



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

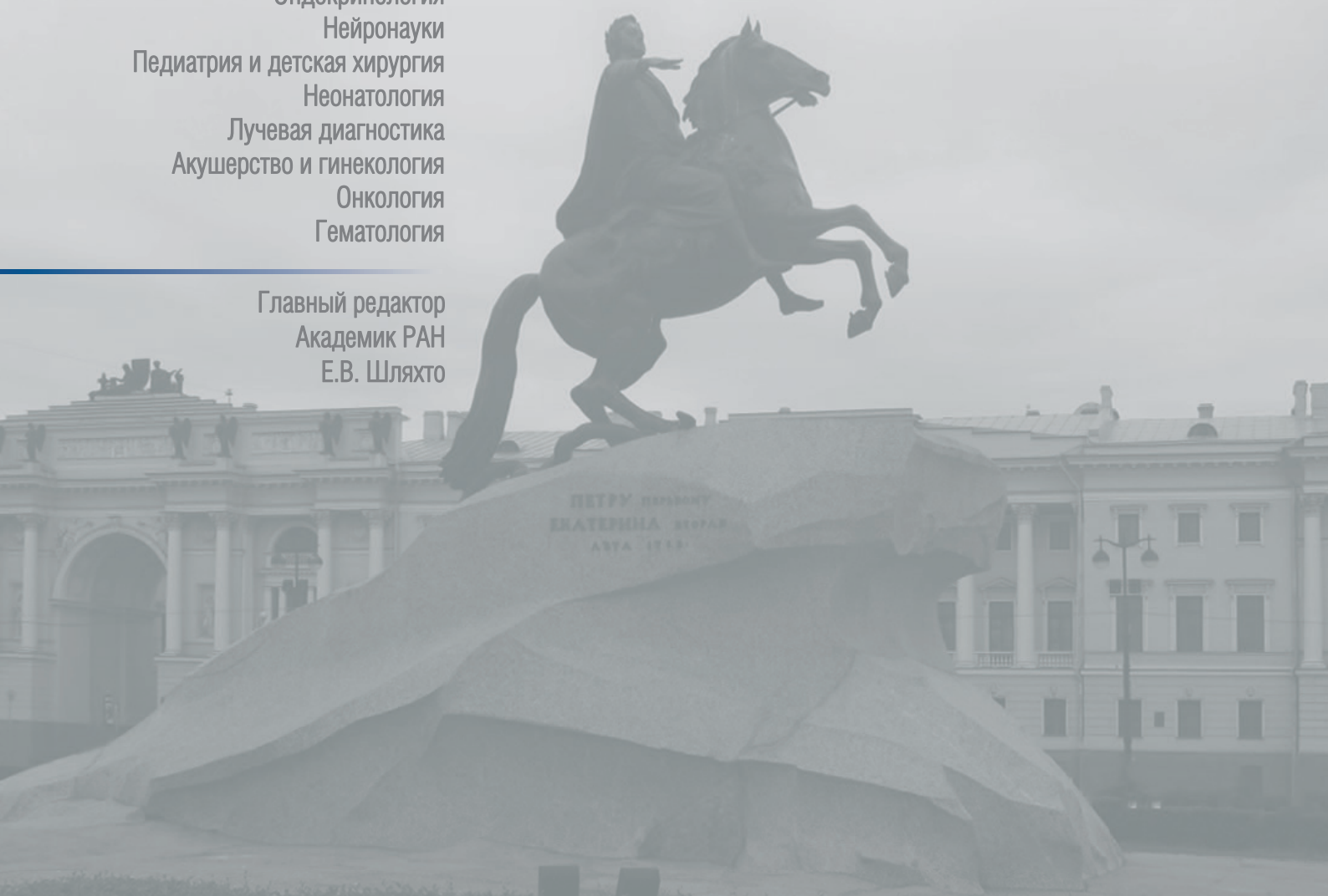
Трансляционная Медицина Translational Medicine

Научно-практический рецензируемый медицинский журнал

том 11 № 4 / 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 № 4 / 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: bulleten@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 11.09.2024

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)
A. Chesnikova (Rostov-on-Don)
M. Darenskaya (Irkutsk)
A. Efremushkina (Barnaul)
A. Galyavich A. S. (Kazan)
E. Grineva (St. Petersburg)
Yu. Grinshtein (Krasnoyarsk)
V. Kashtalap (Kemerovo)
V. Klimontov (Novosibirsk)
D. Korolev (St. Petersburg)
A. Kostareva (St. Petersburg)
D. Lebedev (St. Petersburg)
Yu. Lopatin (Volgograd)
S. Makarov (Kemerovo)
A. Malashicheva (St. Petersburg)
M. Melikyan (Moscow)
O. Moiseeva (St. Petersburg)
M. Neimark (Barnaul)
I. Nikitina (St. Petersburg)
K. Protasov (Irkutsk)
V. Ryabov (Tomsk)
D. Ryzhkova (St. Petersburg)
D. Sadykova (Kazan)
A. Samorodov (Ufa)
A. Savchenko (Krasnoyarsk)
K. Shapovalov (Chita)
O. Sirotkina (St. Petersburg)
V. Troyan (Moscow)
V. Usov (Tomsk)
T. Vavilova (St. Petersburg)
N. Volkova (Rostov-on-Don)
V. Weber (Veliky Novgorod)
I. Zakharova (Moscow)
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 September 11, 2024

18+

СОДЕРЖАНИЕ

СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

309 Усова Е. И., Малишевский Л. М., Алиева А. С., Макарова Т. А., Мурашко Е. А., Кессених Е. Д., Трусов С. Н., Алиева М. С., Яковлев А. Н., Конради А. О.

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ ЦЕРАМИДОВ И ИХ АССОЦИАЦИЯ С КЛИНИКО-АНАМНЕСТИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ

ЭНДОКРИНОЛОГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

324 Никитина И. Л., Капустина А. С., Леонова И. А., Байрамов А. А.

К ВОПРОСУ О НОВЫХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ВОЗМОЖНОСТЯХ КИССПЕПТИНА

РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА

334 Султанова К. Т., Крышень К. Л., Макарова М. Н.
ТРАНСЛЯЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ТЕСТ-СИСТЕМ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ТЕРМИЧЕСКИХ ОЖОГОВЫХ РАН

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

342 Вавилова В. А., Фаустова Н. М., Пелешок А. А., Крышень К. Л., Макарова М. Н., Макаров В. Г.

БЕЛОК S100B КАК БИОЛОГИЧЕСКИЙ МАРКЕР ПОВРЕЖДЕНИЯ НЕРВНОЙ ТКАНИ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ В ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

351 Косман В. М., Карлина М. В., Петрова Е. М., Макарова М. Н., Макаров В. Г.

ОБ ОЦЕНКЕ КОНТАМИНАЦИИ И АНАЛИЗЕ КОНТРОЛЬНЫХ ПРОБ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ТОКСИКОКИНЕТИКИ

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

364 Лаврищева Ю. В., Яковенко А. А., Потапов И. В.
РЕДКИЙ КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ СОЧЕТАННОГО ПОРАЖЕНИЯ ПОЧЕК, СВЯЗАННЫЙ С IGG4-АССОЦИИРОВАННЫМ СИСТЕМНЫМ ЗАБОЛЕВАНИЕМ

CONTENT

CARDIOVASCULAR DISEASE

309 Elena I. Usova, Lev M. Malishevskii, Asiiat S. Alieva, Taiana A. Makarova, Ekaterina A. Murashko, Elizaveta D. Kessenich, Sergey N. Trusov, Madina S. Alieva, Alexey N. Yakovlev, Alexandra O. Konradi

CHANGES IN CERAMIDE CONCENTRATIONS AND THEIR ASSOCIATION WITH CLINICAL AND ANAMNESTIC PARAMETERS IN PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME

METABOLIC DISEASES

324 Irina L. Nikitina, Anna S. Kapustina, Irina A. Leonova, Alekber A. Bairamov

NOVEL THERAPEUTIC OPPORTUNITIES OF KISSPEPTIN

REGENERATIVE MEDICINE

334 Kira T. Sultanova, Kirill L. Kryshen', Marina N. Makarova

TRANSLATIONAL POTENTIAL OF TEST SYSTEMS IN MODELLING THERMAL BURN WOUNDS

ORIGINAL RESEARCH

342 Valeriya A. Vavilova, Natalia M. Faustova, Andrei A. Peleshok, Kirill L. Kryshen', Marina N. Makarova, Valery G. Makarov

S100B PROTEIN AS A BIOLOGICAL MARKER OF NERVE TISSUE DAMAGE IN LABORATORY ANIMALS IN PRECLINICAL STUDIES

351 Vera M. Kosman, Marina V. Karlina, Elizaveta M. Petrova, Marina N. Makarova, Valery G. Makarov

ON THE ASSESSMENT OF CONTAMINATION AND ANALYSIS OF CONTROL SAMPLES IN TOXICOKINETICS STUDIES

CASE REPORT

364 Yulia V. Lavrishcheva, Alexandr A. Jakovenko, Ilya V. Potapov
A RARE DELETERIOUS CASE OF CONCOMITANT RENAL DISEASE ASSOCIATED WITH IGG4-ASSOCIATED SYSTEMIC DISEASE

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ ЦЕРАМИДОВ И ИХ АССОЦИАЦИЯ С КЛИНИКО-АНАМНЕСТИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ

Усова Е. И., Малишевский Л. М., Алиева А. С., Макарова Т. А.,
Мурашко Е. А., Кессених Е. Д., Трусов С. Н., Алиева М. С.,
Яковлев А. Н., Конради А. О.

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

Контактная информация:

Усова Елена Ивановна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: el.lenkin@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 26.06.2024
и принята к печати 22.08.2024.

Резюме

Актуальность. Учитывая динамику метаболизма при остром коронарном синдроме (ОКС), изучение молекулярных липидных метаболитов имеет особое значение, поскольку в их составе наиболее быстро отражаются изменения, происходящие в момент острого события. В ряде проспективных исследований продемонстрирована прогностическая ценность церамидов, однако изучение их динамики и ассоциации с клиническими параметрами пациентов с ОКС представлено не в полной мере. **Цель.** Изучить изменение концентраций церамидов Cer(d18:1/16:0), Cer(d18:1/18:0), Cer(d18:1/24:0) и Cer(d18:1/24:1) и их ассоциацию с клинико-анамнестическими параметрами у пациентов с ОКС. **Материалы и методы.** Среди 110 пациентов проведен липидомный анализ с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии — тандемной масс-спектрометрии. **Результаты.** При поступлении в стационар уровень церамидов был самым высоким и снижался с течением времени (для всех $p < 0,001$). Продemonстрированы особенности концентраций церамидов в зависимости от клинико-анамнестических параметров пациентов с ОКС. Выявлена слабая ассоциация церамидов с возрастом и высокочувствительным тропонином I, умеренная ассоциация с показателями липидограммы на протяжении разных периодов времени. Впервые представлены данные об уровнях Cer(d18:1/16:0) и Cer(d18:1/24:0) в зависимости от дебюта заболевания, концентрации Cer(d18:1/16:0) в зависимости от длительности ангинозного приступа и уровне Cer(d18:1/18:0) в зависимости от наличия отягощенного наследственного анамнеза по сердечно-сосудистым заболеваниям. **Заключение.** Изменение концентрации церамидов с течением времени и особенности их уровня в зависимости от клинико-анамнестических параметров пациентов с ОКС расширяют представление о значимости липидных метаболитов.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография — тандемная масс-спектрометрия, липидомный анализ, острый коронарный синдром, церамиды.

Для цитирования: Усова Е.И., Малишевский Л.М., Алиева А.С. и др. Изменение уровня концентраций церамидов и их ассоциация с клинико-анамнестическими параметрами у пациентов с острым коронарным синдромом. Трансляционная медицина. 2024; 11(4): 309-323. DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-4-309-323. EDN: JOJRNМ

CHANGES IN CERAMIDE CONCENTRATIONS AND THEIR ASSOCIATION WITH CLINICAL AND ANAMNESTIC PARAMETERS IN PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME

Elena I. Usova, Lev M. Malishevskii, Asiat S. Alieva,
Taiana A. Makarova, Ekaterina A. Murashko,
Elizaveta D. Kessenich, Sergey N. Trusov, Madina S. Alieva,
Alexey N. Yakovlev, Alexandra O. Konradi

Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Elena I. Usova,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.
E-mail: el.lenkin@yandex.ru

Received 26 June 2024; accepted 22 August 2024.

Abstract

Background. Given the metabolic dynamics of acute coronary syndrome (ACS), the study of molecular lipid metabolites is of particular importance because their composition most rapidly reflects the changes occurring at the time of the acute event. Several prospective studies have demonstrated the prognostic value of ceramides, however, the study of their dynamics and association with clinical parameters of patients with ACS is underrepresented. **Objective.** To investigate changes in Cer(d18:1/16:0), Cer(d18:1/18:0), Cer(d18:1/24:0), and Cer(d18:1/24:1) ceramide concentrations and their association with clinical and anamnestic parameters in patients with ACS. **Design and methods.** Lipidomic analysis by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry was performed among 110 patients with ACS. **Results.** At admission to the hospital the ceramide level was the highest and decreased with time (for all $p < 0.001$). The peculiarities of ceramide concentrations depending on clinical and anamnestic parameters of patients with ACS are shown. Ceramides were found to be weakly correlated with age and high-sensitivity troponin I, and moderately correlated with lipid profile at different time periods. For the first time, information on Cer(d18:1/16:0) and Cer(d18:1/24:0) levels depending on disease debut, Cer(d18:1/16:0) concentration depending on duration of the pain attack, and Cer(d18:1/18:0) level depending on the presence of family history of cardiovascular disease is presented. **Conclusion.** The dynamics of ceramide concentrations over time and the peculiarities of their levels depending on the clinical and anamnestic parameters of patients with ACS expand the understanding of the importance of lipid metabolites.

Key words: acute coronary syndrome, ceramides, high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, lipidomic analysis.

For citation: Usova EI, Malishevskii LM, Alieva AS, et al. Changes in ceramide concentrations and their association with clinical and anamnestic parameters in patients with acute coronary syndrome. Translational Medicine. 2024; 11(4): 309-323. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-4-309-323. EDN: JOJRNM

Список сокращений: АССЗ — атеросклеротические сердечно-сосудистые заболевания, ИБС — ишемическая болезнь сердца, ИМбпST — инфаркт миокарда без подъема сегмента ST, ИМпST — инфаркт миокарда с подъемом сегмента ST, ОКС — острый коронарный синдром, ОХС — общий холестерин, ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания, ФП — фибрилляция предсердий, ХС нЛВП — холестерин липопротеидов невысокой плотности.

Введение

Внедрение омиксных технологий в практику современного здравоохранения привело к выявлению ряда потенциальных биомаркеров развития атеросклеротических сердечно-сосудистых заболеваний (АССЗ) [1]. В частности, использование методик липидного анализа стало одной из фундаментальных ступеней в изучении молекулярных липидных метаболитов, в составе которых наиболее быстро и четко могут отражаться любые изменения, обусловленные влиянием внутренних и внешних факторов. Применение методов липидного анализа позволяет более глубоко исследовать патофизиологические механизмы течения АССЗ и выявлять биомаркеры развития и прогрессирования процессов атеросклероза.

Церамиды — одни из широко изучаемых представителей подкласса сфинголипидов, уникальное строение которых позволяет им выступать в качестве структурных компонентов мембран, а также в роли вторичных мессенджеров, участвующих во внутриклеточной и межклеточной передаче сигналов, процессах дифференцировки, пролиферации, апоптоза и экспрессии цитокинов, что в целом формирует комплекс реакций, имеющих значение в атерогенезе [2]. Поскольку патофизиология атеросклероза представляет собой сложное взаимодействие процессов воспаления, дисфункции эндотелия, нарушений липидного обмена и активации тромбоцитов, в нескольких исследованиях продемонстрирована ассоциация церамидов с каждым из этих процессов, что указывает на их предполагаемое участие в развитии, прогрессировании и трансформации атеросклеротических бляшек в нестабильное состояние [3].

В ряде проспективных исследований продемонстрирована прогностическая ценность церамидов [4, 5], однако полученные данные основаны на однократных измерениях концентрации липидных метаболитов. Динамическое исследование потенциальных биомаркеров представляется важным и информативным аспектом, поскольку позволяет представить изменения в уровне церамидов с течением времени и дополнить понимание их

прогностической роли. Помимо этого, изучение ассоциации церамидов с демографическими, клинико-анамнестическими и лабораторными параметрами является ценным компонентом в расширении представлений об уровне этих биомаркеров у пациентов с острыми АССЗ.

Таким образом, цель исследования заключалась в изучении изменений уровня концентраций церамидов Cer(d18:1/16:0), Cer(d18:1/18:0), Cer(d18:1/24:0) и Cer(d18:1/24:1) и их ассоциаций с клинико-анамнестическими параметрами у пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС).

Материалы и методы

Исследование проводилось на базе ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России в соответствии с положением Хельсинкской декларации и было одобрено локальным этическим комитетом. Все пациенты заполнили форму информированного согласия на участие в исследовании.

Исследуемая популяция

В рамках пилотного исследования уровня и динамики церамидов из проспективного наблюдательного регистрового исследования пациентов с ОКС [6] был проведен искусственный отбор 110 участников.

В исследование были включены:

- пациенты с верифицированным диагнозом нестабильной стенокардии — с клиникой типичного ангинозного приступа, изменениями по данным электрокардиограммы (ЭКГ) в виде отсутствия подъема сегмента ST, отсутствием повышения кардиоферментов, наличием гемодинамически значимых стенозов коронарных артерий, потребовавших одномоментной экстренной реваскуляризации миокарда;
- пациенты с инфарктом миокарда без подъема сегмента ST (ИМбпST), имеющие типичный болевой синдром в грудной клетке, отсутствие подъема сегмента ST по данным ЭКГ, повышение миокардиальных ферментов, наличие гемодинамически значимых стенозов коронарных артерий, потребовавших экстренной реваскуляризации миокарда;
- пациенты с инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST (ИМпST), имеющие типичный болевой синдром в грудной клетке, динамическое изменение сегмента ST и зубца Т по данным ЭКГ, повышение миокардиальных ферментов, наличие обструктивного поражения коронарных артерий, потребовавших экстренной реваскуляризации миокарда.

Критерии исключения: больные с внутригоспитальными осложнениями (жизнеугрожающими нарушениями ритма и проводимости, острой сердечной недостаточностью высоких градаций,

кардиогенным шоком), лица с тяжелой соматической патологией, с известными онкологическими заболеваниями, беременные женщины и в периоде лактации.

Забор биоматериала и подготовка образцов плазмы

Забор крови проводился из локтевой вены в пластиковые пробирки системы Vacuette с антикоагулянтом ЭДТА при поступлении в стационар и до проведения коронарной ангиографии (которая была осуществлена в первые сутки от момента поступления в стационар), на третьи сутки стационарного лечения и через 3 месяца после выписки из стационара. Биообразцы центрифугировали при 2000 оборотах в минуту в течение 10 минут при температуре +4 °С.

Определение церамидов в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии — тандемной масс-спектрометрии

Определение церамидов в плазме крови проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии — тандемной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) с использованием жидкостного хроматографа Agilent 1260 Infinity с тандемным масс-спектрометрическим детектором Agilent 6460 Triple Quad LC/MS с источником нагреваемой электрораспылительной ионизации и программным обеспечением для управления и обработки данных MassHunter (Agilent, США). Для построения градуировочных зависимостей использовали набор дейтерированных стандартов церамидов для масс-спектрометрии (330713X, Avanti). Стоковый раствор содержит 4 церамида: C16 Ceramide-d7 (d18:1-d7/16:0); C18 Ceramide-d7 (d18:1-d7/18:0); C24 Ceramide-d7 (d18:1-d7/24:0); C18 Ceramide-d7 (d18:1-d7/24:1 (15Z)). Рабочие растворы готовили путем последовательного разбавления стокового раствора смесью дихлорметан:метанол 1:3.

Экстракцию липидов из 100 мкл плазмы крови проводили по методу Фолча [7]. Непосредственно перед проведением ВЭЖХ-МС/МС анализа образцы перерастворяли в 100 мкл смеси дихлорметан:метанол 1:3. Хроматографическое разделение проводили на колонке Chromolith® Performance RP-18 endcapped 100-2, с предколонкой Chromolith® Performance RP-18. Температура колонки 40 °С. Состав подвижной фазы: А — 10 мМ раствор ацетата аммония и 0,1 об. % муравьиной кислоты в воде; Б — 10 мМ раствор ацетата аммония и 0,1 об. % муравьиной кислоты в смеси ацетонитрил:изопропанол 4:3. Режим элюирования

0–1 мин 85 %Б; 1–2,5 мин 85–100 %Б; 2,5–7 мин 100 %Б; 7–7,1 мин 85–100 %Б; 7,1–10,3 мин 85 %Б. Скорость подвижной фазы через колонку — 0,3 мл/мин. Температура автосэмплера — 4 °С; объем вводимой пробы — 2 мкл.

Масс-спектрометрическое детектирование церамидов проводили в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) при следующих условиях: режим положительной ионизации; температура газа-осушителя 290 °С, температура пикового газа 300 °С, расход газа-осушителя и пикового газа 9 л/мин; давление на распылителе 30 psi; напряжение на капилляре — 3500 В; напряжение фрагментатора — 120 В; напряжение ускорителя ячейки соударения — 7 В; энергия ячейки соударения — 12 В. MRM-переходы дейтерированных стандартов церамидов: 545.5, 573.5, 657.5, 655.5→271.3. MRM-переходы эндогенных церамидов: 538.5, 566.5, 650.5, 648.5→264.3.

Лабораторное исследование

Анализ высокочувствительного тропонина I проводился на анализаторах Architect i2000 при помощи тест-системы Abbott ARCHITECT STAT High Sensitive Troponin-I и Access2 с применением тест-системы высокочувствительного тропонина I (Access hsTnI). Липидный спектр, уровень С-реактивного белка, креатинина, глюкозы определяли на биохимическом анализаторе Abbot Architect c8000 (США) с использованием диагностических наборов фирмы Abbot Diagnostic (США). Скорость клубочковой фильтрации рассчитывали по формуле СКД-EPI. Уровень гликированного гемоглобина был определен с помощью автоматического анализатора Bio-Rad D-10 (США).

Инструментальное обследование

Антропометрическое обследование включало в себя измерение роста, массы тела с последующим расчетом индекса массы тела по формуле Кетле. Измерение артериального давления с помощью тонометра OMRON M3 Expert (Япония) было проведено при поступлении пациента в стационар.

Исследование уровня высокочувствительного тропонина I было выполнено с помощью Architect i2000 с использованием тест-системы Abbott ARCHITECT STAT High Sensitive Troponin-I и Access2 с применением тест-системы высокочувствительный тропонин I, реагент (Access hsTnI). Параметры липидограммы, С-реактивного белка, глюкозы плазмы крови, содержание креатинина в сыворотке крови определяли на биохимическом анализаторе Abbot Architect c8000 (США) с использованием диагностических наборов фирмы

Abbot Diagnostic (США). Расчет скорости клубочковой фильтрации (pСКФ) производили по формуле СКД-EPI. Гликированный гемоглобин был определен с помощью автоматического анализатора Bio-Rad D-10 (США).

Ультразвуковое исследование общих сонных артерий проводили при использовании аппарата My Sono U6 (Samsung, Корея) в соответствии с общепринятым протоколом обследования. Трансторакальная эхокардиография была выполнена при использовании диагностических аппаратов Vivid 7 (GE Healthcare, США) и Sonos 7500 (Philips, США). Выполнение коронарной ангиографии было осуществлено всем пациентам в первые сутки при поступлении в стационар, коронарное русло было визуализировано с помощью ангиографической установки Allura FD20 (Philips, Нидерланды). Порядок верификации объема поражения коронарного русла представлен на рисунке 1.

У всех пациентов выявили гемодинамически значимое поражение коронарного русла, в связи с чем одномоментно по показаниям была проведена реваскуляризация миокарда, за исключением одного больного, который отказался от оперативного вмешательства по личным причинам, несмо-

тря на информирование о возможных рисках и последствиях.

