ Кыргызская государственная медицинская академия имени И. К. Ахунбаева, Бишкек, Кыргызстан

Статья поступила в редакцию 25.10.2023
и принята к печати 08.02.2024.

Резюме

Опухоли головного мозга представляют собой наиболее распространенную группу новообразований у детей, входящую в топ-3 причин детской смертности от онкопатологии.

Целью работы был анализ литературных данных о современных подходах к персонализации лечения опухолей ЦНС у детей на основании изучения молекулярно-генетических, иммуногистохимических, визуализационных характеристик.

В статье дана полная и детальная характеристика часто встречающихся видов новообразований нервной системы — глиом низкой степени злокачественности (LGG), глиом высокой степени злокачественности (HGG), смешанных глионевральных опухолей и др.

Описаны молекулярно-генетические, иммуногистохимические, визуализационные характеристики каждого вида глиом. Также представлены современные сведения о прогнозе и лечении новообразований.

Установлено, например, что прогноз течения LGG/GNT у детей чаще зависит от возраста ребенка, гистологии и локализации опухоли, а также ее молекулярного профиля. У более старших пациентов прогноз более благоприятный, чем у младших детей. Хорошо визуализирующиеся опухоли, расположенные поверхностно (полушарные или мозжечковые), чаще характеризуются лучшим исходом, чем диффузные глиомы, а также глубоко расположенные опухоли.

BRAF-мутации и перегруппировки *FGFR* могут свидетельствовать о лучшем прогнозе, чем при наличии SNV. В то же время точечные мутации *BRAF* с сопутствующей делецией *CDKN2A*, а также мутации с H3.3 pK27 являются наиболее опасными.

Ключевые слова: глиома высокой степени злокачественности, глиома низкой степени злокачественности, опухоль, ЦНС, HGG, LGG.

Для цитирования: Назаралиева Э.Т., Забродская Ю.М., Герасимов А.П. и др. Интегральный нейроонкологический диагноз как основа персонализированного лечения опухолей головного мозга (на примере глиом у детей). Трансляционная медицина. 2024; 11(1): 65-76. DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-1-65-76. EDN: DLBDVT

INTEGRAL NEURO-ONCOLOGICAL DIAGNOSIS AS THE BASIS FOR PERSONALIZED TREATMENT OF BRAIN TUMORS (ON THE EXAMPLE OF GLIOMAS IN CHILDREN)

Eleonora T. Nazaralieva¹, Yulia M. Zabrodsкая¹,
Aleksandr P. Gerasimov¹, Maksim A. Shevtsov^{2,3},
Elnura T. Nazaralieva⁴, Aleksandr V. Kim³, Bolot R. Djanaliev⁴
Konstantin A. Samochernykh¹

Corresponding author:

Eleonora T. Nazaralieva,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.
E-mail: neleonora@yandex.ru

¹ Polenov Russian Scientific Research Institute of Neurosurgery — branch Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

² Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

³ Almazov National Medical Research Centre, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Saint Petersburg, Russia

⁴ I. K. Akhunbaev Kyrgyz State Medical Academy, Bishkek, Kyrgyzstan

Received 25 October 2023; accepted
08 February 2024.

Abstract

Brain tumors are the most common group of neoplasms in children, which is in the top-3 causes of infant mortality from oncopathology.

The aim of the study is to make a literature review of modern approaches to the personalization of treatment of CNS tumors in children based on the study of molecular genetics, immunohistochemical and imaging characteristics.

The article provides a description of the most common types of neoplasms of the nervous system — low grade gliomas (LGG), high grade gliomas (HGG), mixed glioneural tumors, etc.

The molecular genetics, immunohistochemical, visualization characteristics of each type of gliomas are described. Modern information on prognosis and treatment of tumors is also given in the publication.

The prognosis of the course of LGG/GNT in children depends more often on the patient's age, histology, and location of the tumor, as well as its molecular profile. Older patients have a more favorable prognosis than younger children. Well-visualized tumors located superficially have a better outcome than diffuse gliomas, as well as deeply located tumors.

Detection of BRAF mutations and FGFR rearrangements may indicate a better prognosis than in the presence of SNV. Local mutations of BRAF with concomitant deletion of CDKN2A, as well as mutations with H3.3 pK27 are the most dangerous.

Key words: CNS, high grade glioma, HGG, LGG, low grade glioma, tumor.

For citation: Nazaralieva ET, Zabrodsкая YuM, Gerasimov AP, et al. Integral neuro-oncological diagnosis as the basis for personalized treatment of brain tumors (on the example of gliomas in children). Translational Medicine. 2024; 11(1): 65-76. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-1-65-76. EDN: DLBDVT

Список сокращений: ВБП — выживаемость без прогрессирования, ВОЗ — Всемирная организация здравоохранения, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, МАРК — митоген-активируемая протеинкиназа (mitogen-activated protein kinase), МРТ — магнитно-резонансная томография, ПА — пилоцитарная астроцитома, ЦНС — центральная нервная система, DNET — дизэмбриопластическая нейроэпителиальная опухоль (dysembryoplastic neuroepithelial tumor), DWI — диффузно-взвешенные изображения (diffusion-weighted imaging), FISH — флуоресцентная гибридизация in situ (fluorescence in-situ hybridization), GNT — глионевральные опухоли (glioneural tumors), HGG — глиома высокой степени злокачественности (high-grade glioma), IDH — изоцитратдегидрогеназа (isocitrate dehydrogenase), LGG — глиома низкой степени злокачественности (low-grade glioma), NAA — N-ацетиласпартат, SNV — однонуклеотидная вариация (single nucleotide variant).

Введение

Опухоли головного мозга — наиболее распространенная группа солидных опухолей, являющихся ведущей причиной детской смертности от онкопатологии. Уровень заболеваемости этими опухолями в экономически развитых странах в последнее десятилетие превзошел таковой при лейкемии, его общий уровень составил 5,85 на 100 000 населения [1–3].

К настоящему времени проведено большое количество исследований, посвященных «молекулярному ландшафту» различных опухолей центральной нервной системы (ЦНС), для разработки и совершенствования стратегий лечения, в том числе таргетной терапии. Полученные результаты были учтены в новой версии классификации опухолей ЦНС Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) 2021 года [4, 5]. Большой объем информации о молекулярно-генетических, иммунологических, биохимических характеристиках опухолей мозга, который представлен в этих работах, свидетельствует о том, что молекулярный профиль опухоли нередко может быть более точным инструментом прогнозирования по сравнению с гистологическими и визуализационными

характеристиками заболевания, что позволяет использовать эти данные для совершенствования подходов к лечению опухолей ЦНС [6–9].

В классификации ВОЗ 2021 года появились уточнения в молекулярной характеристике, а также данные по различным типам опухолей, пересмотрена номенклатура нейроонкологии, произведена разработка таксономии гибридных опухолей в сочетании с ранее выявленными гистопатологическими характеристиками. Однако значимость молекулярных биомаркеров до настоящего времени не определена и существенно варьирует: от предоставления только дополнительных подтверждающих результатов для отдельных опухолей до установления точного диагноза. В этой форме классификации опухоли группируются по-разному: одни на основании гистологических и/или генетических признаков, в первую очередь генетических событий (например, статус IDH или H3), в то время как другие — на их роли в онкогенезе, например, в МАРК-пути (RAS-mitogen-activated protein kinase) [4, 10, 11].

Прогресс в изучении молекулярных характеристик опухолей также показал, что естественное течение опухолей ЦНС может быть не связано со степенью их дифференцировки, что в определенной степени снизило прогностическую значимость гистологической оценки степени дифференцировки опухолей в эпоху интенсивного изучения их геномного профилирования [5, 7, 12, 13].

Цель исследования — проанализировать литературные данные о современных подходах к персонализации лечения опухолей центральной нервной системы у пациентов детского возраста на основании изучения молекулярно-генетических, иммуногистохимических, визуализационных характеристик.

Глиомы являются наиболее распространенной группой опухолей в детском возрасте, на их долю приходится примерно 45 % опухолей из числа детских высокодифференцированных глиом, эпендимом, медуллобластом, 30 и 15 % в структуре опухолей ЦНС соответственно.

Достаточно давно установленное различие между диффузными глиомами детей и взрослых наконец было признано в рамках классификации

ВОЗ 2021 года, при этом «глиомы, глионейрональные опухоли и нейрональные опухоли» были распределены в 6 семейств:

- 1) диффузные глиомы взрослого типа;
- 2) диффузные глиомы низкой степени злокачественности детского типа;
- 3) диффузные глиомы высокой степени злокачественности детского типа;
- 4) ограниченные астроцитарные глиомы;
- 5) глионейрональные и нейрональные опухоли;
- 6) эпендимомы [4, 5].

Детская и взрослая глиомы клинически, рентгенологически и биологически различаются, что подтверждается наличием различных мутаций и молекулярных сигнатур в этих опухолях.

Глиомы детей низкой степени злокачественности. Смешанные глионевральные опухоли. Наиболее распространенный тип глиом низкой степени злокачественности у детей (LGGs) — пилоцитарная астроцитома (ПА), на долю которой приходится 15,2 % в структуре всех педиатрических опухолей ЦНС [1, 3]. Основное различие молекулярных характеристик детских и взрослых LGG заключается в том, что молекулярные характеристики большинства детских опухолей связаны с нарушениями MAPK-пути, связанного с RAS-митоген-активируемой протеинкиназой, в ней выявляется в среднем одна генетическая абберрация. В то же время для взрослых LGG характерна более высокая мутационная нагрузка [14–16].

Клинически для педиатрических LGG/GNT характерен благоприятный прогноз с крайне низкой вероятностью злокачественного перерождения, в отличие от взрослых аналогов, в которых злокачественная трансформация является частью естественного течения болезни [16, 17]. При этом, несмотря на гистологическое сходство, эти опухоли имеют различные нейровизуализационные признаки.

Молекулярный ландшафт LGG/GNT

Наименования приводимых в работе молекулярно-генетических маркеров рассматриваемой группы опухолей представлены в таблице 1.

Путь RAS/MAPK, играющий ключевую роль в регуляции пролиферации и выживания клеток, является наиболее вовлеченным в онкогенез. Как и другие сигнальные пути, при активации фактором роста рецептор тирозинкиназы передает сигнал через каскад регулирующих белков от поверхности до ДНК в ядре клетки. Абберрации в любом отдельном компоненте этого каскада могут привести к усилению его активности и неограниченной клеточной активности в отношении пролиферации, повышению устойчивости клеток к апоптозу [15].

Онкогены детских опухолей, наиболее часто вовлеченные в путь MAPK и выявляющиеся в LGG/GNT, — *BRAF*, *NF1* и *FGFR* соответственно. Генетические абберрации в этих опухолях можно разделить на 2 категории:

- 1) перегруппировка (слияние, дублирование или транслокация);
- 2) однонуклеотидная вариация (SNV) мутации. Эта информация важна для диагностики, поскольку опухоли, несущие генетические изменения, чаще обнаруживаются у детей младшего возраста, при этом для них характерен лучший прогноз, чем те, при которых определяется SNV [17, 18].

Изменения BRAF. BRAF является ключевым белковым регулятором, поэтому генетическая абберрация, изменяющая этот белок, может приводить к активации последующего молекулярного каскада. Наиболее частыми генетическими абберрациями *BRAF* являются слияние KIAA1549-BRAF и точечная мутация *BRAF* p.V600E. Слияние KIAA1549-BRAF является наиболее распространенной генетической абберрацией в педиатрической опухоли LGG/GNT, на ее долю приходится 30–40 % случаев, чаще это опухоли задней черепной ямки или опухоли мозжечка [19]. Опухоли с другими вариантами BRAF-слияний встречаются редко, при этом поражают большие полушария и ствол головного мозга. С другой стороны, *BRAF* p.V600E мутация встречается с частотой всего 5–10 % ПА, но чаще выявляется в других педиатрических LGG/GNT, при этом ее частота различается при разных гистологических подтипах. Этот признак обнаруживается в 40–80 % плеоморфных ксантоастроцитом (ППА), в 30–40 % диффузных астроцитом и в 25–45 % случаев при ганглиоглиомах. Детские LGG/GNT при наличии *BRAF* p.V600E имеют худший прогноз [18].

Альтерация EGFR. FGFR1-4 представляют собой различные виды рецепторов тирозинкиназы. Генетические изменения, влияющие на этот рецептор, активируют последующий каскад MAPK в отсутствие стимулятора фактора роста [19, 20]. FGFR-генетическую абберрацию можно разделить на альтерацию *FGFR* и управляемую SNV *FGFR1*. Абберрации *FGFR* выявляются в опухолях с гистологическими признаками олигодендроглиальной опухоли, включая дизэмбриопластическую нейроэпителиальную опухоль (DNET), олигодендроглиомы и нейроцитомы желудочков мозга. Они также описаны в 3–10 % первично внемозжечковых опухолей. В ряде случаев *FGFR1* SNV также ассоциирован с розеткообразующими глионейронными опухолями [20].

Для опухолей с наличием альтераций *FGFR* характерна преимущественно полушарная локализация, в частности кортикальная/юкстакор-

Таблица 1. Основные нейроонкогены, упоминаемые в статье, и их функции

Table 1. Main neuro-oncogenes mentioned in the article and their functions

Ген	omim	локус	функция
BRAF	164757	7q34	серин/треониновая киназа
NF1	613113	17q11.2	контроль RAS/MAPK/cAMP каскадов, цитоскелет
NF2	607379	22q12.2	адгезия, трансмембранный сигналинг, цитоскелет
FGFR1	136350	8p11.23	рецептор фактора роста фибробластов
FGFR2	176943	10q26.13	рецептор фактора роста фибробластов
TSC1	605284	9q34.13	контроль каскада mTOR
TSC2	191092	16p13.3	контроль каскада mTOR
KRAS	190070	12p12.1	ГТФаза системы RAS
CRAF	164760	3p25.2	серин/треониновая киназа
PTPN11	176876	12q24.13	протеин-тирозиновая фосфатаза нерецепторного типа
NTRK1	191315	1q23.1	рецептор нейротрофной тирозинкиназы
MYB	189990	6q23.3	фактор транскрипции, ассоциированный с Mir150 и H3K27ac
MYBL1	159405	8q13.1	фактор транскрипции
IDH1	147700	2q34	НАДФ-зависимая изоцитрат-дегидрогеназа (цитоплазматическая)
CDKN2A	600160	9p21.3	ингибитор циклин-зависимой киназы, контроль критических путей контроля клеточного цикла p53 и RB1
TP53	191170	17p13.1	система p53
ATRX	300032	Xq21.1	хеликаза
MGMT	156569	10q26.3	метилгуанин-ДНК метилтрансфераза
PDGFRA	173490	4q12	рецептор тромбоцитарного фактора роста
EGFR	131550	7p11.2	рецептор фактора роста эпителия
ALK	105590	2p23.2-p23.1	рецепторная тирозинкиназа
ROS1	165020	6q22.1	рецепторная тирозинкиназа
MET	164860	7q31.2	рецепторная тирозинкиназа

тикальная. При этом слияние или дупликация, встречающиеся у более молодых пациентов, связаны с более благоприятным прогнозом по сравнению с наличием SNV-мутаций [18, 20].

NF1. Ген супрессора опухоли *NF1* кодирует нейрофибромин 1, белок, который подавляет путь MAPK, влияя на белковый компонент RAS-пути. Мутации зародышевой линии гена *NF1* устраняют ключевые негативные регуляторные механизмы MAPK-пути, что приводит к неконтролируемой пролиферации клеток [21].

Опухоли ЦНС возникают у 15–20 % пациентов с мутациями *NF1*, при этом глиомы зрительного пути составляют большинство таких опухолей, на них приходится примерно 75–80 % случаев. Наиболее распространенной локализацией NF1-опухолей, локализирующихся вне зрительного пути,

является ствол головного мозга (20 % случаев), затем следуют полушария головного мозга, мозжечок и подкорковые структуры, на каждую из этих областей приходится примерно 5 % случаев. NF1-глиома обычно имеет индолентное течение и регрессирует спонтанно после ремиттирующего течения [18, 22].

Недавние исследования показали возможное наличие aberrаций с участием MAPK-пути или факторов транскрипции в NF1-сопутствующих глиомах низкой степени злокачественности, что объясняет наблюдаемые различия в естественном течении заболевания. Глиомы зрительного пути, связанные с *NF1*, обычно не подвергается биопсии; однако, учитывая вышеприведенные новые сведения об этой сопутствующей aberrации, пациентам, отнесенным к группе высокого риска, возможно, требуется выполнение биопсии [16].

Другие aberrации сигнальных MAPK-путей.

Другой вариант aberrации MAPK-пути включает мутации *TSC1/2*, *KRAS*, слияния *CRAF*, мутации *PTPN11* и *NTRK*-слияния. *TSC1/2* представляют собой гены-супрессоры опухолей, которые кодируют ингибирующий рост белок гамартин, который влияет на компонент mTOR MAPK-пути. SNV-мутации *TSC1/2* выявляются в субэпендимальной гигантской астроцитоме (СЭГА) у больных туберозным склерозом. Другие aberrации пути, отличного от MAPK, встречаются нечасто, в частности, в LGG/GNT.

Пути, отличные от MAPK, и иные неустоявленные изменения наблюдаются в 10 % детских LGG/GNT [18], к ним относятся изменения *MYB* и *MYBL1*, мутации *IDH*, мутации гистонов и *CDKN2A*-делеции [23].

Ряд вышеперечисленных признаков позволили по-новому оценить клиническую картину у детей LGG/GNT, при этом может наблюдаться аномальное и более агрессивное клиническое течение, отличающееся от того, что ожидается для педиатрической LGG.

Протоонкоген *MYB* является фактором, участвующим в транскрипции, связанным с пролиферацией и дифференцировкой кроветворных клеток и других клеток-предшественников. Изменения в *MYB* и *MYBL1* наблюдаются в ангиоцентрических глиомах и диффузных астроцитомах [13]. Эти опухоли локализуются преимущественно в больших полушариях, ствол мозга является второй по частоте локализацией. Они выявляются у детей младшего возраста, преимущественно с хорошим прогнозом, несмотря на их диффузный характер, 10-летняя общая выживаемость составляет 90–95 % [16].

Мутации в гене изоцитратдегидрогеназы (Isocitrate dehydrogenase — *IDH*) встречаются редко в педиатрической популяции, преимущественно у подростков старше 14 лет, что позволяет поставить вопрос о принадлежности этих опухолей к группе глиом взрослых [23, 24].

Ранее считалось, что мутации гистонов характерны исключительно для педиатрических HGG, однако недавние исследования показали, что эти признаки редко присутствуют в LGG/GNT у детей, включая ганглиоглиомы и диффузные астроцитомы. В одной работе было показано, что мутации гистонов выявляются с частотой до 12 % в этих опухолях [25].

В целом клиническое течение педиатрических LGG с мутацией гистонов сходно с таковым при HGG у детей (такие больные погибают в течение 1–3 лет), однако для них характерна более высокая выживаемость по сравнению с их гистологически

полноценными аналогами, описаны случаи выживаемости до 10 лет после выполнения резекции опухоли [16]. Тем не менее, педиатрические LGG с мутациями гистонов следует лечить как HGG вследствие высокого риска их прогрессирования.

Наконец, *CDKN2A* является супрессором опухоли и регулятором клеточного цикла. Этот признак выявляется в детских HGG и глиомах взрослых, соматические мутации *CDKN2A* встречаются в большинстве онкологических заболеваний человека. Недавно было показано, что у детей LGGs, особенно при наличии точечной мутации *BRAF*, могут иметь агрессивное течение, в конечном счете могут трансформироваться во вторичные PHGG с наличием делеции *CDKN2A* [16].

Клинический ландшафт LGG/GNT. В настоящее время молекулярное профилирование вошло в стандарт диагностики и лечения опухолей ЦНС в специализированных отделениях в большинстве стран. Однако диагностический подход во многом зависит от наличия кадровых, технических и финансовых ресурсов. В связи с этим большинство специалистов предпочитают проводить тестирование в порядке, основанном на клиническом и визуализационном фенотипах опухоли. При этом педиатрические LGG/GNT — опухоли срединной линии и задней черепной ямки, первоначально исследуют на наличие слияния *BRAF* и *BRAF*-мутации соответственно.

С другой стороны, опухоли больших полушарий, такие как DNET и олигодендроглиома сначала оцениваются на наличие изменений *FGFR*. В случае отрицательных результатов переходят к другому набору тестов, например, к профилированию *BRAF*. Использование таких алгоритмов тестирования считается эффективным, их применение обосновано тем, что большинство LGG/GNT характеризуются единственной генетической aberrацией.

В медицинских центрах более высокого уровня диагностика может начинаться с выполнения секвенирования следующего поколения, что позволяет сэкономить время последовательного тестирования и определить педиатрические LGG/GNT с относительно редкими молекулярными характеристиками [18].

Существует несколько методологий тестирования при проведении молекулярной характеристики опухоли. К ним относятся иммуногистохимические методы, в том числе флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), профилирование метилирования и цифровая полимеразная цепная реакция (ПЦР), каждый тест имеет определенные преимущества и недостатки. Иммуногистохимия является наиболее доступным методом оценки *BRAF*-мута-

ции, *IDH1* p.R132H- и H3.3 p.K27M-мутаций, при этом выбор методов диагностики зависит от ресурсов учреждения [16]. До настоящего времени не определен золотой стандарт, в классификации ВОЗ 2021 года отсутствует указание на конкретный метод тестирования в отношении определения молекулярной характеристики опухолей ЦНС, если только это не является необходимым для диагностики конкретной подгруппы опухолей [4].

Прогноз. Прогноз течения LGG/GNT у детей чаще зависит от возраста пациента, гистологии и локализации опухоли, а также ее молекулярного профиля. У более старших пациентов прогноз может быть лучше, чем у детей младшего возраста. Опухоли, которые хорошо визуализируются и расположены не глубинно (полушарные или мозжечковые), чаще характеризуются лучшим исходом, чем диффузные глиомы, а также глубоко расположенные опухоли.

По результатам молекулярной диагностики выявление *BRAF*-мутации и перегруппировки *FGFR* также могут свидетельствовать о лучшем прогнозе, чем при наличии SNV. В то же время точечные мутации *BRAF* с сопутствующей делецией *CDKN2A*, а также мутации с H3.3 p.K27 несут самый высокий риск [16, 26].

Лечение. Полная тотальная резекция является методом выбора при педиатрической LGG/GNT в случае ее выполнимости. Для пациентов с опухолями с наличием слияния *BRAF* можно прогнозировать 5-летний период выживаемости без прогрессирования (ВБП) на уровне 77–100 %, при этом частота прогрессирования или рецидива является относительно низкой. При опухолях с изменениями *FGFR1/2* 5-летняя ВБП колеблется от 69 до 88 % [27]. Опухоли с *MYB*- и *MYBL1*-мутациями характеризуются высокой 10-летней общей выживаемостью на уровне 90 % [28]. Глиомы зрительного пути у пациентов с *NF1* часто протекают бессимптомно и не требуют лечения, в ряде случаев описана регрессия этих опухолей без какого-либо лечения [29].

В то же время, несмотря на относительно хороший прогноз после хирургического вмешательства, достичь полного удаления опухоли достаточно сложно, особенно в условиях диффузных глиом и/или при глубинной опухоли, затрагивающей функционально-значимые (например, речевые) центры. В этих случаях требуется проведение адъювантной химиотерапии и/или лучевой терапии. Однако именно эти виды лечения уже могут характеризоваться наличием значительных факторов риска и побочных явлений, включая снижение когнитивных функций, эндокринопатии

и повышенный риск возникновения вторичных злокачественных новообразований.

Таким образом, стратификация риска перед проведением лечения и тщательная молекулярная категоризация сегодня представляются необходимой основой, позволяющей осуществлять правильный выбор тактики лечения пациентов с опухолями ЦНС [16].

В последние годы проводятся клинические исследования возможностей терапии этих опухолей с использованием ингибиторов *BRAF*, в частности при LGG с наличием *BRAF*-мутаций. Ингибиторы *BRAF* показали высокую эффективность при *BRAF* p.V600E. опухоли, в то время как педиатрические LGG/GNT с наличием слияния *BRAF* остаются невосприимчивыми к вышеуказанной терапии.

Ингибиторы MEK используются для педиатрических LGG/GNT, обогащенных слиянием *BRAF* и связанных с *NF1*, эти препараты показали многообещающие результаты по данным клинических исследований [16].

Визуализационный ландшафт LGG/GNT. Для фенотипа педиатрических LGG/GNT характерен очень широкий спектр изображений. Отсутствие ограничения диффузии и усиление диффузии при выполнении магнитно-резонансной томографии (МРТ) обычно рассматривается в качестве важного отличительного признака опухолей ЦНС высокой степени злокачественности. В то же время для некоторых более редких педиатрических LGG/GNT, таких как десмопластическая инфантильная ганглиоглиома или астроцитомы, нередко характерно ограничение диффузии из-за высокой клеточности этих опухолей [20].

Характеристики визуализации LGG/GNTs отличаются от таковых при взрослых глиомах. Интенсивное усиление солидного компонента часто описывается при детских опухолях, но считается признаком опухоли высокой степени злокачественности при оценке глиом у взрослых. Это связано с тем, что в обоих случаях неопластические сосуды при детской и взрослой опухоли негерметичны, но структурно (и генетически) различаются: сосуды у детей более широкие, менее плотные, более зрелые и, что важно, неэффективные, что может приводить к образованию кистозных некротических изменений [20].

Результаты магнитно-резонансной спектроскопии (МРС) также различаются при глиомах взрослых и детей: соотношение NAA к холину и повышенный уровень лактата часто обнаруживаются в LGG у детей, но считаются признаком высокой степени злокачественности при глиомах взрослых. Другой пример радиологических различий

между опухолями у детей и взрослых — лептоменингеальное распространение. Лептоменингеальная диссеминация описана при опухоли низкой степени злокачественности у детей, включая диссеминированную пиломиксоидную астроцитому и диффузную лептоменингеальную диссеминированную глионейрональную опухоль, но в то же время этот признак нередко наблюдается на фоне глиом высокой степени злокачественности у взрослых [17].

Локализация опухоли, безусловно, является важнейшим визуализирующим фенотипом при ее радиогистогеномной оценке, в частности, педиатрическая глиома низкой степени злокачественности является диффузной и хорошо отграниченной глионейрональной опухолью.

Кортикальное кистозное поражение с пузырьчатым видом и яркой окантовкой на FLAIR подтверждает диагноз, DNET, усиление солидного компонента и минерализация могут свидетельствовать о ганглиоглиоме. Десмопластическая инфантильная ганглиоглиома/астроцитомы обычно развивается у детей раннего возраста, является крупной, солидной и кистозной опухолью с поражением мозговых оболочек, показывающей относительно T2 гипоинтенсивный сигнал солидного компонента [20].

Расположение опухоли также очень важно оценивать в отношении ствола головного мозга: при диффузных педиатрических LGG/HGG расположение в области моста соответствует высокой степени злокачественности, в то время как цервикомедуллярные, медулло-мостовые и опухоли, возникающие из ножки мозжечка, являются преимущественно низкоккачественными [30].

Детская глиома высокой степени злокачественности. Педиатрические HGG являются опухолями 3 и 4 степени, на их долю приходится от 3 до 20 % опухолей ЦНС у детей [31, 32]. Они связаны с очень плохим исходом, медиана общей выживаемости составляет около 9 месяцев с момента постановки диагноза и 5,6 месяца для пациента с рецидивом заболевания [33]. Стратегия лечения педиатрической HGG разработана на основе исследования GBM для взрослых, что частично объясняет плохие результаты лечения этой группы опухолей [34].

Только в 2012 году в педиатрической HGG были впервые идентифицированы мутации гистонов, при этом было показано, что педиатрические HGG — это злокачественное новообразование, отличающееся от такового у взрослых [35]. Это отражено в Классификации ВОЗ 2021 года, где педиатрическая диффузная глиома высокой

степени признается отдельной единицей, которая охватывает:

- 1) диффузную срединную глиому с измененной H3K27;
- 2) диффузную полушарную глиому, H3G34-мутант;
- 3) диффузную педиатрическую глиому высокой степени злокачественности, H3-дикий тип/IDH-дикий тип;
- 4) полушарную глиому младенческого типа.

В классификации ВОЗ 2021 года также исключен термин «глиобластома» из номенклатуры ЦНС у детей [4].

Молекулярный ландшафт педиатрической HGG. Выполнение идентификации изменения гистонов стало важнейшим этапом совершенствования диагностики PGG [35]. Гистоновые белки являются базовыми структурными компонентами хромосомы, вокруг гистоновых глобул совершается 2 оборота ДНК. Модификация этих единиц и изменения в метилировании ДНК контролируются экспрессией соответствующих генов. Эти процессы относятся к эпигенетической регуляции.

Для педиатрической HGG характерны:

- 1) изменения эпигенетических регуляторов;
- 2) передача сигналов киназы.

Изменения гистона 3 обнаруживаются у 50 % детей. Изменения H3G34R/V и H3K27 представляют собой различные мутации замены аминокислот в гистоновом хвосте H3.3 [37]. Наличие H3G34R/V модификации обычно обнаруживается в педиатрических HGG больших полушарий, что обычно сочетается с мутациями *TP53* и *ATRX*, при этом промотор *MGMT* метилирования H3K27M встречается главным образом в диффузных срединных глиомах, включая глиомы, локализующиеся в таламусе, стволе мозга и мозжечке.

Аберрации MAPK-пути обнаруживаются у 62 % детей. При HGG выявляются и мутации в рецепторе тирозина (например, *PDGFRA* и *EGFR*), которые обычно сопровождаются наличием H3G34R/V, и изменения на уровне PI3K/mTOR, которые сосуществуют с H3K27 [36].

Мутации *IDH* способствуют прогрессированию опухоли за счет вмешательства в цикл Кребса. Эти мутации часто встречаются при глиомах 2–4 степени и являются благоприятным прогностическим фактором. Наличие *IDH*, совпадающей с делецией 1p/19q, является отличительной чертой олигодендроглиомы. Редко встречается у детей, обычно возникает у пациентов старшего возраста, в том числе с сопутствующими мутациями *TP53* и *ATRX* [27].

Другие педиатрические HGG несут мутацию *NFI*, в них выявляются признаки слияния рецеп-

торов тирозинкиназ [27]. Полушарная глиома младенческого типа занимает второе место по степени мутационного бремени после педиатрической HGG. Она отличается от других педиатрических опухолей, которые характеризуются средним мутационным бременем наличия 15 изменений и проявляются скорее как низко-, чем высокозлокачественные глиомы [37]. В этой опухоли выявляются аберрации пути MAPK, особенно рецепторные тирозинкиназы ALK, ROS1, NTRK и MET [38, 39]. Эти аберрации обычно являются результатом генов слияния, вторичных по отношению к межхромосомным или внутрихромосомным структурным перестройкам и, что важно, обычно представляют собой единственное драйверное событие в опухоли. Это, в свою очередь, обуславливает реагирование данного вида опухолей на таргетную терапию при использовании соответствующих ингибиторов рецепторной тирозинкиназы.

Клинический ландшафт детского HGG. Педиатрические HGG представляют собой высокоагрессивные новообразования, которые при макро- и микроскопическом изучении идентичны HGG взрослых, но при этом молекулярные и генетические характеристики различаются, что отражается на прогнозе и реакции опухоли на используемые терапевтические стратегии [40].

Для педиатрической HGG с измененным гистонным характерен неблагоприятный прогноз с общей выживаемостью на уровне 10 и 15 месяцев для диффузных срединных глиом с измененным гистонном H3.3 K27 и H3.1 K27 соответственно. Полушарные глиомы с измененным H3G34 имеют несколько лучший прогноз при общей выживаемости 24 месяца. При IDH-мутантных HGG отмечается лучший прогноз с выживаемостью 5 лет. Наконец, опухоли дикого типа IDH характеризуются лучшим прогнозом по сравнению с педиатрическим HGG с измененным гистонном, для них характерна выживаемость более 4 лет.