Статистический анализ

Анализ данных проведен при помощи пакета прикладных программ IBM SPSS v.28. Распределение оценивалось по критерию Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллиефорса. В случае нормального распределения количественных данных результаты представлялись в виде среднего значения и стандартного отклонения ($M \pm SD$), а при отличном от нормального — в виде медианы с интерквартильным размахом ($Me [25;75]$). В таблицах при сравнении групп количественные данные представлены только в виде $Me [25;75]$. Для сравнения количественных данных в двух независимых группах при нормальном распределении использовался t-критерий Стьюдента, при отличном от нормального — критерий Манна-Уитни. Для сравнения количественных данных в трех независимых группах был использован однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA). Для сравнения качественных показателей применялся критерий χ^2 Пирсона. При корреляционном анализе был использован критерий Спирмена. Для анализа количественных перемен-

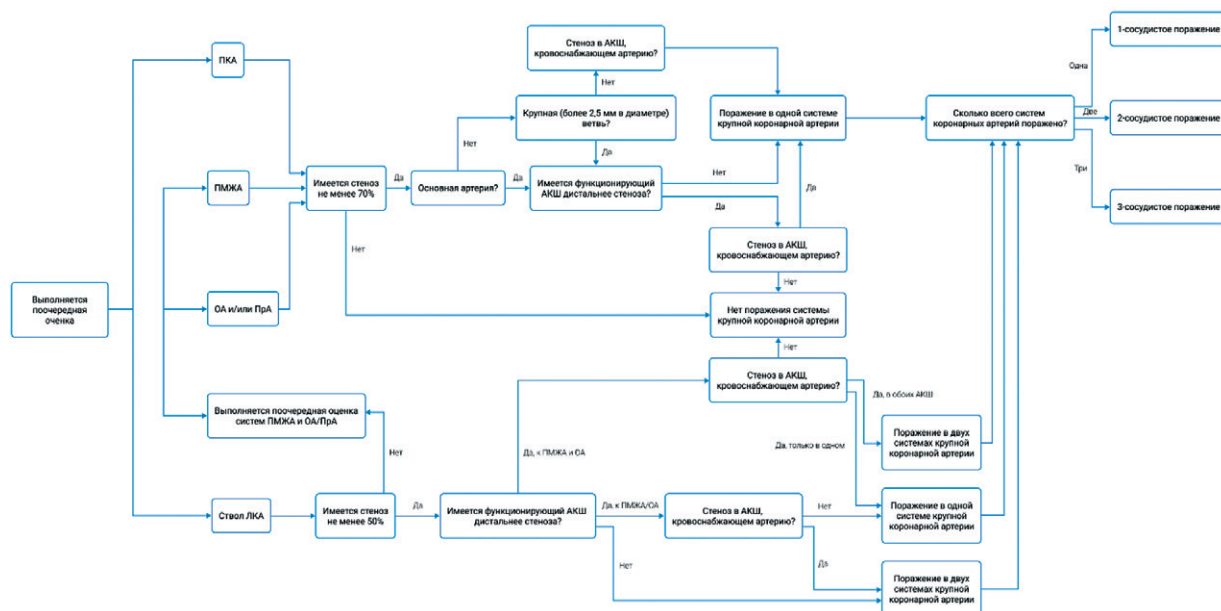


Рис. 1. Порядок верификации объема поражения коронарного русла

Примечание: АКШ — аортокоронарное шунтирование, ЛКА — левая коронарная артерия, ОА — огибающая артерия, ПКА — правая коронарная артерия, ПМЖА — передняя межжелудочковая артерия, ПрА — промежуточная артерия.

Figure 1. Verification of coronary lesion volume

Note: AIV — anterior interventricular artery, CABG — coronary artery bypass grafting, CA — circumflex artery, IA — intermediate artery, LCA — left coronary artery, RCA — right coronary artery.

Таблица 1. Клинико-anamnestический профиль пациентов

Table 1. Clinical and anamnestic profile of patients

Параметр	Все пациенты (n = 110)
Возраст, лет (Me, IQR)	66 [59; 71]
Мужской пол (n, %)	71 (64,5 %)
Тип ОКС - нестабильная стенокардия (n, %) - ИМбпST (n, %) - ИМпST (n, %)	56 (50,9 %) 15 (13,6 %) 39 (35,5 %)
Дебют заболевания с ОКС (n, %)	48 (43,6 %)
Дестабилизация длительно текущего анамнеза ИБС (n, %)	62 (56,4 %)
Длительность болевого синдрома - до 15 мин (n, %) - до 30 минут (n, %) - более 30 минут (n, %)	42 (38,2 %) 19 (17,3 %) 49 (44,5 %)
Объем поражения коронарного русла - Однососудистое (n, %) - Двухсосудистое (n, %) - Трехсосудистое (n, %)	37 (33,6 %) 46 (41,8 %) 27 (24,6 %)
Вид реваскуляризации - Чрескожное коронарное вмешательство (n, %) - Аортокоронарное шунтирование (n, %) - Не проводилось (n, %)	105 (95,5 %) 4 (3,6 %) 1 (0,9 %)
Традиционные факторы риска	
Отягощенный наследственный анамнез по ССЗ (n, %)	53 (48,2 %)
Систолическое артериальное давление при поступлении, мм рт. ст.	145 ± 26
Диастолическое артериальное давление при поступлении, мм рт. ст.	83 [76; 90]
Артериальная гипертензия (n, %)	104 (94,5 %)
Дислипидемия (n, %)	103 (93,6 %)
Индекс массы тела, кг/м ²	29 ± 4
Ожирение (n, %)	41 (37,3 %)
Степень ожирения - I степень (n, %) - II степень (n, %) - III степень (n, %)	29 (70,7 %) 9 (22,0 %) 3 (7,3 %)
Сахарный диабет 2 типа (n, %)	33 (30,0 %)
Курение - активный курильщик/курил ранее (n, %) - никогда не курил (n, %)	71 (64,5 %) 39 (35,5 %)
Соблюдение диеты (n, %)	14 (12,7 %)
Регулярная физическая активность (n, %)	25 (22,7 %)
Анамнестический профиль	
Раннее развитие сердечно-сосудистых заболеваний (n, %)	45 (40,9 %)
Атеросклероз брахиоцефальных артерий (n, %)	74 (67,3 %)

Постинфарктный кардиосклероз (n, %)	28 (25,5 %)
Фибрилляция предсердий (n, %)	23 (20,9 %)
Хроническая сердечная недостаточность	34 (31,0 %)
Хроническая болезнь почек (n, %)	16 (14,5 %)
Ишемический инсульт в анамнезе (n, %)	16 (14,5 %)
Лабораторный профиль в период госпитализации	
Глюкоза, ммоль/л	6,9 [5,8; 8,7]
Гликированный гемоглобин, %	5,6 [5,1; 6,2]
Креатинин сыворотки, мкмоль/л	84,1 [71,9; 99,2]
Расчетная скорость клубочковой фильтрации, мл/мин/1,73м ²	76,6 ± 21,9
С-реактивный белок, мг/л	2,8 [1,4; 6,9]
Общий холестерин, ммоль/л	4,7 ± 1,2
Холестерин липопротеидов невысокой плотности, ммоль/л	3,7 [2,9; 4,3]
Холестерин липопротеидов низкой плотности, ммоль/л	2,9 ± 1,0
Холестерин липопротеидов высокой плотности, ммоль/л	1,0 [0,9; 1,2]
Холестерин липопротеидов очень низкой плотности, ммоль/л	0,8 [0,6; 1,0]
Триглицериды, ммоль/л	1,7 [1,2; 2,3]
Особенности медикаментозной терапии	
Прием дезагрегантной терапии в анамнезе	84 (76,4 %)
Прием гиполипидемической терапии в анамнезе	65 (59,1 %)
Интенсивность назначенной терапии ГМГ-КоА-редуктазы (статинов) в период госпитализации: - средней интенсивности (n, %) - высокой интенсивности (n, %)	8 (7,3 %) 102 (92,7 %)
Соблюдение приема статинов через 3 месяца после выписки	106 (96,4 %)
Интенсификация гиполипидемической терапии по результатам липидограммы	99 (90,0 %)

Примечание: ИБС — ишемическая болезнь сердца, ИМбпST — инфаркт миокарда без подъема сегмента ST, ИМпST — инфаркт миокарда с подъемом сегмента ST, ОКС — острый коронарный синдром, ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания.

Note: ACS — acute coronary syndrome, CAD — coronary artery disease, CVDs — cardiovascular diseases, NSTEMI — non-ST-elevation myocardial infarction, STEMI — ST-elevation myocardial infarction.

ных в трех связанных группах применяли критерий Фридмана. Статистически значимым различием при сравнении двух групп считалось достижение уровня $p < 0,05$, при сравнении трех групп — $p < 0,017$.

Результаты

В пилотное исследование вошло 110 пациентов с ОКС, медиана возраста составила 66 лет, преобладали лица мужского пола (71 (64,5 %)). Подробный клинико-anamnestический профиль пациентов представлен в таблице 1.

Практически у всех пациентов была артериальная гипертензия и дислипидемия с относительно невысоким уровнем атерогенных липидов. Наиболее частой причиной госпитализации стала нестабильная стенокардия, половина пациентов имела длительный анамнез ишемической болезни сердца (ИБС). Предшествующий прием дезагрегантной и гиполипидемической терапии был отмечен более чем у половины пациентов. В период госпитализации все получили оптимальную медикаментозную терапию. Через 3 месяца после выписки из стацио-

Таблица 2. Изменение концентраций церамидов с течением времени

Table 2. Changes in ceramide concentrations over time

Временной интервал	Cer(d18:1/16:0), мкг/мл	Cer(d18:1/18:0), мкг/мл	Cer(d18:1/24:0), мкг/мл	Cer(d18:1/24:1), мкг/мл
При поступлении в стационар	449,5 [321,3; 574,4]	262,9 [213,6; 318,3]	4977,3 [4021,4; 6461,7]	2813,7 [2245,3; 3728,9]
На третьи сутки лечения	431,8 [331,7; 535,7]	258,8 [215,6; 317,8]	4222,1 [3310,6; 5293,1]	2710,3 [2136,9; 3518,3]
Через 3 месяца после выписки	392,0 [295,0; 466,8]	217,6 [182,7; 249,2]	3743,7 [3082,5; 4598,7]	2202,1 [1656,6; 3062,2]
p	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

нара более 90 % пациентов была рекомендована интенсификация гиполипидемической терапии.

Динамика концентраций церамидов представлена в таблице 2.

Пик концентраций всех церамидов приходился на момент поступления в стационар с последующим снижением к третьим суткам стационарного лечения и третьему месяцу наблюдения.

Особенности концентраций церамидов в зависимости от параметров пациентов представлены в таблице 3. Дебют заболевания с ОКС сопровождался более высокими значениями Cer(d18:1/16:0) и Cer(d18:1/24:0) по сравнению с длительно текущим анамнезом ИБС. Концентрация Cer(d18:1/16:0) была выше у пациентов с ИМпST по сравнению с больными с ИМбпST и нестабильной стенокардией. Уровень Cer(d18:1/24:0) был выше у лиц с ИМпST, чем у пациентов с нестабильной стенокардией и ИМбпST. Затяжной ангинозный приступ был ассоциирован с более высоким значением Cer(d18:1/16:0) по сравнению с длительностью болевого синдрома менее 30 минут. Наличие отягощенного наследственного анамнеза по сердечно-сосудистым заболеваниям (ССЗ) характеризовалось более высоким уровнем Cer(d18:1/18:0) по сравнению с его отсутствием. У лиц с предшествующей терапией статинами уровень Cer(d18:1/16:0) и Cer(d18:1/24:0) был ниже по сравнению со статин-наивными пациентами. Кроме того, больные с длительным приемом дезагрегантной терапии также имели более низкий уровень Cer(d18:1/24:0) в сравнении с дезагрегант-наивными пациентами. Сопутствующий диагноз фибрилляции предсердий (ФП) ассоциировался с более низким значением Cer(d18:1/24:0) по сравнению с показателем у больных без ФП.

По мере увеличения возраста отмечалось снижение концентрации Cer(d18:1/24:0) (коэффициент

корреляции -0,228, $p = 0,016$). При поступлении в стационар уровень Cer(d18:1/16:0) имел слабую ассоциацию с уровнем высокочувствительного тропонина I (коэффициент корреляции 0,200, $p = 0,036$), что также было отмечено на третьи сутки стационарного лечения (коэффициент корреляции 0,272, $p = 0,004$). Помимо этого, была выявлена слабая ассоциация между значениями Cer(d18:1/18:0) и общего холестерина (ОХС) (коэффициент корреляции 0,189, $p = 0,048$), холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС нЛВП) (коэффициент корреляции 0,189, $p = 0,048$), триглицеридов (коэффициент корреляции 0,219, $p = 0,022$). Также была определена умеренная ассоциация между концентрациями Cer(d18:1/24:0) и ОХС (коэффициент корреляции 0,354, $p < 0,001$), ХС нЛВП (коэффициент корреляции 0,359, $p < 0,001$), холестерином липопротеидов низкой плотности (ХС ЛНП) (коэффициент корреляции 0,310, $p = 0,001$), холестерином липопротеидов очень низкой плотности (коэффициент корреляции 0,261, $p = 0,006$), триглицеридами (коэффициент корреляции 0,277, $p = 0,003$). Через 3 месяца после выписки сохранялась умеренная ассоциация между уровнями Cer(d18:1/24:0) и ОХС (коэффициент корреляции 0,312, $p = 0,001$), ХС нЛВП (коэффициент корреляции 0,310, $p = 0,001$), ХС ЛНП (коэффициент корреляции 0,221, $p = 0,021$). Кроме того, отмечена слабая ассоциация значений Cer(d18:1/24:1) с ОХС (коэффициент корреляции 0,215, $p = 0,025$), а снижение Cer(d18:1/24:1) ассоциировалось с увеличением расчетной скорости клубочковой фильтрации (коэффициент корреляции -0,200, $p = 0,037$).

Обсуждение

Потенциал церамидов в прогнозировании риска крупных сердечно-сосудистых событий у пациентов с АССЗ представлен в ряде исследований [3–5],

Таблица 3. Плазменный уровень церамидов в зависимости от демографических и клинико-анамнестических параметров пациентов с ОКС

Table 3. Plasma ceramide levels in relation to demographic, clinical and anamnestic parameters of patients with acute coronary syndrome

Параметр	Cer (d18:1/16:0), мкг/мл	Cer (d18:1/18:0), мкг/мл	Cer (d18:1/24:0), мкг/мл	Cer (d18:1/24:1), мкг/мл
Пол				
Мужской (n = 71)	435,4 [309,7; 572,5]	261,3 [214,9; 312,0]	4895,9 [3991,1; 6646,5]	2701,2 [2173,4; 3828,5]
Женский (n = 39)	484,1 [320,4; 594,0]	270,8 [209,7; 372,5]	5058,6 [4085,8; 6312,0]	2890,7 [2482,1; 3680,0]
p	0,285	0,522	0,977	0,415
Дебют заболевания				
Впервые ОКС (n = 48)	487,2 [370,3; 650,2]	278,4 [221,3; 349,4]	6070,5 [4476,5; 7516,6]	2856,0 [2304,1; 3816,6]
Дестабилизация длительно текущего анамнеза ИБС (n = 62)	392,9 [307,2; 564,6]	257,9 [207,8; 304,6]	4609,6 [3754,2; 5726,9]	2656,1 [2191,6; 3611,4]
p	0,004	0,100	0,001	0,360
Тип ОКС				
Нестабильная стенокардия (n = 56)	396,4 [303,2; 515,3]	259,2 [214,2; 308,8]	4732,3 [3993,3; 5991,0]	2580,6 [2261,2; 3409,5]
ИМбпST (n = 15)	484,1 [376,7; 591,3]	301,9 [217,2; 372,5]	4406,8 [3069,6; 6312,0]	3016,4 [2240,5; 3745,2]
ИМпST (n = 39)	502,1 [337,5; 667,3]	264,2 [194,1; 342,9]	6064,8 [4449,1; 7998,0]	2821,3 [2189,5; 4131,8]
p	0,002	0,420	0,003	0,213
Длительность болевого синдрома				
До 15 минут (n = 42)	360,4 [302,0; 503,6]	261,8 [213,1; 313,1]	4664,9 [3900,5; 6268,2]	2643,4 [2328,6; 3485,7]
До 30 минут (n = 19)	481,5 [309,3; 572,5]	270,8 [179,0; 302,5]	5538,7 [4286,3; 6960,6]	3016,4 [2173,4; 5136,3]
Более 30 минут (n = 49)	516,0 [382,7; 645,2]	262,2 [210,0; 353,6]	5110,1 [3944,3; 7219,9]	3016,4 [2173,4; 5136,3]
p	0,014	0,989	0,297	0,265
Время обращения в стационар				
До 24 часов (n = 49)	448,5 [334,2; 626,6]	252,1 [202,9; 294,9]	4882,7 [4058,4; 6624,8]	2890,7 [2219,8; 3864,7]
После 24 часов (n = 61)	450,4 [309,3; 566,5]	275,3 [216,2; 333,0]	5143,7 [3970,9; 6446,9]	2591,3 [2238,3; 3637,9]
p	0,178	0,096	0,962	0,578
Отягощенный наследственный анамнез по ССЗ				
Наличие (n = 53)	484,1 [336,9; 599,3]	277,5 [215,4; 356,3]	5470,2 [4179,0; 6938,2]	2701,2 [2277,2; 3764,7]

Отсутствие (n = 57)	440,5 [307,2; 565,9]	256,2 [210,3; 288,0]	4715,0 [3700,9; 6365,9]	2886,1 [2171,1; 3688,4]
p	0,168	0,038	0,053	0,695
Ожирение				
Наличие (n = 41)	444,1 [322,1; 573,0]	264,5 [216,2; 322,8]	5448,5 [4042,9; 6605,2]	2926,1 [2253,3; 3864,7]
Отсутствие (n = 69)	464,7 [309,6; 587,2]	259,0 [204,7; 310,7]	4753,7 [3919,7; 6394,3]	2705,5 [2208,0; 3669,3]
p	0,769	0,243	0,549	0,518
Сахарный диабет				
Наличие (n = 33)	450,9 [336,6; 542,0]	262,2 [211,8; 346,4]	5106,5 [4306,0; 6531,9]	3034,3 [2307,9; 3782,6]
Отсутствие (n = 77)	448,5 [308,6; 587,2]	263,5 [212,2; 309,3]	4895,9 [3752,9; 6499,0]	2701,2 [2208,0; 3627,1]
p	0,914	0,722	0,607	0,451
Курение в анамнезе				
Да (n = 71)	440,5 [309,7; 571,1]	262,2 [213,8; 312,0]	5178,6 [4241,1; 6822,7]	2606,6 [2173,4; 3781,0]
Нет (n = 39)	472,6 [337,5; 639,1]	264,5 [210,8; 355,5]	4618,5 [3649,3; 5938,0]	2902,1 [2358,4; 3680,0]
p	0,445	0,874	0,791	0,050
Соблюдение диеты				
Да (n = 14)	471,3 [292,7; 611,4]	259,2 [173,2; 299,1]	5621,2 [4774,3; 7102,7]	3203,8 [2289,9; 5147,0]
Нет (n = 96)	446,3 [329,5; 581,3]	263,9 [214,1; 322,2]	4818,8 [3904,2; 6405,2]	2813,7 [2222,9; 3591,3]
p	0,854	0,457	0,121	0,425
Физическая активность				
Регулярная (n = 25)	450,9 [306,7; 638,3]	239,7 [153,5; 341,0]	5585,7 [3664,0; 7126,1]	2821,3 [2219,8; 4515,6]
Гиподинамия (n = 85)	448,5 [326,4; 566,6]	264,5 [214,5; 317,7]	4884,2 [4042,9; 6337,6]	2705,5 [2238,3; 3669,3]
p	0,983	0,264	0,630	0,729
Фибрилляция предсердий				
Наличие (n = 23)	435,4 [350,9; 590,8]	228,6 [205,1; 363,5]	4406,8 [3385,3; 5471,9]	2982,3 [2240,0; 3595,7]
Отсутствие (n = 87)	464,7 [309,7; 574,7]	264,5 [217,2; 316,4]	5178,6 [4286,3; 6822,7]	2606,6 [2217,0; 3781,0]
p	0,730	0,471	0,047	0,478
Хроническая болезнь почек				
Наличие (n = 16)	506,9 [379,7; 591,2]	258,8 [182,3; 364,7]	4994,6 [4444,5; 6383,4]	2997,3 [2296,9; 3830,8]
Отсутствие (n = 94)	442,6 [309,6; 573,8]	264,4 [214,6; 317,0]	4977,3 [3935,1; 6532,0]	2801,7 [2212,5; 3611,4]

p	0,278	0,647	0,861	0,342
Хроническая сердечная недостаточность				
Наличие (n = 34)	463,2 [323,7; 596,7]	257,6 [213,7; 322,9]	5460,2 [4536,6; 6786,2]	2809,3 [2185,5; 3906,6]
Отсутствие (n = 76)	447,3 [312,5; 572,9]	267,7 [210,0; 320,3]	4818,0 [3784,8; 6350,3]	2846,1 [2245,3; 3674,6]
p	0,681	0,771	0,205	0,872
Объем поражения коронарного русла				
Однососудистое (n = 37)	434,3 [308,3; 571,5]	258,7 [207,8; 317,5]	5126,9 [3997,7; 6690,6]	2846,6 [2244,4; 3793,6]
Двухсосудистое (n = 46)	477,1 [330,4; 639,4]	269,9 [218,3; 352,6]	4895,6 [4075,3; 7044,9]	3021,7 [2259,6; 3835,7]
Трехсосудистое (n = 27)	398,8 [323,8; 530,3]	264,2 [192,1; 310,9]	4618,5 [3755,6; 6076,2]	2407,6 [2197,7; 2978,2]
p	0,195	0,540	0,375	0,164
Медикаментозная терапия				
Статин-наивные пациенты (n = 45)	521,9 [361,4; 641,4]	274,5 [205,8; 342,0]	6076,2 [4256,9; 7798,6]	2890,7 [2208,0; 3839,4]
Пациенты с длительным приемом статинов (n = 65)	403,5 [308,6; 514,5]	259,3 [213,7; 307,3]	4711,2 [3853,1; 6001,4]	2606,6 [2250,0; 3637,9]
p	0,012	0,903	0,003	0,607
Дезагрегант-наивные пациенты (n = 26)	424,3 [309,6; 610,9]	263,9 [179,0; 305,1]	5932,0 [4339,1; 8473,2]	2848,4 [1904,2; 4060,6]
Пациенты с длительным приемом дезагрегантов (n = 84)	450,7 [329,5; 574,4]	261,8 [215,0; 322,2]	4818,8 [3904,2; 6350,3]	2763,4 [2260,7; 3658,9]
p	0,530	0,408	0,022	0,844

Примечание: ИБС — ишемическая болезнь сердца, ИМбпST — инфаркт миокарда без подъема сегмента ST, ИМпST — инфаркт миокарда с подъемом сегмента ST, ОКС — острый коронарный синдром.

Note: ACS — acute coronary syndrome, CAD — coronary artery disease, NSTEMI — non-ST-elevation myocardial infarction, STEMI — ST-elevation myocardial infarction.

однако полученные данные основываются преимущественно на результатах однократного исследования их уровня. Для более точного понимания имеют значение не только концентрации метаболитов, но и их динамика в ходе проспективного наблюдения [8]. В настоящем исследовании был проведен трехкратный забор биообразцов, по результатам которого выявлен наиболее высокий уровень церамидов при поступлении в стационар с небольшим снижением к третьим суткам стационарного лечения и более выраженным снижением к третьему месяцу наблюдения. Поиск научных трудов, посвященных изучению динамики уровня церамидов у пациентов

с ОКС, привел к немногочисленным результатам. Так, в исследовании L. P. de Carvalho и соавторов (2018) [9], включившем 456 пациентов с острым инфарктом миокарда, показано, что наиболее высокий уровень восьми церамидов был зарегистрирован до проведения коронарной ангиографии, в последующем он снижался ко вторым суткам наблюдения. В работе J. Burrello и коллег (2020) [10] также продемонстрированы более высокие концентрации церамидов до осуществления чрескожного коронарного вмешательства, снижение которых отмечалось ко второму дню исследования. Полученные нами результаты согласуются и дополняют опубликованные

данные. Пик концентрации липидных метаболитов на момент поступления в стационар возможно связан с каскадом реакций при ОКС, каждый из которых имеет определенную ассоциацию с церамидами. Предполагается, что, будучи потенциальными предикторами развития крупных сердечно-сосудистых событий, Cer(d18:1/16:0) может быть ассоциирован с тромботическим путем, Cer(d18:1/18:0) — с воспалительным, а Cer(d18:1/24:1) — с липидным [11]. Роль Cer(d18:1/24:0) остается противоречивой: по результатам некоторых исследований отсутствует связь с развитием неблагоприятных событий [12], однако в ряде работ предполагается, что повышение его уровня может быть ассоциировано со снижением риска сердечно-сосудистых событий [5].

Определенные виды церамидов по-разному могут быть ассоциированы с клинико-демографическими параметрами у пациентов с ОКС. Несмотря на известные паттерны нарастания уровня церамидов в плазме крови с увеличением возраста в различных популяциях пациентов [2], в исследуемой нами выборке выявлена обратная ассоциация между возрастом и уровнем Cer(d18:1/24:0), которая может быть обусловлена снижением предполагаемых «кардиозащитных» свойств данного церамида с увеличением возраста пациентов.

По результатам настоящего исследования выявлено, что концентрации Cer(d18:1/16:0) и Cer(d18:1/24:0) были выше у пациентов с ИМпST по сравнению с больными с ИМбпST и нестабильной стенокардией. В исследовании С. Ту и соавторов (2020) [13] продемонстрированы аналогичные данные, где пациенты с инфарктом миокарда имели более высокие значения церамидов в сравнении с лицами с нестабильной стенокардией. Полученные данные позволяют предположить, что церамиды по-разному могут быть связаны с фенотипами ОКС и иметь определенную ассоциацию в зависимости от степени ишемии миокарда.

В исследуемой популяции пациентов лица с сопутствующим диагнозом ФП имели более низкий уровень Cer(d18:1/24:0) по сравнению с больными без ФП. Принимая во внимание влияние церамидов на процессы ремоделирования предсердий и предполагаемое антиапоптотическое действие Cer(d18:1/24:0) [14], снижение его уровня среди пациентов с ФП имеет научное обоснование.

Различная сила корреляционных связей церамидов с показателями липидного спектра и высокочувствительным тропонином I продемонстрирована в ряде исследований [15, 16], однако, отличительной особенностью нашей работы является представление данных об их тесной взаимос-

вязи как в период острого состояния, так и в относительно стабильных условиях после выписки из стационара. Но, невзирая на данные об этих корреляциях, предполагается, что церамиды плазмы крови обладают высокой прогностической ценностью, несмотря на традиционные предикторы риска [5].

Полученное снижение уровня Cer(d18:1/24:0) на фоне длительного приема дезагрегантной терапии согласуется с опубликованными данными [17] и может быть обусловлено потенциальным нарушением обмена сфинголипидов на фоне проводимой терапии [18]. В отношении влияния гиполипидемической терапии на уровень церамидов представлены различные позиции, что подчеркивает важность изучения данного вопроса. В настоящем исследовании выявлено, что больные с предшествующей терапией статинами имели более низкие значения Cer(d18:1/16:0) и Cer(d18:1/24:0) по сравнению со статин-наивными пациентами, что находит свое подтверждение в работе К. Tarasov и коллег (2014) [19], продемонстрировавших снижение уровня Cer(d18:1/16:0) и Cer(d18:1/24:0) как на фоне монотерапии симвастатином (40 мг), так и в комбинации с эзетимибом, а также в результатах исследования по дозозависимому эффекту розувастатина [20] и высокоинтенсивной терапии статинами в комбинации с ингибиторами PCSK9 [21]. Полученные нами данные вносят дополнительный вклад в представление о возможном влиянии статинов на уровень церамидов.

Насколько нам известно, в рамках проведенного исследования среди пациентов с ОКС впервые представлены данные об уровнях Cer(d18:1/16:0) и Cer(d18:1/24:0) в зависимости от дебюта заболевания, концентрации Cer(d18:1/16:0) в зависимости от длительности ангинозного приступа и уровне Cer(d18:1/18:0) в зависимости от наличия отягощенного наследственного анамнеза по ССЗ, что дает новую информацию об особенностях уровней церамидов с изучаемыми параметрами.

Таким образом, полученные данные о динамике церамидов у пациентов с ОКС согласуются с известными представлениями об изменении их уровня с течением времени. Продemonстрированы дополнительные сведения об особенностях концентрации церамидов в зависимости от клинико-анамнестических параметров пациентов с ОКС.

Ограничения исследования

Исследование имеет несколько ограничений: одноцентровой характер, небольшой объем выборки, анализ ассоциации церамидов с клинико-анамнестическими параметрами в общей группе

пациентов с ОКС без подразделения на его типы, отсутствие данных об ассоциации церамидов с крупными сердечно-сосудистыми событиями.

Заключение

Полученные результаты изменения концентрации церамидов с течением времени и особенности их ассоциации с клинико-анамнестическими параметрами пациентов с ОКС расширяют представление о значимости этих липидных метаболитов в аспекте острых АССЗ.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Благодарности / Acknowledgements

Авторский коллектив выражает благодарность Прохорихину А. А., к.м.н., научному сотруднику НИИ интервенционной хирургии, врачу по рентгенэндоваскулярной диагностике и лечению отделения рентгенохирургических методов диагностики и лечения ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России за помощь во включении пациентов в исследование, а также Кривошеиной М. И. и Мигуновой М. А., лаборантам-исследователям НИИ метаболомного и метаболического профилирования НЦМУ «Центр персонализированной медицины», ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, за участие в пробоподготовке и обработке биообразцов. / The authors would like to thank A. A. Prokhorikhin, PhD, Research Associate of the Research Laboratory of Interventional Surgery, doctor of X-ray endovascular diagnostics and treatment of the Department of X-ray surgical methods of diagnostics and treatment of Almazov National Medical Research Centre or his help in including patients in the study, and M. I. Krivosheina and M. A. Migunova, research laboratory assistants of the Research Laboratory of Metabolomic and Metabolic Profiling at the World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Almazov National Medical Research Centre, for their participation in sample preparation and processing of biosamples.

Финансирование / Funding

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2022-301 от 20.04.2022). / This work was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2022-301).

Список литературы / References

1. Usova EI, Alieva AS, Yakovlev AN, et al. Integrative Analysis of Multi-Omics and Genetic Approaches-A New Level in Atherosclerotic Cardiovascular Risk Prediction. *Biomolecules*. 2021;11(11):1597. DOI: 10.3390/biom11111597.
2. McGurk KA, Keavney BD, Nicolaou A. Circulating ceramides as biomarkers of cardiovascular disease: Evidence from phenotypic and genomic studies. *Atherosclerosis*. 2021;327:18–30. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2021.04.021.
3. Cheng JM, Suoniemi M, Kardys I, et al. Plasma concentrations of molecular lipid species in relation to coronary plaque characteristics and cardiovascular outcome: Results of the ATHEROREMO-IVUS study. *Atherosclerosis*. 2015;243(2):560–6. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.10.022.
4. Meeusen JW, Donato LJ, Kopecky SL, et al. Ceramides improve atherosclerotic cardiovascular disease risk assessment beyond standard risk factors. *Clin Chim Acta*. 2020;511:138–142. DOI: 10.1016/j.cca.2020.10.005.
5. Laaksonen R, Ekroos K, Sysi-Aho M, et al. Plasma ceramides predict cardiovascular death in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes beyond LDL-cholesterol. *Eur Heart J*. 2016;37(25):1967–76. DOI: 10.1093/eurheartj/ehw148.
6. Usova EI, Malishevskii LM, Alieva AS, et al. Analysis of predictors of recurrent acute cardiovascular events in patients with acute coronary syndrome. *Russian Journal of Cardiology*. 2024;29(6):5881. In Russian [Усова Е.И., Малишевский Л.М., Алиева А.С. и др. Анализ предикторов риска развития повторных острых сердечно-сосудистых событий у пациентов с острым коронарным синдромом. *Российский кардиологический журнал*. 2024;29(6):5881]. DOI: 10.15829/1560-4071-2024-5881.
7. Eggers LF, Schwudke D. Liquid Extraction: Folch. *Encyclopedia of Lipidomics*, 2016; 1–6. DOI:10.1007/978-94-007-7864-1_89-1.
8. Tan SH, Koh HWL, Chua JY, et al. Variability of the Plasma Lipidome and Subclinical Coronary Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2022;42(1):100–112. DOI: 10.1161/ATVBAHA.121.316847.
9. de Carvalho LP, Tan SH, Ow GS, et al. Plasma Ceramides as Prognostic Biomarkers and Their Arterial and Myocardial Tissue Correlates in Acute Myocardial Infarction. *JACC Basic Transl Sci*. 2018;3(2):163–175. DOI: 10.1016/j.jacbts.2017.12.005.
10. Burrello J, Biemmi V, Dei Cas M, et al. Sphingolipid composition of circulating extracellular vesicles after myocardial ischemia. *Sci Rep*. 2020;10(1):16182. DOI: 10.1038/s41598-020-73411-7.
11. Akhiyat N, Vasile V, Ahmad A, et al. Plasma Ceramide Levels Are Elevated in Patients With Early

Coronary Atherosclerosis and Endothelial Dysfunction. *J Am Heart Assoc.* 2022;11(7):e022852. DOI: 10.1161/JAHA.121.022852.

12. Meeusen JW, Donato LJ, Bryant SC, et al. Plasma Ceramides. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38(8):1933–1939. DOI: 10.1161/ATVBAHA.118.311199.

13. Tu C, Xie L, Wang Z, et al. Association between ceramides and coronary artery stenosis in patients with coronary artery disease. *Lipids Health Dis.* 2020;19(1):151. DOI: 10.1186/s12944-020-01329-0.

14. Jensen PN, Fretts AM, Hoofnagle AN, et al. Plasma Ceramides and Sphingomyelins in Relation to Atrial Fibrillation Risk: The Cardiovascular Health Study. *J Am Heart Assoc.* 2020;9(4):e012853. DOI: 10.1161/JAHA.119.012853.

15. Gencer B, Morrow DA, Braunwald E, et al. Plasma ceramide and phospholipid-based risk score and the risk of cardiovascular death in patients after acute coronary syndrome. *Eur J Prev Cardiol.* 2022;29(6):895–902. DOI: 10.1093/eurjpc/zwaa143.

16. Li F, Li D, Yu J, et al. Association Between Plasma Ceramides and One-Year Mortality in Patients with Acute Coronary Syndrome: Insight from the PEACP Study. *Clin Interv Aging.* 2023;18:571–584. DOI: 10.2147/CIA.S402253.

17. Gaggini M, Michelucci E, Ndreu R, et al. Lipidomic Analysis to Assess the Correlation between Ceramides, Stress Hyperglycemia, and HbA1c in Acute Myocardial Infarction. *Molecules.* 2023;28(2):716. DOI: 10.3390/molecules28020716.

18. Knapp M, Lisowska A, Knapp P, Baranowski M. Dose-dependent effect of aspirin on the level of sphingolipids in human blood. *Adv Med Sci.* 2013;58(2):274–81. DOI: 10.2478/ams-2013-0021.

19. Tarasov K, Ekroos K, Suoniemi M, et al. Molecular lipids identify cardiovascular risk and are efficiently lowered by simvastatin and PCSK9 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(1):E45–52. DOI: 10.1210/jc.2013-2559.

20. Ng TW, Ooi EM, Watts GF, et al. Dose-dependent effects of rosuvastatin on the plasma sphingolipidome and phospholipidome in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(11):e2335–40. DOI: 10.1210/jc.2014-1665.

21. Ye Q, Svatikova A, Meeusen JW, et al. Effect of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Inhibitors on Plasma Ceramide Levels. *Am J Cardiol.* 2020;128:163–167. DOI: 10.1016/j.amjcard.2020.04.052.

Информация об авторах:

Усова Елена Ивановна, врач-кардиолог, аспирант кафедры кардиологии факультета послевузовского и дополнительного образования Института медицинского образования, младший научный сотрудник НИЛ нарушений липидного обмена и атеросклероза НЦМУ «Центр

персонализированной медицины», ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Малишевский Лев Михайлович, аспирант кафедры сердечно-сосудистой хирургии факультета послевузовского и дополнительного образования Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Алиева Асият Сайгидовна, врач-кардиолог, к.м.н., заведующий НИЛ нарушений липидного обмена и атеросклероза НЦМУ «Центр персонализированной медицины», руководитель Центра атеросклероза и нарушений липидного обмена, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Макарова Таяна Алексеевна, врач — клинический фармаколог, аспирант кафедры кардиологии факультета послевузовского и дополнительного образования Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Мурашко Екатерина Александровна, к.х.н., заведующий НИЛ метаболомного и метаболического профилирования НИЦ неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины», ассистент кафедры математики и естественнонаучных дисциплин Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Кессених Елизавета Дмитриевна, научный сотрудник НИЛ метаболомного и метаболического профилирования НИЦ неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины», аспирант кафедры клеточной биологии и гистологии лечебного факультета Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Трусов Сергей Николаевич, к.фарм.н., химик-аналитик ЦКДЛ ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Алиева Мадина Сайгидовна, врач — анестезиолог-реаниматолог ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Яковлев Алексей Николаевич, к.м.н., начальник службы по развитию регионального здравоохранения Управления по реализации федеральных проектов, заведующий НИЛ технологий прогнозирования риска развития сердечно-сосудистых осложнений НЦМУ «Центр персонализированной медицины», ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Конради Александра Олеговна, д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий НИО артериальной гипертензии, заведующий кафедрой организации управления и экономики здравоохранения Института медицинского образования, заместитель генерального директора по научной работе ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Authors information:

Elena I. Usova, MD, postgraduate student of the Department of Cardiology, Faculty of Postgraduate and Additional Education, Institute of Medical Education, junior researcher, research laboratory of lipid disorders and atherosclerosis World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Almazov National Medical Research Centre;

Lev M. Malishevskii, postgraduate student of the Department of Cardiovascular Surgery, Faculty of Postgraduate and Additional Education, Institute of Medical Education, Almazov National Medical Research Centre;

Asiiat S. Alieva, MD, PhD, Head of laboratory of lipid disorders and atherosclerosis WCRC for Personalized Medicine, Head of the Center for Atherosclerosis and Lipid Disorders, Almazov National Medical Research Centre;

Taiana A. Makarova, clinical pharmacologist, postgraduate student of the Department of Cardiology, Faculty of Postgraduate and Additional Education, Institute of Medical Education, Almazov National Medical Research Centre;

Ekaterina A. Murashko, PhD, head of Laboratory of metabolomic and metabolic profiling, Research Centre of unknown, rare and genetically determined diseases, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, assistant at the Department of Mathematics and Natural Sciences, Institute of Medical Education, Almazov National Medical Research Centre;

Elizaveta D. Kessenikh, scientific researcher of Laboratory of metabolomic and metabolic profiling, Research Centre of unknown, rare and genetically determined diseases, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, postgraduate student of the Department of Cell Biology, Institute of Medical Education, Almazov National Medical Research Centre;

Sergey N. Trusov, PhD, analytical chemist of Clinical diagnostic laboratory of Almazov National Medical Research Centre;

Madina S. Alieva, anesthesiologist-intensive care specialist, Almazov National Medical Research Centre;

Alexey N. Yakovlev, MD, PhD, Head of the Healthcare Development Service at the division of the Federal projects implementation, Head of the Research Laboratory for Cardiovascular Risk Prediction Technologies World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Almazov National Medical Research Centre;

Alexandra O. Konradi, doctor of medical sciences, professor, RAS academician, Head of the Research Institute of Arterial Hypertension, Head of the Department of Organization of Management and Economics of Health Care, Institute of Medical Education, Deputy General Director for Research of Almazov National Medical Research Centre.

К ВОПРОСУ О НОВЫХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ВОЗМОЖНОСТЯХ КИССПЕПТИНА

Никитина И. Л., Капустина А. С., Леонова И. А., Байрамов А. А.

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

Контактная информация:

Леонова Ирина Александровна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: leonova_ia@mail.ru

Статья поступила в редакцию 19.07.2024
и принята к печати 22.08.2024.

Резюме

Вопросы оптимизации терапевтических возможностей в коррекции расстройств, связанных с нарушениями полового развития, репродуктивной системы, задержки старта пубертата, имеют высокую актуальность, так как в конечном счете данная группа патологий может негативно влиять на демографические показатели, связанные с рождаемостью, фертильностью и в целом с уровнем здоровья молодых людей. В настоящем обзоре представлены современные сведения о роли лиганд-рецепторной системы кисспептина KISS/KISS1R, открытие которой имело революционное значение для расшифровки генеза нейроэндокринной регуляции репродуктивной системы. Также приведен обзор и анализ исследований последних десятилетий о клинко-экспериментальных работах, направленных на изучение кисспептина и его агонистов как потенциальных терапевтических средств лечения ряда расстройств. Приведены данные о позитивном влиянии кисспептина на пульсаторную секрецию ГнРГ и гонадотропинов, что может быть использовано в лечении гипогонадотропного гипогонадизма, нарушений овуляции и других болезней репродуктивной системы. Также освещены данные о возможностях применения кисспептина в коррекции связанной с ожирением неалкогольной жировой болезни печени, остеопенических состояний, психосексуальных расстройств. Разработка аналогов кисспептина потенциально может решить некоторые фармакологические проблемы, возникающие при использовании природных форм кисспептина, хотя для реализации этого потенциала необходимы дальнейшие клинические испытания.

Ключевые слова: гипогонадизм, гонадотропин-рилизинг гормон, гонадотропины, кисспептин, пубертат, репродуктивная система.

Для цитирования: Никитина И.Л., Капустина А.С., Леонова И.А., Байрамов А.А. К вопросу о новых терапевтических возможностях кисспептина. Трансляционная медицина. 2024; 11(4): 324-333. DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-4-324-333. EDN: HUAJKZ

NOVEL THERAPEUTIC OPPORTUNITIES OF KISSPEPTIN

Irina L. Nikitina, Anna S. Kapustina, Irina A. Leonova,
Alekbber A. Bairamov

Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Irina A. Leonova,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.
E-mail: leonova_ia@mail.ru

Received 19 July 2024; accepted 22 August 2024.

Abstract

Diseases associated with disorders of sexual development, the reproductive system, delayed of puberty onset are of high relevance. This negatively affect the health of young people, the demographic indicators, fertility and require a search for therapy. This review presents current data on the role of the kisspeptin ligand-receptor system KISS/KISS1R, the discovery of which was of revolutionary significance for deciphering the genesis of neuroendocrine regulation of the reproductive system.

A review and analysis of clinical and experimental research from recent decades, aimed at studying kisspeptin and its agonists as a potential therapeutic approach. Data are presented on the positive effect of kisspeptin on the pulse secretion of GnRH and gonadotropins, which can be used in the treatment of hypogonadotropic hypogonadism, ovulation disorders and other diseases of the reproductive system. Outside the human hypothalamus, kisspeptin and its receptor are expressed in the brain in key limbic and paralimbic regions, and in peripheral tissues. We summarise data on the pharmacological use of kisspeptin in reproductive disorders and fertility treatment, as well as its putative utility in hypoactive sexual desire disorder, osteoporosis and non-alcoholic fatty liver disease, now known as metabolic dysfunction-associated fatty liver disease.

Key words: gonadotropin-releasing hormone, gonadotropins, hypogonadism, kisspeptin, puberty, reproductive system.

For citation: Nikitina IL, Kapustina AS, Leonova IA, Bairamov AA. Novel therapeutic opportunities of kisspeptin. Translational Medicine. 2024; 11(4): 324-333. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-4-324-333. EDN: HUAJKZ

Список сокращений: ГГГО — гипоталамо-гипофизарно-гонадная ось, ГнРГ — гонадотропин-рилизинг гормон, ЛГ — лютеинизирующий гормон, КП — кисспептин, НАЖБП — неалкогольная жировая болезнь печени.

Половое развитие и созревание человека является важной составляющей жизнедеятельности в целом, включает разные этапы, начиная с внутриутробного периода дифференцировки пола, и представляет собой переходный период между детством и половой зрелостью, включающей физические, психические и репродуктивные аспекты взросления организма. Процессы полового созревания

контролируются комплексом нейроэндокринных факторов, среди которых наиболее изученными являются иерархические взаимодействия внутри гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси (ГГГО), включающие прямые и обратные связи между уровнем половых стероидов, гонадотропных гормонов и гонадотропин-рилизинг гормоном (ГнРГ) [1–3]. В последние годы была сформулирована новая концепция старта пубертата, в основу которой легли результаты большого числа исследований в области молекулярно-генетической, эпигенетической и нейроэндокринной регуляции ГнРГ-секретирующей функции гипоталамуса [4–7]. Согласно современным представлениям, наиболее

важная роль в регуляции старта пубертата состоит в эпигенетическом контроле групп генов, обеспечивающих супрессию/активацию транссинаптического межнейронального сигналинга в пределах кисспептиновых нейронов, синхронизированных с нейронами системы KNDy (кисспептин, нейрокин В, динорфин), информация с которых поступает в ГнРГ-секретирующие нейроны гипоталамуса. В настоящее время идентифицированы 2 группы генов — Polycombgroup (PcG), транскрипционные ингибиторы, и Trithoraxgroup (TrxG), транскрипционные активаторы, которые подвергаются эпигенетическому контролю (гиперметилование ДНК, деацетилирование гистонов, некодируемые микроРНК и др.). В зависимости от характера эпигенетической информации преобладает действие супрессорной или активаторной группы генов на секреторные нейроны, продуцирующие кисспептин, который, в свою очередь, включается в межнейрональный сигналинг в синхронизации с продуктами системы KNDy, приводя в итоге к активации либо супрессии секреции ГнРГ ядрами преоптической зоны гипоталамуса [6–8] (рис. 1).

Таким образом, согласно современным представлениям, пубертат и половое созревание в целом являются следствием сложных многоэтапных иерархических взаимодействий продуктов транскрипционной активности ряда генов и последующей трансляции информационного сигналинга, опосредуемого нейромедиаторами, в пределах межнейрональных взаимодействий, в конечном счете направленных на активацию секреции ГнРГ нейросекреторными ядрами гипоталамуса, что в целом запускает последующие гонадотропин-зависимые эффекты полового развития подростка. С клинической точки зрения следует отметить, что возраст старта физиологического пубертата имеет значительные индивидуальные колебания (женский пол — с 8 до 13 лет; мужской пол — с 9 до 14 лет). К числу нормальных вариантов пубертата могут быть отнесены поздний возрастной старт с быстрой прогрессией либо, напротив, раннее начало с различными по темпам сценариями прогрессии и достижения половой зрелости. В ряде ситуаций представляется сложным провести дифференциацию между супрафизиологическими отклонения-

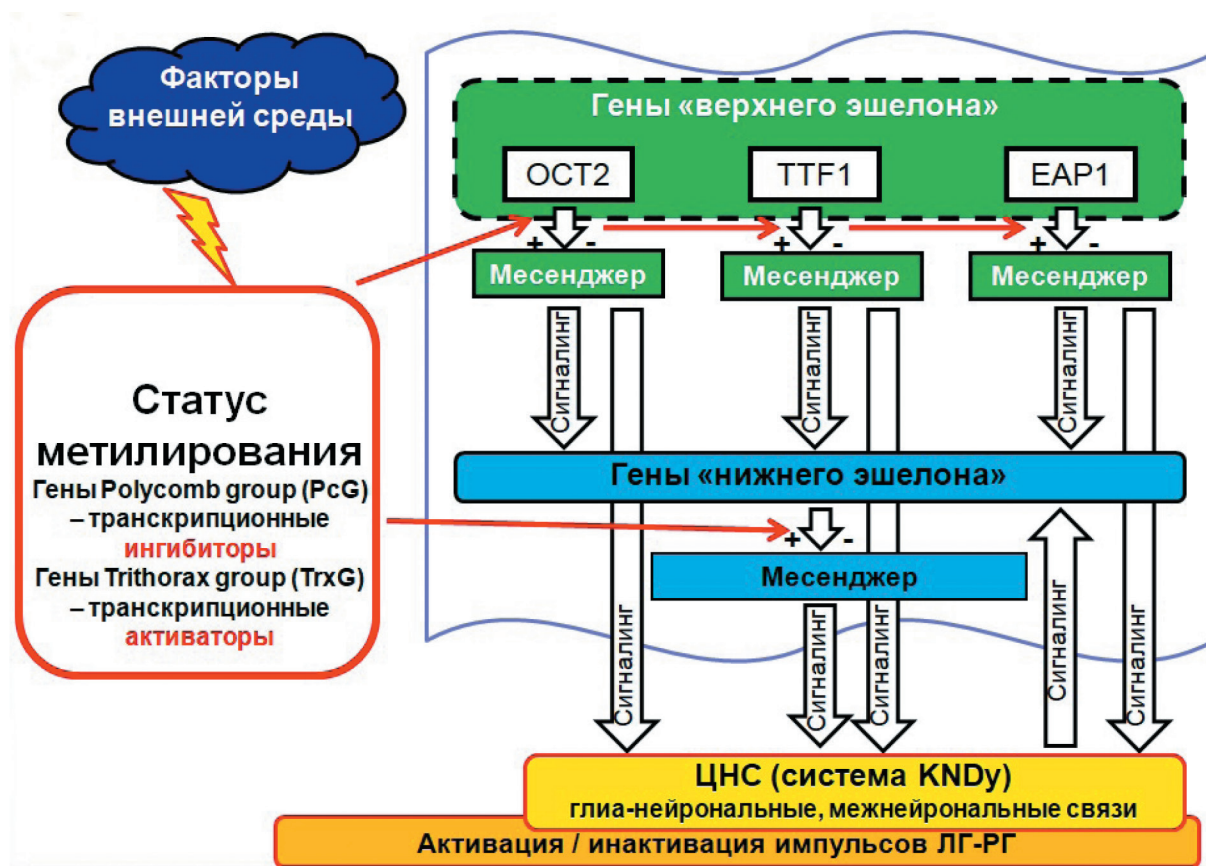


Рис. 1. Схема регуляции гонадной оси ([8], в модификации Никитиной И.Л.)

Figure 1. Gonadal axis regulation scheme ([8], modified by I. L. Nikitina)

ми в половом развитии с органическим гипогонадизмом, требующим принципиально иной тактики терапии. Для подростков и молодых взрослых речь идет, в первую очередь, о синдроме «позднего пубертата», отклонениях в установлении регулярного овуляторного менструального цикла, нарушениях фертильности и некоторых других состояниях, связанных с расстройствами репродуктивной системы и поиском путей их коррекции.

Учитывая роль нейропептидов в межнейрональном сигналинге, следует отдельно остановиться на роли лиганд-рецепторной системы кисспептина KISS/KISS1R, открытие которой имело революционное значение для расшифровки гена за нейроэндокринной регуляции репродуктивной системы. Система KISS/KISS1R включает ген кисспептина, который локализуется на длинном плече 1 хромосомы (1q32). Продуктом транскрипционной активности данного гена является гидрофобный белок (включающий 145 аминокислот), который может быть расщеплен в процессе протеолитического распада до белков с более низкой молекулярной массой — не теряющих биологической активности кисспептинов 54, 14, 13 и 10 (КП-54, КП-14, КП-13, КП-10). Рецептор кисспептина, в настоящее время обозначаемый KISS1R, является лигандом G-протеинового рецептора 54 (GPR54) (рис. 2).

Установлена локализация KISS1R в различных отделах ЦНС, с наиболее высокой представленно-

стью в перивентрикулярных и аркуатных ядрах гипоталамуса. В настоящее время кисспептины представляются ключевыми регуляторами секреции ГнРГ, однако осуществление эффективных глия-нейрональных и межнейрональных взаимодействий возможно только в коэкспрессии генов системы KNDy [5–8]. Результатом снижения кисспептинового сигналинга является задержка полового развития и гипогонадотропный гипогонадизм, в то время как активация его может привести к преждевременному половому развитию [9, 10].