Инфантильная полушарная глиома обычно возникает у детей в возрасте 3 лет и является ярким примером необходимости комплексного применения методов геномики, визуализации и гистологии. Несмотря на то, что опухоль характеризуется высокоагрессивным фенотипом по данным нейровизуализации, младенческая полушарная глиома имеет лучший прогноз из всех педиатрических HGG с 5-летней общей выживаемостью 54,5 % соответственно [39].

Относительно недавно проведенная молекулярная категоризация педиатрических HGG позволит проводить клинические и доклинические исследования, в частности, в отношении комби-

нированной цитотоксической и таргетной терапии в дополнение к иммунотерапии. Таким образом, развивается мультимодальная стратегия лечения для педиатрических HGG [34].

Ландшафт визуализации педиатрической HGG. Полушарные HGG часто представляют собой большие нечетко очерченные гетерогенные массы, в которых выявляются переменные геморрагические и/или некротические компоненты. Контрастное усиление варьирует от незначительного до выраженного усиления и усиления некротических участков в этих опухолях [40]. Плотные компоненты часто свидетельствуют об ограничении диффузии при использовании диффузно-взвешенных изображений (DWI) в процессе выполнения МРТ и являются ценным диагностическим признаком, отличающим его от опухолей низкой степени злокачественности [41].

Педиатрические HGG также связаны с повышенной перфузией при использовании DWI. Усиление контраста отражает патологическое поражение гематоэнцефалического барьера, в то время как степень перфузии отражает степень васкуляризации.

Диффузная срединная глиома возникает из таламуса, гипоталамуса, шишковидной железы, ствола головного мозга, мозжечка и спинного мозга. Фенотип изображения варьирует от экспансивного без некротических изменений до растущих опухолей с центральным некрозом [42]. В отличие от других полноценных опухолей диффузные срединные глиомы показали отсутствие ограничения диффузии, при этом характеристики перфузии аналогичны LGG [43]. На MRS HGG классически показывают повышенное соотношение Cho/Cr, снижение NAA/Cr и повышение уровня лактата, свидетельствующие о высоком клеточном обмене, потере нейронов и некрозе соответственно.

Установлено, что высокий уровень лактата является плохим прогностическим признаком у пациентов с диффузными срединными глиомами [44]. Выявление высоких уровней D-2-гидроксиглутарата (2-HG), связанных с IDH1/2, подтверждает высокозлокачественные варианты глиомы; тем самым предоставляя высокочувствительный и специфичный прогностический биомаркер длительной общей выживаемости у пациентов с глиомой с высокой чувствительностью и специфичностью [45].

Заключение

В последнее десятилетие появилось большое количество информации о молекулярно-генетических характеристиках педиатрических опухолей головного мозга, что радикально изменило представления

о патофизиологии данного вида злокачественных новообразований. Существенно изменился подход к диагностике и стратегии лечения этих злокачественных новообразований, в рамках которого все большую значимость приобретает использование принципов прецизионной медицины. Дальнейшее совершенствование классификации ВОЗ параллельно с уточнением молекулярных подгрупп опухолей, возможно, снизит значимость гистологического исследования. Применение методов секвенирования следующих поколений будет способствовать углубленному изучению молекулярно-генетического ландшафта различных опухолей в сопоставлении с их клиническими характеристиками, позволяя прогнозировать течение и исход болезни.

Рентгенологические данные о локализации опухоли в настоящее время рассматриваются в качестве своего рода «радиогеномного ключа» к разным подгруппам опухолей головного мозга, что обусловлено различиями экспрессии генов при различной локализации новообразований. В перспективе радиогеномный анализ предоставит возможность сопоставить с молекулярно-генетическими маркерами и другие качественные и количественные характеристики визуализации, такие как архитектура опухоли, ее метастатические паттерны, а также характеристики диффузии и перфузии. Все это позволит формулировать интегральный нейроонкологический диагноз и на его основе вырабатывать тактику персонализированного лечения опухолей головного мозга, с учетом того, что результаты нейровизуализации и данные молекулярно-генетического исследования являются основой прогноза исхода лечения опухолей ЦНС у детей.

Безусловно, специалисты, в том числе нейрохирурги, должны учитывать клиническую значимость ключевых путей и онкогенных факторов, поскольку это обеспечит эффективное внедрение мультидисциплинарного подхода в лечение опухолей головного мозга у детей. Все это необходимо учитывать, поскольку нейровизуализация и молекулярно-генетическое распознавание бластоматозного процесса являются комплексным триггером первой линии исследования и оценки прогноза исхода лечения опухолей ЦНС.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Финансирование / Funding

Работа выполнена в рамках Госзадания: Разработка новой технологии лечения больных вторичными новообразованиями головного мозга

и рецидивирующими менингиомами № ЕГИСУ 123021000128-4. / The work was carried out within the framework of the State Task: Development of a new technology for the treatment of patients with secondary brain tumors and recurrent meningiomas No. EGISU 123021000128-4.

Список литературы / References

1. Ostrom QT, Cioffi G, Waite K, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2014-2018. *Neuro-Oncology*. 2021; 23: 101–105. DOI: 10.1093/neuonc/noz150.
2. Alleman K, Knecht E, Huang J, et al. Multimodal Deep Learning-Based Prognostication in Glioma Patients: A Systematic Review. *Cancers (Basel)*. 2023; 15 (2): 545. DOI: 10.3390/cancers15020545.
3. Grigore FN, Yang SJ, Chen CC, Koga T. Pioneering models of pediatric brain tumors. *Neoplasia*. 2023; 36: 100859. DOI: 10.1016/j.neo.2022.100859.
4. Louis DN, Perry A, Wesseling P, et al. The 2021 WHO Classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Neuro Oncol*. 2021; 23:1231–1251. DOI: 10.1093/neuonc/noab106.
5. Johnson KJ, Bauchet L, Francis SS, et al. Pediatric brain tumors: Origins, epidemiology, and classification — The 2022 Brain Tumor Epidemiology Consortium meeting report. *Clin Neuropathol*. 2023; Jan 12. DOI: 10.5414/NP301520.
6. Ehret F, Kaul D, Clusmann H, et al. Machine learning-based radiomics in neuro-oncology. *Acta Neurochir Suppl*. 2022; 134:139–151. DOI: 10.1007/978-3-030-85292-4_18.
7. Dastmalchi F, Deleyrolle LP, Karachi A, et al. Metabolomics Monitoring of Treatment Response to Brain Tumor Immunotherapy. *Front Oncol*. 2021; Jun 3;11:691246. DOI: 10.3389/fonc.2021.691246.
8. Jaju A, Yeom KW, Ryan ME. MR imaging of pediatric brain tumors. *Diagnostics*. 2022; 12: 961. DOI: 10.3390/diagnostics12040961.
9. Lotan E, Jain R, Razavian N, et al. State of the Art: Machine learning applications in glioma imaging. *AJR Am. J. Roentgenol*. 2019; 212: 26–37. DOI: 10.2214/AJR.18.20218.
10. Bi J, Chowdhry S, Wu S, et al. Altered cellular metabolism in gliomas - an emerging landscape of actionable co-dependency targets. *Nat Rev Cancer*. 2020; 20(1): 57–70. DOI: 10.1038/s41568-019-0226-5.
11. Wagner MW, Hainc N, Khalvati F, et al. Radiomics of pediatric low-grade gliomas: Toward a pretherapeutic differentiation of BRAFmutated and BRAF-fused tumors. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2021; 42: 759–765. DOI: 10.3174/ajnr.A6998.
12. Cacciotti C, Fleming A, Ramaswamy V. Advances in the molecular classification of pediatric brain tumors: a

- guide to the galaxy. *J Pathol.* 2020; 251(3): 249–261. DOI: 10.1002/path.5457.
13. Zhang J, Wu G, Miller CP, et al. Whole-genome sequencing identifies genetic alterations in pediatric low-grade gliomas. *Nat Genet.* 2013; 45:602. DOI: 10.1038/ng.2611.
 14. Bowles EJ, Miglioretti DL, Kwan ML, et al. Long-term medical imaging use in children with central nervous system tumors. *PLoS One.* 2021; 16(4):e0248643. DOI: 10.1371/journal.pone.0248643.
 15. Jones DTW, Gronych J, Lichter P, et al. MAPK pathway activation in pilocytic astrocytoma. *Cell Mole Life Sci.* 2012; 69: 1799–1811. DOI: 10.1007/s00018-011-0898-9.
 16. Ryall S, Tabori U, Hawkins C. Pediatric low-grade glioma in the era of molecular diagnostics. *Acta Neuropathol Commun.* 2020; 8 (1): 30. DOI: 10.1186/s40478-020-00902-z.
 17. Alrayahi J, Zapotocky M, Ramaswamy V, et al. Pediatric brain tumor genetics: What radiologists need to know. *Radiographic.* 2018; 38: 2102–2122. DOI: 10.1148/rg.2018180109.
 18. Ryall S, Zapotocky M, Fukuoka K, et al. Integrated molecular and clinical analysis of 1,000 pediatric low-grade gliomas. *Cancer Cell.* 2020; 37: 569–583. DOI: 10.1016/j.ccell.2020.03.011.
 19. Lin A, Rodriguez FJ, Karajannis MA, et al. BRAF alterations in primary glial and glioneuronal neoplasms of the central nervous system with identification of 2 novel KIAA1549: BRAF fusion variants. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2012; 71: 66–72. DOI: 10.1097/NEN.0b013e31823f2cb0.
 20. Bag AK, Chiang J, Patay Z. Radiohistogenomics of pediatric low-grade neuroepithelial tumors. *Neuroradiology.* 2021; 63(8):1185–1213. DOI: 10.1007/s00234-021-02691-1.
 21. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, et al. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition E-Book. Philadelphia, PA: Elsevier Health Sciences, 2014.
 22. de Blank PMK, Fisher MJ, Liu GT, et al. Optic pathway gliomas in neurofibromatosis Type 1: An update: surveillance, treatment indications, and biomarkers of vision. *J Neuroophthalmol.* 2017; 37 (Suppl.1): 23–32. DOI: 10.1097/WNO.0000000000000550.
 23. Hartmann C, Meyer J, Balss J, et al. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: A study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol.* 2009; 118: 469–474. DOI: 10.1007/s00401-009-0561-9.
 24. Leu S, von Felten S, Frank S, et al. IDH mutation is associated with higher risk of malignant transformation in low-grade glioma. *J Neurooncol.* 2016; 127: 363–372. DOI: 10.1007/s11060-015-2048-y.
 25. Ryall S, Krishnatry R, Arnoldo A, et al. Targeted detection of genetic alterations reveal the prognostic impact of H3K27M and MAPK pathway aberrations in paediatric thalamic glioma. *Acta Neuropathol Commun.* 2016; 4: 93. DOI: 10.1186/s40478-016-0353-0.
 26. Mistry M, Zhukova N, Merico D, et al. BRAF mutation and CDKN2A deletion define a clinically distinct subgroup of childhood secondary high-grade glioma. *J Clin Oncol.* 2015; 33(9):1015–1022. DOI: 10.1200/JCO.2014.58.3922.
 27. Mackay A, Burford A, Carvalho D, et al. Integrated molecular metaanalysis of 1,000 pediatric high-grade and diffuse intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell.* 2017; 32: 520–537. DOI: 10.1016/j.ccell.2017.08.017.
 28. Chiang J, Harreld JH, Tinkle CL, et al. A single-center study of the clinicopathologic correlates of gliomas with a MYB or MYBL1 alteration. *Acta Neuropathol.* 2019; 138: 1091–1092. DOI: 10.1007/s00401-019-02081-1.
 29. Collins VP, Jones DTW, Giannini C. Pilocytic astrocytoma: Pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol.* 2015; 129: 775–788. DOI: 10.1007/s00401-015-1410-7.
 30. Raybaud C, Ramaswamy V, Taylor MD, et al. Posterior fossa tumors in children: Developmental anatomy and diagnostic imaging. *Child's Nervous System.* 2015; 31: 1661–1676. DOI: 10.1007/s00381-015-2834-z.
 31. Broniscer A, Gajjar A. Supratentorial high-grade astrocytoma and diffuse brainstem glioma: Two challenges for the pediatric oncologist. *Oncologist.* 2004; 9:197–206. DOI: 10.1634/theoncologist.9-2-197.
 32. Perkins SM, Rubin JB, Leonard JR, et al. Glioblastoma in children: A single-institution experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011; 80: 1117–1121. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2010.03.013.
 33. Kline C, Felton E, Allen IE, et al. Survival outcomes in pediatric recurrent high-grade glioma: Results of a 20-year systematic review and meta-analysis. *J Neurooncol.* 2018; 137:103–110. DOI: 10.1007/s11060-017-2701-8.
 34. Chatwin HV, Cruz J, Green AL. Pediatric high-grade glioma: Moving toward subtype-specific multimodal therapy. *FEBS J.* 2021; 288: 6127–6141. DOI: 10.1111/febs.15739.
 35. Schwartzentruber J, Korshunov A, Liu XY, et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature.* 2012; 482: 226–231. DOI: 10.1038/nature10833.
 36. Sun Y, Bailey CP, Sadighi Z, et al. Pediatric high-grade glioma: Aberrant epigenetics and kinase signaling define emerging therapeutic opportunities. *J Neurooncol.* 2020; 150: 17–26. DOI: 10.1007/s11060-020-03546-0.
 37. Jones C, Baker SJ. Unique genetic and epigenetic mechanisms driving paediatric diffuse high-grade glioma. *Nat Rev Cancer.* 2014; 14: 651–661. DOI: 10.1038/nrc3811.
 38. Clarke M, Mackay A, Ismer B, et al. Infant high-grade gliomas comprise multiple subgroups characterized by novel targetable gene fusions and favorable outcomes. *Cancer Discovery.* 2020; 10: 942–963. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-19-1030.

39. Guerreiro Stucklin AS, Ryall S, Fukuoka K, et al. Alterations in ALK/ ROS1/NTRK/MET drive a group of infantile hemispheric gliomas. *Nat Commun.* 2019; 10: 1–13. DOI: 10.1038/s41467-019-12187-5.
40. Goncalves FG, Viaene AN, Vossough A. Advanced magnetic resonance imaging in pediatric glioblastomas. *Front Neurol.* 2012; 12. DOI: 10.3389/fneur.2021.733323.
41. Panigrahy A, Bleuml S. Neuroimaging of pediatric brain tumors: From basic to advanced magnetic resonance imaging (MRI). *J Child Neurol.* 2009; 24: 1343–1365. DOI: 10.1177/0883073809342129.
42. Aboian MS, Solomon DA, Felton E, et al. Imaging characteristics of pediatric diffuse midline gliomas with histone H3 K27M mutation. *AJNR.* 2017; 38:795. DOI: 10.3174/ajnr.A5076.
43. Hales PW, d'Arco F, Cooper J, et al. Arterial spin labelling and diffusion-weighted imaging in paediatric brain tumours. *NeuroImage Clin.* 2019; 22: 101696. DOI: 10.1016/j.nicl.2019.101696.
44. Yamasaki F, Kurisu K, Kajiwaru Y, et al. Magnetic resonance spectroscopic detection of lactate is predictive of a poor prognosis in patients with diffuse intrinsic pontine glioma. *Neuro-Oncology.* 2011; 13: 791. DOI: 10.1093/neuonc/nor038.
45. Simon M, Hosen I, Gousias K, et al. TERT promoter mutations: A novel independent prognostic factor in primary glioblastomas. *NeuroOncol.* 2015; 17: 45–52. DOI: 10.1093/neuonc/nou158.

Информация об авторах:

Назаралиева Элеонора Тууганбаевна, к.м.н., старший научный сотрудник НИЛ нейрохирургии детского возраста РНХИ им. проф. А. Л. Поленова — филиала ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Забродская Юлия Михайловна, д.м.н., заведующая НИЛ патоморфологии нервной системы РНХИ им. проф. А. Л. Поленова — филиала ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Герасимов Александр Павлович, старший научный сотрудник НИЛ нейрохирургии детского возраста РНХИ им. проф. А. Л. Поленова — филиала ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Шевцов Максим Алексеевич, д.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт цитологии РАН»; заведующий НИО трансляционной онкологии НЦМУ «Центр персонализированной медицины», ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Назаралиева Эльнура Тууганбаевна, врач-патологоанатом, ассистент кафедры патологической анатомии Кыргызской государственной медицинской академии им. И. К. Ахунбаева;

Ким Александр Вонгиевич, д.м.н., заведующий ДНХО № 7, доцент кафедры нейрохирургии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Джаналиев Болот Рахманович, д.м.н., профессор кафедры патологической анатомии Кыргызской государственной медицинской академии им. И. К. Ахунбаева;

Самочерных Константин Александрович, д.м.н., профессор РАН, директор РНХИ им. проф. А. Л. Поленова — филиала ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; заведующий научно-исследовательским центром персонализированной онкологии НЦМУ «Центр персонализированной медицины», ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Authors information:

Eleonora T. Nazaralieva, Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher, Research Laboratory of Pediatric Neurosurgery of the Polenov Russian Scientific Research Institute of Neurosurgery — branch Almazov National Medical Research Centre;

Yulia M. Zabrodskaia, Doctor of Medical Sciences, Head of the Research Laboratory of Pathomorphology of the Nervous System of the Polenov Russian Scientific Research Institute of Neurosurgery — branch Almazov National Medical Research Centre;

Aleksandr P. Gerasimov, Senior Researcher Research Laboratory of Pediatric Neurosurgery of the Polenov Russian Scientific Research Institute of Neurosurgery — branch Almazov National Medical Research Centre;

Maxim A. Shevtsov, Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher of the Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences; Head of Research Center for Translational Oncology, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Almazov National Medical Research Centre;

Elnura T. Nazaralieva, Pathologist, Assistant of the Department of Pathological Anatomy of the I. K. Akhunbaev Kyrgyz State Medical Academy;

Aleksandr V. Kim, Doctor of Medical Sciences, Head of the Children's Neurosurgical Department No. 7, Associate Professor of the Department of Neurosurgery of the Almazov National Medical Research Centre;

Bolot R. Djanaliev, Doctor of Medical Sciences, Professor of the Department of Pathological Anatomy of the Kyrgyz State Medical Academy named I. K. Akhunbaev;

Konstantin A. Samochernych, Doctor of Medical Sciences professor of the Russian Academy of Sciences, director of the Polenov Russian Scientific Research Institute of Neurosurgery — branch Almazov National Medical Research Centre; Head of the Research Center for Personalized Oncology, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Almazov National Medical Research Centre.

МОЖНО ЛИ ПРЕДВИДЕТЬ ОСЛОЖНЕНИЯ ПОСЛЕ РЕКОНСТРУКТИВНЫХ ОПЕРАЦИЙ У БОЛЬНЫХ С ТРОФИЧЕСКИМИ НАРУШЕНИЯМИ НА ФОНЕ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО АТЕРОСКЛЕРОЗА В СОЧЕТАНИИ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ?

Глушков Н. И., Фадеева Э. А., Пузряк П. Д., Реснянская Е. Д.,
Каменская А. Е., Гайфуллин А. Р., Антоненко А. И., Иванов М. А.,
Жданович К. В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный
медицинский университет имени И. И. Мечникова» Министерства
здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Фадеева Энже Алексеевна,
ФГБОУ ВО «СЗГМУ
им. И. И. Мечникова» Минздрава России,
Пискаревский пр., 47, Санкт-Петербург,
Россия, 195067.
E-mail: fadееva.neverl@gmail.com

Статья поступила в редакцию
20.11.2023, принята к печати 08.02.2024.

Резюме

Актуальность. Осложнения после реваскуляризации у лиц с периферическим атеросклерозом и сахарным диабетом могут приводить к негативным итогам оперативных вмешательств на фоне критической ишемии. **Цель.** Целью исследования явилось выявление обстоятельств, предрасполагающих к развитию тех или иных осложнений после реконструкции у пациентов с критической ишемией и сахарным диабетом. **Материалы и методы.** Осуществлено проспективное исследование результатов реконструктивных вмешательств у 78 пациентов с трофическими нарушениями на фоне периферического атеросклероза и сахарного диабета. В 25 наблюдениях выявлены осложнения (основная группа), у 53 пациентов имело место неосложненное течение послеоперационного периода. Анализировалось влияние сопутствующих заболеваний, особенностей оперативного лечения на возникновение неблагоприятных исходов. **Результаты.** Проявления сердечной недостаточности повышают вероятность артериальных тромбозов ($p < 0,05$). Признаки печеночной дисфункции увеличивают частоту ТЭЛА в периоперационном периоде ($p < 0,05$). Адекватная коррекция гипергликемии снижает риск развития инсульта. **Заключение.** Данные о предрасполагающих к развитию осложнений обстоятельствах позволяют более тщательно подготовиться к реконструкции на фоне критической ишемии у лиц с периферическим атеросклерозом и сахарным диабетом и свести к минимуму число неблагоприятных исходов вмешательства.

Ключевые слова: критическая ишемия, осложнения, периферический атеросклероз, реконструктивные вмешательства.

Для цитирования: Глушков Н.И., Фадеева Э.А., Пузряк П.Д. и др. Можно ли предвидеть осложнения после реконструктивных операций у больных с трофическими нарушениями на фоне периферического атеросклероза в сочетании с сахарным диабетом? Трансляционная медицина. 2024; 11(1): 77-86. DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-1-77-86. EDN: DOUAQL

IS IT POSSIBLE TO ANTICIPATE COMPLICATIONS AFTER RECONSTRUCTIVE SURGERY IN PATIENTS WITH TROPHIC DISORDERS ON THE BACKGROUND OF PERIPHERAL ATHEROSCLEROSIS IN COMBINATION WITH DIABETES MELLITUS?

Nikolay I. Glushkov, Enzhe A. Fadeeva, Petr D. Puzdryak, Ekaterina D. Resnyanskaya, Anastasiia E. Kamenskaya, Aleksandr R. Gaifullin, Alisa I. Antonenko, Mikhail A. Ivanov, Kristina V. Zhdanovich

North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Enzhe A. Fadeeva,
North-Western State Medical University
named after I. I. Mechnikov,
Piskarevsky pr., 47, Saint Petersburg, Russia,
195067.
E-mail: fadeeva.neverl@gmail.com

Received 20 November 2023; accepted
08 February 2024.

Abstract

Background. Complications after revascularization in individuals with peripheral atherosclerosis and diabetes mellitus can lead to negative results of surgical interventions against the background of critical ischemia. **Objective.** The aim of the study was to identify predisposing circumstances for the development of certain complications after reconstruction in patients with critical ischemia and diabetes mellitus. **Materials and methods.** A prospective study of the results of reconstructive interventions was carried out in 78 patients with trophic disorders on the background of peripheral atherosclerosis and diabetes mellitus. Complications were detected in 25 cases (the main group), 53 patients had uncomplicated course of the postoperative period. The influence of concomitant diseases, peculiarities of surgical treatment on the occurrence of adverse outcomes was analyzed. **Results.** Manifestations of heart failure increase the likelihood of arterial thrombosis ($p < 0.05$). Signs of hepatic dysfunction increase the frequency of PE in the perioperative period ($p < 0.05$). Adequate correction of hyperglycemia reduces the risk of stroke. **Conclusion.** The data on the circumstances predisposing for the development of complications make it possible to prepare more carefully for reconstruction against the background of critical ischemia in people with peripheral atherosclerosis and diabetes mellitus and minimize the number of adverse outcomes of intervention.

Key words: complications, critical ischemia, peripheral atherosclerosis, reconstructive interventions.

For citation: Glushkov NI, Fadeeva EA, Puzdryak PD, et al. Is it possible to anticipate complications after reconstructive surgery in patients with trophic disorders on the background of peripheral atherosclerosis in combination with diabetes mellitus? Translational Medicine. 2024; 11(1): 77-86. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-1-77-86. EDN: DOUAQL

Список сокращений: ИОХВ — инфекция области хирургического вмешательства, КИНК — критическая ишемия нижних конечностей, ОКС — острый коронарный синдром, ПИКС — постинфарктный кардиосклероз, СД — сахарный диабет, СПОН — синдром полиорганной недостаточности, ТЭЛА — тромбоэмболия легочной артерии, ХСН — хроническая сердечная недостаточность.

Введение

Реваскуляризация при хронической ишемии нижних конечностей и сахарном диабете (СД) составляет альтернативу консервативным методам лечения и позволяет в кратчайшие сроки обеспечить симптоматический контроль и улучшить качество жизни [1]. Вместе с тем, при осложненном течении послеоперационного периода может не только отсутствовать положительный клиниче-

ский эффект от оперативного вмешательства, но и существует реальная угроза жизни пациента либо потери конечности [2]. Имеются мнения, что осложнения после реваскуляризации являются уделом пациентов с тяжелым и длительным течением СД, чему способствуют высокая встречаемость многоуровневых атеросклеротических поражений, изменения в других сосудистых бассейнах, склонность к гиперкоагуляции в периоперационном периоде, а также существование очагов инфекции в случае нарушения трофики [3]. Однако схожие предрасполагающие обстоятельства могут иметь место у лиц с неосложненным течением послеоперационного периода; существенную роль играет и характер выполненных хирургических вмешательств [4].

Настоящее исследование посвящено вопросам предрасположенности больных к развитию ослож-

Таблица 1. Характеристика исследуемых больных

Table 1. Characteristics of patients-researched

КРИТЕРИИ	Основная группа (n = 25)	Контроль (n = 53)	p	ОШ	95 % ДИ
Мужской пол, абс. (%)	10 (40,0 %)	29 (54,7 %)	0,225	0,552	0,210–1,449
Возраст, годы (M ± SD)	71 ± 7	70 ± 8	0,896	–	–
ИМТ, кг/м ² (M ± SD)	29,3 ± 5,0	30,1 ± 6,4	0,702	–	–
Ожирение II ст., абс. (%)	4 (17,4 %)	5 (10,2 %)	0,422	1,829	0,446–7,499
Курение, абс. (%)	5 (20,0 %)	6 (12,2 %)	0,312	1,991	0,538–7,364
Гипертоническая болезнь 3 ст., абс. (%)	21 (84,0 %)	43 (81,1 %)	1,000	1,221	0,342–4,354
Стенокардия II–III ФК, абс. (%)	2 (8,0 %)	9 (17,0 %)	0,487	0,425	0,085–2,133
ПИКС, абс. (%)	13 (52,0 %)	23 (43,4 %)	0,477	1,413	0,544–3,669
Атеросклеротический кардиосклероз, абс. (%)	13 (52,0 %)	27 (50,9 %)	0,931	1,043	0,403–2,702
ХСН II–III ФК по NYHA, абс. (%)	14 (56,0 %)	31 (58,5 %)	0,154	0,903	0,346–2,360
Фибрилляция предсердий, абс. (%)	7 (28,0 %)	13 (24,5 %)	0,743	1,197	0,409–3,503
ОНМК/ТИА, абс. (%)	5 (20,0 %)	9 (17,0 %)	0,759	1,222	0,363–4,116
Цереброваскулярная болезнь, абс. (%)	16 (64,0%)	25 (47,2%)	0,165	1,991	0,748–5,298
Хроническая болезнь почек С3б–С5, абс. (%)	10 (40,0%)	12 (22,6%)	0,112	2,278	0,816–6,359

Примечание: ИМТ — индекс массы тела; ОНМК — острое нарушение мозгового кровообращения в анамнезе; ПИКС — постинфарктный кардиосклероз; ТИА — транзиторная ишемическая атака в анамнезе; ФК — функциональный класс; ХСН — хроническая сердечная недостаточность.

нений после реваскуляризации при КИНК атеросклеротического генеза у пациентов с СД.

Материалы и методы

Исследование выполнено в формате одноцентрового проспективного наблюдения и ретроспективного анализа результатов лечения 78 пациентов с IV стадией хронической ишемии нижних конечностей по А. В. Покровскому-Fountain на фоне периферического атеросклероза и СД, которым осуществлялись реконструктивные вмешательства. В основную группу вошли 25 больных, у которых в послеоперационном периоде развились те или иные осложнения; контрольную группу составили 53 человека с неосложненным течением послеоперационного периода.

Демографические характеристики пациентов и имеющиеся заболевания представлены в таблице 1; группы сопоставимы по возрасту, полу и сопутствующей патологии.

Критерий включения: реваскуляризация конечности в связи с IV стадией хронической ишемии конечности у лиц с периферическим атеросклерозом и сахарным диабетом.

Критерии исключения: отказ от участия в исследовании, сахарный диабет 1 типа, неопластический процесс.

В ходе исследования анализировалось влияние сопутствующих заболеваний и других обстоя-

тельств, которые могли сказаться на развитии осложнений. Диагноз гипертонической болезни ставился на основе рекомендаций «Артериальная гипертензия у взрослых» (Scardio, 2020). Хроническая сердечная недостаточность классифицировалась по NYHA. Наличие хронической болезни почек (ХБП) подтверждалось в случае выявления почечных маркеров повреждения в течение трех месяцев (Клинические рекомендации ХБП, РФ 2021).

С целью выявления особенностей атеросклеротического поражения магистральных артерий нижних конечностей для выбора оптимального метода реваскуляризации выполнялись дуплексное сканирование и МСКТ-ангиография. Характеристика проведенных оперативных вмешательств представлена в таблице 2.

Сахарный диабет диагностировался в случае получения пациентом сахароснижающей терапии или при уровне гликированного гемоглобина выше 6,5 %. Особое внимание уделялось особенностям и течению сахарного диабета: общий стаж диабета, приверженность диете, особенности сахароснижающей терапии, наличие осложнений (табл. 3).

Степень выраженности поражения тканей оценивали по классификации Wagner F. M. (табл. 4).

В исследуемых группах пациентов регистрировалась продолжительность оперативного вмешательства, объем кровопотери, время пребывания в стационаре и длительность нахождения

Таблица 2. Характеристика проведенных оперативных вмешательств

Table 2. Characteristics of the surgical interventions performed

ОПЕРАЦИИ	ОТКРЫТЫЕ	ЭНДОВАСКУЛЯРНЫЕ	ГИБРИДНЫЕ
ЭАЭ из ОБА/ГБА	–	–	2
Бедренно-подколенное шунтирование	21	–	4
Бедренно-тибиальное шунтирование	6	–	–
ТЛБА без стентирования:			
аорто-подвздошный сегмент	–	4	1
бедренно-подколенный сегмент	–	28	1
тибиальный сегмент	–	41	2
ТЛБА со стентированием:			
аорто-подвздошный сегмент	–	3	3
бедренно-подколенный сегмент	–	5	–

Примечание: ОБА/ГБА — общая бедренная артерия/глубокая бедренная артерия; ТЛБА — транслюминальная баллонная ангиопластика; ЭАЭ — эндартерэктомия.

Таблица 3. Характеристика терапии сахарного диабета и степени компенсации углеводного обмена

Table 3. Characteristic of diabetes mellitus therapy and carbohydrate exchange compensation degree

ПОКАЗАТЕЛИ	Основная группа (n = 25)	Контрольная группа (n = 53)	p
Сахароснижающая терапия:			
Отсутствует, абс. (%)	2 (8,0)	3 (6,2)	0,601
ПССП, абс. (%)	13 (52,0)	21 (43,8)	
Инсулинотерапия, абс. (%)	5 (20,0)	17 (35,4)	
Комбинированная терапия, абс. (%)	5 (20,0)	6 (12,5)	
ЗПТ, абс. (%)	0 (0,0)	1 (2,1)	>0,001
Приверженность диете, абс. (%)	13 (68,4)	32 (80,0)	0,345
Уровень гликированного гемоглобина:			
< 7,0 %, абс. (%)	1 (4,3)	6 (15,4)	0,076
< 7,5 %, абс. (%)	14 (60,9)	28 (71,8)	
< 8,0 %, абс. (%)	8 (34,8)	5 (12,8)	

Примечание: ЗПТ — заместительная почечная терапия; ПССП — пероральные сахароснижающие препараты.