Кисспептин и его рецептор, кроме гипоталамуса, экспрессируются в других отделах головного мозга: лимбической системе, таламусе, роstralных ядрах, а также в таких периферических тканях, как гонады, плацента, жировая и костная ткани [11]. Следовательно, кроме роли кисспептина как ключевого регулятора ГГГО, изучается влияние этого нейропептида в формировании полового поведения, эмоций, его участие в метаболизме, в том числе костной ткани, контроле беременности и ее осложнений [12–14]. Учитывая данные, полученные при изучении влияния кисспептина в вышеперечисленных регионах, логичной является гипотеза об использовании этой группы пептидов в качестве новых лекарственных средств. Исследование потенциальных терапевтических возможностей кисспептина представляется тем более актуальным, что существующие методы заместительной терапии центральных форм ги-

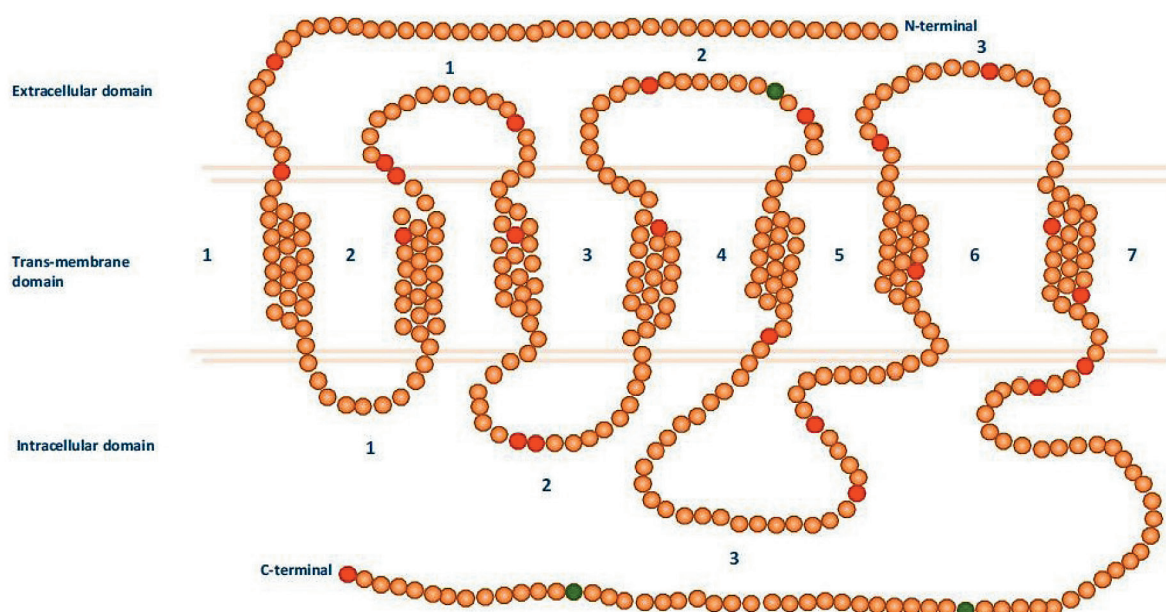


Рис. 2. Варианты рецептора кисспептина (KISS1R)

Figure 2. Variants of the kisspeptin receptor (KISS1R)

погонадизма, расстройств фертильности, а также возможности запуска старта пубертата при его конституциональной задержке ограничены или отсутствуют. В данной публикации мы приводим современные сведения, касающиеся результатов ряда исследований в этом направлении (рис. 3).

Клинические испытания кисспептина стартовали после достаточно обширных экспериментальных исследований на животных и первоначально проводились на группах здоровых добровольцев мужского и женского пола. Так, опубликованы исследования введения КП-54, КП-10, а также аналогов KISS1R, таких как TAK-683 и MVT-602, которые были недавно разработаны путем модификации КП-10 и так же, как кисспептин, имеют пептидную структуру. Сравнивались болюсное введение и непрерывная подкожная инфузия с титрацией дозы, а также проводилось сравнение эффектов нативного кисспептина и его аналогов [15, 16]. КП-10 показал хорошую эффективность *in vitro*, но считается, что он не проникает через гематоэнцефалический барьер и имеет более короткий период полураспада, чем КП-54 ($t_{1/2}$ 3 против 28 минут), из-за значительной ферментативной деградации, что делает его менее подходящим для болюсного введения [17]. Нативный КП-54 имел более длительный период полувыведения и индуцировал большее повышение лютеинизирующего гормона (ЛГ) *in vivo* после болюсного введения,

но его производство более дорогое из-за большей длины пептида. Введение экзогенного кисспептина в ряде исследований показало стимулирующее влияние на ГнРГ и ЛГ у здоровых мужчин и женщин, а также у пациентов с репродуктивными заболеваниями при использовании различных форм пептида кисспептина (КП-54, КП-10, КП-аналог), длительности, частоты (болюсная или непрерывная инфузия) и путей введения (центральный, подкожный, интраназальный или внутривенный) [17–22]. Подкожное введение КП-54 стимулировало секрецию гонадотропинов у здоровых женщин на протяжении всех фаз менструального цикла, но наибольшее повышение ЛГ наблюдалось в предовуляторную фазу [21–26]. Внутривенное введение КП-10 было наименее эффективным во время фолликулярной фазы менструального цикла и не вызывало гонадотропного ответа при подкожном введении [27, 28].

У здоровых мужчин как внутривенное болюсное введение, так и непрерывная инфузия КП-10 вызывали значительный ответ ЛГ, при этом последний поддерживал секрецию ЛГ в течение как минимум 22,5 часа [20, 25]. Острое и хроническое введение внутривенного КП-10 индуцировало повышение ЛГ у тучных мужчин с гипогонадизмом, связанным с диабетом, и здоровых пожилых мужчин, тем самым подчеркивая многообещающие терапевтические возможности использования

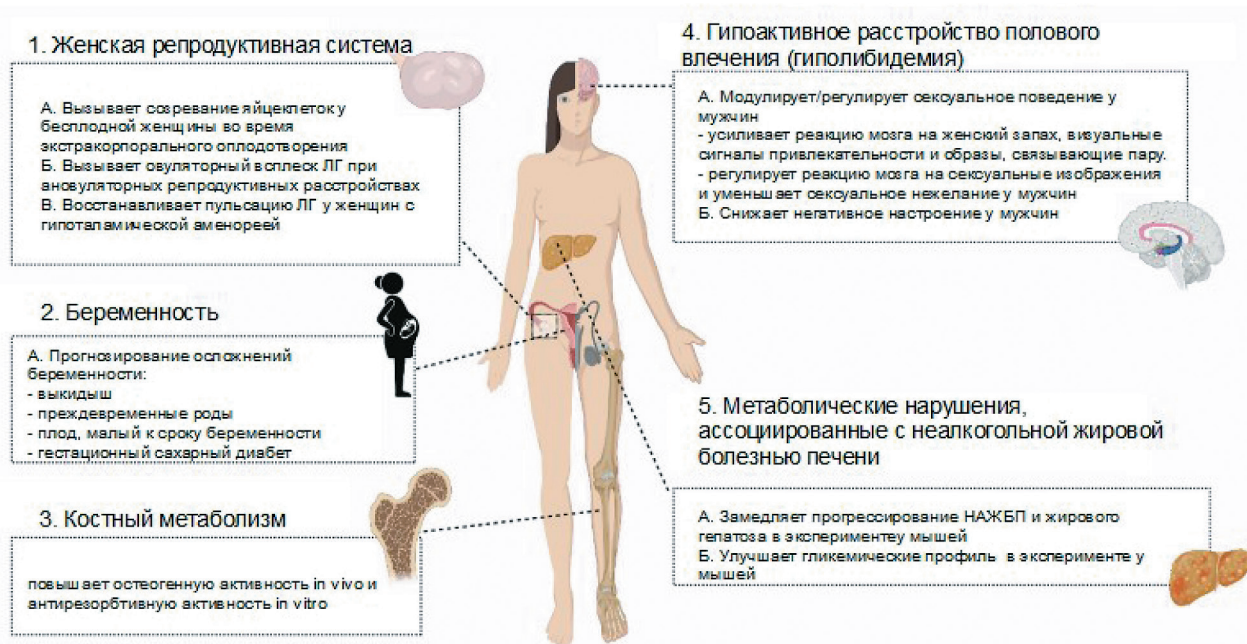


Рис. 3. Потенциальное применение кисспептина у людей

Figure 3. The potential ways of using kisspeptin in humans

кисспептина при мужском функциональном гипогонадизме, связанном с диабетом, ожирением или возрастом [29, 30]. Агонисты рецепторов KISS1R, такие как TAK-683 и MVT-602, которые были недавно разработаны путем модификации КП-10, обладают повышенной стабильностью и эффективностью, что позволяет обеспечить более экономичное производство пептидов. Недавно было показано, что агонисты рецепторов кисспептина, в том числе MVT-602 и TAK-683, значительно повышают секрецию ЛГ у мужчин и женщин [16, 31]. MVT-602, введенный во время фолликулярной фазы менструального цикла здоровым женщинам, вызывал аналогичную амплитуду ЛГ, что и КП-54, но приводил к более устойчивому подъему ЛГ с соответствующим увеличением площади под кривой повышения ЛГ [16]. Однако фармакокинетические свойства MVT-602 и KP-54 были сходными, что позволяет предположить, что более продолжительный эффект был связан с дифференциальной активацией рецептора кисспептина [16]. При исследовании *in vitro* на GnRH-нейронах мышей MVT-602 оказался более эффективным и вызывал более длительную активность GnRH-нейронов, чем КП-54 (115 против 55 минут) [16]. Важно отметить, что кисспептины применялись несколькими сотнями пациентов в разных исследовательских группах и в разных популяциях, но не были связаны с какими-либо побочными эффектами [15, 18–21, 32]. Исследования потенциала применения кисспептинов при репродуктивных расстройствах, особенно при бесплодии в циклах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), имеют перспективный характер, что связано с возможностью создания ЛГ-подобного действия для подготовки ооцитов к оплодотворению. Наиболее часто с этой целью используется хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), введение которого может иметь избыточный характер и приводить к синдрому гиперстимуляции яичников (СГЯ), повышению их секреции, повышению фактора роста эндотелия сосудов, что в некоторых случаях ведет к осложнениям со стороны функции почек, асциту и даже развитию критических состояний [33]. Новые данные позволяют предположить, что кисспептин является многообещающим средством для созревания ооцитов в рамках протоколов ЭКО. Однократное подкожное введение КП-54 вызывает выброс ЛГ, достаточный для созревания ооцитов у женщин, проходящих лечение методом ЭКО [34]. У женщин с высоким риском СГЯ КП-54 достигал показателя живорождения на одну передачу в 45 %, не вызывая какого-либо клинически значимого СГЯ [35]. Введение второй дозы КП-54 через

10 часов после первого длительного воздействия ЛГ приводило к повышению надежности индукции созревания ооцитов, но, что важно, без увеличения частоты клинически значимого СГЯ [36]. Более длительная продолжительность действия MVT-602 обеспечивала более точное воспроизведение физиологического всплеска ЛГ в середине цикла после минимального протокола стимуляции и представила собой желательный профиль ЛГ для индукции созревания ооцитов во время протокола ЭКО, но данный агонист KISS1R еще не проверен в клинических исследованиях [38]. В ретроспективном сравнении КП-54 снижал вероятность СГЯ в 33 раза по сравнению с ХГЧ [33]. Наконец, кисспептин явился потенциально лучшим выбором по сравнению с ХГЧ во время ЭКО, поскольку он также стимулирует выброс фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), тогда как ХГЧ обладает только ЛГ-подобной активностью [38].

Исследования последних лет показали терапевтический потенциал кисспептина при гипоталамической аменорее, которая может развиваться при низкой массе, хроническом стрессе при наличии генетической предрасположенности. Гипоталамическая аменорея характеризуется потерей физиологического пульсирующего характера секреции ГнРГ/ЛГ, что приводит к снижению развития фолликулов яичников, низкому уровню эстрадиола и ановуляции. Восстановление менструального цикла, даже при условии обратного развития причинных факторов, всегда является проблемным моментом, так как пульсаторная секреция ГнРГ не всегда подвергается полному обратному развитию. Введение КП-54 женщинам с гипоталамической аменореей увеличивало пульсацию ЛГ [16, 24, 39] и приводило к четырехкратному повышению ЛГ по сравнению со здоровыми женщинами [24, 26]. J. M. Castellano и соавторы объясняли данный феномен увеличением экспрессии KISS1R в гипоталамусе, как видно на модели недоедающих грызунов [40]. Однако при длительном применении два раза в день при подкожном введении кисспептина реакция ЛГ была заметно ослаблена к 14-му дню, что свидетельствовало о тахифилаксии, скорее всего, вследствие десенсибилизации рецептора кисспептина [24]. Увеличение интервала дозирования до двух раз в неделю позволило добиться стойкой стимуляции ЛГ в течение 8 недель [23]. Таким образом, феномен тахифилаксии, по-видимому, связан с частотой введения и дозой используемого КП-54, а также чувствительностью к этой дозе. С. N. Jayasena и коллеги заключили, что непрерывная внутривенная инфузия КП-54 в более низких дозах может использоваться в качестве альтерна-

тивного подхода для увеличения пульсирующей секреции ЛГ у женщин с гипоталамической аменореей, не вызывая тахифилаксии [39].

В исследовании G. Scott и соавторов были получены данные, что в ответ на введение агониста KISS1R TAK-683 в виде непрерывной подкожной инфузии происходило дозозависимое подавление секреции ЛГ и, как следствие, тестостерона, что было рекомендовано использовать при резистентных к хирургическому лечению вариантах рака предстательной железы [15].

Исследование лекарственных препаратов среди пациентов детского и подросткового возраста всегда затруднительно и требует особого контроля. Однако существуют работы по изучению влияния кисспептина у детей с задержкой полового развития, так как реализация процессов пубертата происходит среди именно этой возрастной группы.

Так, в исследовании S. B. Seminara и коллег подросткам с задержкой полового развития вводили кисспептин с последующим введением ГнРГ и наблюдали за изменением пульсаторной секреции ЛГ. Результаты были разноречивыми. Так, из 15 детей с задержкой полового созревания у 6 пациентов наблюдался хотя бы один спонтанный пульс ЛГ в течение ночи; у всех этих испытуемых была четкая реакция на кисспептин. Семь испытуемых не отреагировали на кисспептин, а у одного субъекта наблюдался промежуточный ответ. У детей, ответивших на кисспептин, гормональная секреция была сравнима со взрослыми. Также в ряде источников утверждается, что лица с идиопатическим гипогонадотропным гипогонадизмом не достигают полового созревания и не реагируют на физиологические дозы кисспептина [41].

В другом исследовании той же группы авторов в Университете Массачусетса (США) участвовали 16 детей (3 девочки и 13 мальчиков) с задержкой или остановкой полового созревания. Дети, прошедшие тесты на стимуляцию кисспептином и ГнРГ, наблюдались каждые 6 месяцев для выявления клинических признаков прогрессирования в период полового созревания. У всех участников, ответивших на введение кисспептина повышением уровня ЛГ на 0,8 мМЕ/мл или выше, впоследствии наступил спонтанный пубертат ($n = 8$). Те участники, у которых наблюдался ответ ЛГ на кисспептин $\leq 0,4$ мМЕ/мл, достигли возраста 18 лет без развития физических признаков полового созревания ($n = 8$). Сделано заключение, что уровень стимуляции ЛГ в ответ на кисспептин может дать прогноз в отношении перспективы спонтанного пубертата с достаточно высокой точностью ($p = 0,0002$). Более того, тест со стимуляцией кис-

спептином превзошел стимулированный ГнРГ ЛГ, ингибин В и генетическое тестирование в прогнозировании исходов полового созревания [42].

Группой исследователей, возглавляемых S. Seminara, проводится не завершенное в настоящее время одно из перспективных в данном направлении исследований, в котором участвуют мальчики (возраст 13,5–17 лет) и девочки (возраст 12–17 лет) с задержкой старта пубертата: определяется возможность стимуляции спонтанного старта пубертата на фоне введения кисспептина.

Рассматривая терапевтический потенциал кисспептинов и их агонистов, следует остановиться на исследованиях при метаболических болезнях, нарушениях костного метаболизма, психосексуальных расстройствах и половой дисфории. Метаболический статус является важным при оценке потенциала функциональной активности репродуктивной системы и полового развития. Известно, что ожирение является достаточно распространенной проблемой современности, с тенденцией к росту в группе детей и подростков [43]. Процессы периферического сигналинга жировой ткани и гормонов-регуляторов ГГТО находятся в тесном взаимодействии, при этом в условиях избытка жировой ткани эти процессы могут приобретать супрафизиологическое влияние. Метаболическое значение ожирения проявляется в развитии ряда коморбидных состояний, таких как сахарный диабет 2 типа, дислипидемия, неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП). Есть работы, показавшие, что у нокаутных по гену KISS1R мышей на диете с высоким содержанием жиров развился стеатоз печени, непереносимость глюкозы и резистентность к инсулину по сравнению с контрольной группой, получавшей диету с высоким содержанием жиров, у людей наблюдалось компенсаторное увеличение экспрессии KISS1/KISS1R в биоптатах печени при НАЖБП, а уровни циркулирующего кисспептина были увеличены у пациентов с НАЖБП по сравнению с больными диабетом 2 типа и здоровыми участниками. Таким образом, кисспептины потенциально могут использоваться для лечения или замедления прогрессирования НАЖБП, однако ожидаются дальнейшие трансляционные клинические исследования в этом направлении [13].

Психосексуальные расстройства затрагивают примерно каждого третьего человека в мире, оказывая пагубное воздействие на качество жизни, межличностные отношения и фертильность [44]. Недавние исследования на людях с использованием функциональной магнитно-резонансной томографии продемонстрировали, что кисспептин усиливает передачу сигналов в лимбических

и паралимбических областях человеческого мозга (миндалевидное тело, поясная извилина, базальные ганглии), а также в префронтальной коре в ответ на обонятельные и зрительные сигналы, связанные с полом. Соответственно, улучшение функций мозга, вызванное КП-54, произошло в большей степени у участников с более низкими исходными показателями вознаграждения и сексуальным качеством жизни. Таким образом, сделано заключение, что киспептин может способствовать усилению чувства влечения и сексуального влечения, а также может оказаться ценным терапевтическим средством для пациентов с сопутствующими репродуктивными и психосексуальными расстройствами [45, 46].

Что касается влияния на костный метаболизм, то есть данные, что у человека как киспептин, так и его рецептор экспрессируются в клетках фетальных остеобластов и образцах костей остеосаркомы, тогда как рецептор киспептина также обнаруживается в остеопредшественниках и скелетных стволовых клетках [47, 48]. Лечение киспептином *in vitro* повышало уровень щелочной фосфатазы в мезенхимальных стволовых клетках костного мозга человека на 41 % и ингибировало резорбтивную активность остеокластов до 53 % [12]. Острое введение КП-54 здоровым мужчинам увеличивало остеокальцин (маркер активности остеобластов) до 24 %, что сравнимо по величине с эффектами терипаратида [12, 49]. Однако требуются дальнейшие крупномасштабные клинические исследования в группах заболеваний с нарушенным обменом костной ткани, чтобы установить эффекты хронического применения киспептина и оценить его потенциал в отношении лечения остеопороза.

Таким образом, обобщая представленные данные, следует подчеркнуть, что киспептин действует через гипоталамус, стимулируя эндогенную секрецию ГнРГ и последующее высвобождение гонадотропинов. Экспрессия киспептина в гипоталамусе снижается при некоторых функциональных репродуктивных расстройствах, например, гиперпролактинемии, ожирении и гипогонадизме, связанном с недостаточным питанием. Следовательно, лечение таких состояний с помощью киспептина как средства заместительной терапии концептуально перспективно. Киспептин может иметь терапевтическую пользу в ряде клинических ситуаций, включая восстановление репродуктивного здоровья у женщин с гипоталамической аменореей, в качестве триггера созревания ооцитов во время протоколов ЭКО, в качестве лечения гипогонадотропного, в том числе возрастного, гипогонадизма у мужчин, при расстройствах, связанных

с задержкой старта пубертата у подростков обоего пола. Также возможные терапевтические показания могут рассматриваться при остеопорозе и НАЖБП, расстройствах влечения и половой дисфории в дальнейших клинических исследованиях.

Разработка аналогов киспептина потенциально может решить некоторые фармакологические проблемы, возникающие при использовании природных форм киспептина, хотя для реализации этого потенциала необходимы дальнейшие клинические испытания.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Финансирование / Funding

Обзор выполнен в рамках темы государственного задания № 056-00019-24-00 на 2024 год и на плановый период 2025 и 2026 годов «Оценка эффективности в эксперименте и доклинические исследования нового лекарственного препарата для лечения мужского гипогонадизма» (уникальный номер реестровой записи 720000Ф.99.1.БН62АБ09000). / The review was carried out within the framework of the topic of the state assignment № 056-00019-24-00 for 2024 and for the planning period of 2025 and 2026 «Experimental efficacy assessment and preclinical studies of a new drug for the treatment of male hypogonadism» (the unique number of the registry entry 720000Ф.99.1.БН62АБ09000).

Список литературы / References

1. Parent A-S, Teilmann G, Juul A, et al. The Timing of Normal Puberty and the Age Limits of Sexual Precocity: Variations around the World, Secular Trends, and Changes after Migration. *Endocrin Reviews*. 2003;24(5):668–693.
2. Dedov II, Peterkova VA. *Pediatric endocrinology*. M.: Universum Publishing, 2006. P. 600. In Russian [Дедов И.И., Петеркова В.А. Детская эндокринология. М.: Универсум Паблишинг, 2006. 600 с.].
3. Nikitina IL. *Pediatric endocrinology*. Rostov-on-Don: Phoenix, 2006. P. 224. In Russian [Никитина И.Л. Детская эндокринология. Ростов-на Дону: Феникс, 2006. 224 с.].
4. Abreu AP, Kaiser UB. Pubertal development and regulation. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2016; 4(3): 254–264. DOI: 10.1016/S2213-8587(15)00418-0.
5. Ojeda SR, Lomniczi A, Sandau U, et al. New concepts on the control of the onset of puberty. In Loche S, Cappa M, Ghizzoni L, et al. *Pediatric Neuroendocrinology: Endocr Dev*. Basel, Karger. 2010. Vol. 17. P. 44–51.
6. Lomniczi A, Ojeda SR. The emerging role of epigenetics in the regulation of female puberty: in

Bourguignon J-P, Parent A-S (eds): Puberty from bench to clinic. Lessons for clinical management of pubertal disorders. Endocr Dev. Basel, Karger. 2016. Vol. 29. P. 1–16.

7. Willemssen RH, Dunger DB. Normal variations in pubertal timing: genetic determinants in relation to growth and adiposity: in Bourguignon J-P, Parent A-S (eds): Puberty from bench to clinic. Lessons for clinical management of pubertal disorders. Endocr Dev. Basel, Karger. 2016. Vol. 29. P. 17–35.

8. Bourguignon J-P, Parent A-S, Mullis PE. Puberty from Bench to Clinic. 1st edition. Karger. 2016. 263 p.

9. De Roux N, Genin E, Carel JC, et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100(19):10972–6. DOI: 10.1073/pnas.1834399100.

10. Tsoutsouki J, Abbbara A, Dhillon W. Novel therapeutic avenues for kisspeptin. Current Opinion in Pharmacology. 2022; 67:102319. doi.org/10.1016/j.coph.2022.102319.

11. Mills EG, Yang L, Abbbara A, et al. Current perspectives on kisspeptins role in behaviour. Front Endocrinol (Lausanne). 2022; 13: 928143.

12. Comninou AN, Hansen MS, Courtney A, et al. Acute effects of kisspeptin administration on bone metabolism in healthy men. J Clin Endocrinol Metab. 2022; 107:1529–1540, <https://doi.org/10.1210/clinem/dgac117>.

13. Guzman S, Dragan M, Kwon H, et al. Targeting hepatic kisspeptin receptor ameliorates nonalcoholic fatty liver disease in a mouse model. J Clin Invest. 2022 May 16;132(10):e145889.

14. Tsoutsouki J, Patel B, Comninou AN, et al. Kisspeptin in the prediction of pregnancy complications. Front Endocrinol. (Lausanne). 2022; 13: 942664. doi.org/10.3389/fendo.2022.942664.

15. Scott G, Ahmad I, Howard K, et al. Double-blind, randomized, placebo-controlled study of safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of TAK-683, an investigational metastatin analogue in healthy men. Br J Clin Pharmacol. 2013; 75(2): 381–91 DOI: 10.1111/j.1365-2125.2012.04385.x.

16. Abbbara A, Eng PC, Phylactou M, et al. Kisspeptin receptor agonist has therapeutic potential for female reproductive disorders. J Clin Invest. 2020; 130:6739–6753. DOI: 10.1172/JCI139681.

17. Abbbara A, Clarke SA, Dhillon WS. Clinical potential of kisspeptin in reproductive health. Trends Mol Med. 2021; 27:807–823.

18. Dhillon WS, Chaudhri OB, Patterson M, et al. Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. J Clin Endocrinol Metab. 2005; Dec, 90:6609–6615.

19. Chan Y-M, Butler JP, Pinnell NE, et al. Kisspeptin resets the hypothalamic GnRH clock in men. J Clin Endocrinol Metab. 2011 Jun;96(6):E908–15.

20. George JT, Veldhuis JD, Roseweir AK, et al. Kisspeptin-10 is a potent stimulator of LH and increases pulse frequency in men. J Clin Endocrinol Metab. 2011 Aug;96(8):E1228–36. DOI: 10.1210/jc.2011-0089.

21. Dhillon WS, Chaudhri OB, Thompson EL, et al. Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. J Clin Endocrinol Metab. 2007; 92:3958–3966.

22. Mills EG, Swedrowska M, Thurston L, et al. Intranasal kisspeptin administration stimulates reproductive hormone secretion in healthy men [cited 2022 Aug 12] Endocr Abstr. 2021 Oct 18:77.

23. Jayasena CN, Nijher GMK, Abbbara A, et al. Twice-weekly administration of kisspeptin-54 for 8 weeks stimulates release of reproductive hormones in women with hypothalamic amenorrhea. Clin Pharmacol Ther. 2010; 88:840–847.