Таблица 4. Степень выраженности трофических изменений

Table 4. Severity of trophic changes

Степень выраженности поражения по классификации Wagner F. M.:	Основная группа (n = 25)	Контрольная группа (n = 53)	p
1	3 (14,3)	6 (12,5)	0,679
2	4 (19,0)	17 (35,4)	
3	3 (14,3)	7 (14,6)	
4	11 (52,4)	17 (35,4)	
5	0 (0,0)	1 (2,1)	

в отделении реанимации и интенсивной терапии, динамика заживления трофических дефектов, факт и частота развития послеоперационных осложнений.

Обстоятельства риска неблагоприятного течения послеоперационного периода оценивались применительно ко всем осложнениям в целом, а также по отношению к каждой из разновидностей осложненного течения: тромбоз оперированного сегмента, инфекция области хирургического вмешательства (ИОХВ), острый коронарный синдром, ТЭЛА, потребность в высокой ампутации, летальный исход.

Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро-Уилка. Количественные показатели, имеющие нормальное распределение, описывались с помощью средних арифметических величин (M) и стандартных отклонений (SD), границ 95 % доверительного интервала (95 % ДИ). При отсутствии нормального распределения количественные данные описывались с помощью медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (Q_1 – Q_3). Сравнение двух групп по количественному показателю, имеющему нормальное распределение, при условии равенства

дисперсий выполнялось с помощью t-критерия Стьюдента, при неравных дисперсиях выполнялось с помощью t-критерия Уэлча. Сравнение двух групп по количественному показателю, распределение которого отличалось от нормального, выполнялось с помощью U-критерия Манна-Уитни. Сравнение процентных долей при анализе четырехпольных таблиц сопряженности выполнялось с помощью критерия хи-квадрат Пирсона (при значениях ожидаемого явления более 10), точного критерия Фишера (при значениях ожидаемого явления менее 10). Сравнение процентных долей при анализе многопольных таблиц сопряженности выполнялось с помощью критерия хи-квадрат Пирсона.

Результаты

Послеоперационный период характеризовался развитием осложнений достоверно реже после эндоваскулярного лечения в сравнении с открытыми операциями (17,4 % против 47,1 %, $p = 0,005$); частота развития анализируемых осложнений представлена на рисунке 1.

Отдельно оценивались исходы реваскуляризации при многоуровневых поражениях артерий нижних конечностей. При проведении вмешательств на различных сегментах в рамках нескольких хирургических протоколов частота встречаемости осложнений была почти в 2 раза выше, чем при гибридном подходе к реваскуляризации (70,0 % против 40,0 % соответственно, $p = 0,006$; рис. 2).

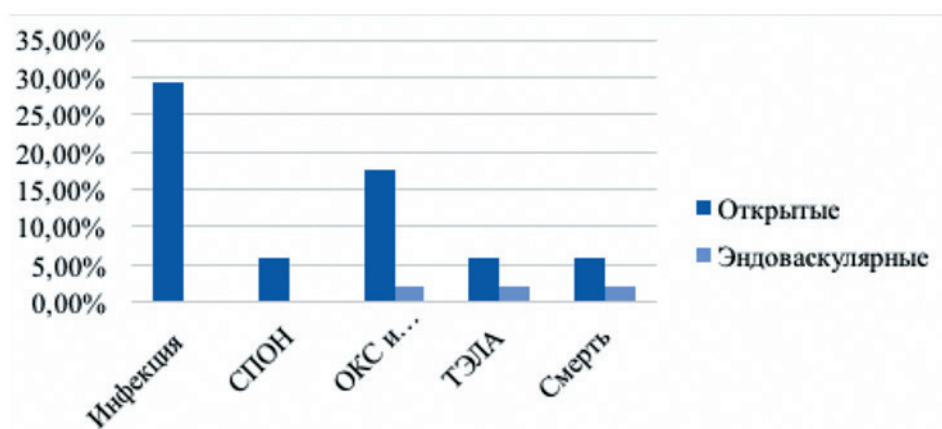


Рис. 1. Осложнения после оперативных вмешательств (по оси ординат — частота в процентах)

Figure 1. Complications after surgery (on the axis ordinate — frequency in percent)

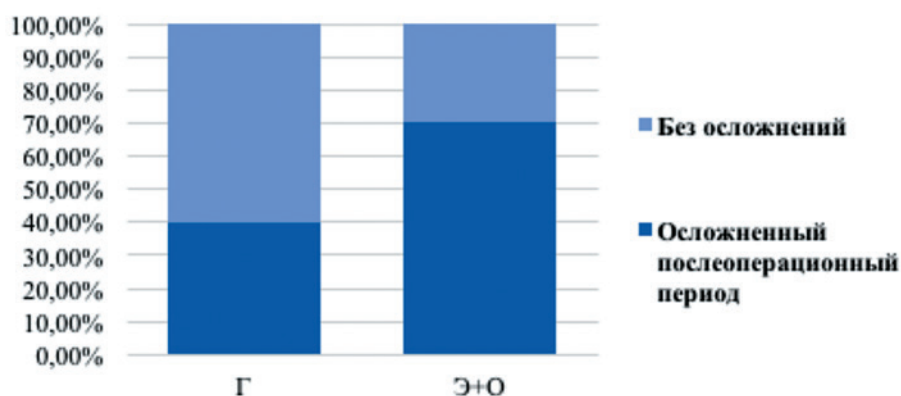


Рис. 2. Встречаемость осложнений при различных вариантах реконструктивных вмешательств у больных с многоуровневыми поражениями (по оси ординат — частота в процентах; Г — гибридные вмешательства; Э+О — многоэтапные операции)

Figure 2. Occurrence of complications in various reconstructive interventions in patients with multi-level lesions (ordinate axis — frequency in percent; Г — hybrid interventions; Э+О — multi-stage operations)

Число случаев развития ИОХВ было достоверно больше после открытых и гибридных операций в сравнении с эндоваскулярными ($p = 0,004$; рис. 3).

Кардиоваскулярная патология является одним из решающих обстоятельств, которые определяют исходы реваскуляризации у больных с КИНК и СД. Так, наличие ПИКС ассоциировалось с риском развития СПОН ($p = 0,041$; ОШ = 11,769, 95 % ДИ 0,612–226,492) и летального исхода после оперативных вмешательств ($p = 0,018$; ОШ = 14,841, 95 % ДИ 0,791–278,360; рис. 4).

Аналогичным образом на частоту развития таких грозных осложнений, как тромбоз оперированного сегмента ($p < 0,001$; ОШ = 1,160; 95 % ДИ: 0,053–25,484), ИОХВ ($p = 0,023$) и кровотечения

($p = 0,025$), в послеоперационном периоде влияет снижение сердечного выброса на фоне тяжелого течения сердечной недостаточности у больных с КИНК и СД. В частности, выраженная ХСН более чем в 2 раза увеличивает встречаемость ИОХВ (рис. 5).

Непосредственную угрозу для жизни больного в послеоперационном периоде представляет развитие тромбоэмболических осложнений, а именно ТЭЛА. В случае хронической ишемии нижних конечностей IV степени у больных СД частота ТЭЛА достоверно увеличивалась на фоне выраженной воспалительной реакции с лейкоцитозом ($p = 0,047$) и повышением активности трансаминаз ($p = 0,040$).

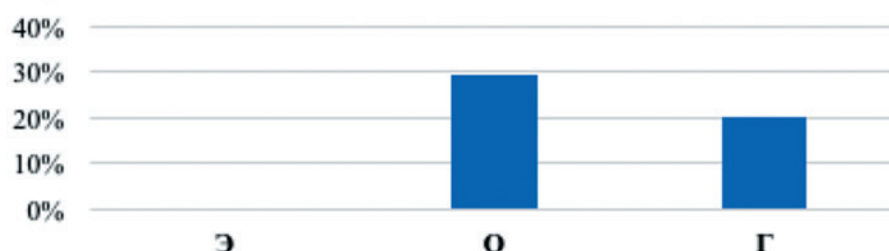


Рис. 3. Частота развития инфекционных осложнений при различных видах оперативных вмешательств (по оси ординат — частота в процентах; Э — эндоваскулярные; О — открытые; Г — гибридные операции)

Figure 3. Incidence of infectious complications in various types of surgical interventions (on the axis ordinate — frequency in percent; Э — endovascular; О — open; Г — hybrid operations)

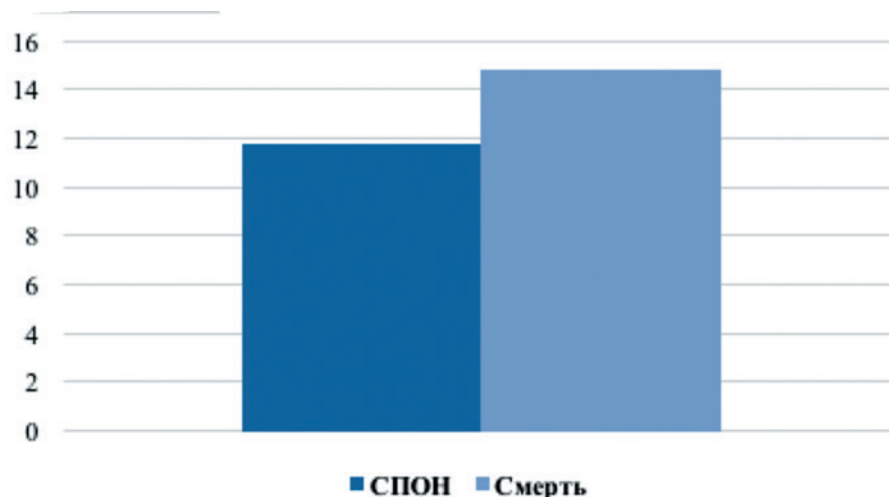


Рис. 4. Отношение шансов развития СПОН и летального исхода при наличии ПИКС (по оси ординат — ОШ)

Figure 4. Ratio of chances of development of SPON and death in the presence of PICS (on the axis ordinate — OR)

Обсуждая такие грозные негативные последствия, как ТЭЛА и летальный исход, после реваскуляризации у пациентов с СД и трофическими нарушениями на фоне критической ишемии, следует добавить, что в случае гликированного гемоглобина более 7,5 % частота упомянутых осложнений возрастала ($p = 0,036$ и $p = 0,046$ соответственно) (рис. 6).

Не менее значимым представляется вопрос о возможностях коррекции гликемии для профилактики осложнений при лечении критической ишемии. Оказалось, что мониторинг результатов сахароснижающей терапии и ее своевременная модификация снижают частоту нарушений мозгового кровообращения ($p = 0,008$).

Обсуждение

Определяющее воздействие на выбор метода реконструкции сыграл вариант атеросклероти-

ческого поражения по классификации TASC II. В случае многоуровневых изменений способ реваскуляризации выбирался с учетом специально разработанного индекса ARCHI [5].

После открытых операций у больных с КИНК и СД чаще наблюдались инфекционные осложнения, неблагоприятные кардиоваскулярные события, летальные исходы, что совпадает с результатами, полученными в ходе других крупных наблюдений [6]. Более ранние исследования пациентов не выявляли различий в результатах между открытым и эндоваскулярным подходами лечения КИНК у больных с СД [7, 8].

Указанное обстоятельство не свидетельствует об однозначном преимуществе эндоваскулярных операций в связи с ограничениями по их эффективному использованию. В то же время гибридные вмешательства могут быть компромиссом между опасностью традиционных и непродол-

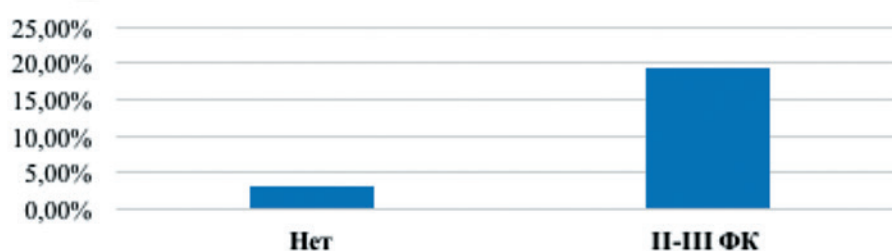


Рис. 5. Встречаемость ИОХВ в зависимости от функционального класса ХСН (по оси ординат — частота в процентах)

Figure 5. Frequency of IOMC depending on HSN functional class (on the axis ordinate — frequency in percent)

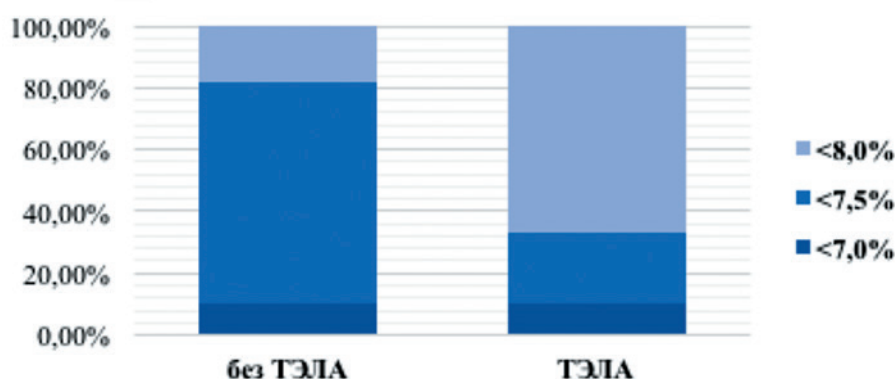


Рис. 6. Влияние уровня гликированного гемоглобина на развитие ТЭЛА (по оси ординат — частота в процентах)

Figure 6. Influence of glycosylated hemoglobin level on TELA development (on the axis ordinate — frequency in percent).

жительным положительным итогом эндоваскулярных операций [9].

К тому же открытые операции преимущественно востребованы при атеросклеротическом поражении одного из сегментов, тогда как в случае многостадийных поражений травматичность череды конвенциональных вмешательств может быть причиной отказа в хирургической помощи. Именно в этом случае гибридные методики позволяют обеспечить как адекватный приток, так и требуемый отток [10].

Сахарный диабет является тем заболеванием, которое предрасполагает к ишемическим повреждениям миокарда, что характерно и для лиц с КИНК на фоне генерализованного атеросклероза [11]. Хроническая сердечная недостаточность и постинфарктный кардиосклероз явились предикторами осложненного течения после оперативных вмешательств (тромбоз оперированного сегмента, инфекция области хирургического вмешательства с соответствующими отрицательными последствиями вплоть до полиорганной недостаточности). Возможным решением непростой тактической задачи является гибридный способ сосудистой реконструкции, который имеет меньшую инвазивность в сравнении с открытыми операциями при аналогичных технических возможностях.

Обстоятельства риска развития венозных тромбозомболических осложнений достаточно изучены, но в случае решения сложнейшей задачи (реваскуляризации) у больных КИНК и СД на одно из ведущих мест выходит нарушение печеночных функций и проявления системного воспаления [12]. В осуществленном исследовании отмечено повышение активности трансаминаз и наличие лейкоцитоза в случае развития ТЭЛА в периоперационном периоде.

Не только встречаемость ТЭЛА, но и летальность после выполненной реконструкции на фоне КИНК и СД могут быть связаны с особенностями течения сахарного диабета, которые влияют на нарушение кровообращения через механизм гиперкоагуляции [13]. В осуществленном исследовании обсуждаемые результаты лечения КИНК были ассоциированы с повышением уровня гликированного гемоглобина. Успешная коррекция углеводных нарушений обеспечивает уменьшение частоты нарушений мозгового кровообращения, что не может не сказываться на развитии летальных исходов [14].

Выводы

Сочетанные оперативные вмешательства (эндоваскулярные и открытые) в рамках нескольких

хирургических протоколов у больных с трофическими нарушениями на фоне КИНК и СД предсказуемо влекут за собой увеличение вдвое числа наиболее грозных осложнений в сравнении с одномоментными гибридными методами. У названной категории больных негативное влияние на итоги реконструкций оказывают проявления сердечной недостаточности, печеночной дисфункции, признаки воспалительного ответа и повышения уровня гликированного гемоглобина.

Ограничением настоящего исследования следует считать отсутствие сведений об отдаленных результатах реконструкций у больных КИНК в сочетании с сахарным диабетом.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Список литературы / References

1. Soyoye DO, Abiodun OO, Ikem RT, et al. Diabetes and peripheral artery disease: A review. *World J Diabetes*. 2021 Jun 15; 12(6):827–838. DOI: 10.4239/wjd.v.12.i6.827.
2. Darling JD, Bodewes TCF, Deery SE, et al. Outcomes after first-time lower extremity revascularization for chronic limb-threatening ischemia between patients with and without diabetes. *J Vasc Surg*. 2018 Apr; 67(4):1159–1169. DOI: 10.1016/j.jvs.2017.06.119.
3. Wiecezór R, Wiecezór AM, et al. Type 2 Diabetes and Cardiovascular Factors Contrasted with Fibrinolysis Disorders in the Blood of Patients with Peripheral Arterial Disease. *Medicina (Kaunas)*. 2019 Jul 22; 55(7):395. DOI: 10.3390/medicina55070395.
4. Luan J, Xu J, Zhong W, et al. Adverse Prognosis of Peripheral Artery Disease Treatments Associated With Diabetes: A Comprehensive Meta-Analysis. *Angiology*. 2022 Apr; 73(4):318–330. DOI: 10.1177/00033197211042494.
5. Glushkov NI, Ivanov MA, Apresyan AYU, et al. Are hybrid technologies appropriate for revascularization of aortoiliac-femoral segment? *Pirogov Russian Journal of Surgery = Khirurgiya. Zhurnal im. N. I. Pirogova*. 2020;(8):49–54. In Russian [Глушков Н.И., Иванов М.А., Апресян А.Ю. и др. Оправдано ли применение гибридных технологий при реваскуляризации аорто-подвздошно-бедренного сегмента. *Хирургия. Журнал им. Н. И. Пирогова*. 2020;8:49–54]. DOI: 10.17116/hirurgia202008149.
6. Elbadawi A, Elgendy IY, Saad M, et al. Contemporary Revascularization Strategies and Outcomes Among Patients With Diabetes With Critical Limb Ischemia: Insights From the National Inpatient Sample. *JACC Cardiovasc Interv*. 2021 Mar 22; 14(6):664–674. DOI: 10.1016/j.jcin.2020.11.032.

7. Egorova NN, Guillerme S, Gelijns A, et al. An analysis of the outcomes of a decade of experience with lower extremity revascularization including limb salvage, lengths of stay, and safety. *J Vasc Surg.* 2010 Apr; 51(4):878–85, 885.e1. DOI: 10.1016/j.jvs.2009.10.102.

8. Goodney PP, Beck AW, Nagle J, et al. National trends in lower extremity bypass surgery, endovascular interventions, and major amputations. *J Vasc Surg.* 2009 Jul; 50(1):54–60. DOI: 10.1016/j.jvs.2009.01.035.

9. Puzdryak PD, Shlomin VV, Bondarenko PB, et al. Comparison of the results of hybrid and open surgical treatment of multilevel arterial disease of lower extremities. *Russ. Jour. Card. and Cardiovasc. Surg. = Kard. i serd.-sosud. khir.* 2019;12(3):227–234. In Russian [Пуздряк П.Д., Шломин В.В., Бондаренко П.Б. и др. Сравнение результатов гибридного и открытого хирургического лечения многоуровневого поражения артерий нижних конечностей. Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. 2019; 12(3):227–234]. DOI: 10.17116/kardio201912031227.

10. Serna Santos J, Söderström M, Helminen R, et al. Outcome after Hybrid Outflow Interventions for Chronic Limb-threatening Ischemia. *Scandinavian Journal of Surgery.* 2021; 110(2):241–247. DOI: 10.1177/1457496920975608.

11. Nativel M, Potier L, Alexandre L, et al. Lower extremity arterial disease in patients with diabetes: a contemporary narrative review. *Cardiovascular Diabetology.* 2018; 17(1):138. DOI: 10.1186/s12933-018-0781-1.

12. Keller K, Schmitt VH, Vosseler M, et al. Diabetes Mellitus and Its Impact on Patient-Profile and In-Hospital Outcomes in Peripheral Artery Disease. *J Clin Med.* 2021 Oct 28; 10(21):5033. DOI: 10.3390/jcm10215033.

13. Sumera Z, Muhammad AT, Shabbir A, et al. Diabetes and its Association with Peripheral Arterial Disease. *Biomed J Sci & Tech Res* 37(5); 2021. DOI: 10.26717/BJSTR.2021.37.006052.

14. Achim A, Stanek A, Homorodean C, et al. Approaches to Peripheral Artery Disease in Diabetes: Are There Any Differences? *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2022; 19(16):9801. DOI: 10.3390/ijerph19169801.

Информация об авторах:

Глушков Николай Иванович, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой общей хирургии ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И. И. Мечникова» Минздрава России;

Фадеева Энже Алексеевна, студент 6 курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И. И. Мечникова» Минздрава России;

Пуздряк Петр Дмитриевич, аспирант кафедры общей хирургии ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И. И. Мечникова» Минздрава России;

Реснянская Екатерина Денисовна, студент 4 курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И. И. Мечникова» Минздрава России;

Каменская Анастасия Евгеньевна, студент 4 курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И. И. Мечникова» Минздрава России;

Гайфуллин Александр Рустемович, студент 3 курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И. И. Мечникова» Минздрава России;

Антоненко Алиса Игоревна, студент 3 курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И. И. Мечникова» Минздрава России;

Иванов Михаил Анатольевич, д.м.н., профессор кафедры общей хирургии ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И. И. Мечникова» Минздрава России;

Жданович Кристина Витальевна, аспирант кафедры общей хирургии ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И. И. Мечникова» Минздрава России.

Authors information:

Nikolay I. Glushkov, MD, Professor, Head of the Department of General Surgery, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov;

Enzhe A. Fadeeva, 6th year student of the Faculty of Medicine, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov;

Pyotr D. Puzdryak, Postgraduate student of the Department of General Surgery, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov;

Ekaterina D. Resnyanskaya, 4th year student of the Faculty of Medicine, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov;

Anastasia E. Kamenskaya, 4th year student of the Faculty of Medicine, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov;

Aleksander R. Gaifullin, 3rd year student of the Faculty of Medicine, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov;

Alisa I. Antonenko, 3rd year student of the Faculty of Medicine, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov;

Mikhail A. Ivanov, MD, Professor, Department of General Surgery, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov;

Kristina V. Zhdanovich, postgraduate student of the Department of General Surgery, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov.

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ СЦЕНАРИИ РАЗВИТИЯ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА И ОСНОВНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ИШЕМИЧЕСКОГО КАСКАДА

Шиленко Л. А.¹, Карпов А. А.^{1,2}, Веретенникова Е. И.³,
Шиленко А. А.^{1,4}, Галагудза М. М.^{1,5}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский
государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» имени
В. И. Ульянова (Ленина)», Санкт-Петербург, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский
государственный педиатрический медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего профессионального образования
«Санкт-Петербургский национальный исследовательский
университет информационных технологий, механики и оптики»,
Санкт-Петербург, Россия

⁵ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт аналитического приборостроения Российской академии
наук», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Шиленко Леонид Алексеевич,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: shilenko.leo@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 18.08.2023
и принята к печати 24.03.2024.

Резюме

Ишемический инсульт занимает одно из лидирующих мест среди всех причин инвалидизации и смертности. Ключевыми подходами к лечению этой патологии являются тромболитическая терапия и тромбоаспирация. Несмотря на доказанную эффективность, применение этих методов ограничено сравнительно узким терапевтическим окном. Учитывая это, сохраняется большая актуальность в дальнейшем изучении молекулярных механизмов ишемического-реперфузионного повреждения головного мозга в рамках концепции ишемического каскада. Воздействие на механизмы индукции и реализации различных видов программируемой клеточной гибели с помощью фармакологических агентов представляет собой перспективный подход к ослаблению повреждения головного мозга при ишемическом инсульте. В настоящем обзоре рассмотрены ключевые процессы, ведущие к необратимому повреждению нейронов и их гибели. Детально рассмотрены механизмы формирования и роль эксайтотоксичности, кальциевой перегрузки, оксидативного и нитрозильного стресса, дисфункции митохондрий, а также запуск сигнальных путей апоптоза и асептического воспаления. Обсужден вопрос различных вариантов клеточной гибели на фоне этих патологических процессов. Наряду с рассмотрением сигнальных путей, способствующих

прогрессии повреждения головного мозга, отдельное внимание уделено активации при ишемии протективных сигнальных механизмов, обеспечивающих повышение резистентности клетки к гибели.

Ключевые слова: головной мозг, ишемический инсульт, ишемическое-реперфузионное повреждение, клеточная гибель.

Для цитирования: Шиленко Л.А., Карпов А.А., Веретенникова Е.И. и др. Патогенетические сценарии развития ишемии головного мозга и основные элементы ишемического каскада. Трансляционная медицина. 2024; 11(1): 87-102. DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-1-87-102. EDN: EYWTGT

PATHOGENETIC SCENARIOS OF THE DEVELOPMENT OF BRAIN ISCHEMIA AND THE MAIN ELEMENTS OF THE ISCHEMIC CASCADE

Leonid A. Shilenko¹, Andrei A. Karpov^{1,2},
Elizaveta I. Veretennikova³, Alexey A. Shilenko^{1,4},
Michael M. Galagudza^{1,5}

¹ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI", Saint Petersburg, Russia

³ Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russia

⁴ University ITMO, Saint Petersburg, Russia

⁵ Institute for Analytical Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Leonid A. Shilenko,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.

E-mail: shilenko.leo@yandex

Received 18 July 2023; accepted
24 March 2024.

Abstract

Ischemic stroke is one of the leading causes of disability and mortality. The key approaches to the treatment of this pathology are thrombolytic therapy and thromboaspiration. Despite their proven efficacy, the application of these methods is limited by a relatively narrow therapeutic window. There remains a great relevance in the further study of the molecular mechanisms of ischemic-reperfusion brain damage within the framework of the ischemic cascade concept. The impact on the mechanisms of induction and implementation of various types of programmed cell death with the help of pharmacological agents is a promising approach to reduce brain damage in ischemic stroke. This review considers the key processes leading to irreversible damage to neurons and their death. The mechanisms of formation and the role of excitotoxicity, calcium overload, oxidative and nitrosyl stress, mitochondrial dysfunction, as well as the triggering of signaling pathways of apoptosis and aseptic inflammation are considered in detail. The issue of various variants of cell death against the background of these pathological processes is discussed. Along with the consideration of signaling pathways that contribute to the progression of brain damage, special attention is paid to the activation of protective signaling mechanisms during ischemia, which provide an increase in cell resistance to death.

Key words: brain, cell death, ischemic stroke, ischemic-reperfusion injury.

For citation: Shilenko LA, Karpov AA, Veretennikova EI, et al. Pathogenetic scenarios of the development of brain ischemia and the main elements of the ischemic cascade. Translational Medicine. 2024; 11(1): 87-102. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-1-87-102. EDN: EYWTGT

Список сокращений: АФК — активные формы кислорода, ГМ — головной мозг, ИРП — ишемическое-реперфузионное повреждение, DAPK1 — ассоциированная с клеточной смертью протеинкиназа 1, NMDA — N-метил-D-аспарат, PARP-1 — поли[АДФ-рибоза]полимераза-1.

Введение

Несмотря на значительные успехи в диагностике и лечении, достигнутые в последние 20 лет, нарушения мозгового кровообращения характеризуются высокой распространенностью и тяжестью последствий. Они могут происходить по ишемическому и геморрагическому типу. Механизмы и клинические проявления ишемических нарушений зависят от калибра окклюзированных артерий головного мозга (ГМ) [1]. Так, атеротромбоз сонных и интракраниальных артерий вызывает типичный ишемический инсульт. Ишемический инсульт — это снижение интенсивности кровоснабжения тканей ГМ, в результате которого происходит уменьшение доставки к нейронам необходимого количества глюкозы и кислорода, которые требуются для обеспечения нормальной функции ГМ [2, 3]. Применение тромболитической терапии кардинальным образом улучшило прогноз у пациентов с атеротромбозом мозговых артерий. В то же время во многих случаях спонтанное либо медикаментозное восстановление кровотока после периода ишемии сопровождается парадоксальным нарастанием повреждения, в связи с чем процесс повреждения ткани ГМ при нарушениях кровообращения целесообразно рассматривать в контексте ишемического-реперфузионного повреждения (ИРП). Обструкция пенетрирующих артериол и более мелких паренхиматозных артериол, патоморфологическим субстратом которой является болезнь мелких сосудов ГМ, приводит к повреждению белого вещества, включая лейкоараоз, лакунарные инфаркты и микроинфаркты. Наибольшей чувствительностью к ишемическому повреждению характеризуется подкорковое белое вещество, находящееся на границе сосудистых бассейнов средней и передней мозговых артерий. Болезнь мелких сосудов ГМ проявляется как в виде атеросклеротического поражения мелких артерий (например, пиальных артерий и мест отхождения пенетрирующих артерий), так и в утолщении стенки сосудов артериолярного калибра, в которых не образуются атеросклеротические бляшки [4]. Важнейшим фактором риска развития болезни мелких сосудов является артериальная гипертензия, на ранних стадиях которой утолщение меди и артериол происходит за счет компен-

саторной гипертрофии и гиперплазии гладкомышечных клеток [5].

По мере прогрессирования артериальной гипертензии начинает доминировать повреждение эндотелия с нарушением плотных контактов между соседними эндотелиоцитами и выраженным повышением проницаемости интимы, что приводит к ее инфильтрации такими белками плазмы крови, как фибриноген, тромбин, иммуноглобулины класса G и др. [6]. В результате активации микроглии и астроцитов запускается процесс нейровоспаления, сопровождающийся повреждением в основном белого вещества ГМ. В стенке артериол при этом также развивается воспаление, завершающееся постепенной гибелью гладкомышечных клеток и параллельным отложением аморфного белка гиалина. Морфологическими коррелятами болезни мелких сосудов являются артериолосклероз и липогиалиноз [7, 8]. В наиболее тяжелых случаях развивается фибриноидный некроз артериол, для которого характерна деструкция стенки артериолы и выраженное периваскулярное воспаление.

Этиологические факторы ишемического инсульта

Среди этиологических факторов ишемического инсульта в настоящее время доминирует (~50 %) атеротромбоз экстракраниальных и интракраниальных мозговых артерий, возникающий при дестабилизации и разрыве атеросклеротической бляшки с последующим тромбозом [9] (рис. 1). На втором месте среди причин ишемического инсульта находится болезнь мелких сосудов (~25 %), ассоциированная с возникновением лакунарных инсультов и микроинсультов. Несмотря на то, что размер инфаркта при лакунарном инсульте значительно меньше, чем при атеротромботическом поражении, последствия лакунарного и более обширного инсульта могут быть сравнимы. В настоящее время общепризнано, что локализация инсульта имеет столь же важное значение, как и его объем; данное положение получило воплощение в виде концепции так называемой «стратегической зоны» инфаркта [10]. Последние исследования с сопоставлением симптомов и локализации позволили выявить такие ключевые зоны, как левая угловая извилина, левые базальные ганглии, белое вещество вокруг базальных ганглиев. Третьей важнейшей причиной ишемического инсульта является эмболия артерий ГМ, которая отмечается приблизительно в 20 % случаев [11].

Основные источники эмболов при эмбологенном ишемическом инсульте представлены в таблице 1. В 5 % случаев ишемический инсульт возникает вследствие редких причин, которые

подразделяются на воспалительные и невоспалительные заболевания артерий ГМ. К невоспалительным заболеваниям могут быть отнесены фибромускулярная дисплазия, радиационная васкулопатия, болезнь моямая, болезнь Фабри и ред-

кие наследственные формы болезни мелких сосудов ГМ. К воспалительным заболеваниям артерий ГМ относятся изолированный ангиит центральной нервной системы, височный артериит и другие васкулиты.

Таблица 1. Виды эмболии и источники эмболов при эмболическом ишемическом инсульте

Table 1. Types of embolism and sources of emboli in embolic ischemic stroke

Вид эмболии	Место образования эмболов
Кардиогенная	Левые отделы сердца: - легочные вены - левое предсердие - левый желудочек
Парадоксальная	Вены большого круга кровообращения: - вены нижних конечностей - вены малого таза - вены брюшной полости
Артерио-артериальная	Атеротромбоз аорты и крупных артерий ГМ: - тромбоэмболия - атероэмболия
Эмболия из неустановленных источников	?