24. Jayasena CN, Nijher GMK, Chaudhri OB, et al. Subcutaneous injection of kisspeptin-54 acutely stimulates gonadotropin secretion in women with hypothalamic amenorrhea, but chronic administration causes tachyphylaxis. J Clin Endocrinol Metab. 2009; 94: 4315–4323.

25. Jayasena CN, Nijher GMK, Comninou AN, et al. The effects of kisspeptin-10 on reproductive hormone release show sexual dimorphism in humans. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article/96/12/E1963/2834843>.

26. Jayasena CN, Comninou AN, Veldhuis JD, et al. A single injection of kisspeptin-54 temporarily increases luteinizing hormone pulsatility in healthy women [cited 2022 Jun 20] Clin Endocrinol. 2013; 79:558–563.

27. Jayasena CN, Nijher GMK, Comninou AN, et al. The effects of kisspeptin-10 on reproductive hormone release show sexual dimorphism in humans. J Clin Endocrinol Metab. 2011; 96:E1963–E72.

28. Chan Y-M, Butler JP, Sidhoum VF, et al. Kisspeptin administration to women: a window into endogenous kisspeptin secretion and GnRH responsiveness across the menstrual cycle. E1458 jcem.endojournals.org J Clin Endocrinol Metab. 2012; 97.

29. George JT, Veldhuis JD, Tena-Sempere M, et al. Exploring the pathophysiology of hypogonadism in men with type 2 diabetes: kisspeptin-10 stimulates serum testosterone and LH secretion in men with type 2 diabetes and mild biochemical hypogonadism. Clin Endocrinol. 2013; 79:100–104.

30. Abbbara A, Narayanaswamy S, Izzi-Engbeaya C, et al. Hypothalamic response to kisspeptin-54 and pituitary response to gonadotropin-releasing hormone are preserved in healthy older men. Neuroendocrinology. 2018; 106:401–410.

31. Matsui H, Masaki T, Akinaga Y, et al. Pharmacologic profiles of investigational kisspeptin/metastatin analogues, TAK-448 and TAK-683, in adult male rats in comparison to the GnRH analogue leuprolide. Eur J Pharmacol. 2014; 735:77–85.

32. Gordon CM, Ackerman KE, Berga SL, et al. Functional hypothalamic amenorrhea: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102:1413–1439.
33. Abbara A, Islam R, Clarke SA, et al. Clinical parameters of ovarian hyperstimulation syndrome following different hormonal triggers of oocyte maturation in IVF treatment. *Clin Endocrinol.* 2018;88:920–927.
34. Jayasena CN, Abbara A, Comninou AN, et al. Kisspeptin-54 triggers egg maturation in women undergoing in vitro fertilization. *J Clin Invest.* 2014; 124:3667–3677.
35. Abbara A, Jayasena CN, Christopoulos G, et al. Efficacy of kisspeptin-54 to trigger Oocyte maturation in women at high risk of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) during in vitro fertilization (IVF) therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100: 3322–3331.
36. Abbara A, Clarke S, Islam R, et al. A second dose of kisspeptin-54 improves oocyte maturation in women at high risk of ovarian hyperstimulation syndrome: a Phase 2 randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2017;32:1915–1924.
37. Abbara A, Hunjan T, Ho VNA, et al. Endocrine requirements for oocyte maturation following hCG, GnRH agonist, and kisspeptin during IVF. In *Treatment. Lausanne: Front Endocrinol.* 2020 Oct 6:11.
38. Abbara A, Clarke SA, Dhillo WS. Novel concepts for inducing final oocyte maturation in in vitro fertilization treatment. *Endocr Rev* 2018 Oct, 39:593–628.
39. Jayasena CN, Abbara A, Veldhuis JD, et al. Increasing LH pulsatility in women with hypothalamic amenorrhoea using intravenous infusion of kisspeptin-54. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99:E953–E961.
40. Castellano JM, Navarro VM, Fernández-Fernández R, et al. Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology.* 2005;146:3917–3925.
41. Chan Y-M, Lippincott MF, Kusa TO, et al. Divergent responses to kisspeptin in children with delayed puberty. *JCI Insight.* 2018;19;3(8):e99109. DOI: 10.1172/jci.insight.99109.
42. Chan Y-M, Lippincott MF, Barroso PS, et al. Using Kisspeptin to Predict Pubertal Outcomes for Youth With Pubertal Delay. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(8):e2717–e2725. DOI: 10.1210/clinem/dgaa162.
43. Nikitina IL. Obesity in children and adolescents: problem, solutions. Review of Russian and international recommendations. Attending doctor. 2018;1: 31–36 In Russian [Никитина И.Л. Ожирение у детей и подростков: проблема, пути решения. Обзор российских и международных рекомендаций. Лечащий врач. 2018;1: 31–36].
44. Mills EG, Yang L, Abbara A, et al. Current perspectives on kisspeptins role in behaviour. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.928143>.
45. Yang L, Demetriou L, Wall MB, et al. Kisspeptin enhances brain responses to olfactory and visual cues of attraction in men. *JCI Insight.* 2020; 5. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.133633>.
46. Comninou AN, Wall MB, Demetriou L, et al. Kisspeptin modulates sexual and emotional brain processing in humans. *J Clin Invest.* 2017 Feb 1, 127:709–719, <https://doi.org/10.1172/JCI89519>.
47. Wang F-S, Chen H, Wu Z-Y, et al. KISS1 expression in osteosarcoma: high in Chinese clinical cases, but lower in cell lines. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP.* 2011; 12:3229–3234.
48. Dotterweich J, Tower RJ, Brandl A, et al. The KISS1 receptor as an *in vivo* microenvironment imaging biomarker of multiple myeloma bone disease. *PLoS One.* 2016 May 9;11(5):e0155087.
49. de Sousa IO, Diniz ET, Marques TF, et al. Short-term bone marker responses to teriparatide and strontium ranelate in patients with osteoporosis previously treated with bisphosphonates. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2010; 54:244–249.

Информация об авторах:

Никитина Ирина Леоровна, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой детских болезней с клиникой лечебного факультета, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Капустина Анна Сергеевна, врач — детский эндокринолог Университетской клиники, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Леонова Ирина Александровна, к.м.н., доцент, доцент кафедры детских болезней с клиникой лечебного факультета ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Байрамов Алекбер Азизович, д.м.н., ведущий научный сотрудник НИЛ детской эндокринологии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Authors information:

Irina L. Nikitina, doctor of medical sciences, professor, head of the Department of Childhood Diseases with the Clinic of the Faculty of Medicine, Almazov National Medical Research Centre;

Anna S. Kapustina, pediatric endocrinologist of the Clinic of the Faculty of Medicine, Almazov National Medical Research Centre;

Irina A. Leonova, MD, PhD, associate Professor of the Department of Childhood Diseases with the Clinic of the Faculty of Medicine, Almazov National Medical Research Centre;

Alekber A. Bairamov, doctor of medical sciences Leading Researcher of the Pediatric Endocrinology Laboratory, Almazov National Medical Research Centre.

ТРАНСЛЯЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ТЕСТ-СИСТЕМ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ТЕРМИЧЕСКИХ ОЖГОВЫХ РАН

Султанова К. Т., Крышень К. Л., Макарова М. Н.

Акционерное общество «Научно-производственное объединение “Дом Фармации”», г. п. Кузьмоловский, Ленинградская область, Россия

Контактная информация:

Султанова Кира Тимуровна,
АО «НПО «Дом Фармации»,
ул. Заводская, д. 3, к. 245, г. п.
Кузьмоловский, Всеволожский район,
Ленинградская обл., Россия, 188663.
E-mail: sultanova.kt@doclinika.ru

Статья поступила в редакцию 30.05.2024
и принята к печати 22.08.2024.

Резюме

В статье описаны преимущества и особенности экспериментальных моделей термических ожогов с использованием тест-систем *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*. Дана объективная оценка применения каждого подхода в зависимости от вида исследования. Так, модели клеточных культур просты, но не в полной мере отражают структуру кожи человека, что ограничивает их трансляционную ценность. Модели *ex vivo*, например, эксплантаты кожи, обеспечивают необходимую архитектуру для изучения межклеточных взаимодействий, однако они также имеют свои недостатки, в первую очередь связанные с коротким сроком жизнеспособности. В целом, модели *in vitro* и *ex vivo* имеют ограничения в воспроизведении всех аспектов патогенеза и заживления ожоговых ран. В связи с этим для изучения патологии ожоговой раны, ее влияния на организм и эффективности терапии широко используются лабораторные животные, в первую очередь мыши, крысы и свиньи. Решение об использовании экспериментальных моделей на животных принимается с учетом их трансляционной значимости для человека. У грызунов заживление ран происходит в основном за счет сокращения, в отличие от реэпителизации и грануляции, которые наблюдаются у людей, что способствует более быстрому заживлению ран у грызунов. Значительные сходства между определенными свойствами кожи человека и свиньи делает последнюю релевантной тест-системой в фармакодинамических исследованиях термических ожоговых ран.

Ключевые слова: карликовые свиньи, крысы, мыши, ожоговая рана.

Для цитирования: Султанова К.Т., Крышень К.Л., Макарова М.Н. Трансляционный потенциал тест-систем при моделировании термических ожоговых ран. Трансляционная медицина. 2024; 11(4): 334-341. DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-4-334-341. EDN: HRREWN

TRANSLATIONAL POTENTIAL OF TEST SYSTEMS IN MODELLING THERMAL BURN WOUNDS

Kira T. Sultanova, Kirill L. Kryshen', Marina N. Makarova

Research and manufacturing company "Home of Pharmacy",
Kuzmolovsky settlement, Leningrad Region, Russia

Corresponding author:

Kira T. Sultanova,
RMC "Home of Pharmacy",
Zavodskaya str., 3, room 245, Kuzmolovskiy
settlement, Vsevolozhskiy building,
Leningrad Region, Russia.
E-mail: sultanova.kt@doclinika.ru

Received 30 May 2024; accepted 22 August 2024.

Abstract

The article describes the advantages and features of experimental models of thermal burns using *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* test systems. An objective assessment of the application of each approach depending on the type of study is given. For example, cell culture models are simple but do not fully reflect the structure of human skin, which limits their translational value. *Ex vivo* models, such as skin explants, provide the necessary architectonics to study intercellular interactions, but they also have drawbacks, primarily related to short viability. In general, *in vitro* and *ex vivo* models have limitations in reproducing all aspects of burn wound pathogenesis and healing. In this regard, laboratory animals, primarily mice, rats, and pigs, are widely used to study burn wound pathology, its effects on the body, and the efficacy of therapy. The decision to use experimental animal models is made taking into account their translational relevance to humans. In rodents, wound healing occurs mainly by contraction, in contrast to the re-epithelialisation and granulation seen in humans, which contributes to faster wound healing in rodents. The significant similarities between certain properties of pig and human skin make the latter a relevant test system in pharmacodynamic studies of thermal burn wounds.

Key words: burn wound, mice, pigs, rats.

For citation: Sultanova KT, Kryshen' KL, Makarova MN. Translational potential of test systems in modelling thermal burn wounds. *Translational Medicine*. 2024; 11(4): 334-341. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-4-334-341. EDN: HRREWN

Введение

Ожоговая травма — это патофизиологическое состояние, при котором деструктивные повреждения, индуцированные термическим, химическим, электрическим, радиационным воздействием, вызывают структурные и функциональные нарушения в различных системах органов человека [1].

Экспериментальные модели ожогов являются важным инструментом для изучения последствий ожогов или создания новых стратегий лечения. В отличие от клинических исследований, экспериментальные модели позволяют сравнивать различные проявления ожогов в контролируемых условиях и тем самым предоставляют соответ-

ствующую информацию о молекулярных механизмах повреждения, а также потенциальных терапевтических мишенях [2, 3].

Разработан ряд моделей *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* для изучения патогенеза и лечения ожоговых травм. Каждая из них имеет ряд преимуществ и ограничений, и выбор конкретной модели обычно представляет собой компромисс между доступностью, этическими соображениями и целью исследования [3–6]. Этот обзор посвящен основным тест-системам, используемым в доклинических исследованиях для моделирования термических ожоговых ран, выявлению их преимуществ и недостатков.

В обзор включены публикации, доступные для поиска в базах данных PubMed и Google Scholar на 10 декабря 2023 года. В приоритете были научные статьи, опубликованные за последние 5 лет. Ключевыми словами для поиска необходимой информации являлись: ожоговая рана, мыши, крысы, карликовые свиньи, и их английские варианты: burn wound, mice, rats, pigs. Особое внимание в статьях уделялось используемым тест-системам, способам индукции ожоговой травмы, полученным результатам и выводам.

Двумерные и трехмерные культуры

Культивирование клеток — одна из основных технологий *in vitro*, используемая для изучения физиологии клеток и тканей и патофизиологии ожоговых ран вне организма. Культуры клеток млекопитающих (как лабораторных животных, так и человека) позволяют изучать архитектуру и метаболизм кожи, механизмы патогенеза термических ран на клеточном и субклеточном уровнях, а также проводить оценку эффективности и безопасности потенциальных терапевтических агентов [5, 7].

Модели *in vitro* на основе культур монослойных клеток являются простой системой для характеристики клеточных сигнальных событий в ответ на термическую травму. Достаточно простой тест-системой *in vitro* является монослой фибробластов или эпителиальных клеток [8]. При двумерном культивировании клеток клетки выращивают на плоских чашках, оптимизированных для прикрепления клеток и их роста, при этом кинетика роста и прикрепление клеток не соответствуют таковым *in vivo*, естественное микроокружение клеток также представлено не полностью, что лишает их физиологического контекста. Несмотря на это, данные двумерные модели могут быть использованы для изучения цитотоксичности или пролиферативных процессов [9].

Более сложные модели и более надежные — трехмерные, позволяют учесть физиологический контекст, обеспечивая некоторую структурную и физиологическую эквивалентность модели и процессов, протекающих *in vivo* [10]. Для того чтобы воспроизвести клеточную архитектуру, человеческие кератиноциты культивируют на деэпидермизированной дерме. Это позволяет изучать взаимодействие клеток с матриксом, а также их миграцию при ожоговых поражениях [11]. Данная техника культивирования позволяет изучать процессы, протекающие в ожоговой ране, на клеточном и даже молекулярном уровнях, однако, в полной мере такая тест-система не отображает всей сложной архитектуры человеческой кожи,

хотя в некоторых случаях это является ее преимуществом. Так, в экспериментальных моделях *in vivo* трудно охарактеризовать молекулярные изменения при термических ожогах на клеточном уровне, так как в этом процессе задействовано множество переменных, например, компоненты воспалительного и коагуляционного каскадов, что затрудняет дискретную оценку клеточного эффекта, если стоит такая задача. Таким образом, технологии трехмерного культивирования могут быть использованы для изучения заживления ожоговых ран, протекания процессов воспаления и метаболизма во время регенерации и реэпителизации, а также при оценке эффективности и токсичности потенциальных терапевтических противоожоговых агентов на скрининговом этапе их разработки.

Существенным недостатком современных моделей *in vitro* является то, что они все еще не позволяют воспроизвести всю сущность биологических систем в одной модели [12]. В то же время такие тест-системы дают возможность проводить дискретное наблюдение за различными структурами, такими как эпидермис и дерма, без вмешательства других типов клеток. Кроме того, модели *in vitro* характеризуются существенными преимуществами, такими как высокая стандартизация, высокая пропускная способность и простота реализации в стандартных лабораториях.

Эксплантаты кожи

Моделирование ожогов кожи *ex vivo* представляет собой еще один подход к изучению ожоговых ран и противоожоговой терапии, устраняющий некоторые недостатки других типов моделей. При использовании эксплантатов (в том числе и эксплантатов, полученных от лабораторных животных) сохраняется неповрежденная структура кожи. Человеческая кожа как тест-система позволяет исключить межвидовые различия в ее структуре и иммунных реакциях. Данные технологии являются связующим звеном между клеточными моделями *in vitro* и *in vivo*.

Для воспроизведения ожоговых ран разработано несколько моделей *ex vivo*, которые позволяют охарактеризовать реакцию клеток и внеклеточного матрикса на термическую травму и ранние стадии процессов заживления. В экспериментальной работе используют как кожу человека, так и кожу лабораторных животных [4, 13, 14]. Например, значительные сходства между определенными свойствами кожи свиньи и человека (в частности, толщина эпидермиса и липидный состав) делают кожу свиньи подходящей и легкодоступной тест-системой для моделирования термической

травмы. Однако, несмотря на сходства кожи сви-
ньи и человека, присутствуют также анатомиче-
ские и физиологические ограничения.

В качестве альтернативы, в исследованиях *ex vivo*, возможно использование образцов кожи че-
ловека и моделирование специфичных и легко
воспроизводимых ожоговых повреждений, пато-
генез которых сопоставим с клиническим. Для
ожоговых ран разработано несколько моделей
кожи человека *ex vivo*, позволяющих охарактери-
зовать реакцию клеток и внеклеточного матрикса
на термическое повреждение и ранние стадии про-
цессов заживления [15, 16]. Однако при моделиро-
вании ожоговых травм с использованием кожных
эксплантатов необходимо учитывать межиндиви-
дуальную изменчивость термически поврежден-
ной кожи человека.

Стоит отметить, что при использовании дан-
ных технологий необходимо учитывать качество
донорской кожи, которое зависит от правильности
оперативного вмешательства и участка отбора об-
разца. К тому же воспалительные реакции в усло-
виях *ex vivo* отражают исключительно местные
реакции иммунных клеток, поскольку тромбоци-
ты, нейтрофилы и моноциты не могут инфильтри-
ровать в место ожоговой травмы. Другим ограни-
чением, также характерным для использования
эксплантатов, является короткий период экспери-
ментального наблюдения.

Лабораторные животные

Выбор экспериментальной модели на живот-
ных определяется с учетом их максимальной
трансляционной значимости для человека. По-
мимо того, что каждая модель *in vivo* уникальна
и имеет преимущества и ограничения, только ис-
пользование животных позволяет воспроизвести
патогенез патологии на организменном уровне.

Грызуны. Ожоговые раны могут быть различ-
ных форм и размеров, и модели грызунов доста-
точно универсальны для изучения большинства
из них. Кожа мышей и крыс не имеет выражен-
ного сцепления с основной структурой по сравне-
нию с кожей человека, за счет наличия у грызунов
Panniculus carnosus (тонкий слой скелетных мышц)
[17]. Тем не менее, они вносят значительный вклад
в исследование патогенеза и регенерации ожого-
вых ран, создание противоожоговых препаратов.
На грызунах можно воссоздать термические раны
от пламени, горячей жидкости, химические ожоги
и радиационные ожоги любой степени. Грызуны
также являются адаптируемой моделью для изу-
чения вторичной инфекции ожоговых ран чело-
века с использованием различных возбудителей,

включая грамположительные и грамотрицатель-
ные, анаэробные и аэробные бактерии и грибы.
Ожоговый дефект обычно проводится на большом
участке кожи (шерсть предварительно удаляется),
а животных перед процедурой анестезируют. По-
сле формирования термической травмы, инфици-
рование проводят путем местного нанесения куль-
туры или путем инъекции под поверхность ожога.

Мышь является одной из наиболее часто ис-
пользуемых моделей животных в доклинических
исследованиях [18] и, в частности, связанных с за-
живлением ожогов и ран [19]. В качестве экспери-
ментальной модели это животное предоставило
исследователям ключевую информацию о сигналь-
ных путях, участвующих в процессе заживления,
во многом благодаря разнообразию специфичных
для мышцы реагентов и возможности использо-
вания трансгенных линий. Хотя использование
мышей в качестве тест-системы имеет свои пре-
имущества, их основным недостатком является
неспособность полностью имитировать процесс
заживления ран у людей. Заживление ран у мышей
происходит в основном за счет сокращения раны
(первичное натяжение), что делает время заживле-
ния довольно быстрым по сравнению с человеком.
Заживление ран у человека происходит в основном
за счет реэпителизации и грануляции (вторичное
натяжение). Другим потенциальным ограниче-
нием для использования мышей является то, что,
в отличие от людей, мыши не подвержены образо-
ванию гипертрофических или келоидных рубцов.
Более того, кожа мыши покрыта густой шерстью.
Волосные фолликулы богаты прогениторными
клетками, что способствует быстрому заживлению
и кератинизации кожи. Стоит отметить, что мыши
сравнительно устойчивы к действию патогенов,
что делает данных животных плохо адаптируемой
моделью при изучении инфицированных ожогов.
Таким образом, процесс заживления ран (сокраще-
ние раны) и различия в иммунном статусе следует
учитывать при попытке экстраполировать любые
результаты исследований с мышей на людей [20].

Крысы наряду с мышами широко используются
в качестве тест-системы при моделировании
ожогов. По сравнению с мышью крыса обладает
большим размером тела, с ней легче обращаться,
а также она менее подвержена стрессу при контак-
те с человеком. Как и у людей, кожа крысы состо-
ит из основных слоев эпидермиса и дермы. У крыс
кожа отличается эластичностью и отсутствием
сильного сцепления с нижележащими структу-
рами по сравнению с кожей человека, у них, так
же как у мышей, присутствует *Panniculus carnosus*
[21, 22]. Различия, присущие коже человека и кры-

сы, следует учитывать при определении того, подходят ли крысы для моделей заживления ран.

Таким образом, как и все модели *in vivo*, модели с использованием грызунов имеют свои ограничения. Заживление раны происходит путем ее сокращения, в отличие от реэпителизации и грануляции, наблюдаемых у человека. Это ускоряет заживление, поскольку грызуны менее подвержены сепсису и иммуносупрессии, связанным с ожоговой раной. Это может создать трудности при изучении инфицированных ожогов, однако их можно преодолеть, искусственно поддерживая рану открытой.

Свиньи. Давно установлено сходство между физиологией и анатомией кожи человека и свиньи, что делает ее релевантной тест-системой в фармакодинамических исследованиях ожоговых ран. Кожа свиньи похожа на человеческую по своей архитектуре — дерма и эпидермис толстые и по глубине схожи с человеческими, кожа плотно прикреплена к нижележащим структурам. Как и у людей, дерма свиньи состоит из двух зон — четко выраженной сосочковой дермы с тонкими коллагеновыми волокнами и богатой мукополисахаридами матрицей, перемешанной с клетками соединительной ткани, а также плотной ретикулярной дермы, где сплетенные коллагеновые пучки и эластичные волокна обеспечивают прочность и эластичность кожи [23, 24].

Кожа свиньи отличается от кожи человека двумя основными аспектами — отсутствием пото-

вых желез и меньшим количеством эластичных волокон в дерме. Подкожно-жировая клетчатка свиней немного отличается от подкожно-жировой клетчатки человека тем, что имеется один или два слоя коллагеновых фасций, соединенных с дермой фиброзными перегородками подкожного жира. Волосяной покров свиньи расположен группами по два-три отдельных волоска. Сальные железы присутствуют в поверхностной части ретикулярной дермы, выходящей в волосяной канал, как и у других млекопитающих. Трубочатые апокринные железы прилегают к волосяным фолликулам, и их больше, чем у людей. Субэпидермальная сосудистая сеть менее плотная, чем у человека. Процесс заживления у свиней происходит через воспаление, пролиферацию, реэпителизацию и ремоделирование, аналогично человеку [14, 25].

Кроме того, свиньи имеют достаточно большой размер, что позволяет создать множественные ожоги у каждой отдельной свиньи, не вызывая системной стрессовой реакции. Обычно общее количество ожогов ограничено до $< 5\text{--}10\%$ от общей площади поверхности тела. Выполнение нескольких ожогов у одной и той же свиньи также позволяет одновременно изучать несколько методов лечения [14].

Молодые свиньи обладают высокой устойчивостью к заражению и инфекции. Это можно рассматривать как эволюционное преимущество, учитывая условия окружающей среды, в которых они живут. Однако это качество может быть как преи-

Таблица 1. Сравнительная характеристика архитектоники кожи лабораторных животных и человека

Table 1. Comparative characteristics of the architectonics of the skin of laboratory animals and humans

Признак	Человек	Свинья	Крыса	Мышь
Волосяной покров	Редкий	Редкий	Плотный	Плотный
Эпидермис	Толстый	Толстый	Тонкий	Тонкий
Дерма	Толстая	Толстая	Тонкая	Тонкая
Panniculus carnosus	Нет	Нет	Присутствует	Присутствует
Архитектура кожи	Кожа плотно прикреплена к нижележащим структурам	Кожа плотно прикреплена к нижележащим структурам	Кожа слабо прикреплена к нижележащим структурам	Кожа слабо прикреплена к нижележащим структурам
Основной механизм заживления ран	Реэпителизация	Реэпителизация	Сокращение	Сокращение

муществом, так и недостатком использования свиньи, особенно при изучении инфицированных ожоговых ран. Стоит также учитывать экономическую составляющую использования свиней в качестве тест-системы — они относительно дороги [26, 27].

В таблице 1 представлена обобщенная информация об архитектонике кожи лабораторных животных и человека.

Таким образом, моделирование термической травмы *in vivo* предоставляет ценные сведения, которые можно сопоставить с заживлением ран у человека. Однако на этапе планирования исследования должен оценить достоинства и ограничения каждой модели в соответствии с целями эксперимента (табл. 2).

Индукция термической ожоговой раны у лабораторных животных. Для нанесения термической травмы у животных удаляется шерстяной покров для обеспечения равномерного ожогового ранения. Выбор места ожога важен, чтобы гарантировать одинаковые ожоговые травмы. Для грызунов спина (область холки) является идеальным местом для нанесения термического повреждения,

потому что животному трудно до нее добраться, что предотвращает дальнейшее повреждение области раны [17]. На свиньях удачным местом нанесения ожоговой раны является грудная паравerteбральная зона. При формировании раны непосредственно над остистыми отростками позвонков или слишком далеко по бокам от ребер ожог будет неоднородный — степень повреждения кожи будет различаться. Кроме того, по мере приближения к нижней поверхности брюшной стенки, ожоги не заживают так же хорошо, как ожоги, прилегающие к паравerteбральной области [3].