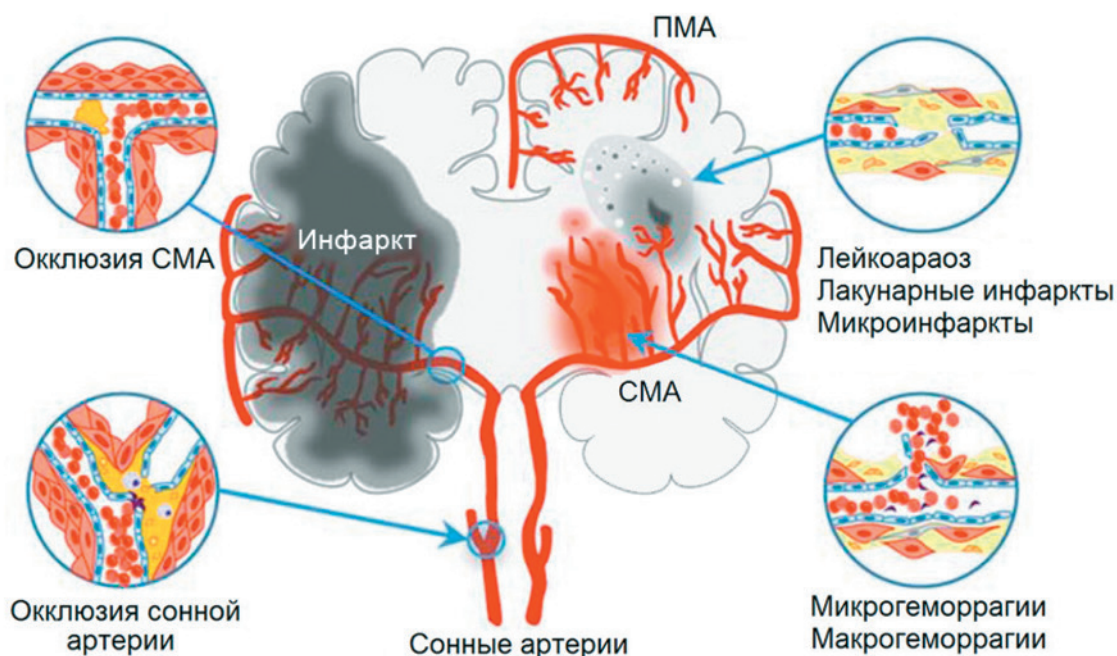


Рис. 1. Патогенетические сценарии нарушений мозгового кровообращения (Faraco G., et al. (2013) [5])

Примечание: ПМА — передняя мозговая артерия, СМА — средняя мозговая артерия.

Figure 1. Pathogenetic scenarios of cerebrovascular accidents (Faraco G., et al. (2013) [5])

Note: ACA — anterior cerebral artery, MCA — middle cerebral artery.

Ишемический каскад как ключевая концепция повреждения ткани головного мозга

Со времени первых попыток систематизации механизмов развития ишемического повреждения ГМ в литературе сложилась удобная для восприятия и понимания концепция ишемического каскада [12]. Ее сущность заключается в том, что индуцированные ишемией ГМ молекулярные, клеточные и тканевые нарушения располагаются в прямоугольной системе координат по оси ординат, а по оси абсцисс при этом откладывается время с момента начала ишемии ГМ. Общий обзор нарушений, составляющих ишемический каскад при ишемическом инсульте, может быть представлен следующим образом. Оклюзия церебральной артерии сопровождается резким снижением перфузионного давления в дистальной части артериального русла. Перфузионное давление при этом выходит за пределы нижнего порога ауторегуляции мозгового кровотока (50–60 мм рт. ст.). Несмотря на максимальную дилатацию сосудов, уровень объемного кровотока в данном сосудистом бассейне начинает линейно зависеть от перфузионного давления и становится недостаточным для обеспечения метаболических потребностей ткани [13]. Ранние функциональные нарушения в нейронах, располагающихся в наиболее чувствительных к ишемии структурах ГМ (кора больших полушарий, гиппокамп и др.), возникают уже в первые минуты и включают уменьшение пула АТФ, дисфункцию Na^+/K^+ -АТФазы и утрату ее электрогенного эффекта, что сопряжено с развитием ишемической (гипоксической) деполяризации нейронов. Деполяризация глутаматэргических нейронов приводит к высвобождению в синаптическую щель нефизиологических количеств глутамата, что запускает механизм эксайтотоксичности. Параллельно происходит активация образования активных форм кислорода (АФК) с развитием оксидативного стресса и перекисного окисления липидов. Чуть позже возникает резкое увеличение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , что в сочетании с дисфункцией митохондрий и оксидативным стрессом приводит в конце первого — начале второго часа ишемии к формированию раннего необратимого повреждения нейронов и их массовой гибели путем некроза. При этом начинается образование ядра инфаркта. Высвобождение из поврежденных и погибших нейронов, а также из клеток глии белков теплового шока и других повреждение-ассоциированных молекулярных паттернов (или аларминов) запускает активацию механизмов врожденного иммунитета с увеличением локаль-

ной продукции провоспалительных цитокинов и хемокинов, что в сочетании с увеличением проницаемости гематоэнцефалического барьера приводит к инфильтрации инфарктированного участка ГМ лейкоцитами. Первыми в очаг повреждения из кровеносного русла поступают нейтрофилы, затем — моноциты и последними — лимфоциты. Развивается нейровоспаление, которое может быть ассоциировано с наступлением «второй волны» клеточной гибели, которая в данном случае является программируемой и включает такие варианты, как апоптоз, некроптоз, аутофагия и др. В процесс вовлекаются не только рекрутированные из кровотока лейкоциты, которые осуществляют фагоцитоз фрагментов погибших клеток, но и клетки глии (микроглия и астроциты). Завершающие этапы ишемического каскада, которые реализуются спустя 5–7 дней, включают реактивный глиоз и формирование кисты, а также малоэффективные процессы ангиогенеза, миелинизации, нейрогенеза и нейрорегенерации. Ниже дается более детальная характеристика основных звеньев ишемического каскада в порядке их возникновения.

Основные механизмы ишемического-реперфузионного повреждения головного мозга Эксайтотоксичность и ранняя клеточная гибель

Эксайтотоксичность и кальциевая перегрузка относятся к ранним проявлениям ишемического каскада и вносят существенный вклад в формирование необратимого ишемического повреждения нейронов [14]. Классический механизм эксайтотоксической гибели нейронов запускается в результате ишемической деполяризации глутаматэргических нейронов и усиленного высвобождения из их терминалей возбуждающего нейротрансмиттера глутамата [15]. Усиленное высвобождение глутамата сочетается с нарушением его обратного захвата в пресинаптические окончания и астроциты, вследствие дисфункции транспортера возбуждающих аминокислот 2 (EAAT2), что приводит к резкому увеличению концентрации глутамата в синаптическом пространстве [16].

В результате происходит гиперстимуляция ионотропных рецепторов глутамата, селективно связывающих N-метил-D-аспартат (NMDA), на постсинаптической мембране, что приводит к открытию кальциевых каналов и поступлению ионизированного Ca^{2+} в цитоплазму нейронов. Увеличение концентрации Ca^{2+} опосредует развитие мощного повреждающего эффекта, поскольку происходит активация Ca^{2+} -чувствительных ферментов — кальпаинов, обладающих неизбирательным

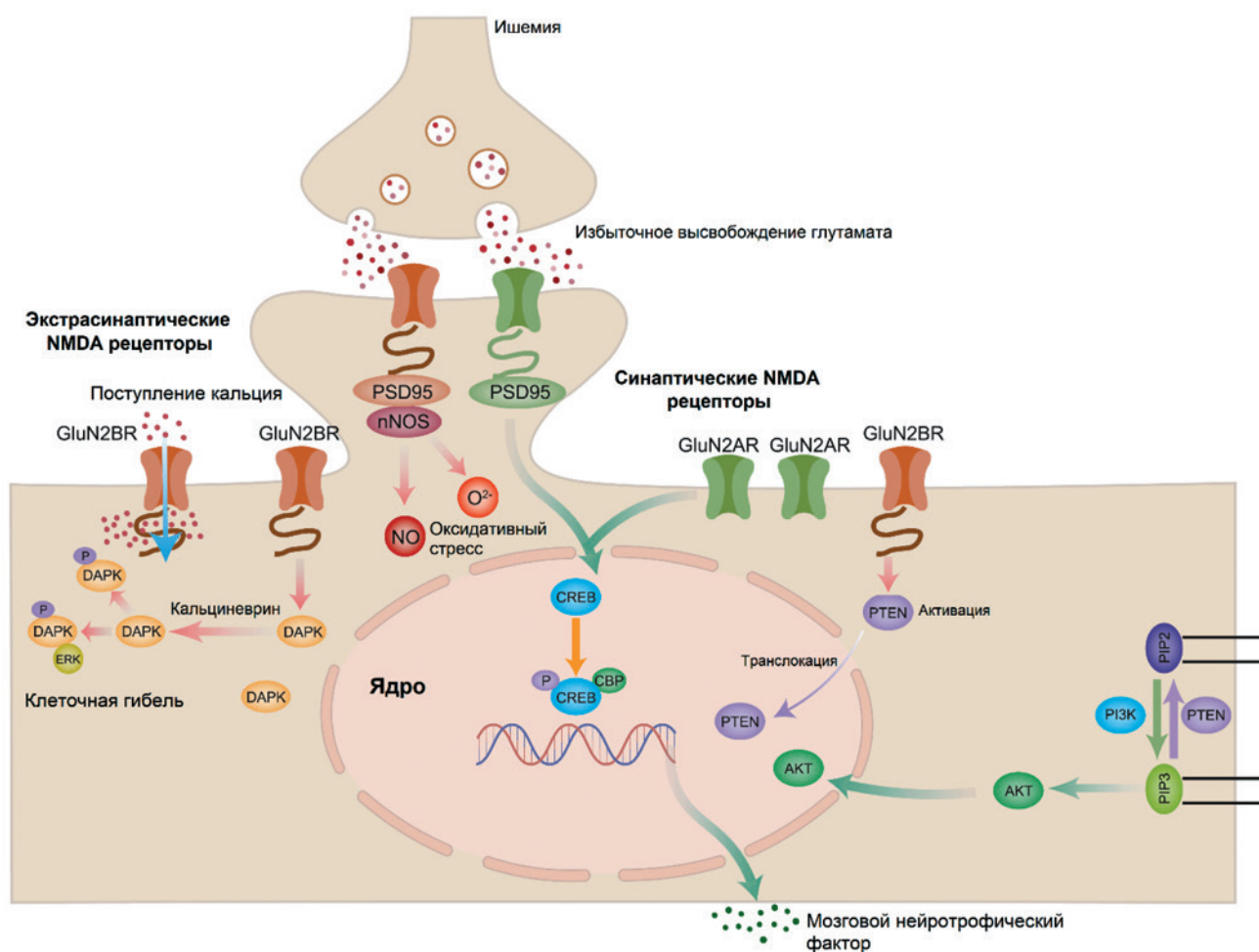


Рис. 2. Последствия активации NMDA рецепторов зависят от их молекулярного строения и локализации (Qin C, et al. (2022) [20])

Примечание: PSD95 — белок постсинаптической плотности 95, nNOS — нейрональная синтаза оксида азота, NO — оксид азота II, O₂⁻ — супероксид анион-радикал, NMDA — N-метил-D-аспартат, GluN2BR — GluN2B содержащий рецептор NMDA, GluN2AR — GluN2A содержащий рецептор NMDA, DAPK — протеинкиназа, ассоциированная с клеточной смертью, p-DAPK — фосфорилированная DAPK, ERK — киназа, регулируемая внеклеточным сигналом, CREB — белок, связывающий элемент ответа циклического аденозинмонофосфата, CREB-CBP — CREB-связывающий белок, p-CREB — фосфорилированный CREB, PTEN — гомолог фосфатазы и тензина, PI3K — фосфоинозитид 3-киназа, PIP2 — фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат, PIP3 — фосфатидилинозитол 3,4,5-трифосфат, AKT — протеинкиназа B. Активация экстраинаптических NMDA рецепторов, содержащих GluN2B пептид, приводит к нейрональному повреждению и гибели. Активация синаптических рецепторов, содержащих GluN2A субъединицу, оказывает защитное действие.

Figure 2. The consequences of NMDA receptor activation depend on their molecular structure and location (Qin C, et al. (2022) [20])

Note: PSD95 — postsynaptic density protein 95, nNOS — neuronal nitric oxide synthase, NO — nitric oxide, O₂⁻ — superoxide anion radical, NMDA — N-methyl-D-aspartate, GluN2BR — GluN2B-containing NMDA receptor, GluN2AR — GluN2A-containing NMDA receptor, DAPK — death-associated protein kinase, p-DAPK — phosphorylated DAPK, ERK — extracellular signal-regulated kinase, CREB — cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein, CREB-CBP — CREB-binding protein, p-CREB — phosphorylated CREB, PTEN — phosphatase and tensin homolog, PI3K — phosphoinositide 3-kinase, PIP2 — phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP3 — phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, AKT — protein kinase B. Activation of extrasynaptic NMDA receptors containing GluN2B peptide leads to neuronal damage and death. Activation of synaptic receptors containing the GluN2A subunit has a protective effect.

протеолитическим действием, и фосфолипаз С и А₂, вызывающих, соответственно, повреждение мембраны и высвобождение арахидоновой кислоты с активацией образования ее метаболитов [17]. Еще один активируемый Ca²⁺ фермент — это нейрональная NO-синтаза, активация которой приводит к гиперпродукции NO и образованию АФК и азота, в частности, пероксинитрита (ONOO⁻) [18]. Параллельно происходит активация глутаматных рецепторов других типов, а именно: рецептора α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA) и каинатных рецепторов. Активация этих рецепторов сопряжена с открытием натриевых каналов и массивным поступлением Na⁺ в цитоплазму нейронов с последующим отеком, также ведущим к клеточной гибели.

Проведенные в последние 10 лет исследования показали, что последствия гиперактивации NMDA рецепторов нельзя считать однозначно негативными, так как они могут зависеть от состава субъединиц данных рецепторов и их локализации. NMDA рецепторы, локализованные в области синапсов, содержат в своем составе GluN2A субъединицу, тогда как расположенные экстраинаптически NMDA рецепторы преимущественно содержат GluN2B субъединицу [19]. Наличие субъединиц GluN2A/GluN2B определяет интенсивность кальциевого тока после связывания рецептора с лигандом и функциональные последствия активации рецептора (рис. 2).

Показано, что активация экстраинаптических GluN2B-содержащих рецепторов сопровождается более интенсивным входом Ca²⁺ и, помимо уже указанных выше негативных последствий активации ферментов, приводит к инактивации важнейшего транскрипционного фактора CREB, торможению сигналинга киназ, активируемых внеклеточными сигналами (ERK), увеличению экспрессии проапоптотических генов (например, p53 и BAX). Известно также, что активация GluN2B-содержащих рецепторов приводит к запуску сигнального пути ассоциированной с клеточной смертью протеинкиназы 1 (DAK1), что вызывает гибель клетки путем апоптоза [21]. В активации DAK1 принимает участие белок кальциневрин [22]. Негативные эффекты активации экстраинаптических GluN2B-содержащих NMDA рецепторов могут объясняться и активацией сигнального пути гомолога фосфатазы и тензина (PTEN), который усиливает клеточную гибель за счет подавления пути PI3K-Akt.

Напротив, активация синаптических GluN2A-содержащих NMDA рецепторов может иметь нейропротективные последствия, поскольку кальциевый сигналинг при этом активирует

транскрипционный фактор CREB, под контролем которого находится мозговой нейротрофический фактор (BDNF), стимулирующий выживание клетки в условиях повреждения, а также обеспечивающий нейропластичность и нейрогенез. GluN2A-содержащие NMDA рецепторы также сопряжены с протективным PI3K-Akt сигнальным путем, который опосредует подавление проапоптотических факторов BAD и p53, а также ингибирует киназу гликогенсинтазы-3β [23].

Эти данные могут служить объяснением неудач при проведении клинических исследований неселективных ингибиторов NMDA рецепторов [24]. В настоящее время уже разработаны селективные ингибиторы GluN2B рецепторов, которые обладают нейропротективными эффектами в преклинических исследованиях [25].

Поступление Ca²⁺ в цитоплазму нейронов через кальциевый канал NMDA рецептора играет ключевую роль в запуске повреждения или, напротив, выживания клетки. При этом нарушения кальциевого гомеостаза нейронов при ишемии в настоящее время рассматриваются в более широком контексте, поскольку повышение [Ca²⁺]_i может происходить вследствие его высвобождения из таких внутриклеточных депо, как митохондрии и эндоплазматический ретикулум, а также в результате поступления через мембранные каналы. К таким каналам относят натрий-кальциевый обменник в «обратном» варианте его работы [26], протон-активируемый катионный канал ASIC1A [27] и каналы с транзиторным рецепторным потенциалом TRP [28]. Указанные каналы и насосы могут представлять собой перспективные фармакологические мишени для борьбы с ИПП. Например, ингибирование канала ASIC1A, который активируется в условиях индуцированного ишемией ацидоза, обладает нейропротективным эффектом [29]. Блокада EP1 рецепторов простагландина E2 также приводит к нейропротекции, так как активация указанных рецепторов нарушает способность Na⁺/Ca²⁺ обменника выводить избыток кальция из клетки [30]. Таким образом, массивное, прогрессирующее поступление в клетки Ca²⁺ играет повреждающую роль и способствует возникновению ранней волны некротической клеточной гибели.

Оксидативный и нитрозильный стресс

Оксидативное повреждение клеточных структур играет важную роль в ишемическом повреждении ГМ и дополнительно активизируется при реперфузии. В сравнении с другими органами ткань ГМ характеризуется повышенной чувствительностью к оксидативному стрессу, что связано

с невысокой активностью ферментативных антиоксидантов, обилием полиненасыщенных жирных кислот в составе мембранных фосфолипидов и сниженной активностью цитохром с оксидазы, что способствует более интенсивному образованию супероксиданиона в процессе передачи электронов по электронтранспортной цепи митохондрий [31]. Ишемия приводит к активации нескольких ферментативных систем, генерирующих АФК (рис. 3). В частности, происходит возникающий при ишемии субстратный дефицит в сочетании с окислительной инактивацией важнейшего кофактора NO-синтазы — тетрагидробиоптерина — и приводит к разобщению окисления L-аргинина и синтеза NO, в результате чего NO-синтаза фактически продуцирует АФК вместо NO [32]. Характерная для ишемии кальциевая перегрузка клетки активизирует ферментативный комплекс НАДФН-оксидазы, который продуцирует супероксиданион-радикал. Медиаторами в этом процессе выступают протеинкиназа C и NO, образующийся в результате активации нейрональной NO-синтазы [33]. Также в результате увеличения ионизированного кальция и воздействия супероксида, обра-

зуемого НАДФН-оксидазой вблизи митохондрий, происходит их деполяризация и усиление образования в них АФК [34]. Активация кальций-чувствительных протеаз способствует превращению ксантиндегидрогеназы в ксантинооксидазу, которая служит дополнительным источником супероксиданион радикала [35].

АФК оказывают повреждающее действие за счет прямого и непрямого механизмов. Прямой механизм подразумевает непосредственное взаимодействие АФК с белками, липидами и ДНК с их окислительной модификацией и нарушением функции. Окислительная модификация белков сопровождается нарушением их конформации или частичной деградацией, что нарушает их специфические функции. Например, окислительная инактивация фермента глутамин-синтетазы в астроцитах приводит к его инактивации и нарушению превращения глутамата в глутамин, что усиливает эксайтотоксичность [36]. Окисление мембранных липидов приводит к формированию липоперекисей, а в дальнейшем — перекисных кластеров, которые вызывают фрагментацию плазмалеммы и гибель клетки. Непрямой механизм заключается

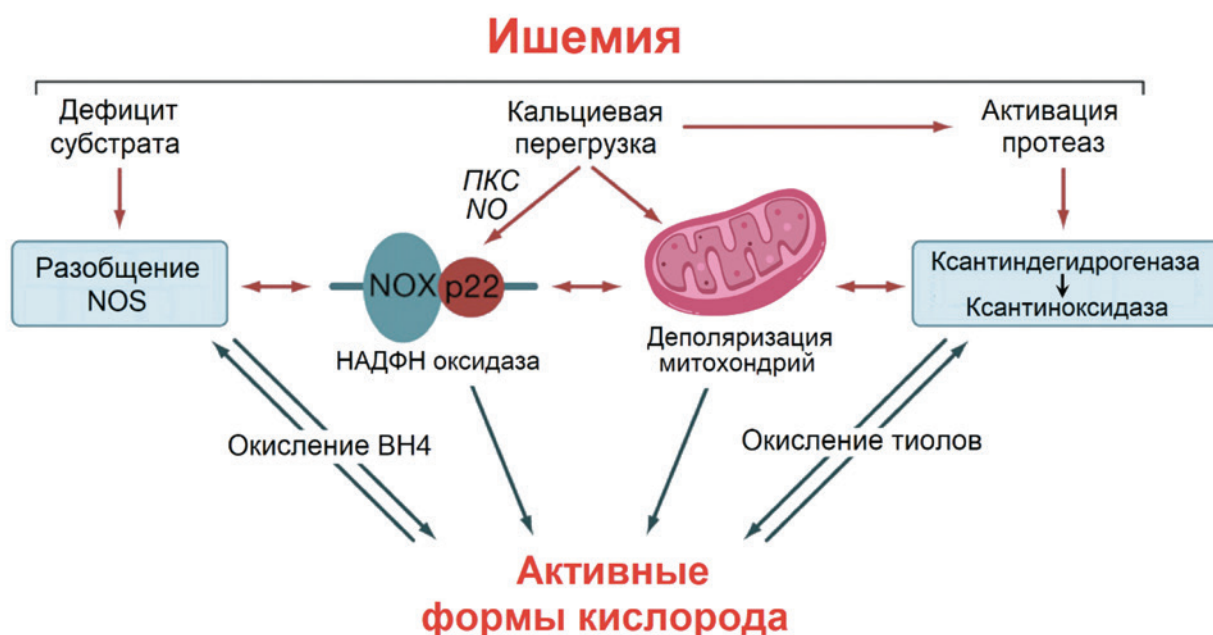


Рис. 3. Источники активных форм кислорода при ишемии головного мозга

Примечание: NOS — синтаза оксида азота, ПКC — протеинкиназа C, NO — оксид азота II, NOX — никотинамидадениндинуклеотидфосфат оксидаза, BH4 — тетрагидробиоптерин, НАДФ — никотинамидадениндинуклеотидфосфат.

Figure 3. Sources of reactive oxygen species in cerebral ischemia

Note: NOS — nitric oxide synthase, PK — protein kinase, NO — nitric oxide, NOX — nicotinamideadeninedinucleotidephosphate oxidase, BH4 — tetrahydrobiopterin, NADPH — nicotinamideadeninedinucleotidephosphate.

в активации ряда внутриклеточных сигнальных путей, в целом направленных на запуск программируемой клеточной гибели. Известно, что АФК активируют белок p53, представляющий собой транскрипционный фактор, контролирующий экспрессию проапоптотических белков Bax, Bid и PUMA [37]. Кроме того, p53, наряду с самими АФК, способствует открытию митохондриальной поры, в результате чего из межмембранного пространства митохондрий высвобождаются цитохром c и апоптоз-индуцирующий фактор, которые активируют каспазы и вызывают апоптоз [38].

Не менее важную роль в механизмах повреждения нейронов играют активные формы азота, к которым относятся NO, пероксинитрит, диоксид азота, нитрозопероксикарбонат и др. Активные формы азота ингибируют ключевые ферменты митохондрий, способствуют открытию митохондриальной поры, повреждают ДНК и активируют кальциевые каналы TRPM7 подтипа [28, 39]. Еще один механизм повреждения связан с тем, что NO модифицирует остатки цистеина в белках за счет взаимодействия с тиольными группами и образования производных S-нитрозотиола. Этот вариант посттрансляционной модификации белка оказывает значимое влияние на функцию клетки в условиях ишемии. Известно, например, что нитрозилирование сопровождается изменением функциональной активности таких важных в контексте ИРП белков, как каспазы, металлопротеиназы, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа и др. [40, 41].

С учетом ключевого значения оксидативного стресса в ИРП ГМ фармакологическое ослабление генерации АФК или их инактивация рассматривались в качестве перспективного кардио- и нейропротективного подхода. К сожалению, многочисленные клинические исследования эффективности антиоксидантов при ишемическом инсульте не показали значимого изменения конечной точки [42]. Одним из теоретических объяснений может служить то, что АФК в небольших количествах выполняют важнейшую сигнальную функцию и регулируют ряд ключевых физиологических процессов [43, 44]. В связи с этим, необходима разработка более таргетных способов воздействия только на избыточную генерацию АФК, которая сопутствует ИРП и оказывает повреждающее действие [45].

Активация сигнальных путей и геномный ответ

Ишемическое повреждение ГМ сопровождается активацией в нейронах и клетках глии множества различных клеточных сигнальных путей [20].

В зависимости от преобладающих последствий все сигнальные пути, активирующиеся при ишемии, могут быть условно разделены на протективные и способствующие нарастанию повреждения. Фармакологические подходы к нейропротекции основаны на стимуляции протективных путей и ингибировании негативных.

Часть сигнальных путей запускается путем стимуляции мембранных рецепторов, тогда как другие не требуют активации рецепторов лигандами. По механизму реализации сигнальные пути могут быть разделены на те, что сопровождаются только посттрансляционной модификацией белков-мишеней, и те, что завершаются изменением экспрессии генов (геномный ответ). Во втором случае, как правило, сигнальный путь содержит тот или иной транскрипционный фактор. Внутриклеточные сигнальные пути при ишемии ГМ можно классифицировать в зависимости от этапа ишемического каскада. В таблице 2 представлена более подробная информация о сигнальных путях и их связи с основными звеньями ишемического каскада.

Дисфункция митохондрий

Митохондрии играют важнейшую роль в механизмах ИРП ГМ практически на всех этапах ишемического каскада. Буквально в первые минуты после наступления критической ишемии ГМ в митохондриях из-за отсутствия кислорода прекращается транспорт электронов по электрон-транспортной цепи, в результате чего снижается протонный градиент и прекращается продукция АТФ. Несколько позже вследствие перегрузки кальцием происходит деполяризация мембраны митохондрий, сопровождающаяся гиперпродукцией АФК, оказывающих повреждающее действие. Еще одно ключевое событие, связанное с митохондриями и играющее важную роль в развитии реперфузионного повреждения ГМ, — это открытие митохондриальной поры, регулирующей проницаемость внутренней мембраны митохондрий. Открытие митохондриальной поры стимулируется рядом факторов, в числе которых повышение концентрации Ca^{2+} и повышение pH в матриксе митохондрий выше 7,0, усиленное образование АФК и частичная деполяризация мембраны митохондрий ($\Delta\psi\text{M}$). Другие факторы, способствующие открытию поры, — это неорганический фосфат, жирные кислоты и проапоптотические молекулы. Открытие поры вызывает немедленную полную деполяризацию мембраны митохондрий (снижение $\Delta\psi\text{M}$), приводя к потере электрохимического градиента. В этой ситуации АТФ-синтаза начина-

Таблица 2. Внутриклеточные сигнальные пути, активирующиеся при ишемическом-реперфузионном повреждении головного мозга

Table 2. Intracellular signaling pathways activated during ischemia-reperfusion injury of the brain

Процесс	Сигнальный путь	Биологическое значение	Источник
Эксайтотоксичность (стимуляция NMDA рецепторов)	Фосфатидилинозитол-3ОН-киназа (PI3K) — протеинкиназа B (Akt)	Нейропротекция (инактивация проапоптотических белков Bad, p53 и др.)	Jo H., et al. (2012) [46]
	Мозговой нейротрофический фактор (BDNF) — цАМФ-зависимый транскрипционный фактор CREB	Нейропротекция (экспрессия генов, уменьшающих апоптоз и увеличивающих выживание)	Zhang Y., et al. (2017) [47]
	Путь гомолога фосфатазы и тензина (PTEN)	Усиление клеточной гибели (подавление пути PI3K/Akt)	Ning K., et al. (2004) [48]
	Путь кальциневрина — ассоциированной с клеточной смертью протеинкиназы 1 (DAPK1)	Усиление апоптоза	Shamloo M., et al. (2005) [49]
	Белок постсинаптической плотности PSD-95 — нейрональная NO-синтаза	Гиперпродукция NO, ранняя клеточная гибель	Zhou L., et al. (2010) [50]
Дисфункция митохондрий и оксидативный стресс	Путь индуцируемого гипоксией фактора 1 α (HIF-1 α)	Защитная роль, повышение устойчивости клетки к гипоксии (транскрипция генов устойчивости)	Kim J. W., et al. (2006) [51]
	Путь транскрипционного ядерного фактора Nrf2 — элементов антиоксидантного ответа (ARE)	Нейропротекция (усиление экспрессии противовоспалительных белков и антиоксидантов)	Dinkova-Kostova A. T., et al. (2015) [52]
	Путь казеин киназы 2 (CK2)	Антиоксидантный эффект	Kim G.S., et al. (2012) [53]
Аутофагия	Путь протеинкиназы — мишени рапамицина млекопитающих (mTOR)	Ограничение аутофагии	Kim Y. C., et al. (2015) [54]
	Путь беклин — Bcl2	Регуляция аутофагии	Rami A. (2008) [55]
Апоптоз	Внешний путь запуска апоптоза (лиганд — рецептор — Fas-ассоциированный белок с доменом смерти — каспаза-8)	Независимая от митохондрий стимуляция апоптоза	Datta A., et al. (2020) [56]
	Внутренний или митохондриальный путь запуска апоптоза (цитохром с — апоптоз-индуцирующий фактор — каспаза-9)	Апоптоз, опосредованный открытием митохондриальной поры	Datta A., et al. (2020) [56]
	Путь p53	Усиление экспрессии проапоптотических белков Bax, Bid и PUMA	Miyashita T., et al. (1995) [37]
	Путь Notch	Стимуляция апоптоза совместно с p53	Balaganapathy P., et al. (2018) [57]
Нейровоспаление	Путь HMGB1 — толл-подобный рецептор (TLR) — ядерный транскрипционный фактор κ B (NF κ B)	Стимуляция воспаления за счет экспрессии генов провоспалительных цитокинов, адгезионных молекул, хемокинов	Shi S., et al. (2013) [58]
	Путь сфингозин-1-фосфатных рецепторов (SP1R)	Стимуляция микроглии	Qin C., et al. (2017) [59]
	Сборка NLRP1 инфламмасомы	«Экстренный» запуск воспаления, пироптоз	Fann D. Y., et al. (2013) [60]
Повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера	Митоген-активируемая протеинкиназа (МАПК) — киназа, регулируемая внеклеточными сигналами (ERK) — матриксные металлопротеиназы	Лизис белков плотных контактов и коллагена базальной мембраны	Maddahi A., et al. (2010) [61]

ет функционировать в обратном режиме, направленном на нормализацию $\Delta\psi_M$, и приобретает АТФазную активность. В результате митохондрии превращаются из энергопродуцирующих органелл в энергопотребляющие [62]. Кроме того, длительное открытие митохондриальной поры сопровождается поступлением воды в матрикс митохондрий и его отеком, который может спровоцировать разрыв наружной мембраны и, следовательно, потерю структурной целостности митохондрий, что приводит к высвобождению в цитозоль различных проапоптотических молекул, содержащихся в межмембранном пространстве, а именно: цитохрома с, апоптоз-индуцирующего фактора (AIF) и фактора, активирующего апоптотическую протеазу (APAF-1). Это может вызывать гибель нейронов путем апоптоза как за счет каспазного каскада, так и посредством апоптотических механизмов, независимых от каспаз.

В последние годы применительно к патогенезу ИРП ГМ в литературе активно обсуждается концепция «контроля качества митохондрий» [63]. Данная концепция базируется на представлениях о том, что совокупность митохондрий в каждой клетке динамично изменяется в зависимости от условий, в которых она находится. Изменения митохондрий касаются как их общего количества в клетке, так и степени их зрелости и функциональных свойств. Контроль качества митохондрий включает несколько взаимосвязанных процессов: биогенез митохондрий, то есть процесс их непрерывного образования из существующих органелл, аутофагию поврежденных митохондрий (митофагию), а также процессы расщепления и слияния митохондрий [64]. Молекулярные механизмы контроля качества митохондрий только начинают изучаться. Вместе с тем, известно, что при ишемическом инсульте происходит снижение биогенеза митохондрий, а активация этого процесса обладает нейропротективным действием. Восстановление и стимуляция процесса митофагии, нарушенного при ишемии ГМ, также может оказывать благоприятное действие за счет более эффективного удаления поврежденных митохондрий и ослабления внутреннего механизма запуска апоптоза [65].

Программируемая клеточная гибель

Клеточная гибель знаменует собой финальный этап ишемического каскада. Исторически при ИРП ГМ рассматривались два основных варианта клеточной гибели — некроз и апоптоз. Некротическая гибель доминирует в начале формирования ядра инфаркта и характеризуется набуханием клетки

и митохондрий с разрывом плазмалеммы. Некроз представляет собой нерегулируемый, непрограммируемый вариант клеточной гибели. Апоптоз требует наличия АТФ, в связи с чем апоптотическая гибель возникает позже и в большей степени характерна для участков ГМ с менее выраженной ишемией [66]. Апоптоз относится к программируемым вариантам клеточной гибели, представления о которых бурно развиваются в последние годы. Наряду с апоптозом, при ИРП ГМ описаны такие варианты программируемой клеточной гибели, как аутофагия, некроптоз, партанатоз, пироптоз и ферроптоз [67] (рис. 4). Ниже дается краткая характеристика этих вариантов клеточной гибели.

При аутофагии происходит энергозависимый захват внутриклеточных органелл в мембранные везикулы, называемые аутофагосомами, слияние аутофагосом с лизосомами и деградация внутриклеточных структур. Важную роль в регуляции и запуске аутофагии играет сигнальный путь, включающий АМФ-активируемую протеинкиназу и мишень рапамицина млекопитающих (mTOR) [54], а также путь индуцируемого гипоксией фактора 1α (HIF- 1α) и стресс эндоплазматической сети. Биологическое значение аутофагии в контексте ИРП ГМ достаточно противоречиво, поскольку в некоторых ситуациях аутофагия может иметь положительное значение для клетки, обеспечивая получение субстратов и энергии из поврежденных структур. При этом избыточная или слишком продолжительная стимуляция аутофагии может усиливать повреждение нейронов при ишемии [69].

Некроптоз представляет собой путь клеточной гибели, который морфологически неотличим от некроза, но при этом индуцируется лиганд-рецепторным взаимодействием и имеет точки контроля в виде рецептор-взаимодействующей протеинкиназы 3 (RIPK3) и других белков, входящих в состав так называемой некрсомы. В настоящее время в преclinical исследованиях тестируются различные молекулы, ингибирующие сигнальные механизмы некроптоза и демонстрирующие нейропротективные эффекты на моделях инсульта [70, 71].

Пироптоз — это программируемая гибель клеток врожденного иммунитета (моноцитов, макрофагов, а также клеток микроглии), которая индуцируется каспазой-1 или другими каспазами. Известно, что инициация пироптоза происходит под влиянием различных факторов, способствующих сборке инфламмасомы. Белки инфламмасомы NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRC4 активируют каспазу-1, которая собирается в активную форму из двух гетеродимеров. Под воздействием каспа-

зы-1 происходит расщепление ингибитора белка гасдермина D, фрагмент которого встраивается в мембрану с формированием пор диаметром до 10–14 нм. Это приводит к осмотическому набуханию клетки и лизису [72].

Ферроптоз — недавно описанная форма программируемой клеточной гибели, осуществляемая посредством Fe-зависимой генерации АФК под контролем глутатионпероксидазы; может быть ингибирована хелаторами железа и липофильными антиоксидантами. Механизм связан с ингибированием цистеин-глутаматного антипортера, обменивающего внеклеточный L-цистеин на внутриклеточный L-глутамат. В результате этого количество внутриклеточного цистеина резко снижается, что вызывает дефицит глутатиона, синтезируемого из цистеина. Истощение запаса глутатиона приводит

к гибели клетки за счет активации процессов перекисного окисления мембранных липидов [73].

Инициация такого вида клеточной гибели, как партанатоз, связана с повреждением ДНК. Это может происходить, в частности, под действием АФК и азота при эксайтотоксичности. Усиление образования пероксинитрита вызывает разрывы нитей ДНК и активацию фермента поли[АДФ-рибоза] полимеразы-1 (PARP-1), что приводит к образованию полимера PAR (поли-АДФ-рибозы). Чрезмерная активация PARP-1 приводит к 10–500-кратному увеличению формирования PAR полимера, что затрудняет протекание биохимических процессов в клетке. Важно отметить, что для активации фермента PARP-1 требуется НАД⁺, который также участвует в энергообеспечении клетки (гликолиз, цикл Кребса). Его использование приводит к исто-

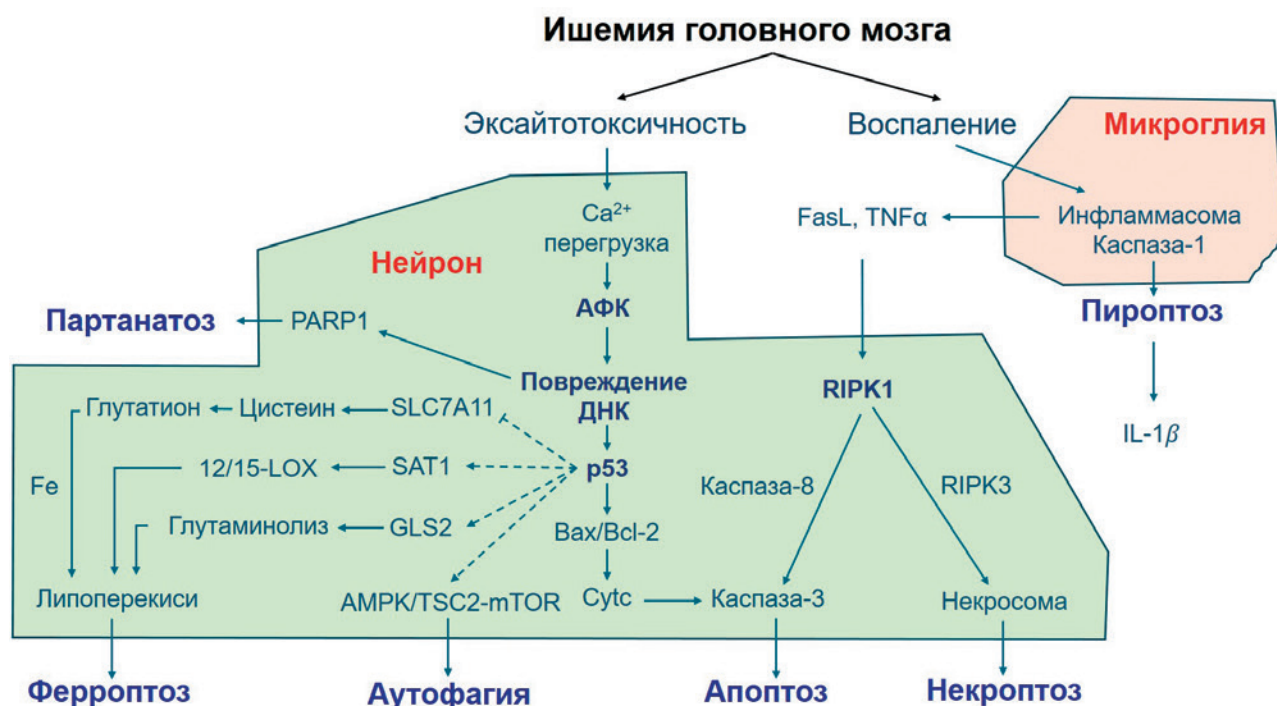


Рис. 4. Разновидности клеточной гибели при ишемии головного мозга (по Tuo Q. Z., et al. (2022) [68])

Примечание: FasL — Fas лиганд, TNFα — фактор некроза опухоли-альфа, Cyt c — цитохром c, IL-1β — интерлейкин-1 бета, АФК — активные формы кислорода, SAT1 — спермидин/спермин N1-ацетилтрансфераза 1, GLS2 — глутаминаза 2, PARP1 — поли [АДФ-рибоза] полимеразы-1, RIPK — рецептор-взаимодействующая протеинкиназа, SLC7A11 — гликопротеин-ассоциированный транспортер аминокислот 11, LOX — липоксигеназа, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, Fe — ион железа.

Figure 4. Types of cell death during cerebral ischemia (Tuo Q. Z., et al. (2022) [68])

Note: FasL — Fas ligand, TNFα — tumour necrosis factor alpha, Cyt c — cytochrome c, IL-1β — interleukin-1 beta, ROS — reactive oxygen species, SAT1 — spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1, GLS2 — glutaminase 2, PARP1 — poly (ADP-ribose) polymerase 1, RIPK — receptor-interacting protein kinase, SLC7A11 — glycoprotein-associated amino acid transporter 11, LOX — lipoxygenase, DNA — deoxyribonucleic acid, Fe — iron ion.

щению ресурсов клетки в виде НАД⁺ и тем самым способствует гибели. Полимер PAR, который в основном образуется в ядре, способен перемещаться в цитозоль, а затем и в митохондрии, где связывается с апоптоз-инициирующим фактором (AIF) и способствует его транслокации в ядро. Этот фактор, попадая в ядро, вызывает конденсацию хроматина и активирует эндонуклеазы, которые также участвуют в фрагментации ДНК, что и вызывает клеточную гибель [74].

Заключение

Ишемический инсульт занимает второе место среди причин смерти в мире. В настоящее время для лечения ишемического инсульта применяются тромболитическая терапия и тромбоаспирация. Несмотря на доказанную эффективность, применение этих методов ограничено сравнительно узким терапевтическим окном. В связи с этим большое значение приобретает дальнейшее изучение молекулярных механизмов ИРП ГМ в рамках концепции ишемического каскада. Ключевыми процессами, ведущими к необратимому повреждению нейронов и их гибели, являются эксайтотоксичность, кальциевая перегрузка, оксидативный и нитрозильный стресс, дисфункция митохондрий, запуск сигнальных путей апоптоза и асептическое воспаление. Наряду с сигнальными путями, способствующими прогрессии повреждения ГМ и клеточной гибели, при ишемии активируются протективные сигнальные механизмы, обеспечивающие повышение резистентности клетки к гибели. Проявлением необратимого повреждения ГМ являются различные варианты клеточной гибели, спектр которых варьирует от классического раннего некроза до таких редких и малоизученных форм программируемой клеточной гибели, как ферроптоз и пироптоз. Сравнительный вклад различных видов клеточной гибели в процесс ИРП ГМ требует дальнейшего изучения. Воздействие на механизмы индукции и реализации различных видов программируемой клеточной гибели с помощью фармакологических агентов представляет собой перспективный подход к ослаблению повреждения ГМ при ишемическом инсульте.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Финансирование / Funding

Исследование выполнено в рамках приоритетного государственного задания ФГБУ «НМИЦ им.

В. А. Алмазова» Минздрава России «Разработка универсального метода мультиорганной консервации донорских органов». / The study was carried out within the framework of the priority state task of the Almazov National Medical Research Centre “Development of a universal method of multi-organ preservation of donor organs”.

Список литературы / References

1. Iadecola C. The pathobiology of vascular dementia. *Neuron*. 2013; 80(4):844–866. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.10.008.
2. Lo Eng H, Dalkara T, Moskowitz MA. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci*. 2003; 4(5):399–415. DOI: 10.1038/nrn1106.
3. Moskowitz MA, Lo Eng H, Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron*. 2010; 67(2):181–198. DOI: 10.1016/j.neuron.2010.07.002.
4. Markus HS, de Leeuw FE. Cerebral small vessel disease: Recent advances and future directions. *Int J Stroke*. 2023; 18(1):4–14. DOI: 10.1177/17474930221144911.
5. Faraco G, Iadecola C. Hypertension: a harbinger of stroke and dementia. *Hypertension*. 2013; 62(5):810–817. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01063.
6. Ungvari Z, Toth P, Tarantini S, et al. Hypertension-induced cognitive impairment: from pathophysiology to public health. *Nat Rev Nephrol*. 2021; 17(10):639–654. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41581-021-00430-6>.
7. Pantoni L. Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *Lancet Neurol*. 2010; 9(7):689–701. DOI: 10.1016/S1474-4422(10)70104-6.
8. Wardlaw JM, Smith C, Dichgans M. Mechanisms of sporadic cerebral small vessel disease: insights from neuroimaging. *Lancet Neurol*. 2013; 12(5):483–497. DOI: 10.1016/S1474-4422(13)70060-7.
9. Ntaios G, Lambrou D, Michel P. Blood pressure changes in acute ischemic stroke and outcome with respect to stroke etiology. *Neurology*. 2012; 79(14):1440–1448. DOI: 10.1212/WNL.0b013e31826d5ed6.
10. Weaver NA, Kuijf HJ, Aben HP. Strategic infarct locations for post-stroke cognitive impairment: a pooled analysis of individual patient data from 12 acute ischaemic stroke cohorts. *Lancet Neurol*. 2021; 20(6):448–459. DOI: 10.1016/S1474-4422(21)00060-0.
11. Diener HC, Easton JD, Hart RG. Review and update of the concept of embolic stroke of undetermined source. *Nat Rev Neurol*. 2022; 18(8):455–465. DOI: 10.1038/s41582-022-00663-4.
12. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*. 1999; 79(4):1431–1568. DOI: 10.1152/physrev.1999.79.4.1431.
13. Markus HS. Cerebral perfusion and stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004; 75(3):353–361.

14. Shen Z, Xiang M, Chen C, et al. Glutamate excitotoxicity: Potential therapeutic target for ischemic stroke. *Biomed Pharmacother.* 2022; 151:113125. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113125.
15. Choi DW. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol.* 1992; 23(9):1261–1276. DOI: 10.1002/neu.480230915.
16. Choi DW, Rothman SM. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci.* 1990; 13:171–182. DOI: 10.1146/annurev.ne.13.030190.001131.
17. Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, et al. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron.* 1995; 15(4):961–973. DOI: 10.1016/0896-6273(95)90186-8.
18. Yamamoto Y, Henrich M, Snipes RL, et al. Altered production of nitric oxide and reactive oxygen species in rat nodose ganglion neurons during acute hypoxia. *Brain Res.* 2003; 961(1):1–9. DOI: 10.1016/S0006-8993(02)03826-X.
19. Stanika RI, Pivovarova NB, Brantner CA, et al. Coupling diverse routes of calcium entry to mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(24):9854–9859. DOI: 10.1073/pnas.0903546106.
20. Qin C, Yang S, Chu YH, et al. Signaling pathways involved in ischemic stroke: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther.* 2022; 7(1):215. DOI: 10.1038/s41392-022-01064-1.
21. Shu S, Pei L, Lu Y. Promising targets of cell death signaling of NR2B receptor subunit in stroke pathogenesis. *Regen Med Res.* 2014; 2(1):8. DOI: 10.1186/2050-490X-2-8.
22. Wang S, Shi X, Li H, et al. DAPK1 Signaling Pathways in Stroke: from Mechanisms to Therapies. *Mol Neurobiol.* 2017; 54(6):4716–4722. DOI: 10.1007/s12035-016-0008-y.
23. Swiatkowski P, Nikolaeva I, Kumar G, et al. Role of Akt-independent mTORC1 and GSK3 β signaling in sublethal NMDA-induced injury and the recovery of neuronal electrophysiology and survival. *Sci Rep.* 2017; 7(1):1539. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01826-w>.
24. Ginsberg MD. Current status of neuroprotection for cerebral ischemia: synoptic overview. *Stroke.* 2009; 40(3 Suppl):S111–S114. DOI: 10.1161/STROKEAHA.108.528877.
25. Sun JY, Zhao SJ, Wang HB, et al. Ifenprodil Improves Long-Term Neurologic Deficits Through Antagonizing Glutamate-Induced Excitotoxicity After Experimental Subarachnoid Hemorrhage. *Transl Stroke Res.* 2021; 12(6):1067–1080. DOI: 10.1007/s12975-021-00906-4.
26. Bano D, Munarriz E, Chen HL, et al. The plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger is cleaved by distinct protease families in neuronal cell death. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1099:451–455. DOI: 10.1196/annals.1387.006.
27. Xiong ZG, Zhu XM, Chu XP, et al. Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels. *Cell.* 2004; 118(6):687–698. DOI: 10.1016/j.cell.2004.08.026.
28. Aarts MM, Tymianski M. TRPMs and neuronal cell death. *Pflugers Arch.* 2005; 451(1):243–249. DOI: 10.1007/s00424-005-1439-x.
29. Simon RP. Acidotoxicity trumps excitotoxicity in ischemic brain. *Arch Neurol.* 2006; 63(10):1368–1371. DOI: 10.1001/archneur.63.10.1368.
30. Abe T, Kunz A, Shimamura M, et al. The neuroprotective effect of prostaglandin E2 EP1 receptor inhibition has a wide therapeutic window, is sustained in time and is not sexually dimorphic. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009; 29(1):66–72. DOI: 10.1038/jcbfm.2008.88.
31. Adibhatla RM, Hatcher JF. Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 2010; 12(1):125–169. DOI: 10.1089/ars.2009.2668.
32. Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch.* 2010; 459(6):923–939. DOI: 10.1007/s00424-010-0808-2.
33. Brennan AM, Suh SW, Won SJ, et al. NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nat Neurosci.* 2009; 12(7):857–863. DOI: 10.1038/nn.2334.
34. Nicholls DG. Oxidative stress and energy crises in neuronal dysfunction. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1147:53–60. DOI: 10.1196/annals.1427.002.
35. Abramov AY, Scorziello A, Duchen MR. Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *J Neurosci.* 2007; 27(5):1129–1138. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4468-06.2007.
36. Oliver CN, Starke-Reed PE, Stadtman ER, et al. Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87(13):5144–5147. DOI: 10.1073/pnas.87.13.5144.
37. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell.* 1995; 80(2):293–299. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90412-3.
38. Endo H, Kamada H, Nito C, et al. Mitochondrial translocation of p53 mediates release of cytochrome c and hippocampal CA1 neuronal death after transient global cerebral ischemia in rats. *J Neurosci.* 2006; 26(30):7974–7983. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0897-06.2006.
39. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007; 87(1):315–424. DOI: 10.1152/physrev.00029.2006.
40. Gu Z, Kaul M, Yan B, et al. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science.* 2002; 297(5584):1186–1190. DOI: 10.1126/science.1073634.

41. Nakamura T, Lipton SA. According to GOSPEL: filling in the GAP(DH) of NO-mediated neurotoxicity. *Neuron*. 2009; 63(1):3–6. DOI: 10.1016/j.neuron.2009.06.013.
42. Jurcau A, Ardelean AI. Oxidative Stress in Ischemia/Reperfusion Injuries following Acute Ischemic Stroke. *Biomedicines*. 2022; 10(3):574. DOI: 10.3390/biomedicines10030574.
43. Petrishev NN, Shlyakhto YeV, Tsyrlin VA, et al. The role of oxygen free radicals in the mechanisms of local and distant ischemic myocardial preconditioning. *Herald of RAMN*. 2006; 8:10–15. In Russian [Петрищев Н.Н., Шляхто Е.В., Цырлин В.А. и др. Роль свободных радикалов кислорода в механизмах локального и дистантного ишемического preconditionирования миокарда. *Вестник РАМН*. 2006; 8:10–15].
44. Faraci FM. Reactive oxygen species: influence on cerebral vascular tone. *J Appl Physiol* (1985). 2006; 100(2):739–743. DOI: 10.1152/japplphysiol.01044.2005.
45. Lipton SA. Pathologically activated therapeutics for neuroprotection. *Nat Rev Neurosci*. 2007; 8(10):803–808. DOI: 10.1038/nrn2229.
46. Jo H, Mondal S, Tan D, et al. Small molecule-induced cytosolic activation of protein kinase Akt rescues ischemia-elicited neuronal death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(26):10581–10586. DOI: 10.1073/pnas.1202810109.
47. Zhang Y, Qiao L, Xu W, et al. Paeoniflorin Attenuates Cerebral Ischemia-Induced Injury by Regulating Ca²⁺/CaMKII/CREB Signaling Pathway. *Molecules*. 2017; 22(3):359. DOI: 10.3390/molecules22030359.
48. Ning K, Pei L, Liao M, et al. Dual neuroprotective signaling mediated by downregulating two distinct phosphatase activities of PTEN. *J Neurosci*. 2004; 24(16):4052–4060. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5449-03.2004.
49. Shamloo M, Soriano L, Wieloch T, et al. Death-associated protein kinase is activated by dephosphorylation in response to cerebral ischemia. *J Biol Chem*. 2005; 280(51):42290–42299. DOI: 10.1074/jbc.M505804200.
50. Zhou L, Li F, Xu HB, et al. Treatment of cerebral ischemia by disrupting ischemia-induced interaction of nNOS with PSD-95. *Nat Med*. 2010; 16(12):1439–1443. DOI: 10.1038/nm.2245.
51. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, et al. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab*. 2006; 3(3):177–185. DOI: 10.1016/j.cmet.2006.02.002.
52. Dinkova-Kostova AT, Abramov AY. The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function. *Free Radic Biol Med*. 2015; 88(Pt B):179–188. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.036.
53. Kim GS, Jung JE, Narasimhan P, et al. Release of mitochondrial apoptogenic factors and cell death are mediated by CK2 and NADPH oxidase. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012; 32(4):720–730. DOI: 10.1038/jcbfm.2011.176.
54. Kim YC, Guan KL. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J Clin Invest*. 2015; 125(1):25–32. DOI: 10.1172/JCI73939.
55. Rami A. Upregulation of Beclin 1 in the ischemic penumbra. *Autophagy*. 2008; 4(2):227–229. DOI: 10.4161/auto.5339.
56. Datta A, Sarmah D, Mounica L, et al. Cell Death Pathways in Ischemic Stroke and Targeted Pharmacotherapy. *Transl Stroke Res*. 2020; 11(6):1185–1202. DOI: 10.1007/s12975-020-00806-z.
57. Balaganapathy P, Baik SH, Mallilankaraman K, et al. Interplay between Notch and p53 promotes neuronal cell death in ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2018; 38(10):1781–1795. DOI: 10.1177/0271678X17715956.
58. Shi S, Yang W, Tu X, et al. Ischemic preconditioning reduces ischemic brain injury by suppressing nuclear factor kappa B expression and neuronal apoptosis. *Neural Regen Res*. 2013; 8(7):633–638. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5374.2013.07.007.
59. Qin C, Fan WH, Liu Q, et al. Fingolimod Protects Against Ischemic White Matter Damage by Modulating Microglia Toward M2 Polarization via STAT3 Pathway. *Stroke*. 2017; 48(12):3336–3346. DOI: 10.1161/STROKEAHA.117.018505.
60. Fann DY, Lee SY, Manzanero S, et al. Intravenous immunoglobulin suppresses NLRP1 and NLRP3 inflammasome-mediated neuronal death in ischemic stroke. *Cell Death Dis*. 2013; 4(9):e790. DOI: 10.1038/cddis.2013.326.
61. Maddahi A, Edvinsson L. Cerebral ischemia induces microvascular pro-inflammatory cytokine expression via the MEK/ERK pathway. *J Neuroinflammation*. 2010; 7:14. DOI: 10.1186/1742-2094-7-14.
62. Di Lisa F, Canton M, Menabò R, et al. Mitochondria and reperfusion injury. The role of permeability transition. *Basic Res Cardiol*. 2003; 98(4):235–241. DOI: 10.1007/s00395-003-0415-x.
63. Tian H, Chen X, Liao J, et al. Mitochondrial quality control in stroke: From the mechanisms to therapeutic potentials. *J Cell Mol Med*. 2022; 26(4):1000–1012. DOI: 10.1111/jcmm.17189.
64. An H, Zhou B, Ji X. Mitochondrial quality control in acute ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2021; 41(12):3157–3170. DOI: 10.1177/0271678X211046992.
65. Xu B, Zhu L, Chu J, et al. Esculetin improves cognitive impairments induced by transient cerebral ischaemia and reperfusion in mice via regulation of mitochondrial fragmentation and mitophagy. *Behav Brain Res*. 2019; 372:112007. DOI: 10.1016/j.bbr.2019.112007.
66. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, et al. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92(16):7162–7166. DOI: 10.1073/pnas.92.16.7162.

67. Mao R, Zong N, Hu Y, et al. Neuronal Death Mechanisms and Therapeutic Strategy in Ischemic Stroke. *Neurosci Bull.* 2022; 38(10):1229–1247. DOI: 10.1007/s12264-022-00859-0.

68. Tuo QZ, Zhang ST, Lei P. Mechanisms of neuronal cell death in ischemic stroke and their therapeutic implications. *Med Res Rev.* 2022; 42(1):259–305. DOI: 10.1002/med.21817.

69. Tedeschi V, Vinciguerra A, Sisalli MJ, et al. Pharmacological inhibition of lysosomal two-pore channel 2 (TPC2) confers neuroprotection in stroke via autophagy regulation. *Neurobiol Dis.* 2023; 178:106020. DOI: 10.1016/j.nbd.2023.106020.

70. Dmitriev YuV, Minasian SM, Galagudza MM. Direct comparison of the infarct-limiting and hemodynamic effects of various necroptosis inhibitors in the model of prolonged static cold storage of the donor rat heart. “Arterial’naya Gipertenziya” (“Arterial Hypertension”). 2018; 24(5):581–585. In Russian [Дмитриев Ю.В., Минасян С.М., Галагудза М.М. Прямое сравнение инфаркт-лимитирующих и гемодинамических эффектов различных ингибиторов некроптоза на модели длительной холодовой консервации донорского сердца крысы. *Артериальная гипертензия.* 2018; 24(5):581–585]. DOI: 10.18705/1607-419X-2018-24-5-581-585.

71. Deng XX, Li SS, Sun FY. Necrostatin-1 Prevents Necroptosis in Brains after Ischemic Stroke via Inhibition of RIPK1-Mediated RIPK3/MLKL Signaling. *Aging Dis.* 2019; 10(4):807–817. DOI: 10.14336/AD.2018.0728.

72. Gou X, Xu D, Li F, et al. Pyroptosis in stroke-new insights into disease mechanisms and therapeutic strategies. *J Physiol Biochem.* 2021; 77(4):511–529. DOI: 10.1007/s13105-021-00817-w.

73. Wei Z, Xie Y, Wei M, et al. New insights in ferroptosis: Potential therapeutic targets for the treatment of ischemic stroke. *Front Pharmacol.* 2022; 13:1020918. DOI: 10.3389/fphar.2022.1020918.

74. Liu S, Luo W, Wang Y. Emerging role of PARP-1 and PARthanatos in ischemic stroke. *J Neurochem.* 2022; 160(1):74–87. DOI: 10.1111/jnc.15464.

Информация об авторах:

Шиленко Леонид Алексеевич, ординатор 1 года обучения кафедры факультетской терапии с клиникой, лаборант-исследователь НИЛ патологии малого круга кровообращения ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Карпов Андрей Александрович, к.м.н., заведующий НИЛ патологии малого круга кровообращения, доцент кафедры патологии Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; ведущий научный сотрудник отдела «Техноло-

гии сильного искусственного интеллекта в физиологии и медицине» СПбГЭТУ «ЛЭТИ»;

Веретенникова Елизавета Ивановна, клинический ординатор 2 года обучения кафедры факультетской терапии им. профессора В. А. Вальдмана ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России;

Шиленко Алексей Алексеевич, лаборант-исследователь НИЛ патологии малого круга кровообращения ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; инженер факультета биотехнологий Университета ИТМО;

Галагудза Михаил Михайлович, д.м.н., профессор и член-корреспондент РАН, директор Института экспериментальной медицины, заведующий кафедрой патологии Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; ведущий научный сотрудник лаборатории радио- и оптоэлектронных приборов биоинформационных и геномных технологий ранней диагностики патологий живых систем, ИАП РАН.

Authors information:

Leonid A. Shilenko, First-Year Resident of the Department of Faculty Therapy with a Clinic, Laboratory Assistant of Laboratory of Pulmonary Vascular Disease, Almazov National Medical Research Centre;

Andrei A. Karpov, PhD, Head of Laboratory of Pulmonary Vascular Disease, Associate Professor of the Department of Pathology, Almazov National Medical Research Centre; Leading Researcher of the Department of “Strong Artificial Intelligence Technologies in Physiology and Medicine”, Saint Petersburg Electrotechnical University ‘LETI’;

Elizaveta I. Veretennikova, 2nd year Resident Physician at the Department of Faculty Therapy named after Professor V. A. Valdman, Saint Petersburg State Pediatric Medical University;

Alexey A. Shilenko, Laboratory Assistant of Laboratory of Pulmonary Vascular Disease, Almazov National Medical Research Centre; Engineer at the Faculty of Biotechnology, University ITMO;

Michael M. Galagudza, MD, DSc, Director of Institute of Experimental Medicine, Head of the Department of Pathology, Almazov National Medical Research Centre, Professor and Corresponding Member of the Russian Academy of Science; Leading Researcher of Laboratory of Radio and Optoelectronic Devices for Bioinformatics and Genomic Technologies for Early Diagnosis of Pathologies in Living Systems, Institute for Analytical Instrumentation of the Russian Academy of Sciences.

ОСНОВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ДЕЛИРИЯ У ПАЦИЕНТОВ ОТДЕЛЕНИЯ РЕАНИМАЦИИ И ИНТЕНСИВНОЙ ТЕРАПИИ: СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Рябченко М. А., Лейдерман И. Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Лейдерман Илья Наумович,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: inl230970@gmail.com

Статья поступила в редакцию 26.02.2024
и принята к печати 10.03.2024.

Резюме

Актуальность. Делирий — это тяжелый нервно-психический синдром, который является распространенной проблемой у пациентов в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ). Несмотря на серьезные последствия развития делирия в ОРИТ, ряд опубликованных в последнее время работ свидетельствуют о недостаточной осведомленности медицинского персонала о ключевых принципах диагностики и лечения данного состояния. **Цель исследования.** Проанализировать и обобщить данные о лечебно-диагностических алгоритмах, позволяющих идентифицировать и проводить адекватную терапию делирия у взрослых пациентов в отделении реанимации и интенсивной терапии. **Материалы и методы.** Проведен поиск в электронных базах данных PubMed и eLIBRARY. В обзор включены публикации доступные для поиска на май 2023 года. **Результаты.** Были выявлены пять инструментов скрининга делирия у взрослых, которые валидизированы на соответствие критериям диагностики делирия, изложенным в Руководстве по диагностике и статистике Американской психиатрической ассоциации (DSM). Перспективами для улучшения клинических результатов являются многокомпонентные программы с большим количеством стратегий, направленные на выявление, оценку, профилактику и лечение делирия в ОРИТ, такие как PAD или ABCDE. **Заключение.** Для своевременной профилактики и эффективной коррекции делирия необходимо использовать валидизированные инструменты скрининга, а также внедрять профилактические стратегии, такие как ABCDEF. Профилактика делирия в ОРИТ путем определения уровня риска, устранения этиологических факторов развития, раннего проведения мультимодальной терапии должна входить в стандартный алгоритм действий медицинского персонала с момента поступления пациента в отделение реанимации и интенсивной терапии.

Ключевые слова: делирий, диагностика, критические состояния, отделение реанимации и интенсивной терапии, факторы риска, CAM-ICU, ICDSC.