Для создания ожогов можно использовать два типа термических повреждений. Первый — использовать для создания травмы горячую или кипящую воду, циркулирующую по поврежденной области. Основным преимуществом этого метода является возможность равномерного покрытия всей площади кожи независимо от ее однородности и подлежащей поверхности. Главный недостаток состоит в том, что эта модель технически более сложна, чем модель контакта, и подвергает исследовательскую группу риску получения

Таблица 2. Преимущества и недостатки лабораторных животных при моделировании ожоговых ран

Table 2. Advantages and disadvantages of laboratory animals in modeling burn wounds

Вид	Преимущества	Недостатки
Мыши	– Оптимальны для моделирования асептических ран – Низкие эксплуатационные расходы – Простота в обращении	– Более рыхлая кожа по сравнению с кожей человека – Густой волосяной покров – Отличный от человека механизм заживления раны – Быстрое заживление раны – Сложно воспроизводить инфицированные раны
Крысы	– Большие размеры тела по сравнению с мышью, что позволяет наносить более крупные или многочисленные раны у одного животного – Успешное моделирование инфицированных ран – Низкие эксплуатационные расходы – Простота в обращении	– Более рыхлая кожа по сравнению с кожей человека – Густой волосяной покров – Отличный от человека механизм заживления раны – Быстрое заживление раны
Свиньи	– Анатомическое и физиологическое сходство кожи с кожей человека – Механизм заживления раны сопоставим с таковым у человека – Большие размеры тела, что позволяет наносить более крупные или многочисленные раны у одного животного	– Дерма крупных и старых животных часто значительно толще, чем у людей – Высокие эксплуатационные расходы – Все хирургические процедуры обычно требуют навыков и опыта

ожогов [28]. Второй — контактный ожог — модель, в которой для формирования термического повреждения используется предварительно нагретый алюминиевый (или латунный) стержень. Эта модель не требует высокоспецифичного оборудования и имеет минимальный риск травмирования исследователей при контактных ожогах [29].

В тех случаях, когда стоит задача изучения инфекционного компонента патогенеза ожогов, возможно дополнительное инфицирование сформированной раны. Стоит учитывать, что бактериальные инфекции ожоговых ран наиболее часто ассоциированы с *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* и *Staphylococcus aureus*, в связи с чем выбор одного из этих микроорганизмов в качестве индуктора является наиболее целесообразным [30–32].

Заключение

Релевантная модель на животных, которая точно воспроизводит последовательные фазы тяжелой ожоговой раны, позволяет исследователям изучать потенциал новых методов лечения, а также расширяет понимание патогенеза ожоговой раны в целом и каждой ее фазы в частности. Модельные системы *in vitro* на основе культур клеток являются простыми с методологической точки зрения, однако не отражают строение кожи в целом, что снижает их трансляционную ценность. Модели *ex vivo* — кожные эксплантаты универсальны и позволяют повторять различные типы ожогов, в том числе и инфицированные. Они также обеспечивают архитектуру кожи, необходимую для изучения межклеточных взаимодействий. Основным ограничением эксплантатов является то, что жизнеспособность ткани может поддерживаться только в течение короткого периода времени из-за использования искусственных сред, не позволяющих в полной мере обеспечить необходимые условия культивирования. Кроме того, стандартизированные эксплантаты человеческой кожи могут быть получены только в результате сложной операции и в соответствии с нормами этики. В целом, модели *in vitro* и *ex vivo* ограничены в силу их способности воспроизводить только некоторые аспекты патогенеза ожоговых ран и их заживления. По этим причинам для изучения послеожоговых патологических механизмов и тестирования новых терапевтических подходов необходимы модели ожогов на животных. Мыши, крысы и свиньи широко применяются в качестве тест-систем для изучения патологии ожоговой раны, ее влияния на организм, а также эффективности терапии. У каждой из них есть преимущества и ограничения, что следует принимать во внимание при планировании

исследования для более успешного переноса результатов доклинических исследований в клиническую практику.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Список литературы / References

1. Jeschke MG, van Baar ME, et al. Burn injury // Nature Reviews Disease Primers. 2020; 6:1: 11. DOI: 10.1038/s41572-020-0145-5.
2. Hao D, Nourbakhsh M. Recent advances in experimental burn models // Biology. 2021;10:6: 526. DOI: 10.3390/biology10060526.
3. Abdullahi A, Amini-Nik S, Jeschke MG. Animal models in burn research // Cellular and molecular life sciences. 2014;71:3241–3255. DOI:10.1007/s00018-014-1612-5.
4. Alves DR, Booth SP, Scavone P, et al. Development of a high-throughput ex-vivo burn wound model using porcine skin, and its application to evaluate new approaches to control wound infection // Frontiers in cellular and infection microbiology. 2018;8: 196. DOI:10.3389/fcimb.2018.00196.
5. Coolen NA, Vlieg M, Van Den Bogaerd AJ, et al. Development of an in vitro burn wound model // Wound repair and regeneration. 2008; 16:4: 559–567. DOI:10.1111/j.1524-475X.2008.00403.x.
6. Traber DL, Barrow RE, Herndon DN, et al. Animal models of burn injury // Surgical research. Academic Press, San Diego, Calif. 2001: 367–377.
7. Lukomskyj AO, Rao N, Yan L, et al. Stem cell-based tissue engineering for the treatment of burn wounds: A systematic review of preclinical studies // Stem Cell Reviews and Reports. 2022; 18:6: 1926–1955. DOI: 10.1007/s12015-022-10341-z.
8. Teimouri A, Yeung P, Agu R. 2D vs. 3D cell culture models for in vitro topical (dermatological) medication testing // Cell Culture. — IntechOpen, 2018. DOI: 10.5772/intechopen.79868.
9. Brocklehurst S, Ghousifam N, Zuniga K, et al. Multilayer In Vitro Human Skin Tissue Platforms for Quantitative Burn Injury Investigation Bioengineering. 2023; 10:2: 265. DOI: 10.3390/bioengineering10020265.
10. Choudhury S, Das A. Advances in generation of three-dimensional skin equivalents: pre-clinical studies to clinical therapies // Cytotherapy. 2021; 23:1: 1–9. DOI:10.1016/j.jcyt.2020.10.001.
11. Pianigiani E, Ierardi F, Mazzanti B, et al. Human de-epidermized dermis as a stem cell carrier // Transplantation proceeding. 2010; 42:6: 2244–2246. DOI:10.1016/j.transproceed.2010.05.040.
12. Schneider V, Kruse D, de Mattos IB, et al. A 3D in vitro model for burn wounds: monitoring of regeneration on

- the epidermal level // *Biomedicines*. 2021; 9:9: 1153. DOI: 10.3390/biomedicines9091153.
13. Liu A, Ocotl E, Karim A, et al. Modeling early thermal injury using an ex vivo human skin model of contact burns // *Burns*. 2021; 47:3: 611–620. DOI: 10.1016/j.burns.2020.08.011.
 14. Swindle MM, Makin A, Herron AJ, et al. Swine as models in biomedical research and toxicology testing // *Veterinary pathology*. 2012; 49:2: 344–356. DOI: 10.1177/0300985811402846.
 15. Labouchère A, Haselbach D, Michetti M, et al. A New Ex Vivo Human Skin Burn Model // *Journal of Burn Care & Research*. 2023; 45:2: 308–317. DOI:10.1093/jbcr/irad071.
 16. Hofmann E, Fink J, Eberl A, et al. A novel human ex vivo skin model to study early local responses to burn injuries // *Scientific reports*. 2021; 11:1: 364. DOI:10.1038/s41598-020-79683-3.
 17. Vinaik R, Aijaz A, Jeschke MG. Small animal models of thermal injury // *Methods Cell Biol*. 2022;168:161–189. DOI: 10.1016/bs.mcb.2021.12.014.
 18. Miroshnikov MV, Makarova MN. Variability of blood biochemical parameters and establishment of reference intervals in preclinical studies. Part 4: Mice. *Laboratory Animals for Science*. 2021; 03: 63–69. In Russian [Мирошников М.В., Макарова М.Н. Вариабельность биохимических показателей крови и установление референсных интервалов в доклинических исследованиях. Сообщение 4: мыши // *Лабораторные животные для научных исследований*. 2021; 3:63–69]. DOI: 10.29296/2618723X-2021-03-08.
 19. Zomer HD, Trentin AG. Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. *J Dermatol Sci*. 2018; 90:1: 3–12. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2017.12.009.
 20. Burmeister DM, Supp DM, Clark RA, et al. Advantages and disadvantages of using small and large animals in burn research: proceedings of the 2021 Research Special Interest Group. *J Burn Care Res*. 2022; 43:5: 1032–1041. DOI:10.1093/jbcr/irac091.
 21. Abdeldjelil M, Messai A, Boudebza A, et al. Practical aspects to generate cutaneous experimental burns in a rat model. *Pharm Lett*. 2017; 9:1: 70–84.
 22. Campelo APBS, Campelo MWS, Britto GADC, et al. An optimized animal model for partial and total skin thickness burns studies. *Acta Cir Bras*. 2011; 26:1: 38–42. DOI: 10.1590/s0102-86502011000700008.
 23. Moniz T, Costa Lima SA, Reis S. Human skin models: From healthy to disease-mimetic systems; characteristics and applications. *Br J Pharmacol*. 2020; 177:19: 4314–4329. DOI:10.1111/bph.15184.
 24. Wardhana A, Lumbuun RFM, Kurniasari D. How to create burn porcine models: a systematic review. *Ann Burns Fire Disasters*. 2018; 31:1: 65–72.
 25. Wang X, Kimble RM. A review on porcine burn and scar models and their relevance to humans. *Wound Practice & Research: Journal of the Australian Wound Management Association*. 2010; 18:1:41–49.
 26. Summerfield A, Meurens F, Ricklin ME. The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. *Mol Immunol*. 2015; 66:1: 14–21. DOI:10.1016/j.molimm.2014.10.023.
 27. Pabst R. The pig as a model for immunology research. *Cell and tissue research*. 2020; 380: 287–304. DOI: 10.1007/s00441-020-03206-9.
 28. Menegat TA, Oliveira AFD, Majewski MGC, et al. Experimental models of scald burns. A scope review. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2019; 34:10: e201901007. DOI:org/10.1590/s0102-865020190100000007.
 29. Gaines C, Poranki D, Du W, et al. Development of a porcine deep partial thickness burn model. *Burns*. 2013; 39:2:311–319. DOI: org/10.1016/j.burns.2012.06.011.
 30. Maslova E, Eisaiankhong L, Sjöberg F, et al. Burns and biofilms: priority pathogens and in vivo models. *npj Biofilms and Microbiomes*. 2021; 7:1: 73. DOI: 10.1038/s41522-021-00243-2.
 31. Dai T, Kharkwal GB, Tanaka M, et al. Animal models of external traumatic wound infections. *Virulence*. 2011; 2:4:296–315. DOI: 10.4161/viru.2.4.16840.
 32. Dobrejkin EA. Eksperimental'noe obosnovanie sposoba modelirovaniya inficirovannoj ozhogovoj rany kozhi u laboratornyh zhivotnyh. *Saratovskij nauchno-meditsinskij zhurnal*. 2013; 9:2: 204–208. In Russian [Добрейкин Е.А. Экспериментальное обоснование способа моделирования инфицированной ожоговой раны кожи у лабораторных животных. Саратовский научно-медицинский журнал. 2013; 9:2: 204–208].

Информация об авторах:

Султанова Кира Тимуровна, к.м.н., руководитель отдела экспериментальной фармакологии и токсикологии АО «НПО «Дом Фармации»;

Крышень Кирилл Леонидович, к.б.н., руководитель отдела специфической токсикологии и микробиологии АО «НПО «Дом Фармации»;

Макарова Марина Николаевна, д.м.н., директор АО «НПО «Дом Фармации».

Authors information:

Kira T. Sultanova, PhD, Head of the Department of Experimental Pharmacology and Toxicology of RMC “Home of Pharmacy”;

Kirill L. Kryshen', PhD, Head of the Department of Specific Toxicology and Microbiology of RMC “Home of Pharmacy”;

Marina N. Makarova, MD, Director of RMC “Home of Pharmacy”.

БЕЛОК S100B КАК БИОЛОГИЧЕСКИЙ МАРКЕР ПОВРЕЖДЕНИЯ НЕРВНОЙ ТКАНИ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ В ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Вавилова В. А., Фаустова Н. М., Пелешок А. А., Крышень К. Л.,
Макарова М. Н., Макаров В. Г.

Акционерное общество «Научно-производственное объединение
“Дом Фармации”», г. п. Кузьмоловский, Ленинградская область,
Россия

Контактная информация:

Вавилова Валерия Александровна,
АО «НПО «Дом Фармации»,
Заводская ул., д. 3, корп. 245,
г. п. Кузьмоловский, Ленинградская
область, Россия, 188663.
E-mail: vavilova.va@doclinika.ru

Статья поступила в редакцию 09.04.2024
и принята к печати 31.07.2024.

Резюме

Актуальность. Для доклинических исследований лекарственных средств актуальной задачей является выбор специфических биохимических маркеров, отражающих повреждения центральной нервной системы в токсикологических и фармакологических экспериментах. Одним из таких маркеров может являться белок S100b, уровень которого позволит оценивать повреждение центральной нервной системы различного генеза. **Цель.** Целью исследования являлась оценка изменения уровня белка S100b в крови крыс и мышей, в гомогенатах головного мозга мышей при повреждениях тканей мозга различного генеза. **Материалы и методы.** Исследование проводилось на самцах аутбредных крыс и мышей. Суммарно было использовано 62 животных: 47 крыс и 15 мышей. Для определения концентрации белка S100b методом иммуноферментного анализа использовали наборы Lifespan Biosciences (США): Rat S100b/S100 beta Elisa kit (Sandwich Elisa) — для крыс и Mouse S100b/S100 beta Elisa kit (Sandwich Elisa) — для мышей. Статистический анализ выполняли с помощью лицензированного программного обеспечения GraphPad Prism 9. **Результаты.** Изменения концентрации белка S100b изучали на моделях алкогольной нейропатии, билатеральной и фокальной церебральной ишемии, черепно-мозговой травмы. Формирование всех патологий приводило к повышению концентрации белка S100b как в плазме крови, так и в тканях головного мозга (при черепно-мозговой травме). Для алкогольной нейропатии, фокальной церебральной ишемии и черепно-мозговой травмы изменения уровня этого маркера достигали статистической значимости. **Заключение.** Повышение концентрации S100b является признаком повреждения нейронов в результате воздействия ишемических, травматических и токсических факторов, а также при гипогликемических состояниях. Таким образом, белок S100b может применяться в доклинических исследованиях в качестве маркера повреждения головного мозга, реагирующего на повреждения различного генеза в исследованиях фармакодинамики и фармакологической безопасности лекарственных препаратов.

Ключевые слова: алкогольная нейропатия, билатеральная ишемия, крысы, мыши, черепно-мозговая травма, S100b.

Для цитирования: Вавилова В.А., Фаустова Н.М., Пелешок А.А. и др. Белок S100b как биологический маркер повреждения нервной ткани у лабораторных животных в доклинических исследованиях. Трансляционная медицина. 2024; 11(4): 342-350. DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-4-342-350. EDN: GQPGRI

S100B PROTEIN AS A BIOLOGICAL MARKER OF NERVE TISSUE DAMAGE IN LABORATORY ANIMALS IN PRECLINICAL STUDIES

Valeriya A. Vavilova, Natalia M. Faustova, Andrei A. Peleshok, Kirill L. Kryshen', Marina N. Makarova, Valery G. Makarov

Research and manufacturing company "Home of Pharmacy", Kuzmolovsky settlement, Leningrad Region, Russia

Corresponding author:

Valeria A. Vavilova,
Research and manufacturing company
"Home of Pharmacy",
Zavodskaya str., 3, building 245,
Kuzmolovsky settlement, Leningrad region,
Russia, 188663.
E-mail: vavilova.va@doclinika.ru

Received 09 April 2024; accepted 31 July 2024.

Abstract

Background. For preclinical studies of drugs a relevant task is the selection of specific biochemical markers reflecting damage to the central nervous system, both in toxicological and pharmacological experiments. One of such markers may be protein S100b, the level of which will make it possible to assess the damage of the central nervous system of various genesis. **Objective.** The aim of the study was to assess changes in the level of S100b protein in the blood and in brain homogenates in brain tissue injuries of various genesis. **Design and methods.** The study was conducted on males of outbred rats and mice. A total of 62 animals were used: 47 rats and 15 mice. To determine the concentration of S100b protein, ELISA kits Rat S100b/S100 beta Elisa kit (Sandwich Elisa) were used) for rats and Mouse S100b/S100 beta Elisa kit (Sandwich Elisa) for mice. Statistical analysis was performed using licensed GraphPad Prism 9 software. **Results:** Changes of protein S100B was explored on models of alcohol neuropathy, bilateral and focal cerebral ischemia, traumatic brain injury. Forming of all pathologies led to increasing of protein S100B both in blood plasma and in brain tissues in case of traumatic brain injury. For alcohol neuropathy, focal and cerebral ischemia and traumatic brain injury changings of this marker level reached statistic meaning. **Conclusion.** Increased concentration of S100b is a sign of neuronal damage as a result of ischemic, traumatic and toxic factors, as well as in hypoglycemic conditions. Thus, protein S100b can be used in preclinical studies as a marker of brain damage, responding to damage of various genesis in studies of pharmacodynamics and pharmacological safety of drugs.

Key words: alcoholic neuropathy, bilateral ischemia, cranio-cerebral trauma, mice, protein S100b, rats.

For citation: Vavilova VA, Faustova NM, Peleshok AA, et al. S100b protein as a biological marker of nerve tissue damage in laboratory animals in preclinical studies. Translational Medicine. 2024; 11(4): 342-350. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-4-342-350. EDN: GQPGRI

Список сокращений: ДКИ — доклинические исследования, ОНМК — острое нарушение мозгового кровообращения, ЦНС — центральная нервная система, ЧМТ — черепно-мозговая травма.

Введение

Белки семейства S100 — это группа интрацеллюлярных кальций-связывающих белков, которые представляют собой гомодимеры массой

10–12 кДа. Белки этой группы обладают высокой тканеспецифичностью: их уровень значительно колеблется в различных отделах головного мозга, однако содержание в отдельно взятых структурах обычно постоянно. Например, наиболее высокая концентрация S100 в норме определяется в мозжечке. Фракции S100 обладают способностью связывать ионы кальция, однако имеют различия в числе кальций-связывающих центров (их ко-

личество варьирует от 2 до 8). S100 экспрессируются преимущественно астроцитами, олигодендроцитами и шванновскими клетками. Точный механизм секреции изучен недостаточно, однако, по экспериментальным данным, в культивированных астроцитах крыс высвобождение S100 может быть связано с изменением внутриклеточной концентрации кальция [1–4].

В литературе описаны различные функции белка S100b: 1) передача сигналов, контролирующая активность ферментов, регуляцию клеточного цикла; 2) поддержание кальциевого гомеостаза; 3) транскрипция, пролиферация, дифференцировка клеток (участие в росте нейритов, ингибирование сборки микротрубочек) и др. [4–7].

Одной из особенностей белка S100b является то, что его функциональное значение зависит от его концентрации во внеклеточном матриксе: в наномолярных концентрациях, считающихся физиологическими; он выполняет адаптационно-трофическую функцию, стимулирует пролиферацию астроцитов, подавляет реакцию астроцитов и микроглии на нейротоксические воздействия [8], в микромолярных концентрациях — стимулирует апоптоз клеток, синтез провоспалительных цитокинов, взаимодействуя с RAGE-рецепторами нейронов, микроглии, астроцитов и клеток сосудистой стенки [9].

В клинической практике белок S100b является одним из специфичных маркеров нарушения мозгового кровообращения, в том числе деструктивно-воспалительных процессов, перинатальной

патологии центральной нервной системы [10–13]. У человека концентрация белка S100b в крови повышается в процессе развития геморрагического или ишемического инсульта в прямой зависимости от величины очага поражения головного мозга. Нарастание уровня белка S100b имеет корреляцию с тяжестью клинической картины при острых и хронических нарушениях мозгового кровообращения, в том числе травматического происхождения. Таким образом, измерение белка S100b у больных с инсультом (ОНМК) позволяет давать оценку тяжести, а также спрогнозировать дальнейшее течение, исход заболевания [4, 10–13]. Авторы работы [12] отмечают, что определение концентрации S100b в крови имеет ограниченную прогностическую ценность при нейротравме, при этом концентрация этого белка в спинномозговой жидкости очень чувствительна к малейшим воздействиям, а высокие уровни в плазме крови белка S100b, свыше 0,7 нг/мл, коррелируют со 100 % летальностью у пациентов.

В ряде статей отмечается, что повышение уровня S100b не всегда коррелирует с тяжестью повреждения головного мозга, например, не было выявлено взаимосвязи между уровнем S100b в сыворотке крови добровольцев и наличием диабетической периферической нейропатии [14].

Следует отметить, что при изучении токсичности лекарственных средств необходимо оценить не только существенные, необратимые нарушения в организме животных, но и функциональные нарушения, приводящие к отдаленным последствиям.

Таблица 1. Количество животных по группам

Table 1. Number of animals by groups

Вид патологии	Вид животных	Количество животных, n	
		Интактные животные	Животные с патологией*
Алкогольная нейропатия	Крысы	8	7
Билатеральная, перманентная, церебральная ишемия		8	7
Фокальная церебральная ишемия		8	9**
Черепно-мозговая травма	Мыши	8	7

Примечания: * — количество животных со сформировавшейся патологией на 2-й день эксперимента; ** — число животных было увеличено в связи с вероятной гибелью на этапе индукции патологии.

Note: * — number of animals with developed pathology on the second day of the experiment; ** — number of animals was increased due to the probable death at the stage of pathology induction.

Целью исследования являлась оценка изменения уровня белка S100b в крови и в гомогенатах головного мозга при повреждениях тканей мозга различного генеза: экспериментальном модели-

ровании ишемии головного мозга (билатеральная и фокальная церебральная ишемия), алкогольной нейропатии у крыс, а также черепно-мозговой травме у мышей.

Таблица 2. Условия моделирования патологий

Table 2. Conditions for the simulation of pathologies

Вид патологии	Условия моделирования патологии
1. Алкогольная нейропатия	Форсированное потребление раствора этанола в нарастающих концентрациях в течение 56 дней [15]. Последовательно повышали концентрацию этанола каждую неделю: 9 % (v/v), 15 % (v/v), 20 % (v/v), 25 % (v/v), 30 % (v/v). Затем животные получали этанол в концентрации 30 % (v/v) в течение 56 дней, при этом доступ к воде был ограничен. Доступ к корму не ограничивали. Доступ к питьевой воде предоставляли животным ежедневно на 2 часа. Интактные животные получали только питьевую воду, без ограничений. Для оценки количества потребленного алкоголя еженедельно взвешивали животных и поилки.
2. Черепно-мозговая травма (ЧМТ)	Метод свободного падения груза на лобно-теменную часть головы мышей [16]. Воздействие осуществлялось с помощью груза массой 305 г, с диаметром конечной точки 3 мм, высота падения — 2,1 см. (Анестезия — ингаляционный наркоз препаратом Фторотан (МНН: галотан), «Пирамал Энтерпрайзис Лимитед», Индия). Сформировано травматическое повреждение средней степени выраженности без летального исхода [17, 18]. Через 1 час после формирования патологии оценивали у мышей неврологический статус.
Билатеральная перманентная церебральная ишемия*	Окклюзия общих сонных артерий с обеих сторон [19, 20]. Схема операции: Срединный разрез кожи по линии проекции трахеи → → разобщение мышц, выделение общих сонных артерий (СА) → наложение лигатуры → прекращение кровоснабжения головного мозга через СА
3. Фокальная церебральная ишемия*	Окклюзия средней мозговой артерии [21, 22]. Схема операции: Срединный разрез кожи по линии проекции трахеи → → разобщение мышц, выделение левой общей СА и ее ветвей — наружную и внутреннюю сонные артерии → наложение временной лигатуры на общую СА → наложение двух лигатур дистальнее от бифуркации на наружную сонную артерию, между которыми производится разрез → введение филамента (нейлоновая нить размером 4–0) во внутреннюю СА на расстояние около 24 мм от бифуркации общей сонной артерии и до начала ответвления средней мозговой артерии → блокирование основания средней мозговой артерии → фиксация филамента к наружной СА, лигирование участка наружной СА → восстановление кровоснабжения в общей СА

Примечание: * — при формировании патологий № 3 и № 4 для общей анестезии животным внутримышечно вводили смесь препаратов Zoletil 100 (Virbac Sante Animale, Франция) и Xila (Interchemie werken «De Adelaar» B.V, Нидерланды) в дозе 2,6 мг/кг.

Note: * — during the formation of pathologies No 3 and No 4 for general anesthesia, animals were intramuscularly injected with a mixture of Zoletil 100 (Virbac Sante Animale, France) and Xila (Interchemie werken “De Adelaar” B.V, Netherlands) in dose of 2,6 mg/kg.

В статье обобщен собственный опыт использования белка S100b как дополнительного маркера повреждения центральной нервной системы (ЦНС) при моделировании патологий ЦНС для изучения фармакологического действия кандидатов в лекарственные средства.

Материалы и методы

Исследования были проведены на самцах аутбредных крыс и мышей (питомник НПО «Дом Фармации», Россия) в период с сентября 2018 года по декабрь 2020 года. В исследовательских работах было использовано суммарно 62 животных: 47 крыс и 15 мышей.