Для цитирования: Рябченко М.А., Лейдерман И.Н. Основные особенности диагностики и лечения делирия у пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии: систематический обзор литературы. Трансляционная медицина. 2024; 11(1): 103-121. DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-1-103-121. EDN: FCAXAI

MAIN FEATURES OF DIAGNOSIS AND TREATMENT OF DELIRIUM IN ICU PATIENTS: A SYSTEMATIC REVIEW

Maksim A. Riabchenko, Ilia N. Leyderman

Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Ilya N. Leyderman,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.
E-mail: inl230970@gmail.com

Received 26 February 2024; accepted
10 March 2024.

Abstract

Relevance. Delirium is a severe neuropsychiatric syndrome, which is a common problem in patients in the intensive care unit (ICU). Recently published works indicate a insufficiency of awareness about the key principles of diagnosis and treatment of this condition. **The aim** of the study is to analyze and summarize data on algorithms that allow the identification and correction of delirium in patients in the intensive care unit. **Materials and methods.** A comprehensive search was conducted in the electronic databases PubMed and eLIBRARY. The review includes searchable publications for May 2023. **Results.** A literature review identified five adult delirium screening tools that have been validated against The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM) diagnostic criteria for delirium. Prospects for improving clinical outcomes are multi-component programs with a large number of strategies aimed at assessing, preventing and treating delirium in the ICU. **Conclusion.** It is necessary to use validated screening tools, as well as implement preventive strategies such as ABCDEF. Prevention of delirium in the ICU by determining the level of risk, eliminating etiological development factors and early multimodal therapy should be included in the standard algorithm from the moment the patient is admitted to the hospital in order to reduce hospital mortality.

Key words: CAM-ICU, critical conditions, delirium, diagnostics, ICDSC, intensive care unit, risk factors.

For citation: Riabchenko MA, Leyderman IN. Main features of diagnosis and treatment of delirium in ICU patients: a systematic review. Translational Medicine. 2024; 11(1): 103-121. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-1-103-121. EDN: FCAXAI

Список сокращений: ИВЛ — искусственная вентиляция легких, МКБ — международная классификация болезней, ОРИТ — отделение реанимации и интенсивной терапии, ЦНС — центральная нервная система, CAM-DSM — диагностическое и статистическое руководство по психическим расстройствам, ICDSC — контрольный список скрининга делирия в отделении интенсивной терапии, ICU — метод оценки спутанности сознания для отделения интенсивной терапии, RASS — шкала возбуждения-седации Ричмонда, SAS — шкала седации и возбуждения Рикера.

Актуальность

Делирий — это тяжелый нервно-психический синдром, который является достаточно распространенной проблемой у пациентов в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ). Делирий нередко встречается у тяжелых пациентов и независимо от этиологии основного заболевания ассоциируется с худшими клиническими исходами, включая увеличение продолжительности механической вентиляции легких (МВЛ), пребывания в ОРИТ и стационаре, более высокими затратами на интенсивную терапию, а также повышает риск

долгосрочных когнитивных нарушений. Многочисленные исследования продемонстрировали тесную взаимосвязь между делирием и повышенной госпитальной летальностью [1–3].

Риск развития делирия особенно высок у отдельных категорий пациентов: пожилых, лиц с уже существующими когнитивными нарушениями, с неизлечимыми заболеваниями, а также больных, перенесших большие оперативные вмешательства и поступающих в ОРИТ в связи с тяжестью состояния [4, 5].

Несмотря на серьезные последствия развития делирия в ОРИТ, ряд опубликованных в последнее время работ свидетельствуют о недостаточной осведомленности медицинского персонала отделений реанимации и интенсивной терапии о ключевых принципах диагностики и лечения данного состояния [6].

Цель представленного обзора — обобщение и анализ данных о лечебно-диагностических алгоритмах, позволяющих идентифицировать и корректировать делирий у взрослых пациентов в отделении реанимации и интенсивной терапии.

Материалы и методы

Проведен комплексный поиск в электронных базах данных PubMed и eLIBRARY. Поиск был вы-

полнен для литературы, опубликованной с января 2000 года по май 2023 года. Первичные ключевые слова: делирий, диагностика, отделение интенсивной терапии использовались в сочетании с дополнительными ключевыми словами: факторы риска, CAM-ICU, ICDSC, критические состояния, искусственная вентиляция легких. Дополнительные исследования были выявлены путем поиска библиографических ссылок в соответствующих статьях (рис. 1).

Критерии включения:

1. Исследования, анализирующие инструменты и методы диагностики делирия в ОРИТ;

1. Исследования, описывающие методы профилактики и лечения делирия в ОРИТ;

2. Исследования, изучающие делирий у пациентов ОРИТ старше 18 лет;

3. Любые типы исследований, ведущие к публикации по интересующей теме.

Критерии исключения:

1. Отчеты о клинических случаях, рефераты, письма, пилотные исследования и редакционные статьи;

1. Делирий в педиатрических ОРИТ;

2. Исследования, написанные не на русском и английском языках;

3. Исследования на моделях с животными.

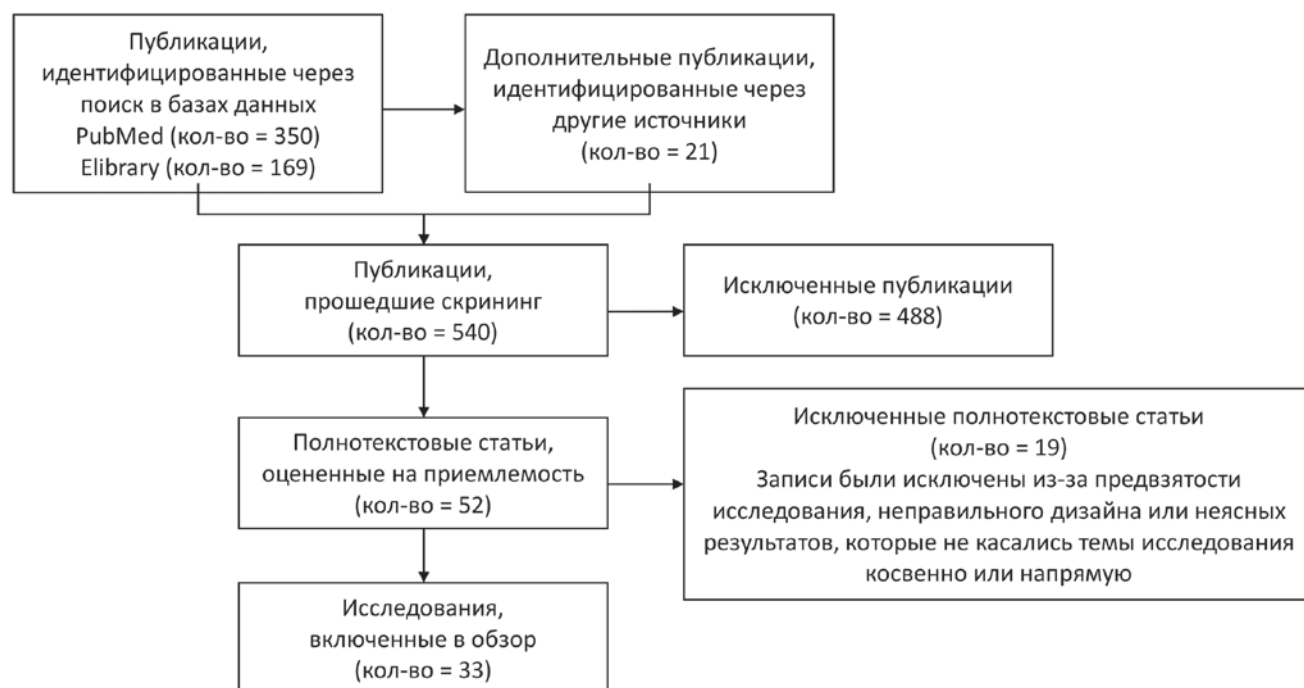


Рис. 1. Процесс поиска литературы в виде блок-схемы

Figure 1. The process of searching literature as a flowchart

Таблица 1. Сравнение диагностических критериев DSM-V (адаптировано из [10]) и МКБ 10

Table 1. Comparison of DSM-V diagnostic criteria (adapted from [10]) and ICD 10

МКБ-10	DSM-V
1. Измененное сознание и внимание (от оглушения до комы; сниженная способность направлять, фокусировать, поддерживать и переключать внимание);	А. Нарушение внимания (т. е. сниженная способность направлять, фокусировать, поддерживать и переключать внимание) и осознанности (сниженная ориентация в окружающей среде).
2. Глобальное расстройство познания (искажения восприятия, иллюзии и галлюцинации, в основном зрительные; нарушения абстрактного мышления и понимания с или без преходящего бреда, но обычно с некоторой степенью инкогеренции; нарушение непосредственного воспроизведения и памяти на недавние события с относительной сохранностью памяти на отдаленные события; дезориентировка во времени, а в более тяжелых случаях в месте и собственной личности);	В. Расстройство развивается в течение короткого периода времени (обычно от нескольких часов до нескольких дней), представляет собой резкое изменение исходного уровня внимания и осознанности и имеет тенденцию к колебаниям в течение дня.
3. Психомоторные расстройства (гипо- или гиперактивность и непредсказуемость перехода от одного состояния к другому; увеличение времени; повышенный или сниженный поток речи; реакции ужаса);	С. Дополнительное нарушение когнитивных функций (например, дефицит памяти, дезориентация, изменение речи или восприятия).
4. Расстройства ритма сон-бодрствование (бессонница, а в тяжелых случаях — тотальная потеря сна или инверсия ритма сон-бодрствование: сонливость днем, ухудшение симптомов в ночное время; беспокойные сны или кошмары, которые при пробуждении могут продолжаться как галлюцинации);	Д. Нарушения в критериях А и С не лучше объясняются ранее существовавшим, установленным или развивающимся нейрокогнитивным расстройством и не возникают вследствие сильно сниженного уровня возбуждения (кома).
5. Эмоциональные расстройства: депрессия, тревога, раздражительность, эйфория, апатия, недоумение, растерянность.	Е. Из анамнеза, физического осмотра или лабораторных результатов есть данные, свидетельствующие о том, что расстройство является прямым физиологическим следствием другого клинического состояния, наркотической интоксикации или абстиненции (т. е. из-за злоупотребления наркотиками или медикаментозного лечения), или воздействия токсина, или обусловлено множественной этиологией.

Результаты

ОПРЕДЕЛЕНИЕ. В настоящий момент понятие «делирий» охватывает широкий спектр расстройств сознания, исключая такие состояния как кома, эпилепсия и деменция. Однако, по данным российской психиатрической практики, термин «делирий» относится только к острому психозу, сопровождающемуся дезориентацией, бредом и галлюцинациями [7].

Согласно Международной классификации болезней (МКБ) делирий — это «этиологически неспецифический синдром, характеризующийся одновременным нарушением сознания и внимания, восприятия, мышления, памяти, психомоторного поведения, эмоций, цикличности сна и бодрство-

вания». Несмотря на то, что данное состояние может встречаться в любом возрасте, чаще всего оно возникает у людей старше 60 лет. Делирий имеет переменное течение с относительно быстрым выздоровлением обычно в течение 4 недель. Тем не менее, иногда оно может продолжаться до 6 месяцев с колебаниями в тяжести симптомов [6, 8, 9].

В пятой редакции Диагностического и статистического руководства по психическим расстройствам (DSM-5), разработанной Американской психиатрической ассоциацией, изложены диагностические критерии делирия. Приведено сравнение критериев диагностики МКБ-10 и DSM-V в таблице 1 [10].

В практике ОРИТ делирий представляет собой остро развивающийся клинический синдром, при

котором нарушается состояние сознания, происходит дезорганизация мышления и пациент испытывает затруднения в получении, обработке, хранении и воспоминании информации [11]. С этой точки зрения синдром делирия является более общим понятием и развивается у более чем половины критических пациентов. В соответствии с этим определением, делирий обладает следующими характеристиками:

А) Представляет собой клинический синдром, который может быть диагностирован у постели больного без использования дополнительных лабораторных или инструментальных методов.

Б) Связан с воздействием стрессового фактора и развивается в течение короткого периода времени.

В) Всегда сопровождается изменением уровня сознания, превышающим сон или глубокую седацию. Для оценки применяется шкала возбуждения-седации Ричмонда (RASS), где пациенту необходимо набрать балл от +4 до -3.

Г) Для того чтобы поставить диагноз, требуется подтвердить снижение памяти и дезорганизацию мышления с помощью специальных тестов [7].

Необходимо проводить дифференциальную диагностику между состоянием делирия и деменцией, особенно у пациентов пожилого возраста. Деменция — состояние генерализованного когнитивного дефицита с нарушением памяти и интеллектуальных способностей, развивающееся в течение значительно более продолжительного временного промежутка (месяцы, годы), поэтому важно определить исходное функциональное состояние пациента.

В большей части клинических случаев использование диагностических критериев МКБ-10 и DSM-V невозможно или вызывает значительные затруднения ввиду длительности оценки, использования их только врачами-психиатрами, отслеживания изменений в сознании и когнитивных нарушений у пациентов, находящихся на искусственной вентиляции легких. По этой причине были созданы, валидизированы и внедрены специальные методы диагностики делирия, которые обладают чувствительностью и специфичностью, сравнимой с критериями DSM-V и МКБ-10, но более применимы в клинической практике [12–15].

ФАКТОРЫ РИСКА. По литературным данным описано более 25 факторов, значительно повышающих риск развития делирия, в том числе заболевания органов дыхания, пожилой возраст, злоупотребление алкоголем, деменция, ионный дисбаланс, потребность в вазопрессорах, повышенные дозы опиоидов или метаболический ацидоз [16].

Выявленные факторы риска можно разделить на предрасполагающие и провоцирующие (табл. 2).

Пожилой возраст, когнитивные нарушения, тяжелые системные заболевания, сепсис являются одними из наиболее часто упоминаемых предикторов и значительно повышают риск развития делирия, вероятно, это связано с низким функциональным психическим и физическим резервом, необходимым для поддержания нормальной функции центральной нервной системы (ЦНС). Кроме того, огромную роль играет применение антихолинэргических средств, стероидов и опиоидов [17]. Потенциальными индукторами делирия в ОРИТ являются все препараты бензодиазепинового ряда, поэтому их использование должно быть ограничено. Необходимо выбирать опиоиды относительно короткого действия (фентанил), не подвергающиеся метаболизму с образованием активных метаболитов. Также значение имеет длительность и глубина седации, так как глубокая и недостаточная седация являются факторами риска. Развитие делирия при применении антихолинэргических препаратов связано с нарушением нейротрансмиссии, а при терапии стероидами — с возникновением побочных реакций [6].

ПАТОГЕНЕЗ. Детальное представление о патофизиологии острых психических расстройств у пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии выходит за рамки данного обзора, однако следует подчеркнуть, что патогенез делирия является многофакторным и до конца неизученным. Предлагается множество разных гипотез о причинах развития острой психической церебральной недостаточности: нейровоспалительная, старение нейронов, дефицит нейромедиаторов, нейроэндокринные причины и нарушение суточной регуляции. В настоящий момент основными являются две взаимодополняющие теории: нейротрансмиттерная и воспалительная [18].

Нейротрансмиттерная теория описывает вовлечение в процесс различных нейромедиаторов: мелатонина, норадреналина, глутамата, гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), дофамина, гистамина, серотонина, триптофана. Ведущая роль принадлежит дефициту холинэргической передачи и избытку дофамина, что приводит к нарушению внимания и сознания [6–8, 16, 18–20].

Воспалительная теория предполагает, что каскад событий начинается с генерализованной воспалительной реакции, эндотелиальной дисфункции, повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера и снижения холинэргического контроля, что в сочетании со снижением защитных сил организма приводит к развитию воспалительных изменений в нервной ткани. Под-

Таблица 2. Факторы риска развития делирия [6, 16]

Table 2. Delirium development risk factors [6, 16]

Предрасполагающие факторы	Провоцирующие факторы	
	Расстройства, провоцирующие развития делирия	Лекарственные средства, провоцирующие расстройства организма
1. Пожилой возраст (≥ 65) 2. Когнитивные расстройства в анамнезе 3. Астения 4. Злоупотребление алкоголем и/или наркотиками, курение в анамнезе 5. Сопутствующие заболевания (заболевания легких, цереброваскулярные заболевания, диабет, анемия, хроническая боль, болезнь Паркинсона, депрессия, тревожные расстройства) 6. Тяжесть основного заболевания до поступления 8. Нарушение слуха и/или зрения	1. Метаболические нарушения (ацидоз, гипербилирубинемия, гиперазотемия) 2. Ионные нарушения (гипер-/гипонатриемия) 3. Артериальная гипертензия /гипотензия 4. Лихорадка, инфекция, сепсис (СРБ, кортизол, ИЛ8) 5. Неадекватное обезболивание (оценка по ВАШ или BPS) 6. Механическая вентиляция легких (>3 дней) 7. Нарушение сна (опросник RCSQ) 8. Тяжелые операции (брюшная полость, кардиохирургия, перелом шейки бедра) 9. Анемия 10. Предоперационное голодание и обезвоживание 11. Иммобилизация (различные катетеры и средства фиксации) 14. Тяжесть состояния в ОРИТ - APACHE II (≥ 20) 15. Длительность пребывания в ОИТ (> 9 дней)	1. Бензодиазепины 2. Опиоиды (морфин) 3. Антихолинергические препараты 4. Стероиды 5. Глубокая седация

тверждается это повышением уровня прокальцитонина, С-реактивного белка (СРБ), интерлейкина 8 (ИЛ-8), интерлейкина 10 (ИЛ-10) и др. Сниженные концентрации матриксной металлопротеиназы 9 (ММР-9) и протеина С в сочетании с высокими концентрациями фактора некроза опухоли (ФНО) с высокой вероятностью подтверждали развития делирия [6–8, 17–20].

На данный момент нет единого представления о причинах возникновения делирия, поэтому изучение патофизиологических механизмов нарушений функций мозга позволит выбирать наиболее доказательные тактики лечения для предотвращения развития данного синдрома и сокращения его длительности [7, 8, 18, 19, 21].

КЛИНИЧЕСКАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ.

Клиническая классификация делирия основана на особенностях нарушений двигательных функций и включает в себя три широко принятых варианта [22] (рис. 2).

1. Гиперактивный тип. Этот тип характеризуется повышенной двигательной активностью с проявлениями тревоги, которые не контроли-

руются больным и имеют хаотический характер. Возможны попытки снять лицевые маски, инфузионные системы, дренажи и катетеры, а также агрессивные действия, которые могут привести к травматизации пациента или окружающих. Соответствует критериям RASS +1 до +4

2. Гипоактивный тип. Проявляется спутанностью сознания, сонливостью, сниженной реакцией на раздражители. Больные замкнуты, неразговорчивы и чрезмерно спокойны. Данный вариант делирия чаще встречается у пожилых и ассоциируется с худшим прогнозом [6]. Соответствует критериям RASS от 0 до -3.

3. Смешанный тип. Чередования гипер- и гипоактивных форм в разные промежутки времени, что обычно сопровождается выраженным нарушением цикла сна и бодрствования. Соответствует критериям RASS -3 до +4.

Считается, что только 10–30 % всех случаев делирия относятся к гиперактивному типу, в то время как смешанный тип регистрируется примерно у половины пациентов, а гипоактивный — в 20–40 % случаев [8].

Клинические варианты делирия

Инфографика, резюмирующая различия между гипоактивным и гиперактивным делирием.

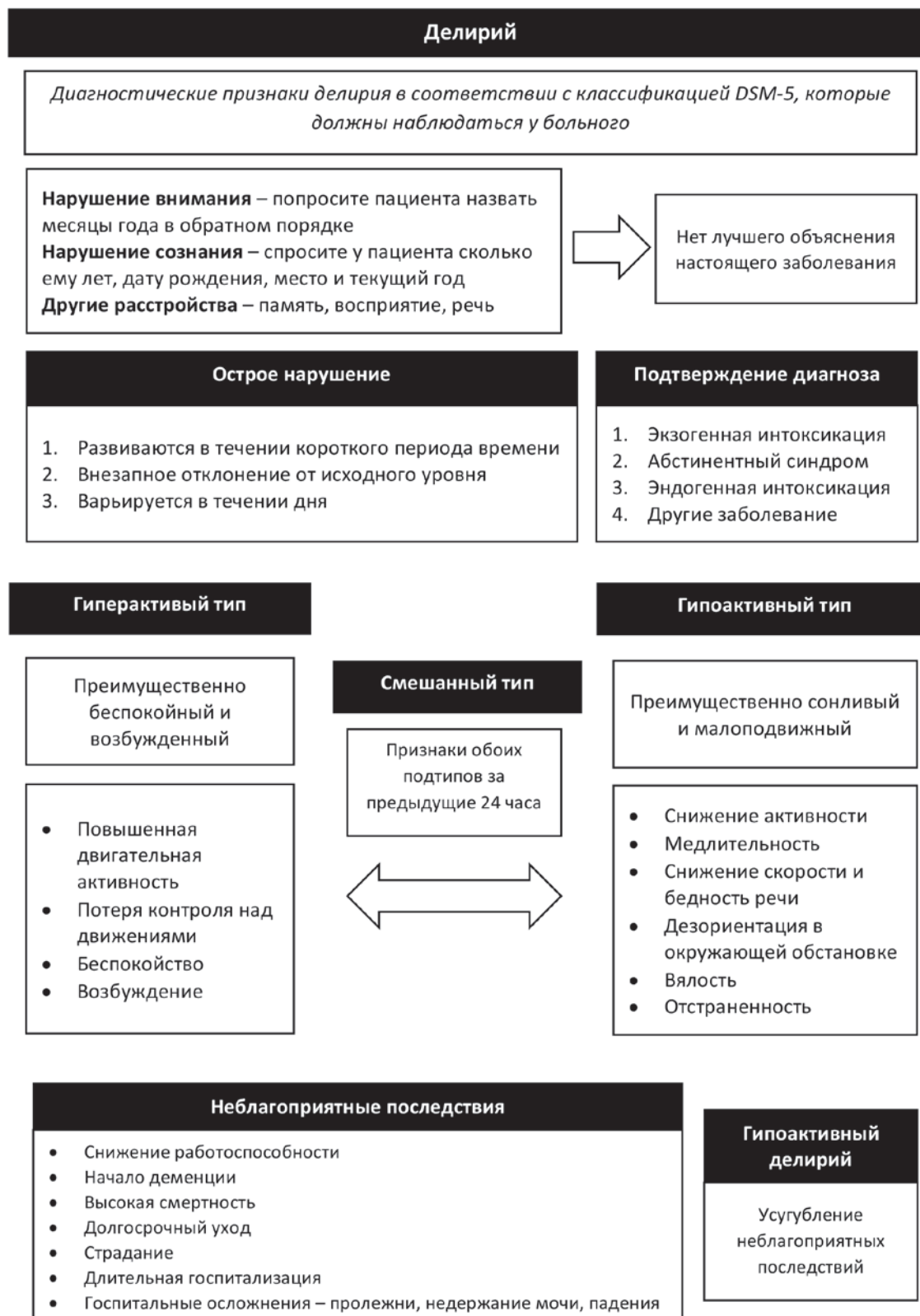


Рис. 2. Клинические варианты делирия (адаптировано из [22])

Figure 2. Clinical delirium options (adapted from [22])

Таблица 3. Шкала RASS (адаптировано из [23], [24]).

Table 3. RASS scale (adapted from [23], [24])

Оценка уровня сознания Ричмондская шкала возбуждения и седации		
+4	Открытая агрессия, непосредственная опасность для персонала	У пациента делирий? Использование шкалы оценки спутанности сознания CAM-ICU
+3	Агрессивен, попытки удаление катетеров	
+2	Частые хаотичные движения, десинхронизация с аппаратом ИВЛ	
+1	Тревожен, беспокоен, энергичные неагрессивные движения	
0	Внимателен и спокоен	
-1	Снижение внимательности, длительное (более 10 секунд) пробуждение при вербальном контакте	СТОП! Пациент в коме, необходимо повторное тестирование позднее
-2	Кратковременное (менее 10 секунд) пробуждение при вербальном контакте	
-3	Двигательная реакция (без зрительного контакта) в ответ на голос	
-4	Отсутствие реакции на голос, присутствует реакция на физическое воздействие	
-5	Отсутствие реакции на голос и физический раздражитель	

У некоторых пациентов может возникать синдром, близкий к делирию, но не удовлетворяющий полностью всем необходимым критериям для постановки данного диагноза. Он описывается термином «субсиндромальный делирий», который соответствует критериям шкалы выявления делирия в интенсивной терапии (ICDSC) от 1 до 3 (>4 — развернутая картина делирия). В настоящее время нет общепринятого определения для субсиндромального делирия, но его диагностика позволяет начать лечение в ранней стадии до появления выраженных симптомов, когда еще не все критерии делирия присутствуют [8].

ДИАГНОСТИКА. Несмотря на высокую частоту развития делирия в ОРИТ, стандартная клиническая оценка зачастую не обеспечивает достаточной информации для постановки диагноза. В связи с этим было разработано и внедрено несколько методов диагностики данного синдрома.

Наиболее часто используют метод оценки спутанности сознания в ОРИТ — систему CAM-ICU и ICDSC. Хотя золотым стандартом и остается использование врачом-психиатром критериев МКБ-10 или DSM-V, с практической точки зрения такой подход, безусловно, нецелесообразен [6].

Система CAM-ICU определяет делирий по четырем диагностически значимым признакам: внезапные изменения/колебания психического статуса, расстройства внимания, дезорганизованное мышление и измененный уровень сознания. Первым шагом является оценка уровня сознания, которая возможна только у пациентов, реагирующих на голос или оклик, поэтому для интерпретации такого состояния необходимо применять RASS или шкалу седации и возбуждения Рикера (SAS) [23–25] (табл. 3 и 4 соответственно).

Следует также учесть, что пациент, который на момент проверки по шкале RASS имеет оценку 0, может все равно находиться в состоянии дели-

Таблица 4. Шкала SAS (адаптировано из [25])

Table 4. SAS scale (adapted from [25])

Шкала седации и возбуждения Рикера (SAS)		
Оценка	Термин	Описание
7	Опасная агитация (возбуждение)	Дергает за эндотрахеальную трубку, пытается удалить катетеры, перелезает через перила кровати, бросается на персонал, мечется из стороны в сторону в постели
6	Выраженная агитация	Не перестает волноваться, требуется частого словесного напоминание о необходимости ограничения поведения, кусает эндотрахеальную трубку
5	Ажитирован	Физически возбужден, успокаивается после словесных команд
4	Спокоен и готов к сотрудничеству	Спокойный, легко пробуждается, выполняет команды
3	Седатирован	Пробуждение от вербальных или тактильных стимулов, выполняет простые команды, затем снова засыпает
2	Сильно седатирован	Пробуждается от выраженных физических раздражителей, возможны периодические спонтанные движения, команды не выполняет
1	Отсутствие пробуждения	Отсутствие реакции на болевые раздражители, контакт невозможен, команды не выполняет, спонтанные движения отсутствуют



Рис. 3. Метод оценки спутанности сознания для ОРИТ. Блок-схема [26]

Figure 3. A method to assess confusion of consciousness for ICU. Flowchart [26]

Таблица 5. Скрининг делирия в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ICDSC) [27]

Table 5. Delirium screening in Intensive Care Units (ICDSC) [27]

Симптомы делирия	Балл
Нарушение уровня сознания А) реакция на стимулы небольшой и средней силы Б) бодрствование В) гиперреакция на нормальную стимуляцию	1 0 1
Невнимательность	0 или 1
Дезориентация	0 или 1
Галлюцинации – бредовые идеи, психоз	0 или 1
Психомоторное возбуждение или заторможенность	0 или 1
Неадекватные речь или настроение	0 или 1
Нарушение цикла сна и бодрствования	0 или 1
Флуктуация симптомов	0 или 1

рия, если в предыдущие сутки были выявлены другие значения шкалы по этой методике.

Следующим шагом является качественная оценка сознания непосредственно с помощью CAM-ICU, алгоритм которой подробно представлен на рисунке 3 [26].

1. Острое начало изменения психического статуса или неустойчивое течение. Под исходным психическим состоянием понимается психическое состояние до госпитализации, во многих случаях оценивается с помощью родственников или по данным истории болезни.

2. Невнимательность. Снижение внимания является одним из ключевых признаков делирия. Существуют две основные категории нарушений внимания: сложности с привлечением внимания и невозможность его удержания. Есть несколько методов для оценки сохранности внимания, одним из которых является распространенный тест, в рамках которого пациенту предлагается сжимать руку во время произнесения буквы А. Затем последовательно произносится: ЛАМПААЛАДДИНА. Если количество ошибок, сделанных пациентом, не превышает двух, то его внимание считается сохранным. Однако, если количество ошибок более двух, это свидетельствует о нарушении внимания и повышает вероятность наличия делирия.

3. У больных с делирием наблюдается измененный уровень сознания, который оценивается, как уже было сказано выше, по шкале RASS. Этот критерий признается положительным, когда текущий уровень сознания отличен от оценки по шкале RASS = 0.

4. Дезорганизованное мышление. Для оценки уровня организации мышления в CAM-ICU используются простые вопросы и команды. Признак 4 положителен, когда обнаружено более одной ошибки как в ответах на вопросы, так и в ответах на команды.

Недавно была разработана версия CAM-ICU на основе балльной оценки (CAM-ICU-7) [15].

Другой диагностический инструмент — ICDSC — оценивает восемь диагностических критериев (измененный уровень сознания, невнимательность, дезориентация, психоз, изменения психомоторной активности, неадекватная речь/настроение, нарушения сна и колебания симптоматики) [27]. Делирий может быть диагностирован, когда четыре из восьми критериев положительны (табл. 5).

Все эти методы направлены, в первую очередь, на выявление наиболее важного критерия делирия — расстройств внимания. Внедрение CAM-ICU и ICDSC в рутинную клиническую практику повысило качество диагностики делирия у пациентов ОРИТ без участия психиатров. Оба метода важны при наблюдении за тяжелыми пациентами и обладают функциями, позволяющими использовать их при разных обстоятельствах. CAM-ICU является идеальным инструментом у критических пациентов на МБЛ, в то время как ICDSC чаще используется средним медицинским персоналом для диагностики субсиндромального делирия, который имеет потенциальные прогностические значения, в том числе для своевременного начала терапии.

Таблица 6. Сестринская шкала оценки делирия [28]

Table 6. Nursing delirium scale [28]

Шкала скрининга делирия медицинскими сестрами (Nu-DESC)				
Симптомы		Баллы		
1	<i>Дезориентация</i> Вербальные или поведенческие признаки отсутствия ориентации во времени или месте или неправильное восприятие окружающих людей	☐ 0	☐ 1	☐ 2
2	<i>Неподобающее поведение</i> Поведение, не соответствующее человеку или месту, в котором он находится, например, пытается встать с постели, тянет за катетеры и эндотрахеальные трубки и др.	☐ 1	☐ 2	☐ 3
3	<i>Неподобающее общение</i> Общение неподходящее для данного человека или места, например, бессвязная, бессмысленная или неразборчивая речь	☐ 1	☐ 2	☐ 3
4	<i>Иллюзии/галлюцинации</i> Видеть или слышать вещи, которых нет, визуальное искажение объектов	☐ 1	☐ 2	☐ 3
5	<i>Психомоторная заторможенность</i> Снижение скорости реакции, полное или почти полное отсутствие спонтанных движений или слов, например, отложенная реакция на толчок, глубокая седация	☐ 1	☐ 2	☐ 3
Итоговый балл		≥ 2 ☐		< 2 ☐
Делирий		Да		Нет

Таким образом, CAM-ICU — это оценка состояния мышления пациента на определенный момент времени, при которой врач задает больному серию вопросов (продолжительностью около 3 мин.) дважды в течение 24-часового интервала. Оценка по ICDSC рассчитывается на основе наблюдений медсестры у постели пациента в течение 12-часовой смены, что может выявить больше симптомов делирия и, следовательно, больше лиц с оценкой по ICDSC 1-3. Также разница заключается в том, что методы оценивают различные особенности делирия. Например, только ICDSC фиксирует нарушение цикла сон-бодрствование. Пациенты, поступившие в ОРИТ, часто испытывают расстройство сна, поэтому ожидается, что они наберут по крайней мере один балл по системе ICDSC.

Для системы CAM-ICU чувствительность и специфичность составляют 80 % и 95,9 % соответственно. Для ICDSC чувствительность и специфичность составляют 74 % и 81,9 % соответственно. Интересно, что оба инструмента обладают более низкой чувствительностью при

тестировании пациентов с гипоактивным делирием [13].

Рассмотренные методы скрининга делирия не подходят для использования в ОРИТ для детей и в отделениях неотложной помощи. Для этого разработаны системы rCAM-ICU для детей и B-CAM для врачей скорой помощи [14].

1) rCAM-ICU был модифицирован на основе CAM-ICU для выявления делирия в возрасте 5 лет и старше. Программа включает в себя соответствующие возрасту материалы: удобные яркие картинки и вопросы типа: «Мороженое горячее?»

2) Поскольку скрининг делирия с помощью доступных инструментов занимает 10–15 мин. или дольше, врачи скорой помощи в большинстве случаев пропускают делирий. В B-CAM пациенту предлагается перечислить месяцы в обратном порядке с декабря по июль вместо выполнения тестов на внимание, используемых в CAM-ICU. Результаты с более чем 1 ошибкой указывают на бред.

Существуют и другие шкалы оценки делирия в отделениях интенсивной терапии, подвержен-

Таблица 7. Шкала выявления делирия (адаптировано из [28])

Table 7. The Delirium Detection Score — DDS (adapted from [28])

Шкала выявления делирия (DDS), модиф. для послеоперационных палат			
	Симптомы	Баллы	
1	<i>Ориентация</i>		
	+ Ориентация во времени, месте, личности, способен к концентрации	☐	0
	+ Не уверен в месте и/или времени, не способен к концентрации	☐	1
	+ Не ориентирован в месте и/или времени	☐	4
	+ Не ориентирован в месте, времени и личности	☐	7
2	<i>Галлюцинации</i>		
	+ Отсутствуют	☐	0
	+ Периодические легкие галлюцинации	☐	1
	+ Постоянные легкие и умеренные галлюцинации	☐	4
	+ Постоянные тяжелые галлюцинации	☐	7
3	<i>Возбуждение</i>		
	+ Нормальная активность сохранена	☐	0
	+ Умеренно выраженное беспокойство	☐	1
	+ Выраженное беспокойство	☐	4
	+ Сильно выраженное беспокойство	☐	7
4	<i>Тревога</i>		
	+ Отсутствие тревожности во время сна	☐	0
	+ Небольшая тревожность	☐	1
	+ Периодически выраженная тревожность	☐	4
	+ Острые панические атаки	☐	7
5	<i>Пароксизмальное потоотделение</i>		
	+ Отсутствие потоотделения	☐	0
	+ Почти не заметно, только ладони	☐	1
	+ Капельки пота на лбу	☐	4
	+ Выраженное потоотделение	☐	7
Делирий		(≥8 б) ☐ Да	(<8 б) ☐ Нет

ные критериям DSM: шкала скрининга делирия средним медицинским персоналом — Nu-DESC, оценка выявления бреда — DDS, когнитивный тест на бред — CTD и скрининг на выявление делирия — DTS (табл. 6, 7 и рис. 4 соответственно) [21, 28, 29].

Пациенты в ОРИТ нередко испытывают боль. В соответствии с клиническими практическими рекомендациями при болях, возбуждении, делирии, болезнях нервной системы и нарушениях сна (PADIS) предлагается контролировать боль у всех взрослых пациентов с помощью инструмента для контроля за болью в ОРИТ — системы CPOT. CPOT включает оценку четырех различных показателей (выражения лица, движений тела, мышечного напряжения и соблюдения режима МВЛ), оцениваемых по шкале от 0 до 2 с общим баллом от 0 до 8 [30] (табл. 8).

Важно учесть, что изменения в уровне сознания и поведении могут быть обусловлены как эпилептическим приступом, так и структурными повреждениями головного мозга. Статистические данные подчеркивают необходимость регулярного полноценного неврологического обследования пациента с включением таких оценочных методов, как CAM-ICU или ICDSC. Если есть опасность развития или прогрессирования уже существующей внутричерепной патологии, требуется немедленное проведение нейровизуализации. Кроме того, для исключения бессудорожного эпилептического приступа необходимо выполнение электроэнцефалографии (ЭЭГ) [7].

Основные принципы лечебной тактики делирия в ОРИТ. Седативные препараты уменьшают тревожное состояние и позволяют легче переносить инвазивные процедуры, такие как интубация тра-

хеи и искусственная вентиляция легких. Степень и уровень седации требуют тщательной оценки из-за большого количества осложнений [18].

Как только диагноз делирия установлен, терапевтические вмешательства следует начинать как можно раньше, чтобы сократить продолжительность эпизода и предотвратить рецидивы [31]. Существуют два основных метода проведения психокоррекции — немедикаментозный и медикаментозный [6].

Нефармакологические методы важно использовать не только для лечения, но и для профилактики. Они включают в себя раннюю диагностику и ограничение факторов риска, таких как дегидратация, иммобилизация, нарушения сна, зрения или слуха. Необходимо стремиться к созданию оптимальных условий для ограничения сенсорной депривации: спокойное и лаконичное общение, напоминание даты и времени, предоставление объективных данных местонахождения, ограничение шума, обеспечение комнатной температуры и спокойного ночного отдыха. Оптимально проводить все стандартные медицинские процедуры и уход за пациентом днем. В ОРИТ следует избегать ненужной фиксации пациентов [31]. Другими важными элементами являются ранняя мобилизация и привлечение родственников для поддержания у пациента чувства безопасности. Значимую роль играет нормализация цикла «день—

ночь» с постоянным освещением днем и исключением света ночью для спокойного отдыха. Необходимо также стараться удалить мочевого катетер, назогастральный зонд и центральный венозный катетер в максимально ранние сроки [8].

Антипсихотические препараты были и остаются основным методом фармакологической коррекции делирия и возбуждения: типичные (например, галоперидол), атипичные (например, кветиапин, оланзапин, рисперидон) и дексмететомидин (высокоселективный агонист $\alpha 2$ -адренорецепторов).

Препаратом первой линии является галоперидол, действие которого основано на блокировании дофаминергических рецепторов. Доза галоперидола зависит от уровня беспокойства пациента, возраста и состояния сердечно-сосудистой системы и обычно составляет от 0,5 до 10 мг энтерально или внутривенно, однократно. [7]. Основными нежелательными эффектами являются нарушения функции экстрапирамидной системы, развитие злокачественного нейролептического синдрома, а также нарушения сердечного ритма и проводимости, включая пируэтную тахикардию и фибрилляцию желудочков, особенно у пациентов с дисфункцией проводящей системы сердца. Для коррекции экстрапирамидных побочных эффектов требуется введение проциклидина или гидрохлорида тригексифенидила.

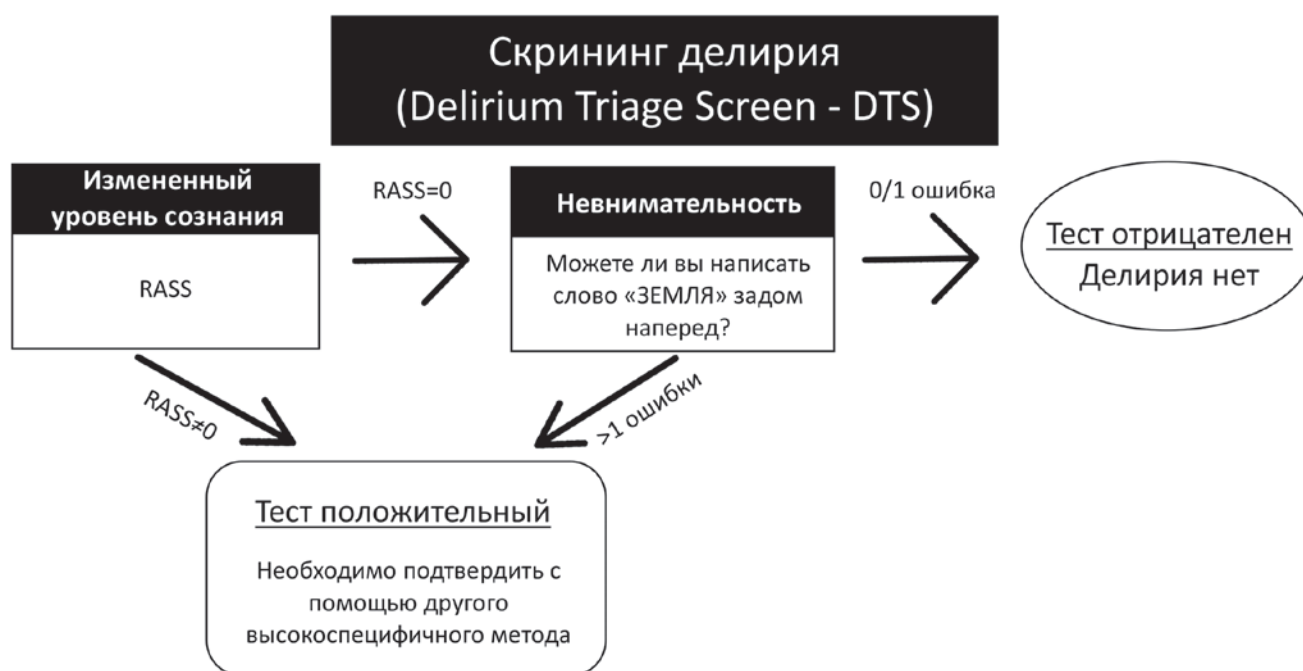


Рис. 4. Скрининг делирия (адаптировано из [29])

Figure 4. Delirium Triage Screen — DTS (adapted from [29])

Таблица 8. Шкала оценки боли в ОРИТ (адаптировано из [30])

Table 8. The Critical-Care Pain Observation Tool — CPOT (adapted from [30])

Показатель	Балл		Описание
Выражение лица	Нейтральное	1	Мышечное напряжение не наблюдается
	Напряженное	2	Нахмуривание, опускание бровей, зажмуривание, сокращение мышц-леваторов лица или любые другие изменения
	Гримасы	3	Все предыдущие изменения, а также плотно закрытые веки (открытый рот или прикусывание эндотрахеальной трубки)
Двигательные реакции	Отсутствие движений или нормальное положение	1	Отсутствие движений (необязательно означает отсутствие боли) или нормальное положение (движение не направлено на место боли или не предназначены для защиты)
	Защитные	2	Медленные, осторожные движения, касания или потирания место боли, привлечение внимание посредством движений
	Беспокойство/возбуждение	3	Тянет эндотрахеальную трубку, пытается сесть, не следует командам, попытка встать с кровати, подергивание конечностями, агрессия в сторону персонала
Синхронизация с аппаратом ИВЛ (интубированный пациент) ИЛИ Речевые реакции (экстубированный пациент)	Не сопротивляется аппарату ИВЛ	1	Легкая вентиляция, отсутствие срабатывания тревог
	Кашляет, но не сопротивляется аппарату ИВЛ	2	Кашель, появление сигналов тревоги, прекращающихся спонтанно
	Сопротивляется аппарату ИВЛ	3	Асинхронность с аппаратом ИВЛ: препятствие вентиляции, частые срабатывание тревог
	Нормально разговаривает или отсутствие голоса	1	Нормально разговаривает или отсутствие голоса
	Вздохи, стоны	2	Вздохи, стоны
	Крик, плачь	3	Крик, плачь
Мышечное напряжение Оценка путем пассивного сгибания и разгибания верхних конечностей в состоянии покоя или оценка при поворотах пациента	Расслаблен	1	Отсутствие сопротивления пассивным движениям
	Напряжение, ригидность	2	Сопротивление пассивным движениям
	Выраженная напряженность или ригидность	3	Выраженное сопротивление пассивным движениям или невозможность их завершить
Итого	_ / 8		

Атипичные нейролептики представляют хорошую альтернативу галоперидолу [21]. Кветиапин, рисперидон и оланзапин являются самыми часто используемыми препаратами этой группы. Они оказывают влияние на гистаминовые, серотониновые и норадреналинергические рецепторы, а также селективно воздействуют на дофаминовые рецепторы, обычно не вызывая экстрапирамидных побочных эффектов. Кроме того, атипичные нейролептики в меньшей степени, чем галоперидол, влияют на когнитивные функции. К сожалению, эти препараты обычно представлены только в энтеральной форме [8].

Бензодиазепины широко используются при лечении делирия, вызванного алкогольной интоксикацией. Однако, они сами по себе являются фактором риска развития неалкогольного делирия. Следует осторожно применять их у пациентов в критическом состоянии из-за их депрессивного воздействия на ЦНС [18].

Новая веха в профилактике и лечении делирия связана с началом применения агонистов α_2 -рецепторов для медикаментозной седации. Наиболее распространенный препарат из этого клас-

са — дексмететомидин. Механизм его направлен на активацию α_2 -адренорецепторов, что приводит к закрытию кальциевых каналов и открытию калиевых каналов, вследствие чего возникает гиперполяризация нейронов и наступает стойкий седативный эффект. Дексмететомидин не вызывает угнетение дыхания, поэтому может использоваться как у больных на ИВЛ, так и у пациентов на самостоятельном дыхании. Препарат обладает седативным, анальгезирующим и анксиолитическим эффектами, практически не вызывает осложнения, присущие другим психоактивным средствам, а также может быть препаратом выбора для терапии и, возможно, профилактики делириозных состояний [18]. Также в некоторых клинических испытаниях его применение было связано с уменьшением времени лечения в отделениях интенсивной терапии и со снижением продолжительности искусственной вентиляции легких [31].

Стоит еще раз подчеркнуть, что тактика ведения пациентов с факторами риска и состояниями, ассоциированными с развитием делирия, заключается первично в адекватной профилактике и только при развитии и дальнейшем достоверном подтверж-

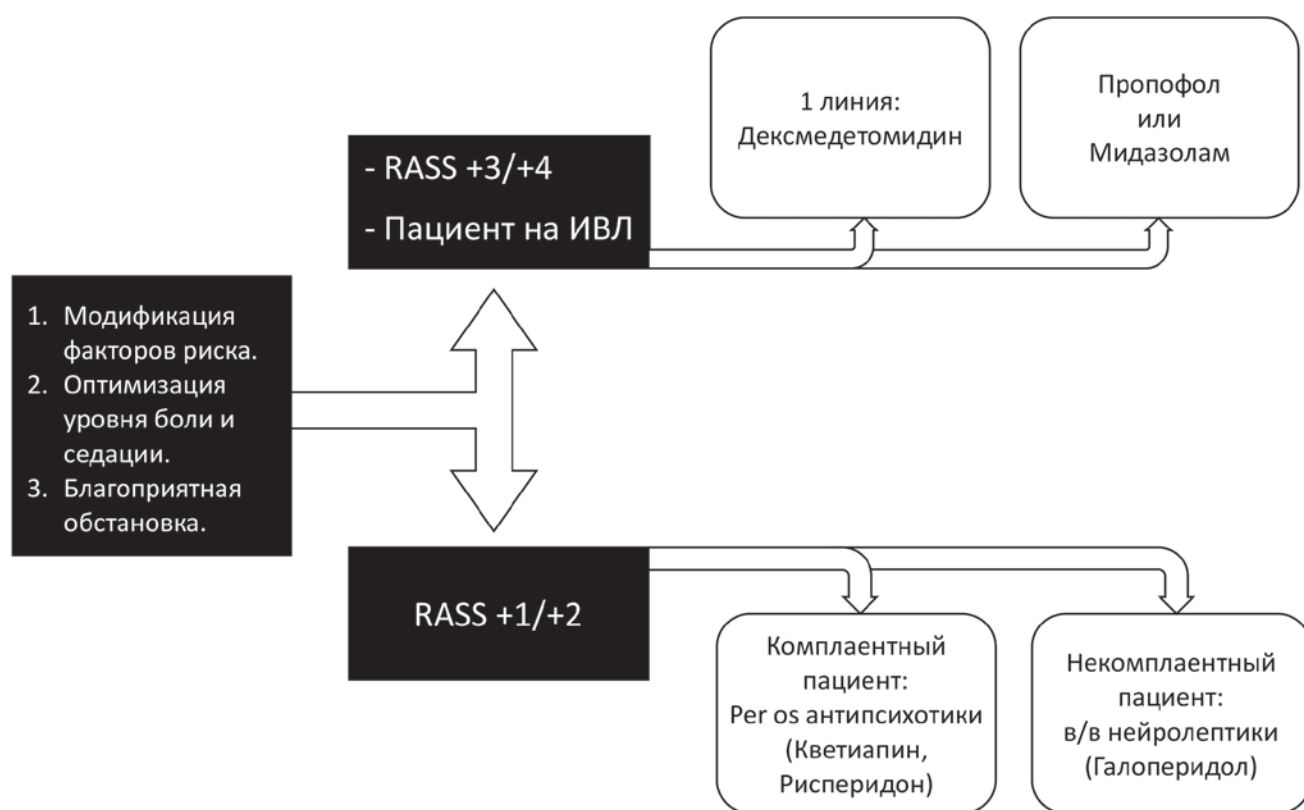


Рис. 5. Лечение гиперактивного делирия (адаптировано из [31])

Figure 5. Treatment of hyperactive delirium (adapted from [31])

Таблица 9. Комплекс ABCDEF (адаптировано из [6])

Table 9. ABCDEF complex (adapted from [6])

Комплекс ABCDEF	Задачи	Мероприятия
A	Оценивать, предотвращать и управлять болью	1. Оценка боли в соответствии с CPT или BPS 2. Обеспечение адекватного обезболивания
B	Испытания на спонтанное пробуждение и испытания на спонтанное дыхание	1. Ежедневные пробы для уменьшения седативного эффекта и пробы на спонтанное дыхание 2. Динамическое уменьшение поддержки аппарата ИВЛ
C	Выбор седации	1. При необходимости следует назначить неглубокую седацию 2. Мониторинг седативного эффекта (например, RASS) 3. Отказ от приема бензодиазепинов 4. Дексметомидин в случаях высокого риска развития делирия
D	Мониторинг и лечение делирия	1. Рутинная оценка делирия с использованием CAM-ICU или ICDSC 2. Немедикаментозное лечение 3. Нормализации цикла «день-ночь»
E	Ранняя мобилизация и физические упражнения	1. Постепенный переход от пассивных упражнений к активным 2. Повседневные занятия
F	Вовлечение семьи	1. Переориентация пациентов относительно их болезни и состояния 2. Эмоциональная поддержка 3. Участие в стимуляции когнитивных функций и ранней активности 4. Участие в посещениях отделения интенсивной терапии

дении используются фармакологические методы [13]. На рисунке 5 представлен возможный алгоритм применения седативных препаратов при гиперактивном делирии.

Перспективы развития методов профилактики и лечения делирия в ОРИТ. Перспективами для улучшения клинических результатов являются многокомпонентные программы с большим количеством стратегий, направленные на оценку, профилактику и лечение делирия в ОРИТ, такие как PAD или ABCDE [32] (табл. 9).

Рекомендации включают следующие стратегии:

- 1) Ранняя легкая седация в течение первых 48 часов с постоянным мониторингом состояния.
- 2) Обезболивания с минимальной седацией или без нее, где это возможно.
- 3) Комплексный подход, который сочетает преимущества различных препаратов и минимизирует их побочные эффекты.
- 4) Использование дексметомидина и атипичных нейролептиков в качестве стратегии для

уменьшения возбуждения, сокращения времени искусственной вентиляции легких и ускорения реабилитации.

Тест на спонтанное пробуждение (SATs) — это ежедневные перерывы в приеме седативных препаратов с постепенным снижением до тех пор, пока уровень боли контролируется. При необходимости прием препаратов возобновляется в половине предыдущей дозы. Тест на спонтанное дыхание (SBTS) — это комплекс мероприятий, направленный на восстановление способности пациента, находящегося на ИВЛ, самостоятельно обеспечивать функцию внешнего дыхания. Пробы на пробуждение и дыхание играют ключевую роль в длительности пребывания в отделениях интенсивной терапии и, таким образом, являются основными задачами пакета ABCDEF [33]. Алгоритм действия врача представлен на рисунке 6.

Заключение

Делирий в ОРИТ является распространенным и тяжелым клиническим синдромом, имеющим

долгосрочные последствия. Несмотря на рекомендации профессиональных сообществ, большинство пациентов ОРИТ во всем мире не проходят рутинный скрининг на делирий, что препятствует своевременной профилактике и правильной коррекции.

Больные в критических состояниях нередко интубированы и получают седативные препараты. Эти особенности данной категории пациентов привели к разработке пяти инструментов скрининга делирия у взрослых, которые были валидированы на соответствие критериям диагностики делирия, изложенным в Руководстве по диагностике и статистике Американской психиатрической ассоциации: контрольный список скрининга делирия в отделении интенсивной терапии (ICDSC), метод оценки спутанности сознания для отделения интенсивной терапии (CAM-ICU), шкала скрининга делирия средним медицинским персоналом (Nu-DESC), оценка выявления делирия (DDS) и когнитивный тест на делирий (CTD).

Следует регулярно наблюдать за пациентами и внедрять профилактические стратегии, такие как комплекс ABCDEF для предотвращения и лечения делирия. Профилактика делирия в ОРИТ путем определения уровня риска, устранения этиологических факторов развития, раннего проведения

мультиmodalной терапии должны входить в стандартный алгоритм действий медицинского персонала с момента поступления больного в стационар.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Salluh JJ, Wang H, Schneider EB, et al. Outcome of delirium in critically ill patients: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2015 Jun 3;350:h2538. DOI: 10.1136/bmj.h2538.
2. Inouye SK, Westendorp RG, Saczynski JS. Delirium in elderly people. *Lancet*. 2014;383(9920):911–922. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60688-1.
3. Pandharipande PP, Girard TD, Jackson JC, et al. Long-term cognitive impairment after critical illness. *N Engl J Med*. 2013;369(14):1306–1316. DOI:10.1056/NEJMoal301372.
4. Pisani MA, Kong SY, Kasl SV, et al. Days of delirium are associated with 1-year mortality in an older intensive care unit population. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(11):1092–1097. DOI:10.1164/rccm.200904-0537OC.



Рис. 6. Протокол «Проснись и дыши» (адаптировано из [33])

Figure 6. The “Wake and Breathe” protocol (adapted from [33])

5. Klein Klouwenberg PM, Zaal IJ, Spitoni C, et al. The attributable mortality of delirium in critically ill patients: prospective cohort study. *BMJ*. 2014;349:g6652. DOI:10.1136/bmj.g6652.
6. Kotfis K, Marra A, Ely EW. ICU delirium — a diagnostic and therapeutic challenge in the intensive care unit. *Anaesthesiol Intensive Ther*. 2018;50(2):160–167. DOI: 10.5603/AIT.a2018.0011.
7. Popugaev KA, Savin IA, Lubnin AYU. Delirium in neurointensive care unit. Literature review. *Russian Journal of Anaesthesiology and Reanimatology*. 2012; 4:19–27. In Russian [Попугаев К.А., Савин И.А., Лубнин А.Ю. и др. Делирий в реаниматологической практике. Анестезиология и реаниматология. 2012; 4:19–27].
8. Likhvantsev VV. Nonspecific delirium in the intensive care unit. *Russian Journal of Anaesthesiology and Reanimatology*. 2015;60(2):55–59. In Russian [Лихванцев В.В. Неспецифический делирий в отделении интенсивной терапии и реанимации. Анестезиология и реаниматология. 2015;60(2):55–59].
9. МКБ-10: Международная статистическая классификация болезней. 10 пересмотр. М.: Медицина; 2003.
10. European Delirium Association; American Delirium Society. The DSM-5 criteria, level of arousal and delirium diagnosis: inclusiveness is safer. *BMC Med*. 2014 Oct 8;12:141. DOI: 10.1186/s12916-014-0141-2.
11. Ely EW, Inouye SK, Bernard GR, et al. Delirium in Mechanically Ventilated Patients: Validity and Reliability of the Confusion Assessment Method for the Intensive Care Unit (CAM-ICU). *JAMA*. 2001;286(21):2703–2710. DOI: 10.1001/jama.286.21.2703.
12. Krewulak KD, Rosgen BK, Ely EW, et al. The CAM-ICU-7 and ICDSC as measures of delirium severity in critically ill adult patients. *PLoS One*. 2020 Nov 16;15(11):e0242378. DOI: 10.1371/journal.pone.0242378.
13. Gusmao-Flores D, Salluh JIF, Chalhuh RÁ, et al. The confusion assessment method for the intensive care unit (CAM-ICU) and intensive care delirium screening checklist (ICDSC) for the diagnosis of delirium: a systematic review and meta-analysis of clinical studies. *Crit Care* 16, R115 (2012). DOI: 10.1186/cc11407.
14. rummel NE, Vasilevskis EE, Han JH, et al. Implementing delirium screening in the ICU: secrets to success. *Crit Care Med*. 2013 Sep;41(9):2196–208. DOI: 10.1097/CCM.0b013e31829a6f1e.
15. Khan BA, Perkins AJ, Gao S, et al. The Confusion Assessment Method for the ICU-7 Delirium Severity Scale: A Novel Delirium Severity Instrument for Use in the ICU. *Crit Care Med*. 2017 May;45(5):851–857. DOI: 10.1097/CCM.0000000000002368.
16. Van Rompaey B, Schuurmans MJ, Shortridge-Baggett LM, et al. Risk factors for intensive care delirium: a systematic review. *Intensive Crit Care Nurs*. 2008 Apr;24(2):98–107. DOI: 10.1016/j.iccn.2007.08.005.
17. Vasilevskis EE, Han JH, Hughes CG, et al. Epidemiology and risk factors for delirium across hospital settings. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2012 Sep;26(3):277–87. DOI: 10.1016/j.bpa.2012.07.003.
18. Gel'fand BR, Linev DV, Yaroshetskiy AI, et al. Delirium in patients in critical conditions: criteria for assessing the severity, prognosis, treatment. *Annaly khirurgii (Annals of Surgery, Russian journal)*. 2016; 21 (1–2): 60–73. In Russian [Гельфанд Б.Р., Линева Д.В., Ярошецкий А.И. и др. Делирий у больных в критических состояниях: критерии оценки тяжести, прогноз, лечение. *Анналы хирургии*. 2016;21(1–2):60–73]. DOI: 10.18821/1560-9502-2016-21-1-60-73.
19. Dunne SS, Coffey JC, Konje S, et al. Biomarkers in delirium: A systematic review. *J Psychosom Res*. 2021 Aug;147:110530. DOI: 10.1016/j.jpsychores.2021.110530.
20. Cerejeira J, Nogueira V, Luís P, et al. The cholinergic system and inflammation: common pathways in delirium pathophysiology. *J Am Geriatr Soc*. 2012 Apr;60(4):669–75. DOI: 10.1111/j.1532-5415.2011.03883.x.
21. Hart RP, Levenson JL, Sessler CN, et al. Validation of a cognitive test for delirium in medical ICU patients. *Psychosomatics*. 1996 Nov-Dec;37(6):533–46. DOI: 10.1016/S0033-3182(96)71517-7.
22. Hosker C, Ward D. Hypoactive delirium *BMJ* 2017; 357:j2047 DOI:10.1136/bmj.j2047.
23. Sessler CN, Gosnell MS, Grap MJ, et al. The Richmond Agitation-Sedation Scale: validity and reliability in adult intensive care unit patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(10):1338–1344. DOI:10.1164/rccm.2107138.
24. Ely EW, Truman B, Shintani A, et al. Monitoring sedation status over time in ICU patients: reliability and validity of the Richmond Agitation-Sedation Scale (RASS). *JAMA*. 2003;289(22):2983–2991. DOI:10.1001/jama.289.22.2983.
25. Khan BA, Guzman O, Campbell NL, et al. Comparison and agreement between the Richmond Agitation-Sedation Scale and the Riker Sedation-Agitation Scale in evaluating patients' eligibility for delirium assessment in the ICU. *Chest*. 2012;142(1):48–54. DOI:10.1378/chest.11-2100.
26. Ely EW, Margolin R, Francis J, et al. Evaluation of delirium in critically ill patients: validation of the Confusion Assessment Method for the Intensive Care Unit (CAM-ICU). *Crit Care Med*. 2001;29(7):1370–1379. DOI:10.1097/00003246-200107000-00012.
27. Bergeron N, Dubois M-J, Dumont M, et al. Intensive Care Delirium Screening Checklist: evaluation of a new screening tool. *Intensive Care Med*. 2001;27(5):859–64. DOI: 10.1007/s001340100909.
28. Radtke FM, Franck M, Schneider M, et al. Comparison of three scores to screen for delirium in the recovery room. *Br J Anaesth*. 2008 Sep;101(3):338–43. DOI: 10.1093/bja/aen193.

29. Han JH, Wilson A, Vasilevskis EE, et al. Diagnosing delirium in older emergency department patients: validity and reliability of the delirium triage screen and the brief confusion assessment method. *Ann Emerg Med.* 2013; 62(5):457–465. DOI: 10.1016/j.annemergmed.2013.05.003.
30. Gélinas C, Fillion L, Puntillo KA, et al. Validation of the critical-care pain observation tool in adult patients. *Am J Crit Care.* 2006;15(4):420–427.
31. Cortés-Beringola A, Vicent L, Martín-Asenjo R, et al. Diagnosis, prevention, and management of delirium in the intensive cardiac care unit. *Am Heart J.* 2021 Feb.; 232:164–176. DOI: 10.1016/j.ahj.2020.11.011.
32. Trogrlić Z, van der Jagt M, Bakker J, et al. A systematic review of implementation strategies for assessment, prevention, and management of ICU delirium and their effect on clinical outcomes. *Crit Care.* 2015 Apr 9;19(1):157. DOI: 10.1186/s13054-015-0886-9.
33. Alkhateeb T, Semler MW, Girard TD, et al. Comparison of SAT and SBT Conduct During the ABC Trial and PILOT Trial. *J Intensive Care Med.* 2023 Nov 19;8850666231213337. DOI:10.1177/08850666231213337.

Информация об авторах:

Рябченко Максим Андреевич, студент 6 курса лечебного факультета Института медицинского образования, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Лейдерман Илья Наумович, д.м.н., профессор кафедры анестезиологии и реаниматологии с клиникой, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Authors information:

Maksim A. Riabchenko, 6th year student of the Faculty of Medicine, Institute of Medical Education, Almazov National Medical Research Centre;

Ilya N. Leyderman MD, PhD, Professor of Anesthesiology and Reanimatology Clinical Chair, Almazov National Medical Research Centre.

ОСЛЕПЛЕНИЕ (МАСКИРОВКА) В ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ КАК ВОЗМОЖНЫЙ ИНСТРУМЕНТ ПОВЫШЕНИЯ ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ И ТРАНСЛЯЦИОННОСТИ ДАННЫХ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)

Макарова М. Н., Ковалева М. А., Макаров В. Г.

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

Контактная информация:

Ковалева Мария Александровна,
АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»,
ул. Заводская, д. 3, к. 245, г. п.
Кузьмоловский, Всеволожский район,
Ленинградская обл., Россия, 188663.
E-mail: kovaleva.ma@doclinika.ru

Статья поступила в редакцию
04.12.2023, принята к печати 15.02.2024.