Все проведенные научно-исследовательские работы были рассмотрены и одобрены для проведения биоэтической комиссией НПО «Дом Фармации». Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях и в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14.

В таблице 2 представлено описание условий формирования патологии на грызунах.

Определение белка S100b в биоматериале животных

Для определения концентрации белка S100b использовали наборы производителя LifeSpan BioSciences (США) в биоматериале крыс использовали ИФА-наборы Rat S100b/S100 beta Elisa kit (Sandwich Elisa) № LS-F5980 (аналитический диапазон методики — 3,125–200 пг/мл) и № LS-F23898 (15,53–1000 пг/мл), в биоматериале мышей — Mouse S100b/S100 beta Elisa kit (Sandwich Elisa), № LS-F5980 (31,25–2000 пг/мл).

Во всех экспериментах на второй день после формирования патологии у крыс было отобрано 0,7 мл крови из хвостовой вены в пробирку с 7 мкл раствора гепарина натрия (5000 МЕ/мл). У мышей кровь была забрана посмертно из полостей сердца в объеме 0,5 мл в пробирку с 5 мкл раствора гепарина натрия (5000 МЕ/мл).

Для получения плазмы пробирку с кровью центрифугировали при 1000g в течение 15 минут при температуре +2–+8 °С.

Для получения гомогенатов мозга использовали лизирующий буферный раствор Ripa Buffer (10X) (Cell Signaling Technology, США), № 9806S.

Головной мозг мышей гомогенизировали в лизирующем буферном растворе (1X) в соотношении 1:4. Ткани мозга гомогенизировали с помощью измельчителя тканей Polytron PT 1600E System

(Kinematica, Швейцария) при охлаждении, помещая пробирку в емкость со льдом, затем гомогенаты обрабатывали в течение 15 минут в ультразвуковой ванне. Гомогенаты центрифугировали при 10000g в течение 10 минут. Супернатанты перед анализом мозга разбавляли в 100000 раз в 0,01M фосфатно-солевом буферном растворе.

Оптическую плотность растворов измеряли на многофункциональном микропланшетном анализаторе CLARIOstar (BMG Labtech, Германия) в двухволновом режиме при 450 нм (основная длина волны) и 650 нм (референсная длина волны). Расчет концентрации белка S100b выполняли с помощью линейной модели обработки данных.

Статистический анализ выполняли с помощью лицензированного программного обеспечения GraphPad Prism версии 9 (GraphPad, США). Данные представлены как $M \pm SEM$, где M — среднее арифметическое, SEM — стандартная ошибка среднего. Для сравнительной оценки уровня белка S100b в норме и при патологии использовали t -критерий Стьюдента для независимых переменных. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В таблице 3 приведены результаты определения уровня белка S100b в плазме крови крыс и мышей и гомогенатах головного мозга мышей при различных патологиях.

В ходе исследований были получены сопоставимые уровни белка S100b в плазме крови для интактных мышей и крыс. Для концентраций исследуемого белка в плазме крови интактных крыс, полученных в ходе экспериментов, характерна значительная вариабельность данных от 29 до 78 пг/мл. Высокая межиндивидуальная вариабельность данных может быть обусловлена сезонными изменениями концентрации S100b в плазме крови, а также отличиями фоновой экспрессии белка S100b не только в центральной нервной системе, но и в других органах и тканях (коже, жировой ткани, почках и др.) [6].

При моделировании алкогольной нейропатии и фокальной церебральной ишемии у крыс наблюдалось статистически значимое повышение, более чем в 2 раза, уровня белка S100b.

Для группы крыс с индуцированной билатеральной перманентной церебральной ишемией увеличение концентрации S100b в плазме крови на 2-й день формирования патологии в среднем в 1,7 раза было наименее выраженным и не имело статистической значимости. При изучении данного вида патологии у крыс была также забрана

кровь на 22-й день после ее формирования (рис. 3). Необходимо отметить, что в течение 20 дней изучаемый показатель для обеих групп животных оставался стабильным: концентрация S100b в интактной группе составила в среднем 65–79 пг/мл, в группе животных с патологией — 102–158 пг/мл.

В исследовании [23] выявлено статистически значимое увеличение уровня белка S100b при ишемически-реперфузионном повреждении головного мозга крыс, уровень S100b в сыворотке крови коррелирует с тяжестью церебральной ишемии с реперфузией.

Для моделирования повреждений ЦНС травматического характера использовали другой вид лабораторных животных — мышей. При моделировании черепно-мозговой травмы (ЧМТ) у мышей динамика содержания S100b в плазме крови и гомогенатах головного мозга была одинаковой и ожидаемо более выраженной по сравнению с другими видами патологий. Так, количество белка S100b при ЧМТ увеличилось в плазме крови в 4,3 раза, в гомогенатах мозга — в 3,6 раза. Аналогичные результаты при использовании мышей были получены в работе [11].

По данным ранее проведенного исследования [24], при развитии гипогликемии у крыс концентрация белка S100b также увеличивается не только

в крови (в среднем в 3 раза), но и в головном мозге в зоне CA1 гиппокампа, что указывает, по мнению авторов [24], «на развитие индуцированных гипогликемическим состоянием нейротоксических процессов в данной структуре».

Изучаемый белок S100b в физиологических (нанолярных) концентрациях S100b выполняет защитную функцию в нейронах [7]. Значительное повышение его уровня рассматривается как признак поражения нейрональных структур.

Необходимо отметить, что белки S100b, кроме вышеперечисленных функций, регулируют клеточный цикл и апоптоз [7] и могут участвовать в процессе онкогенеза. В клинической практике белок S100b как наиболее изученный биомаркер меланомы применяют для оценки развития патологии и эффективности терапии. Концентрация этого белка находится в пределах нормы у здоровых лиц и людей с доброкачественными новообразованиями кожи, но повышается на II стадии развития заболевания и выше (III, IV). Данный факт не противоречит идее использовать S100b как маркер нарушений функционального состояния головного мозга в ходе доклинических исследований (ДКИ), поскольку для такого рода исследований в экспе-

Таблица 3. Концентрация белка S100b в плазме крови и гомогенатах головного мозга у крыс и мышей, M±SEM

Table 3. The concentration of S100b protein in blood plasma and brain homogenates in rats and mice, M±SEM

Вид патологии	Вид животных	Концентрация белка S100b	Интактные животные
		Вид биоматериала, единицы измерения	
Алкогольная нейропатия	Крысы	Плазма крови, пг/мл	29 ± 5 n = 8
Билатеральная, перманентная, церебральная ишемия			78 ± 14 n = 8
Фокальная церебральная ишемия			49 ± 9 n = 8
Черепно-мозговая травма	Мыши	Плазма крови, пг/мл	94 ± 9 n = 8
		Мозг, мкг/г	112 ± 6 n = 8

Примечание: * — отличия статистически значимы в сравнении с интактными животными, t-тест Стьюдента при $p < 0,05$.

Note: * — The differences are statistically significant in comparison with intact animals, Student's t-test at $p < 0.05$.

римент отбирают клинически здоровых животных и повышение уровня этого белка в крови можно ожидать в первую очередь при нарушениях со стороны ЦНС. Статистически значимое повышение концентрации этого белка, не менее чем в 1,5 раза, можно рассматривать как причину дополнительного изучения влияния лекарственных средств на головной мозг не только в ходе ДКИ, но и затем в клинических исследованиях.

В обзорах [25, 26] отмечается, что уровни изучаемого белка в биологических жидкостях являются биомаркером активного нервного дистресса. Несмотря на то, что широкий спектр заболеваний, в которых участвует белок, снижает его специфичность, его уровни остаются важным показателем в отслеживании тенденции заболеваний, связанных с поражением ЦНС.

Таким образом, белок S100b можно рассматривать как неспецифический маркер повреждения головного мозга, реагирующий на механические, гипоксические, ишемические, биохимические и другие нейротоксические факторы, и рекомендовать его применение на различных этапах доклинических исследований лекарственных препаратов.

Необходимо отметить, что для белка S100b в настоящее время не установлены общепринятые референтные значения, как для человека, так и лабораторных животных. Например, в работе Pham и соавторов (2010) [27], уровень белка S100b составил 0,08 нг/мл, тогда как в работе Morera-Fumero и коллег (2013) [28] концентрация аналита состав-

ляла в среднем 35 нг/мл, а также была продемонстрирована зависимость уровня белка от времени года (зима/лето). Высокая вариабельность данных характерна и для животных [29, 30].

Учитывая вышесказанное, определение концентрации S100b в сыворотке крови можно использовать для оценки патологических процессов в ЦНС как на этапе доклинических исследований у животных, так и у человека в клинической практике.

В связи с вышеизложенным, в отсутствие общепринятых референтных значений в экспериментальной работе, необходимо ориентироваться в первую очередь на относительную разницу в концентрациях «до патологии» и «после», а также рекомендовать формирование собственных внутрिलाбораторных норм.

Заключение

Концентрация белка S100b увеличивалась при формировании всех рассматриваемых видов патологий, что может быть диагностическим признаком повреждения нейронов, сопровождающегося нарушением проницаемости гематоэнцефалического барьера при ишемических, травматических повреждениях, а также при гипогликемических состояниях и токсических повреждениях.

Таким образом, белок S100b может быть использован в доклинических исследованиях как маркер патологии центральной нервной системы, реагирующий на повреждения тканей головного мозга различного генеза в исследованиях фармако-

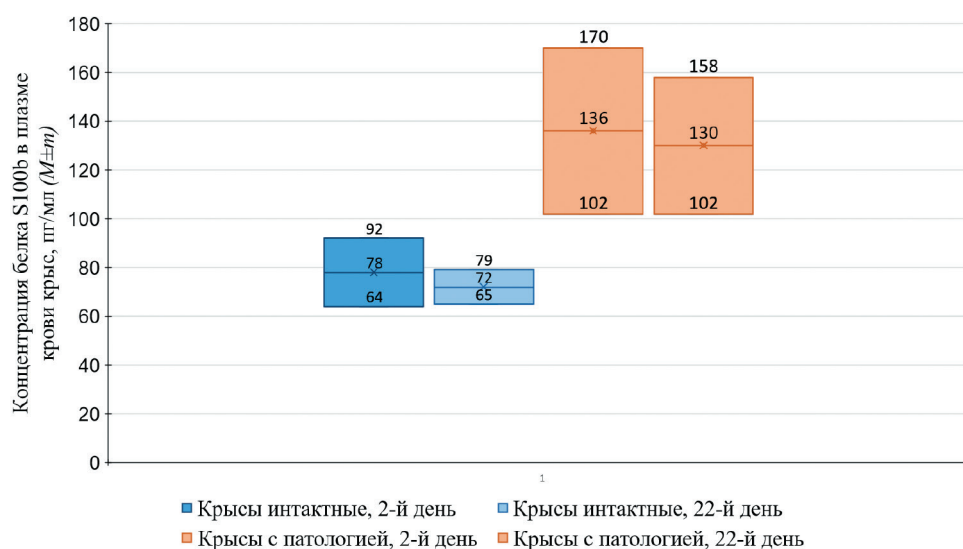


Рис. 1. Изменение концентрации белка S100b в плазме крови (пг/мл) при формировании билатеральной перманентной церебральной ишемии на 2-й и 22-й дни формирования патологии

Figure 1. Changes in the concentration of S100b protein in blood plasma (pg/ml) during the formation of bilateral permanent cerebral ischemia on the 2nd and 22nd days of pathology formation

динамики и фармакологической безопасности лекарственных препаратов в отношении центральной нервной системы.

При оценке результатов исследований рекомендуется, в отсутствие собственных внутрилабораторных норм, ориентироваться в первую очередь на относительную разницу в концентрациях «до патологии» и «после».

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Список литературы / References

1. Arrais AC, et al. S100B protein: general characteristics and pathophysiological implications in the Central Nervous System //International Journal of Neuroscience. 2022;132:313–321. DOI: 10.1080/00207454.2020.1807979
2. Gonzalez LL, Garrie K, Turner MD. Role of S100 proteins in health and disease //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. 2020; 1867(6):118677. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2020.118677
3. Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature) //Biochemical and biophysical research communications. 2004; 322(4):1111–1122. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.07.096
4. Shaitanova TYu, Siskin VA, Nedashkovsky EV. Practical application of S-100b protein in acute cerebrovascular disease. Messenger of anesthesiology and resuscitation. 2014;2:63–71. In Russian [Шайтанова Т.Ю., Саскин В.А., Недашковский Э.В. Практическое применение белка S-100B при острой цереброваскулярной патологии. Вестник анестезиологии и реаниматологии. 2014; 2:63–71].
5. Lue LF, Yan SD, Stern DM, et al. Preventing activation of receptor for advanced glycation endproducts in Alzheimer's disease. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord. 2005;4(3):249–266. DOI: 10.2174/1568007054038210.
6. Beloborodova NV, Dmitriyeva IB, Chernevskaya EA. Diagnostic Value of S100B Protein in Critical Conditions. General Reanimatology. 2011;7(6):72–76. In Russian [Белобородова Н.В., Дмитриева И.Б., Черневская Е.А. Диагностическая значимость белка s100b при критических состояниях. Общая реаниматология. 2011;7(6):72–76]. DOI: 10.15360/1813-9779-2011-6-72.
7. Donato R, Sorci G, Riuzzi F, et al. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. Biochim Biophys Acta. 2009;1793(6):1008–1022. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2008.11.009.
8. Heizmann CW. The multifunctional S100 protein family. Methods Mol Biol. 2002;172:69–80. DOI: 10.1385/1-59259-183-3:069.
9. Trailin AV, Levada OA. S100B-protein: Neurobiology, significance in neurological and psychiatric pathology. International Journal of Neurology. 2009; 1:166–175. In Russian [Траилин А.В., Левада О.А. Белок S100B: нейробиология, значение при неврологической и психиатрической патологии. Международный неврологический журнал. 2009; (1):166–175].
10. Wang KK, Yang Z, Zhu T, et al. An update on diagnostic and prognostic biomarkers for traumatic brain injury. Expert Rev Mol Diagn. 2018; 18(2):165–180. DOI: 10.1080/14737159.2018.1428089.
11. Sandhir R, Onyszchuk G, Berman NE. Exacerbated glial response in the aged mouse hippocampus following controlled cortical impact injury. Exp Neurol. 2008; 213(2):372–380. DOI: 10.1016/j.expneurol.2008.06.013.
12. Kellermann I, Kleindienst A, Hore N, et al. Early CSF and Serum S100B Concentrations for Outcome Prediction in Traumatic Brain Injury and Subarachnoid Hemorrhage. Clin Neurol Neurosurg. 2016;145:79–83. DOI: 10.1016/j.clineuro.2016.04.005.
13. Di Battista AP, Buonora JE, Rhind SG, et al. Blood Biomarkers in Moderate-To-Severe Traumatic Brain Injury: Potential Utility of a Multi-Marker Approach in Characterizing Outcome. Front Neurol. 2015;6:110. DOI:10.3389/fneur.2015.00110.
14. Celikbilek A, Akyol L, Sabah S, et al. S100B as a glial cell marker in diabetic peripheral neuropathy. Neuroscience letters. 2014;558:53–57. DOI: 10.1016/j.neulet.2013.10.067.
15. Kashkin VA. Analgesic effect of cardiotonic steroids against the background of alcoholic neuropathy in the rat. Integrative Physiology. 2020; 1(2):133–139. In Russian [Кашкин В.А. Анальгетический эффект кардиотонических стероидов на фоне алкогольной нейропатии у крыс. Интегративная физиология. 2020;1(2):133–139]. DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-133-139.
16. Chen Y, Constantini S, Trembovler V, et al. An experimental model of closed head injury in mice: pathophysiology, histopathology, and cognitive deficits. J Neurotrauma. 1996; 13(10):557–568. DOI: 10.1089/neu.1996.13.557.
17. Flierl MA, Stahel PF, Beauchamp KM, et al. Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device. Nat Protoc. 2009;4(9):1328–1337. DOI:10.1038/nprot.2009.148.
18. Tsenter J, Beni-Adani L, Assaf Y, et al. Dynamic changes in the recovery after traumatic brain injury in mice: effect of injury severity on T2-weighted MRI abnormalities, and motor and cognitive functions. J Neurotrauma. 2008;25(4):324–333. DOI:10.1089/neu.2007.0452.
19. Aski ML, Rezvani ME, Khaksari M, et al. Neuroprotective effect of berberine chloride on cognitive impairment and hippocampal damage in experimental model of vascular dementia. Iran J Basic Med Sci. 2018; 21(1):53–58. DOI: 10.22038/IJBMS.2017.23195.5865.

20. Cechetti F, Worm PV, Pereira LO, et al. The modified 2VO ischemia protocol causes cognitive impairment similar to that induced by the standard method, but with a better survival rate. *Braz J Med Biol Res.* 2010;43(12):1178–1183. DOI: 10.1590/s0100-879x2010007500124.

21. Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemic brain edema. 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke.* 1986; 85:1–8. DOI: 10.3995/jstroke.8.1.

22. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 1989;20(1):84–91. DOI: 10.1161/01.str.20.1.84.

23. Dimopoulos C, Damaskos C, Papadakis M, et al. Expression of S100B protein in ischemia/reperfusion-induced brain injury after cyclosporine therapy: a biochemical serum marker with prognostic value? *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research.* 2019;(25): 1637. DOI: 10.12659/MSM.912810.

24. Mazukina EV, Shekunova EV, Kashkin VA, et al. Recurrent hypoglycemia affects S100b plasma concentration and S100b hippocampal expression in rats. *Laboratory animals for science.* 2019;(1):95–107. In Russian [Мазукина Е.В., Шекунова Е.В., Кашкин В.А. и др. Влияние умеренной гипогликемии на уровень белка S100b в крови и гиппокампе крыс. Лабораторные животные для научных исследований. 2019;(1):95–107]. DOI: 10.29296/2618723X-2019-01-07.

25. Michetti F, D'Ambrosi N, Toesca A, et al. The S100B story: from biomarker to active factor in neural injury. *J Neurochem.* 2019;148(2):168–187. DOI: 10.1111/jnc.14574.

26. Michetti F, Clementi ME, Di Liddo R, et al. The S100B Protein: A Multifaceted Pathogenic Factor More Than a Biomarker. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(11):9605. DOI: 10.3390/ijms24119605.

27. Pham N, Fazio V, Cucullo L, et al. Extracranial sources of S100B do not affect serum levels [published correction appears in *PLoS One.* 2010;5(10). DOI: 10.1371/annotation/bdcb41f2-a320-4401-a6ab-86e71738597e]. *PLoS One.* 2010;5(9):e12691. DOI: 10.1371/journal.pone.0012691

28. Morera-Fumero AL, Abreu-Gonzalez P, Henry-Benitez M, et al. Summer/winter changes in serum S100B protein concentration as a source of research variance. *J Psychiatr Res.* 2013;47(6):791–795. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2013.03.001.

29. Kural A, Tekin Neijmann S, Toker A, et al. Evaluation of rat major cellular prion protein for early diagnosis in experimental rat brain trauma model. *Turkish Journal of Trauma and Emergency Surgery.* 2020;26(1):1–8. DOI: 10.5505/tjtes.2018.46923.

30. Netto CB, Conte S, Leite MC, et al. Serum S100B protein is increased in fasting rats. *Arch Med Res.* 2006;37(5):683–686. DOI: 10.1016/j.arcmed.2005.11.005.

Информация об авторах:

Вавилова Валерия Александровна, руководитель группы токсикологии, отдел специфической токсикологии и микробиологии, АО «НПО «Дом Фармации»;

Фаустова Наталья Михайловна, к.х.н., руководитель лаборатории иммуноферментного анализа, АО «НПО «Дом Фармации»;

Пелешок Андрей Андреевич, стажер-исследователь, отдел молекулярной фармакологии, АО «НПО «Дом Фармации»;

Крышень Кирилл Леонидович, к.б.н., руководитель отдела специфической токсикологии и микробиологии, АО «НПО «Дом Фармации»;

Макарова Марина Николаевна, д.м.н., директор АО «НПО «Дом Фармации»;

Макаров Валерий Геннадьевич, д.м.н., научный руководитель АО «НПО «Дом Фармации».

Authors information:

Valeriya A. Vavilova, Head of the Toxicology Group, Department of Specific Toxicology and Microbiology, RMC “Home of Pharmacy”;

Natalia M. Faustova, PhD, Head of the Laboratory of enzyme Immunoassay, RMC “Home of Pharmacy”;

Andrei A. Peleshok, research intern, Department of Molecular Pharmacology, RMC “Home of Pharmacy”;

Kirill L. Kryshen', PhD, Head of the Department of Specific Toxicology and Microbiology, RMC “Home of Pharmacy”;

Marina N. Makarova, MD, Director of RMC “Home of Pharmacy”;

Valery G. Makarov, MD, Scientific director of RMC “Home of Pharmacy”.

ОБ ОЦЕНКЕ КОНТАМИНАЦИИ И АНАЛИЗЕ КОНТРОЛЬНЫХ ПРОБ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ТОКСИКОКИНЕТИКИ

Косман В. М., Карлина М. В., Петрова Е. М., Макарова М. Н.,
Макаров В. Г.

Акционерное общество «Научно-производственное объединение
“Дом Фармации”», г. п. Кузьмоловский, Ленинградская область,
Россия

Контактная информация:

Косман Вера Михайловна,
АО «НПО «Дом Фармации»,
Заводская ул., д. 3, корп. 245, г. п.
Кузьмоловский, Ленинградская область,
Россия, 188663.
E-mail: kosman.vm@doclinika.ru

Статья поступила в редакцию 18.05.2024
и принята к печати 11.08.2024.

Резюме

Актуальность. Оценка контаминации контрольных образцов является необходимым элементом подтверждения корректности исследований токсикокинетики (ТК), сопутствующим изучению токсичности лекарственных веществ и препаратов. Вместе с тем недостаточная проработка действующих регуляторных документов обуславливает необходимость обсуждения практических аспектов и совершенствования регуляторной базы. **Цель.** Работа посвящена рассмотрению экспериментального опыта по оценке контаминации контрольных проб в исследованиях ТК. **Материалы и методы.** В качестве экспериментальных примеров рассмотрены два исследования ТК лекарственных препаратов, выполненные с использованием самцов и самок кроликов при пероральном введении исследуемых препаратов в течение 28 (исследование 1) или 90 (исследование 2) дней. **Результаты.** В исследовании 1 выявлен уровень контаминации 17–25 % (в первый и последний дни введения исследуемого препарата соответственно). Контаминация биопроб происходит *in vivo* (контаминация организма животного) и *ex vivo* (на этапе забора биопроб, на преаналитическом и аналитическом этапах). Характер обнаружения аналита в пробах позволил исключить контаминацию *in vivo*, результаты внутреннего расследования позволили предположить, что она происходила на этапе отбора биопроб. В исследовании 2 реализован ряд профилактических мер и получен незначительный уровень контаминации (0,83 %), не оказавший влияния на полноту и корректность интерпретации результатов. **Заключение.** На основании экспериментального опыта сформулированы рекомендации по минимизации и профилактике контаминации контрольных образцов при выполнении биологической части, преаналитического и аналитического этапов исследований. Предположительно, при наличии случайного характера загрязнений, свидетельствующего о его *ex vivo* происхождении, уровень контаминации, не превышающий 25 %, можно считать незначительным, то есть не ведущим к дальнейшему отклонению и аннуляции результатов всего исследования.

Ключевые слова: аннулирование результатов исследования, контаминация, регуляторные документы, токсикокинетика.

Для цитирования: Косман В.М., Карлина М.В., Петрова Е.М. и др. Об оценке контаминации и анализе контрольных проб в исследованиях токсикокинетики. Трансляционная медицина. 2024; 11(4): 351-363. DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-4-351-363. EDN: FWCXVC

ON THE ASSESSMENT OF CONTAMINATION AND ANALYSIS OF CONTROL SAMPLES IN TOXICOKINETICS STUDIES

Vera M. Kosman, Marina V. Karlina, Elizaveta M. Petrova,
Marina N. Makarova, Valery G. Makarov

Research and manufacturing company “Home of Pharmacy”,
Kuzmolovsky settlement, Leningrad Region, Russia

Corresponding author:

Vera M. Kosman,
RMC “Home of Pharmacy”,
Zavodskaya str., 3, building 245,
Kuzmolovsky settlement, Leningrad Region,
Russia, 188663.
E-mail: kosman.vm@doclinika.ru

Received 18 May 2024; accepted 11 August 2024.

Abstract

Relevance. The evaluation of control samples contamination is a necessary element for confirming the correctness of toxicokinetic studies (TK), concomitant with the study of toxicity of drugs and products. At the same time, insufficient elaboration of existing regulatory documents necessitates discussion of practical aspects and improvement of the regulatory framework. **Purpose.** The work is devoted to the consideration of experimental experience of control samples contamination in TK studies. **Materials and methods.** As experimental examples, two studies of TK drugs performed using rabbits with oral administration of study drugs for 28 (Study 1) or 90 (Study 2) days were considered. **Results.** Study 1 revealed a contamination level of 17–25 % (on the first and last days of study drug administration, respectively). Contamination of bioassays can occur *in vivo* (contamination of animals) and *ex vivo* (at the stage of bioassay sampling, at the pre-analytical stage and analytical stage). The nature of the analyte detection in the samples made it possible to exclude contamination *in vivo*, and the results of an internal investigation suggested that it occurred at the stage of biosample selection. In Study 2, a number of preventive measures were implemented and a slight level of contamination was obtained (0.83 %), which did not affect the completeness and correctness of results interpretation. **Conclusion.** Based on experimental experience, recommendations for minimizing and preventing contamination of control samples during the biological part, pre-analytical and analytical stages of studies were formulated. Presumably, in the presence of a random nature of contamination indicating its *ex vivo* origin, the level of contamination not exceeding 25 % can be considered insignificant, i.e. not leading to further deviation and cancellation of the results of the entire study.