Резюме

Актуальность. Качество и результативность доклинических исследований лекарственных средств гарантируют безопасность проведения клинических исследований. Несмотря на многочисленные меры, принимаемые мировым научным сообществом, до сих пор невозможно полностью преодолеть трансляционные барьеры и повысить воспроизводимость получаемых результатов. Наиболее значимыми процедурами, способствующими повышению надежности исследований *in vivo*, являются рандомизация и ослепление (маскировка). Проведение рандомизации не требует привлечения существенных ресурсов, возможные методы описаны достаточно полно и широко используются испытательными центрами. В отличие от рандомизации, ослепление является более трудоемким процессом. **Цель исследования.** Провести анализ научной литературы, посвященной использованию ослепления в доклинических исследованиях, для дальнейшего составления алгоритма этой процедуры в условиях конкретного испытательного центра. **Материалы и методы.** Поиск публикаций выполняли в базах данных PubMed и Google Scholar. В обзор включали публикации, доступные для поиска на 30 апреля 2023 года. **Результаты.** Проведен анализ литературы, посвященной ослеплению в доклинических исследованиях, рассмотрены методы ослепления и этапы научной работы, на которых возможно проводить эту процедуру. Предложен алгоритм частичного ослепления исследования, не требующий привлечения дополнительных специалистов. Показано, что применение ослепления позволяет повысить надежность полученных данных. При невозможности проведения полного ослепления требуется оценить, какие этапы доклинического исследования могут быть ослеплены. Для выполнения ослепления в доклиническом центре должны быть разработаны и внедрены соответствующие процедуры. **Заключение.** Предложенный алгоритм частичного ослепления может значительно снизить непреднамеренное влияние специалиста(ов) на эксперимент или интерпретацию полученных данных.

Ключевые слова: лабораторные животные, систематические ошибки, точность исследования, экспериментальные исследования.

Для цитирования: Макарова М.Н., Ковалева М.А., Макаров В.Г. Ослепление (маскировка) в доклинических исследованиях как возможный инструмент повышения воспроизводимости и трансляционности данных (литературный обзор). Трансляционная медицина. 2024; 11(1): 122-132. DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-1-122-132. EDN: DVGYUC

BLINDING (MASKING) IN NON-CLINICAL STUDIES TO IMPROVE REPRODUCIBILITY AND TRANSLATABILITY (LITERARY REVIEW)

Marina N. Makarova, Mariya A. Kovaleva, Valerii G. Makarov

Research and manufacturing company HOME OF PHARMACY,
Leningrad oblast, Russia

Corresponding author:

Mariya A. Kovaleva,
Research and manufacturing company
HOME OF PHARMACY,
Zavodskaya str., 3–245, Kuzmolovskiy t. s.,
Vsevolozhskiy district, Leningrad oblast,
Russia, 188663.
E-mail: kovaleva.ma@doclinika.ru

Received 04 December 2023; accepted
15 February 2024.

Abstract

Background. Despite numerous measures it is still impossible to overcome translational barriers and increase the reproducibility of the results obtained. The most significant procedures that improve the reliability of in vivo studies are randomization and blinding (masking). Conducting randomization does not require significant resources. In contrast, blinding is a more labor-intensive process. **Research Objective.** To analyze the scientific literature on the use of blinding in preclinical studies to further elaborate an algorithm for this procedure in a particular testing center. **Materials and methods.** Publications were searched in PubMed and Google Scholar databases (until April 30, 2023). **Results.** A literature review of blinding in preclinical studies was conducted, methods and the stages of scientific work at which this procedure can be performed were reviewed. An algorithm for partial study blinding that does not require additional specialists has been proposed. It is shown that the application of blinding allows to increase the reliability of the obtained data. If full blinding cannot be performed, it is necessary to evaluate which stages of the preclinical study can be blinded. Appropriate procedures should be developed and implemented to perform blinding in the preclinical center. **Conclusions.** The proposed blinding algorithm can significantly reduce the influence of the specialist(s) on the experiment or interpretation of the data obtained.

Key words: experimental studies, laboratory animals, research rigor, systematic errors.

For citation: Makarova MN, Kovaleva MA, Makarov VG. Blinding (masking) in non-clinical studies to improve reproducibility and translatability (literary review). *Translational Medicine*. 2024; 11(1): 122-132. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-1-122-132. EDN: DVGUYUC

Введение

Трансляционная медицина в значительной степени опирается на результаты экспериментальных исследований, полученных с участием лабораторных животных. Качество и результативность доклинических исследований лекарственных средств гарантируют безопасность проведения клинических исследований. Проблема низкой трансляции становится очевидной при получении неожиданных результатов во время II и III фаз клинических исследований. Показано, что 80–85 % лекарственных средств с доказанной на этапе доклинических

исследований фармакологической активностью оказываются неэффективными при применении у человека, а 30 % лекарственных средств, не демонстрирующих токсические эффекты в исследованиях безопасности, обладают побочными эффектами при клиническом применении [1]. Так, например, сульфат магния и нимодипин показали эффективность в экспериментальных исследованиях *in vivo* на разных моделях инсульта, при этом во II и III фазах клинических испытаний у пациентов в остром периоде инсульта препараты оказались неэффективными [2]. Помимо очевидных

анатомических и физиологических различий между человеком и лабораторными животными, причиной этого может являться стратегия планирования и выполнения экспериментов в целом, которая не обеспечивает достаточного уровня доказательности для перехода к выполнению клинических исследований [1]. Наибольший вклад в повышение надежности исследования вносят рандомизация и ослепление. Несмотря на то, что чаще эти процедуры рассматриваются вместе, публикация посвящена только процедуре ослепления. В целом под ослеплением следует понимать метод проведения исследования, заключающийся в сокрытии информации от того или иного его участника, призванный исключить субъективное воздействие участников исследования на результат. Часто вместо термина «ослепление» используют термин «маскировка». Такая замена была введена с этической точки зрения. С одной стороны, слово «слепота» может быть трактовано как отсутствие или недостаток знаний в отношении какого-либо вопроса, с другой — может способствовать распространению негативных стереотипов о слепых людях [3]. В связи с этим в работе использован двойной термин «ослепление/маскировка».

Цель работы — провести анализ научной литературы, посвященной использованию ослепления (маскировки) в доклинических исследованиях, для дальнейшего составления алгоритма проведения процедуры в условиях конкретного испытательного центра.

Методы

Представленный описательный обзор обобщает научные публикации об использовании ослепления (маскировки) в доклинических исследованиях. Поиск публикаций выполняли в базах данных PubMed и Google Scholar. В обзор включали публикации, доступные для поиска на 30 апреля 2023 года.

Частота использования ослепления в доклинических исследованиях

В экспериментах *in vivo* ослепление является важной методологической стратегией для снижения риска осознанного или неосознанного влияния сотрудников на результат эксперимента. Представлены убедительные данные о том, что отсутствие процедуры ослепления (маскировки) коррелирует с переоценкой оцениваемых эффектов тестируемых объектов. Так, например, в *in vivo* экспериментах, проведенных без маскировки и рандомизации, в шесть раз чаще представлены положительные эффекты лекарственных средств [3]. Доказано, что использование процедуры ослепления способ-

ствует снижению системных ошибок и позволяет исключить предвзятое отношение в зависимости от вмешательства [4–6].

В случае проведения неослепленных исследований часто происходит преувеличение эффекта до 45 % [7, 8]. По данным, полученным при опросе исследователей швейцарских научных центров, только 27 % опрошенных (общее количество 530) использовали ослепление (маскировку) при проведении исследования на этапе оценки результатов. При этом ученые отметили, что при сравнении собственных данных с литературными наблюдалось завышение эффектов тестируемых объектов в собственных исследованиях [9]. В обзоре С. Kilkenny [10] представлен анализ 271 статьи. Рукописи были опубликованы в период с 2003 по 2005 гг. и содержали результаты исследований с использованием разных видов лабораторных животных. Они были изучены на предмет включения информации, позволяющей оценить и воспроизвести доклиническое исследование. Показано, что рандомизация была описана в 12 % изученных рукописей, из которых 9 % имели подробное описание, гипотеза и характеристики лабораторных животных приведены в 59 %, подробное описание методов статистического анализа дано в 70 %, а ослепление (маскировка) — только в 14 % случаев. В более позднем исследовании проведен анализ 2671 статьи. В зависимости от используемой экспериментальной модели об ослеплении сообщалось в 3–59 % изученных рукописей [11]. При проведении машинного анализа 50 000 статей, опубликованных в 2018 году, показано, что об ослеплении сообщалось только в 12 % изученных рукописей [12].

Нечастое упоминание ослепления (маскировки) при доклинических исследованиях (ДКИ) в рукописях может быть связано, с одной стороны, с отсутствием информации об этом (хотя фактически ослепление выполнялось), с другой стороны — с невыполнением процедуры из-за каких-либо барьеров.

Барьеры использования ослепления в исследованиях *in vivo*

Несмотря на то, что ослепление (маскировка) в ДКИ является одним из важнейших методов повышения надежности полученных результатов, оно не получило широкого распространения в испытательных центрах. В работе [3] представлены результаты опроса 32 исследователей из государственных и контрактных научных центров. Все опрошенные имели опыт работы с лабораторными животными не менее 7 лет и ученую степень. Проведена оценка использования процедуры ослепления в 30 экспериментах на этапах: рандомизации, введения

тестируемых объектов и ухода за лабораторными животными, при оценке результатов и статистической обработке данных. Дополнительно проанализированы основные барьеры, препятствующие внедрению процедуры ослепления (маскировки). Авторами предложена следующая классификация:

1. *Ограничение культуры* — стремление выполнить работу так же, как это делалось ранее. В качестве обоснования ученые сообщали, что процедура ослепления не использовалась в эксперименте потому, что ранее в схожих исследованиях она не применялась.

2. *Увеличение частоты возникновения ошибок* — например, если специалист, осуществляющий процедуру ослепления, совершит ошибку, то она будет обнаружена только по завершении эксперимента.

3. *Проблема авторства и распределения ответственности* — процедура ослепления может потребовать введения дополнительных сотрудников при проведении эксперимента. Требуется понимание распределения ответственности на каждом этапе исследования и степени вовлеченности в эксперимент.

4. *Личные убеждения* — мнение о том, что процедура ослепления не повысит надежность исследования. Отсутствие научного обоснования необходимости процедуры для конкретного типа исследования.

5. *Недостаток или полное отсутствие знаний* — игнорирование процедуры ослепления, связанное с непониманием ее роли.

6. *Практические ограничения* — невозможность использования процедуры ослепления из-за разного вмешательства в экспериментальные группы, например, моделирование патологии хирургическим методом и введение химического вещества в одном исследовании или проведение исследования на лабораторных животных одного вида, имеющих разный фенотип.

7. *Недостаток ресурсов* — исключение процедуры ослепления из-за невозможности введения в исследование дополнительного персонала.

8. *Особенности технологических процессов* — исключение процедуры ослепления из-за невозможности пересмотра технологических процессов, например, использование программ сбора данных эксперимента, не позволяющих выполнить ослепление.

9. *Обеспечение принципов 3Rs и благополучия лабораторных животных в исследовании* — ослепление может негативно влиять на благополучие лабораторных животных. Отсутствие информации о вмешательстве не позволяет проводить адекват-

ное ветеринарное обеспечение в исследовании.

В ходе опроса некоторые исследователи предполагали, что рандомизация является альтернативной ослепления и это достаточная мера для исключения систематических ошибок. По мнению авторов, для преодоления описанных барьеров необходимо систематическое дополнительное обучение сотрудников, включающее в себя теоретические и практические аспекты [3].

Немаловажным является и отсутствие внутренних документов (стандартные операционные процедуры (СОП), рабочие инструкции и т. д.), детально описывающих проведение данной процедуры.

Непреднамеренное раскрытие ослепления

Ситуации, связанные с непреднамеренным раскрытием ослепления (маскировки) в ДКИ, способствуют подкреплению мнения об отсутствии необходимости использования данной процедуры. Следует отметить, что непреднамеренное раскрытие ослепления на отдельных этапах исследования может быть связано с особенностями внешнего вида или физико-химических свойств тестируемого объекта, например, запахом, цветом. Что касается твердых лекарственных форм, возможно изменение внешнего вида раствора или суспензии для введения, что связано с концентрацией вещества(в) в носителе. Такие изменения позволяют исследователю сделать субъективное суждение об уровне доз. В ряде случаев на фоне введения тестируемого объекта у лабораторных животных могут развиваться побочные эффекты, очевидные для конкретного лекарственного препарата (или класса лекарственных препаратов) [13]. Непреднамеренное раскрытие ослепления происходит при использовании разных фенотипов одного вида лабораторных животных при проведении исследований по изучению фармакологической активности противоопухолевых препаратов [3]. В вышеописанных случаях невозможно применить дополнительные меры ослепления. Тем не менее, эти обстоятельства не являются аргументом в пользу полного отказа от использования ослепления в ДКИ. При возникновении таких ситуаций достаточно отразить информацию в отчете, сообщив, какие этапы эксперимента и по какой причине не были ослеплены [13].

Процедура ослепления: ARRIVE 2.0

Одним из руководств, описывающих необходимость использования ослепления, является ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments: исследования на животных: отчетность об экспериментах *in vivo*). Первоначально оно было разработано в 2010 году для повышения

качества итоговых отчетов и научных статей. Документ представляет собой контрольный список вопросов, ответы на которые необходимо включить в отчеты и/или публикации, описывающие эксперименты *in vivo*. Основной целью ARRIVE является возможность надлежащей оценки эксперимента и его методологических аспектов любым ученым,

что должно способствовать воспроизведению методов, результатов и заключений, реализации принципов 3Rs [14]. Накопленный опыт использования первой версии ARRIVE позволил пересмотреть руководящие принципы, и сегодня доступна обновленная расширенная версия ARRIVE 2.0 [15–17]. Основопологающей идеей этого руководства явля-

Таблица 1. Ослепление на разных этапах доклинических исследований

Table 1. Blinding at different stages of non-clinical studies

Этап	Ослепление (маскировка)	Влияние на систематическую ошибку	Пример ошибки при отсутствии ослепления
Рандомизация	Специалист, выполняющий рандомизацию/стратификацию	Ослепление позволяет минимизировать или полностью исключить ошибку отбора лабораторных животных в группы.	Распределение в группу животных, которая будет получать наивысшую дозу тестируемого объекта, наиболее «крепких» животных.
Проведение исследования	Специалист, выполняющий введение тестируемых объектов, наблюдение за лабораторными животными, регистрирующий отдельные показатели	Ослепление позволяет гарантировать одинаковые условия проведения манипуляций и регистрацию показателей. Позволяет минимизировать или полностью исключить ошибки, связанные с проведением исследования.	Щадящее обращение с животными, получающими наивысшую дозу препарата. Различная техника захвата животного может приводить к разной степени выраженности стресса у мышей [20].
	Специалист по уходу за лабораторными животными	Ослепление позволяет гарантировать одинаковое обращение и уход за животными. Позволяет минимизировать или полностью исключить ошибки, связанные с проведением исследования.	Постоянное помещение клетки содержания группы, получающей наивысшую дозу лекарственного препарата, в более затемненную часть стеллажа для создания наиболее комфортных условий может приводить к изменению поведения животных, не связанного с действием тестируемого объекта.
Регистрация результатов	Специалист, выполняющий биохимический/гематологический и гистологический анализ, проводящий анализ биометрических показателей и т. д.	Специалисты ослеплены относительно принадлежности животных к той или иной группе. Ослепление позволяет минимизировать или полностью исключить ошибку выявления исходов и представления результатов.	Субъективная переоценка эффекта вмешательства. Отсутствие ослепления специалиста приводит к увеличению степени различия между группами.
Статистическая обработка данных	Специалист, проводящий статистическую обработку данных	Ослепление позволяет минимизировать или полностью исключить полусубъективные решения в отношении использования тех или иных методов статистического анализа, унифицируется подход к оценке высказывающихся значений.	Субъективная переоценка эффекта вмешательства.

ется повышение качества отчетности в отношении исследований *in vivo*. Результаты ретроспективного обсервационного когортного исследования Leung V. и соавторов, опубликованного в 2018 году, показали, что внедрение ARRIVE способствовало повышению качества научных статей. Тем не менее, ряд пунктов рекомендаций — размер выборки, рандомизация и ослепление — по-прежнему освещается не в полной мере [18].

Стоит отметить, использование принципов ARRIVE 2.0 на этапе формирования итогового отчета и/или рукописи может быть эффективным, только если уже на этапе подготовки исследования в испытательном центре были разработаны и внедрены стандартные методы для обеспечения каждого вопроса, СОП или рабочие инструкции. Таким образом, список контрольных вопросов ARRIVE 2.0 фактически может рассматриваться как список СОП, которые должны быть разработаны в организации, выполняющей научно-исследовательскую деятельность [19]. Пункт 5 рекомендаций ARRIVE 2.0 посвящен процедуре ослепления. Еще на этапе планирования исследования следует определить, какие специалисты и на каких этапах будут ослеплены, с целью минимизации эффектов субъективности при оценке результатов. ARRIVE 2.0 рекомендует использовать процедуру ослепления на 4 этапах — рандомизация, проведение исследования, оценка результатов и статистическая обработка данных (табл. 1). Такое ослепление можно считать полным, его целесообразно использовать при поисковых и трансляционных исследованиях на ранних этапах доклинической разработки лекарственного средства и в случаях, когда повторение эксперимента по каким-либо причинам затруднено (например, длительные исследования на нечеловекообразных приматах) [14]. Если невозможно провести полное ослепление, следует рассмотреть возможность ослепления отдельных этапов (частичное ослепление). В случае, если ослепление не было использовано ни на одном из этапов, следует указать причину, по которой это не было сделано. В качестве примера можно рассмотреть экспериментальную модель пилоркарпиновой эпилепсии на мышах. Наличие спонтанных судорог у лабораторных животных позволит исследователю понять, какая группа получала пилоркарпин, а какая — физиологический раствор натрия хлорида или иной носитель.

Внедрение процедуры ослепления

На основании накопленного опыта и знаний о преимуществах и ограничениях использования процедуры ослепления (маскировки) в АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» был разработан алгоритм ис-

пользования процедуры ослепления на разных этапах доклинического исследования *in vivo* (табл. 2). Принятие решения о том, какие этапы ДКИ должны быть ослеплены для повышения надежности проводимого исследования, основано на необходимости создания одинаковых условий содержания лабораторных животных, обеспечения одинаковых условий ухода за ними и ветеринарного сопровождения, а также единых подходов к проведению манипуляций и регистрации данных. Во внимание принимались требования национальных и международных нормативных и нормативно-правовых документов. Разработанный алгоритм применим для исследований, выполняемых для регистрационных целей, в которых заказчик (спонсор) передает испытательному центру всю необходимую информацию о тестируемых объектах.

По нашему мнению, для рутинных ДКИ (выполняемых в контрактной организации, когда сама организация не заинтересована в исходе исследования) достаточно проводить ослепление следующих этапов: рандомизации, введения тестируемых объектов и ухода за лабораторными животными, а также этапа регистрации результатов, в том случае, если она проводится лаборантом-исследователем. Описанное частичное ослепление (маскировка) представляется достаточным для предотвращения системных ошибок и получения надежных результатов, что обеспечивается высоким уровнем обучения специалистов и отсутствием конфликта интереса с заказчиком (спонсором). Кроме того, частичное ослепление с меньшей вероятностью может привести к ошибкам, чем полное ослепление.

Заключение

На этапе планирования эксперимента исследователи часто ожидают определенного результата и тем самым могут непреднамеренно повлиять на эксперимент или интерпретировать полученные данные таким образом, чтобы поддержать предпочтительную гипотезу. Использование ослепления при проведении доклинических исследований *in vivo* является оправданным инструментом для повышения надежности полученных результатов. Принятие решение об использовании полного или частичного ослепления должно быть взвешенным, поскольку ошибки, совершенные на данном этапе, будут обнаружены только после завершения исследования. При планировании каждого эксперимента требуется определить, какие этапы должны быть ослеплены — рандомизация, введение тестируемых объектов и уход за животными, получение результатов, статистическая обработка данных или иные. При невозможности использования

Таблица 2. Алгоритм использования процедуры ослепления на разных этапах доклинического исследования *in vivo*, принятый в АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»*

Table 2. Algorithm of blinding at different stages of preclinical *in vivo* study, adopted in Research and manufacturing company «Home of Pharmacy» *

Этап	Структурное подразделение/специалист	Процедура	Ослепление (маскировка)	Обоснование
Получение препарата	Провизорская служба/провизор	Присвоение шифра тестируемому объектам	Не ослеплены.	Позволяет ослепить отдельные этапы доклинического исследования и внешних специалистов при арбитражном анализе, проверка статистической обработки данных и т. д.).
Подготовка плана исследования	Научные сотрудники/руководитель исследования	Согласно ГОСТ 33044-2014 ¹ , план исследования и заключительный отчет должны содержать исчерпывающую информацию о тестируемом объекте.	Не ослеплены.	Ослепление не требуется, поскольку руководитель исследования получает заработную плату от работодателя, не зависящую от научных результатов проведенного исследования, что обеспечивает отсутствие конфликта интересов.
Подготовка бирок и первичных карт	Научные сотрудники/руководитель исследования	Первичные карты и бирки не содержат информации о вмешательстве (указан только шифр групп). Присвоение номеров групп случайным образом.	Не ослеплены.	Ослепление персонала, осуществляющего манипуляции (лаборанты-исследователи), уход за животными (зоолаборанты) и ветеринарное сопровождение (ветеринарные врачи и фельдшеры). Присвоение номеров групп случайным образом позволяет исключить традиционное мнение: группа 1 — интактные животные; группа 2 — контроль и т. д.
Рандомизация/стратификация	Ветеринарная служба/лаборант-исследователь	Рандомизация/стратификация заданного числа животных на группы	Ослеплены всегда.	Сотрудник не имеет информации о вмешательстве для каждой группы.

¹ ГОСТ 33044-2014 межгосударственный стандарт «Принципы надлежащей лабораторной практики»

Проведение манипуляций	Ветеринарная служба/лаборант-исследователь	Выполнение манипуляций в соответствии с планом-графиком, в котором нет информации о вмешательстве в каждой группе. Тестируемые объекты зашифрованы. Бирки клеток содержания и первичные карты не содержат информацию о тестируемых объектах, отсутствие доступа к плану исследования.	Ослеплены всегда, исключение: экспериментальные патологии, моделируемые хирургическим путем или когда руководитель исследования самостоятельно проводит хирургическое вмешательство.	Позволяет исключить личное отношение к лабораторным животным в зависимости от вмешательства. Обеспечивает одинаковые условия ухода во всех группах (например, более частая смена подстилки или дополнительное поение и кормление животных, подвергшихся более сильному вмешательству)..
Обеспечение ухода за животными	Ветеринарная служба/зоолаборанты	Бирки клеток содержания не содержат информацию о тестируемых объектах, отсутствие доступа к плану исследования.	Ослеплены всегда.	Позволяет исключить личное отношение к лабораторным животным в зависимости от вмешательства. Обеспечивает одинаковые условия ухода во всех группах (например, более частая смена подстилки или дополнительное поение и кормление животных, подвергшихся более сильному вмешательству)..
Ветеринарное сопровождение	Ветеринарная служба/ветеринарный врач или ветеринарный фельдшер	Бирки клеток содержания не содержат информацию о тестируемых объектах, отсутствие доступа к плану исследования.	Ослеплены всегда, намеренное раскрытие ослепления проводится в случае необходимости оказания животному ветеринарной помощи.	При резком ухудшении состояния животного, не связанном с действием тестируемого объекта (по мнению руководителя исследования), ветеринарный врач получает информацию о тестируемом объекте для дальнейшего принятия решения о стратегии лечения и/или дальнейшей судьбе животного. Повторное ослепление не требуется.
Биохимическое и гематологическое исследование	Отдел биохимии и гистологии/специалисты клинико-лабораторной диагностики	Получает доступ к плану исследования, участвует в обсуждении дизайна исследования.	Не ослеплены.	Ослепление может способствовать появлению ошибок при интерпретации данных (например, отнесение дозы как NOAEL или LOAEL при изучении умеренно токсичных препаратов).
Гистологическое исследование	Отдел гистологии и патоморфологии/патоморфолог	Получает доступ к плану исследования, участвует в обсуждении дизайна исследования.	Не ослеплены.	Ослепление может способствовать появлению ошибок при интерпретации данных (например, отнесение дозы как NOAEL или LOAEL при изучении умеренно токсичных препаратов).

Биометрические и иные исследования	Лаборант-исследователь	Тестируемые объекты зашифрованы. Бирки клеток содержания и первичные карты не содержат информацию о тестируемых объектах, отсутствие доступа к плану исследования.	Ослеплены всегда, исключение, если манипуляции проводит руководитель исследования.	Обеспечивает одинаковые условия проведения манипуляций во всех группах и фиксирование наблюдений.
Статистическая обработка данных	Научные сотрудники/руководитель исследования	Подготовка плана исследования. Присвоение номеров групп случайным образом.	Не ослеплены.	Ослепление не требуется, поскольку руководитель исследования получает заработную плату от работодателя, не зависящую от научных результатов проведенного исследования, и не имеет предпочтительной гипотезы.
Подготовка итогового отчета	Научные сотрудники/руководитель исследования	Подготовка плана исследования. Присвоение номеров групп случайным образом. Статистическая обработка данных.	Не ослеплены.	Каждый отчет содержит информацию о раскрытии конфликта интересов. Руководитель исследования делает письменное заявление об отсутствии финансовых, личных и иных конфликтов с заказчиком.

Примечание: * — представленный подход разработан с учетом обязательного проведения рандомизации/стратификации, проведение исследования в соответствии с принципами GLP (Good laboratory practice, надлежащая лабораторная практика).

Note: * — the approach was developed taking into account the mandatory randomization / stratification and research in accordance with the principles of GLP (Good laboratory practice).

данной процедуры для отдельных этапов в плане исследования (протоколе), а также в итоговом отчете должно быть представлено исчерпывающее обоснование. Непреднамеренное раскрытие ослепления также должно быть описано в итоговом отчете. С целью внедрения процедуры ослепления в каждом испытательном центре должны разрабатываться внутренние документы — стандартные операционные процедуры или инструкции, описывающие порядок ослепления, раскрытия ослепления, с учетом уровня профессиональной подготовки сотрудников, технологических процессов организации и типов проводимых исследований.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье. / Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Список литературы / References

1. Aleksandrov IV, Egorova EI, Vasina EYu, et al. Animal experiments in the era of translational medicine. What would they be? *Translational Medicine*. 2017; 4(2): 52–70. In Russian [Александров И.В., Егорова Е.И., Васина Е.Ю. и др. Экспериментальные исследования на животных в эпоху трансляционной медицины. Какими им быть? *Трансляционная медицина*. 2017; 4(2): 52–70]. DOI:2311-4495-2017-4-2-52-70.
2. Shmonin AA, Maltseva MN, Mel'nikova EV, Vlasov TD. Preclinical studies of drugs on animal stroke models. *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii imeni S. S. Korsakova*. 2017;117(12–2):45–52. In Russian [Шмонин А.А., Мальцева М.Н., Мельникова Е.В. и др. Доклинические исследования лекарственных средств на биологических моделях инсульта // *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. Спецвыпуски*. 2017; 117(12–2): 45–52]. DOI: 10.17116/jnevro201711712245-52.
3. Karp NA, Pearl EJ, Stringer EJ, et al. A qualitative study of the barriers to using blinding in in vivo experiments and suggestions for improvement. *PLoS Biol*. 2022; 20(11): e3001873. DOI: 10.1371/journal.pbio.3001873.
4. Tuytens FAM., de Graaf S, Heerkens JLT. Observer bias in animal behaviour research: can we believe what we score, if we score what we believe?. *Animal Behaviour*. 2014; 90: 273–280. DOI: 10.1016/j.anbehav.2014.02.007.
5. Cordaro L, Ison JR. Psychology of the scientist: X. Observer bias in classical conditioning of the planarian. *Psychological Reports*. 1963; 13(3): 787–789. DOI: 10.2466/pr0.1963.13.3.787.
6. van Wilgenburg E, Elgar MA. Confirmation Bias in Studies of Nestmate Recognition: A Cautionary Note for Research into the Behaviour of Animals. *PLoS ONE*. 2013; 8(1): e53548. DOI:10.1371/journal.pone.0053548.
7. Vesterinen HM, Sena ES, French-Constant C, et al. Improving the translational hit of experimental treatments in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2010; 16(9): 1044–1055. DOI: 10.1177/1352458510379612.
8. Macleod MR, van der Worp HB, Sena ES, et al. Evidence for the efficacy of NXY-059 in experimental focal cerebral ischaemia is confounded by study quality. *Stroke*. 2008; 39(10): 2824–2829. DOI: 10.1161/STROKEAHA.108.515957.
9. Reichlin TS, Vogt L, Wurbel H. The Researchers' View of Scientific Rigor-Survey on the Conduct and Reporting of In Vivo Research. *PLoS ONE*. 2016; 11(12): e0165999. DOI: 10.1371/journal.pone.0165999.
10. Kilkenny C, Parsons N, Kadyszewski E, et al. Survey of the quality of experimental design, statistical analysis and reporting of research using animals. *PLoS One*; 2009; 30 4(11): e7824. DOI: 10.1371/journal.pone.0007824.
11. Macleod MR, Lawson McLean A, Kyriakopoulou A, et al. Risk of bias in reports of in vivo research: a focus for improvement. *PLoS Biol*. 2015; 13(10): e1002273. DOI: 10.1371/journal.pbio.1002273.
12. Menke J, Roelandse M, Ozyurt B, et al. The Rigor and Transparency Index Quality Metric for Assessing Biological and Medical Science Methods. *iScience*. 2020; 23(11): 101698. DOI: 10.1016/j.isci.2020.101698.
13. Bernalov A, Wicke K, Castagné V. Blinding and Randomization. *Good Research Practice in Non-Clinical Pharmacology and Biomedicine. Handbook of Experimental Pharmacology*. 2019; 257. Springer, Cham. DOI:10.1007/164_2019_279.
14. du Sert NP, Ahluwalia A, Alam S, et al. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biol*. 2020; 18(7): e3000411. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000411.
15. Jakobsen JC, Gluud C, Wetterslev J, et al. When and how should multiple imputation be used for handling missing data in randomised clinical trials — a practical guide with flowcharts. *BMC Med Res Methodol*. 2017; 17(1): 162. DOI: 10.1186/s12874-017-0442-1.
16. Holman C, Piper SK, Grittner U, et al. Where have all the rodents gone? The effects of attrition in experimental research on cancer and stroke. *PLoS Biol*. 2016; 14(1): e1002331. DOI: 10.1371/journal.pbio.1002331.
17. Genther-Schroeder ON, Branine ME, Hansen SL. Effects of increasing supplemental dietary Zn concentration on growth performance and carcass characteristics in finishing steers fed ractopamine hydrochloride. *J Anim Sci*. 2018; 96(5): 1903–1913. DOI: 10.1093/jas/sky094.
18. Leung V, Rousseau-Blass F, Beauchamp G, et al. ARRIVE has not ARRIVED: Support for the ARRIVE (Animal Research: Reporting of in vivo Experiments) guidelines does not improve the reporting quality of papers in animal welfare, analgesia or anesthesia. *PLoS ONE*. 2018; 13(5): e0197882. DOI: 10.1371/journal.pone.0197882.

19. 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: монография / Под ред. В. Г. Макарова и В. Н. Шестакова. Санкт-Петербург: НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», 2022. 248 с. с илл. DOI: 10.57034/978-5-6048955-0-4-s3.

20. Hurst JL, West RS. Taming anxiety in laboratory mice. Nat Methods. 2010; 7(10): 825–826. DOI: 10.1038/nmeth.1500.

Информация об авторах:

Ковалева Мария Александровна, к.б.н., руководитель научно-методической группы, АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»;

Макарова Марина Николаевна, д.м.н., директор, АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»;

Макаров Валерий Геннадьевич, д.м.н., профессор, научный руководитель, АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ».

Authors information:

Mariya A. Kovaleva, Candidate of Biological Sciences, Head of the scientific and methodological group, Research and manufacturing company HOME OF PHARMACY;

Marina N. Makarova, doctor of Medical Sciences, Director, Research and manufacturing company HOME OF PHARMACY;

Valery G. Makarov, doctor of Medical Sciences, Professor, Scientific Supervisor, Research and manufacturing company HOME OF PHARMACY.