Key words: cancellation of study results, contamination, regulatory documents, toxicokinetics.

For citation: Kosman VM, Karlina MV, Petrova EM, et al. On the assessment of contamination and analysis of control samples in toxicokinetics studies. *Translational Medicine*. 2024; 11(4): 351-363. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-4-351-363. EDN: FWCXVC

Список сокращений: БЭК — биоэтическая комиссия, ВЭЖХ-МС/МС — высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-селективным детектированием, КК — контроль качества, НПКО — нижний предел количественного определения, ТК — токсикокинетика, ФК — фармакокинетика, М — среднее значение, SD — стандартное отклонение, SEM — стандартная ошибка среднего.

Введение

Согласно действующим в настоящее время регуляторным документам¹ одной из составляющих комплекса доклинических исследований, необходимых для создания и регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения, является оценка их токсикокинетики (ТК). Изучение ТК направлено на оценку системной экспози-

ции и получение фармакокинетических данных, которые используют для интерпретации результатов токсикологических исследований и их значимости для клинической безопасности¹. Таким образом, оценка ТК является составной частью изучения токсичности лекарственных субстанций и препаратов. Основные отличия исследований ТК от изучения фармакокинетики (ФК) связаны с применением значительно более высоких доз и схем введения, отличающихся от планируемых в клинической практике (как правило, при оценке ТК используется ежедневное введение в течение сравнительно длительного периода: 28–90–180 и более дней) [1]. Кроме того, при рассмотрении результатов основной акцент направлен не на характеристику фармакокинетических параметров изучаемого соединения, а на интерпретацию данных токсичности [1, 2]¹.

При изучении токсичности и ТК регуляторными документами предусмотрена оценка контаминации контрольной группы животных исследуемым веществом². Для этого у животных контрольной группы, предусмотренной дизайном исследования по оценке токсичности (не получающей лекарственный препарат и/или получающей плацебо), необходимо провести отбор образцов биоматериала по той же схеме, что для животных экспериментальных групп².

Значительная контаминация, выявленная по результатам анализа контрольных образцов, может привести к аннулированию результатов всего токсикологического исследования². Регуляторные документы указывают на необходимость расследования потенциальных источников загрязнения при наличии существенной контаминации,

принятия корректирующих мер и включения информации о контаминации в отчетные документы². Вместе с тем, действующие регуляторные документы не содержат информации о том, какой уровень контаминации следует считать значительным, критичным и обуславливающим аннуляцию всех полученных в исследовании результатов, а в каких ситуациях можно обосновать незначительное его влияние на обработку данных и интерпретацию итогов работы.

Крайне ограниченное число публикаций по данному вопросу свидетельствует об актуальности более открытого его обсуждения, обмена мнениями и опытом практического решения, что позволило бы в дальнейшем выработать более конкретные критерии и рекомендации.

Цель данной работы — рассмотрение экспериментального опыта по оценке контаминации контрольных проб в исследованиях токсикокинетики.

Материалы и методы

В качестве экспериментальных примеров в работе рассмотрены два исследования ТК лекарственных препаратов, выполненные в АО «НПО «Дом Фармации» в 2022 году.

В экспериментах были использованы кролики породы советская шиншилла (исследование 1) или новозеландский белый (исследование 2) обоих полов (питомник ФГУП «Опытно-промышленное хозяйство «Манихино» — исследование 1 или ООО «АГРО СПЕЦ СЕРВИС», Россия — исследование 2). Возраст животных к началу эксперимента составил 14–16 недель или 17–18 недель для исследований 1 и 2 соответственно. Проведение исследований было одобрено на заседании биоэтической

¹ Рекомендации ЕАЭК № 33 от 22.12.2020 «О Руководстве по изучению токсикокинетики и оценке системного воздействия в токсикологических исследованиях лекарственных препаратов».

Рекомендации ЕАЭК № 10 от 21.05.2020 «О Руководстве по проведению доклинических исследований токсичности при повторном (многократном) введении действующих веществ лекарственных препаратов для медицинского применения».

ICH Topic S 3 A Toxicokinetics: a guidance for assessing systemic exposure in toxicology studies. (CPMP/ICH/384/95). https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/ich-s-3-toxicokineticsguidance-assessing-systemic-exposure-toxicology-studies-step-5_en.pdf. (21 May 2024).

S3A Toxicokinetics: The Assessment of Systemic Exposure in Toxicity Studies <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/s3a-toxicokinetics-assessment-systemic-exposure-toxicity-studies> (21 May 2024).

² Рекомендации ЕАЭК № 10 от 21.05.2020 «О Руководстве по проведению доклинических исследований токсичности при повторном (многократном) введении действующих веществ лекарственных препаратов для медицинского применения».

Guideline on evaluation of control samples in nonclinical safety studies: checking for contamination with the test substance. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP), London, UK (2005). www.ema.europa.eu (21 May 2024).

Таблица 1. Дизайн исследований

Table 1. Research design

Параметр	Исследование 1	Исследование 2
Общее число животных (код исследования)	40 самцов и 40 самок кроликов (БЭК 3.19/22)	48 самцов и 48 самок кроликов (БЭК 2.35/22)
Количество групп, количество животных в группе	четыре группы по 10 самцов и 10 самок	четыре группы по 12 самцов и 12 самок
Количество животных из каждой группы для ТК исследования (код исследования)	по 5 самцов и 5 самок из каждой группы животных (БЭК 1.19/22)	по 6 самцов и 6 самок из каждой группы животных (БЭК 3.35/22)
Введение тестируемых препаратов животным групп 2, 3 и 4*	1, 3 и 6 таблеток в день	1, 5 и 10 таблеток в день
Длительность введения	28 дней	90 дней
Отбор биоматериала для изучения ТК**	на 1–2 сутки и 28–29 сутки эксперимента на следующих временных точках: до введения препарата, через 15, 30, 45 мин., 1, 2, 3, 4, 8 и 24 ч. после введения тестируемого препарата	на 1–2 сутки и 90–91 сутки эксперимента на тех же временных точках

Примечания: * — введение осуществляли без разрушения готовой лекарственной формы препарата, перорально, многократно, один раз в день. Животным контрольной группы (группа 1) осуществляли имитацию введения — в ротовую полость вводили пустой таблеткодаватель.

** — отбор проб у животных группы 1 (по той же схеме, что и для групп 2–4 в первый и последний дни эксперимента) был предусмотрен для анализа возможной контаминации согласно рекомендациям ЕАЭК № 10 от 21.05.2020 «О Руководстве по проведению доклинических исследований токсичности при повторном (многократном) введении действующих веществ лекарственных препаратов для медицинского применения». www.ema.europa.eu.

Note: * — The administration was carried out without destroying the finished dosage form of the drug, orally, repeatedly, once a day. Animals of the control group (group 1) underwent simulated administration — an empty tablet dispenser was injected into the oral cavity.

** — sampling from animals of groups 1 (according to the same scheme as for groups 2–4 on the first and last days of the experiment) was provided for the analysis of possible contamination according to the recommendations Guideline on evaluation of control samples in nonclinical safety studies: checking for contamination with the test substance. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP), London, UK (2005).

комиссии (БЭК) АО «НПО «Дом Фармации» (протоколы БЭК от 19.05.2022 № 1.19/22 и 3.19/22 для исследования 1 и от 03.08.2022 № 2.35/22 и 3.35/22 для исследования 2).

Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях, и в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14.

Кроликов содержали в индивидуальных боксах с решетчатым полом без подстила, с зоной для отдыха (сплошной пол), снабженных автоматической ниппельной системой поения. Минимальная площадь пола на одно животное соответствовала нормативной документации³.

Животных содержали в контролируемых условиях окружающей среды (16–22 °С, относительная влажность воздуха 30–70 %, $\text{NH}_3 \leq 10 \text{ мг/м}^3$, $\text{CO}_2 \leq 0,15 \text{ об. \%}$). Световой режим составил 12 часов света и 12 часов темноты. Был установлен режим

³ Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. 8-е изд. / Пер. с англ. под ред. И. В. Белозерцевой, Д. В. Блинова, М. С. Красильщиковой. М.: ИРБИС, 2017.

воздухообмена, обеспечивающий смену около 15 объемов помещения в час.

Стандартный корм животные получали *ad libitum*, за исключением лишения утреннего кормления перед забором крови. Воду кролики получали без ограничений.

Тестируемые препараты (в исследованиях 1 и 2 изучены разные объекты) не имеют принципиального значения для предмета обсуждаемой работы, поэтому сведения о них, являющиеся конфиденциальной информацией, в статье не представлены.

Дизайн исследований был построен с учетом современных норм биоэтики и соблюдения основных принципов «3Rs» (Replacement, Reduction, Refinement: замещение, сокращение, совершенствование) с использованием минимального количества животных⁴. Поэтому биологическая часть исследований ТК (введение тестируемого препарата, взятие образцов биоматериала и т. д.) выполнена в рамках исследований токсичности и фармакологической безопасности препаратов при многократном пероральном введении кроликам с периодом отсроченного наблюдения. Дизайн исследований представлен в таблице 1.

Образцы крови кроликов отбирали из краевой вены уха с помощью внутривенного катетера, в пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА К2/К3, пробирки IMPROVACUTER, Guangzhou Improve Medical Instruments Co., LTD, Китай) в объеме 2 мл на каждую временную точку с последующим получением плазмы крови центрифугированием 15 минут при 3000 об/мин (центрифуга ОПН-8, ОАО ТНК «ДАСТАН», Киргизия, центрифуга лабораторная LMC-3000, ООО «BioSan», Латвия). Полученные образцы плазмы помещали в промаркированные пластиковые пробирки (типа «Эппендорф») и замораживали при температуре от -18 до -22 °C (морозильный ларь Liebherr GTP 2756, Liebherr, Германия).

Определение концентраций аналитов (действующих веществ препаратов, тестируемых в исследованиях 1 и 2) в биологических образцах с помощью предварительно валидированных (согласно рекомендациям⁵) методик проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектирова-

нием (ВЭЖХ-МС/МС). В исследовании 1 подготовка проб включала следующие манипуляции: в пластиковую центрифужную пробирку вместимостью 1,5 мл (типа «Эппендорф») помещали 0,10 мл исследуемого образца, добавляли 10 мкл воды очищенной, 50 мкл раствора внутреннего стандарта и тщательно перемешивали с помощью орбитальной мешалки Vortex-GENIE G560E (Scientific industries INC, США). Затем добавляли 0,3 мл ацетонитрила (сорт 0, НПК «Криохром», Россия) и снова тщательно перемешивали в течение 5 минут с помощью орбитальной мешалки Vortex-GENIE G560E (Scientific industries INC, США). Пробирку центрифугировали в течение 5 минут при 14 000 об/мин (центрифуга Eppendorf minispin plus, Eppendorf AG, Германия). Надосадочный слой переносили в вialу для автодозатора и дозировали в ВЭЖХ-систему. Объем анализируемой пробы — 0,001 мл. Анализ выполнен методом градиентной обращенно-фазовой ВЭЖХ-МС/МС на хроматографе высокого давления LC-20 (Shimadzu, Япония) с автодозатором и масс-селективным детектором LCMS-8050 с электрораспылительной ионизацией при атмосферном давлении. Линейный диапазон концентраций целевого аналита составил 0,2–508 нг/мл.

В исследовании 2 подготовка проб включала следующие манипуляции: в пластиковую центрифужную пробирку вместимостью 1,5 мл (типа «Эппендорф») помещали 0,10 мл исследуемого образца, добавляли 10 мкл раствора внутреннего стандарта, 20 мкл 0,25 М гидроксида натрия (Scharlau, pellets, for analysis, ACS, Испания), 1000 мкл метил-трет-бутилового эфира (Biosolve, HPLC, Франция) и перемешивали в вортексе (Heidolph Multi Reax, Германия) в течение 2 минут при ~2000 об/мин. После этого образцы центрифугировали в течение 2 минут при 4400 об/мин (центрифуга Eppendorf Centrifuge, Германия). 900 мкл верхнего слоя переносили в вialу автодозатора и выпаривали в токе азота при температуре +40 °C (выпариватель TurboVap LV, США). К сухому остатку добавляли 300 мкл 50 % ацетонитрила (Sigma-Aldrich, HPLC, gradient grade, 99,9 %, Германия), закручивали крышкой и перемешивали в вортексе (Heidolph Multi Reax, Германия).

⁴ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. / Миронов А.Н. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.

⁵ ICH Q2A. Text on validation of analytical procedures. ICH harmonised tripartite guideline. Geneva; 1994.
ICH Q2B. Validation of analytical procedure: methodology. Geneva; 1996.
Bioanalytical method validation. Guidance for industry. FDA; 2018.
Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP192217/2009. EMA; 2011.

в течение 2 минут при ~2000 об/мин. Полученную пробу (0,005 мл) дозировали в ВЭЖХ-систему. Анализ выполнен методом изократической обращенно-фазовой ВЭЖХ-МС/МС на хроматографе Shimadzu Prominence (Япония) с масс-спектрометром с электроспреей ионизацией и квадрупольным масс-анализатором Sciex (США). Линейный диапазон концентраций целевого анализа составил 0,2–50 нг/мл.

Более детальное рассмотрение условий ВЭЖХ-анализа, использованных внутренних стандартов, процедуры и результатов валидации методик не представлено, поскольку это является

конфиденциальной информацией и не имеет принципиального значения для предмета обсуждаемой работы.

Уровень контаминации определяли как число контрольных образцов (т. е. полученных от животных контрольной группы в каждом из исследований) с концентрацией анализа выше нижнего предела количественного определения (НПКО) используемой биоаналитической методики (для каждого из анализов в рассматриваемых исследованиях составил 0,2 нг/мл).

Для всех данных была применена описательная статистика, рассчитаны среднее значение

Таблица 2. Содержание анализа в плазме крови кроликов интактной группы в 1-й и 28-й дни эксперимента в исследовании 1, нг/мл

Table 2. Analyte content in the blood plasma of rabbits of the intact group on days 1 and 28 of the experiment in the study 1, ng/ml

Время, ч	Номер животного в группе										$\overline{X}$	SD	SEM
	1.6	1.7	1.8	1.9	1.10	1.16	1.17	1.18	1.19	1.20			
1-е введение													
0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
0,25	0,0	0,0	0,0	0,0	128,8	59,9	0,0	0,0	0,0	0,0	18,87	42,97	15,19
0,50	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	99,2	0,0	252,5	67,5	41,92	82,04	29,01
0,75	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	849,4	132,3	0,0	459,8	158,1	159,96	282,75	99,97
1,00	0,0	0,0	0,0	359,6	53,7	135,9	0,0	0,0	487,3	91,0	112,75	172,97	61,16
2,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
4,00	109,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,93	34,56	12,22
6,00	68,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	479,1	0,0	0,0	0,0	54,77	150,64	53,26
8,00	105,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,54	33,33	11,78
24,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
28-е введение													
0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
0,25	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
0,50	0,0	0,0	0,0	340,3	104,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	44,50	109,02	38,54
0,75	76,8	0,0	0,0	460,8	140,7	320,8	63,1	0,0	162,6	84,9	130,97	151,67	53,62
1,00	113,2	0,0	0,0	395,0	3212,8	358,3	131,3	0,0	675,2	108,7	499,45	978,08	345,80
2,00	0,0	0,0	0,0	2472,0	63,3	891,8	0,0	0,0	659,3	0,0	408,64	794,07	280,75
4,00	0,0	0,0	0,0	331,5	0,0	90,3	0,0	0,0	0,0	0,0	42,18	105,54	37,32
6,00	0,0	0,0	0,0	115,3	0,0	224,6	0,0	0,0	266,6	0,0	60,65	104,37	36,90
8,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
24,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00

(M), стандартное отклонение (SD) и стандартная ошибка среднего (*SEM*). Статистический анализ выполнен с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, США).

Результаты и обсуждение

При выполнении исследования 1 целевой аналит (действующее вещество тестируемого препарата) был обнаружен в ряде проб, полученных от животных группы 1 в первый и последний дни введения (табл. 2).

Выявленный уровень контаминации составил 17–25 % (в 17 образцах из 100 в первый день введения и в 25 образцах из 100 в последний день введения, рис. 1), что побудило нас проанализировать возможные причины с целью снижения и/или предотвращения риска контаминации контрольных образцов в дальнейших исследованиях.

Контаминация биопроб может происходить на разных этапах: *in vivo* (контаминация организма животного) и *ex vivo* (на этапе забора биопроб, на преаналитическом и аналитическом этапах).

Характер обнаружения аналита в пробах не имел закономерности, характерной для животных, которым препарат был введен, концентрации аналита у животных контрольной группы были существенно ниже, чем у животных в экспериментальных группах (не более 10 % от средних значений, полученных на тех же временных точках для животных группы, получавшей минимальную дозу тестируемого препарата). Вышесказанное позволило сделать вывод, что контаминация проб не связана с ошибочным введением препарата животным контрольной группы.

Контаминация образцов может также происходить *ex vivo* — при их отборе, в процессе преана-

литического этапа (например, получения плазмы крови) и/или анализа проб. Изучив работу Zimmer [3], в которой даны рекомендации по предотвращению контаминации проб в биоаналитической лаборатории и в отношении биологической части исследования, мы проанализировали обстоятельства выполнения исследования 1 (на основании бесед с персоналом, анализа документов и записей по проведению исследования и т. д.). Было выяснено, что манипуляции с животными (введение препаратов и отбор образцов крови по временным точкам) сотрудники ветеринарной службы начинали с группы с наибольшей дозой тестируемого объекта (рис. 2А). Далее переходили к животным следующих групп в порядке снижения вводимой дозы препарата, манипуляции проводили в одном помещении, отбор образцов крови от животных разных групп в ряде случаев осуществлен одним лаборантом-исследователем, а смена средств индивидуальной защиты (СИЗ, в частности перчаток) происходила по необходимости. В такой ситуации нельзя исключить контаминацию образцов через остаточные количества крови, например, на перчатках, тампонах и других материалах, с которыми могли контактировать вакутейнеры для отбора крови и/или непосредственно отбираемый материал.

При получении плазмы крови (преаналитический этап) в химико-аналитической лаборатории были использованы одноразовые расходные материалы (пластиковые пробирки, наконечники для дозаторов), обработку проб проводили последовательно — по временным точкам согласно последовательности отбора образцов, а внутри каждой временной точки — от группы, не получавшей тестируемый объект, к группам, получавшим препарат в порядке увеличения дозы. После получения

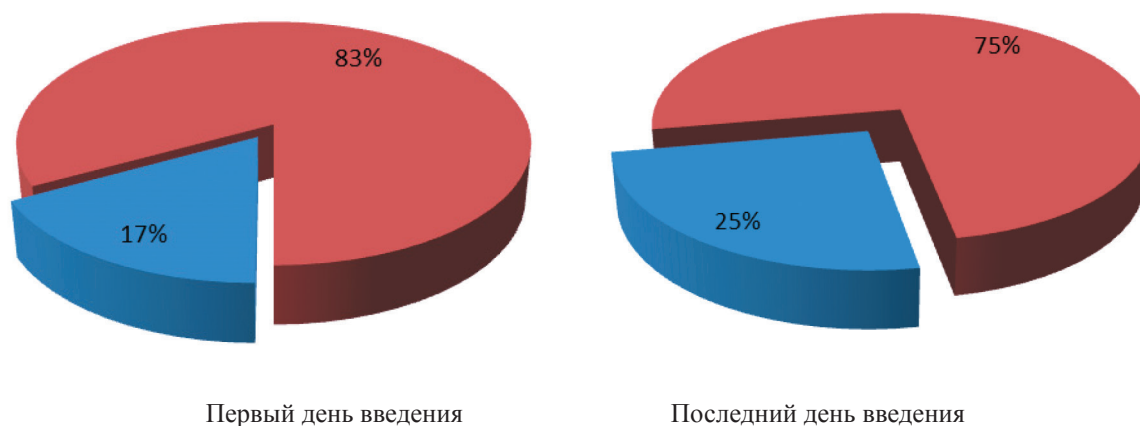


Рис. 1. Контаминация проб целевым аналитом в исследовании 1

Figure 1. Contamination of samples by targeted analysis in study 1

плазмы все образцы были расфасованы в пакеты (грипперы) по временным точкам и группам — для удобства дальнейшего анализа, снижения риска их перепутывания и контаминации. Такая организация работы предположительно должна способствовать минимизации вероятности контаминации образцов.

На аналитическом этапе работы с образцами также вели последовательно — по группам в порядке возрастания дозы препарата, внутри группы — по животным, у каждого животного — в порядке отбора временных точек. Все манипуляции также проводили с применением одноразовых расходных материалов (наконечников к дозаторам, пробирок, виал и т. п.), индивидуальных для каждой пробы каждого образца. Для исключения возможности загрязнения проб в процессе ВЭЖХ-МС/МС-анализа между группами проб от конкретных животных (от нулевой до последней временной точки) дополнительно в последовательность анализа были включены бланк-пробы (пробы интактного биоматериала, не содержащие целевой аналит). Отсутствие сигнала целевого аналита на хроматограммах дополнительных

бланк-проб, а также на хроматограммах проб, полученных до введения (нулевые точки), свидетельствовало об отсутствии переноса и контаминации проб в процессе анализа.

По результатам ретроспективного анализа остальных исследований токсикокинетики, выполненных в организации за 2022 год (табл. 3), было установлено, что в них манипуляции с животными начинали с группы, получавшей наименьшую дозу тестируемого объекта, и далее переходили к животным следующих групп в порядке увеличения вводимой дозы. Работы на преаналитическом и аналитическом этапах выполняли аналогично.

Таким образом, в ходе проведенного внутреннего расследования (на основании бесед с персоналом, анализа документов и записей по проведению исследования и т. д.) выяснено, что установить источник контаминации биопроб в процессе их получения и/или дальнейшей обработки затруднительно, однако, предположительно, контаминация происходила на этапе работы с животными (отбор биопроб). Уровень аналита, обнаруженный в образцах контрольной группы, был существенно ниже, чем уровень концентраций целевого аналита, обнаруживаемый

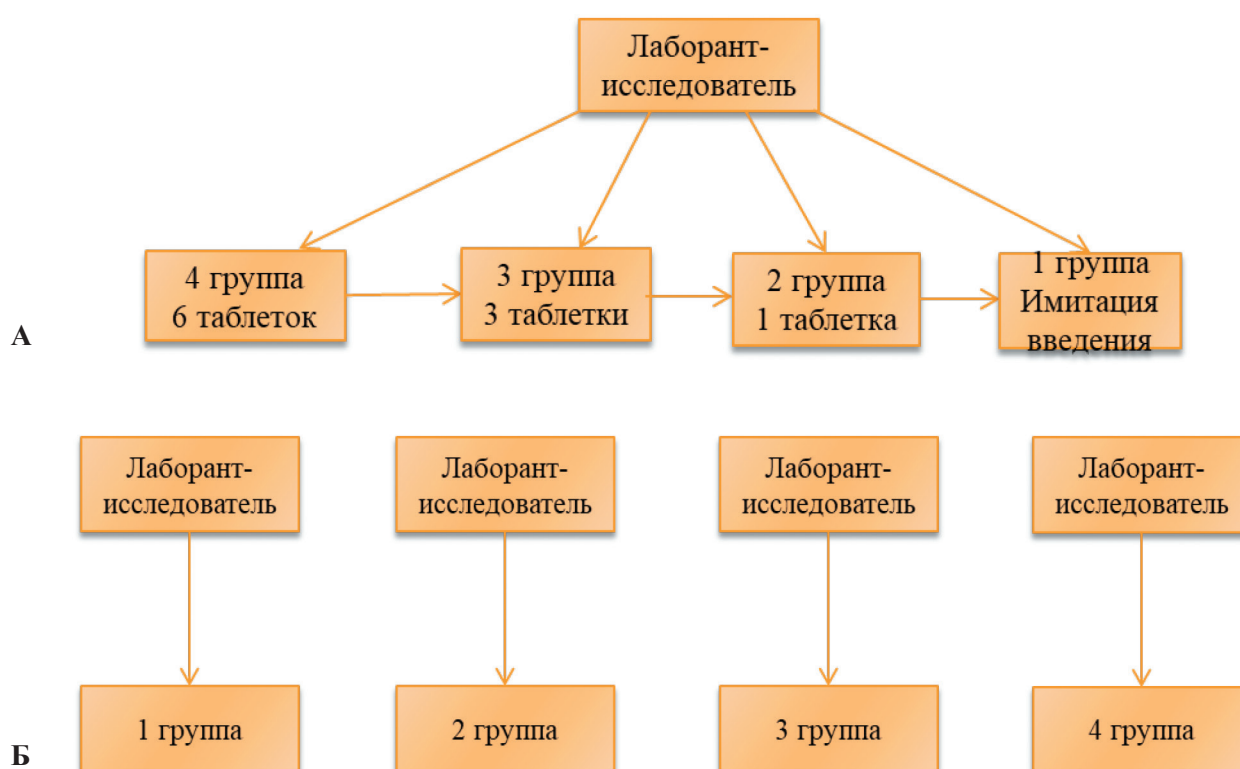


Рис. 2. Схема работы при отборе биоматериала в ходе биологической части исследования 1 (А) и исследования 2 (Б)

Figure 2. Scheme of work in the selection of biomaterial during the biological part of study 1 (A) and study 2 (B)

Таблица 3. Ретроспективный анализ исследований токсикокинетики, проведенных в организации в 2022 году*

Table 3. Retrospective analysis of toxicokinetic studies conducted in the organization in 2022*

Код исследования (протокол БЭК)	Животные, путь введения исследуемого объекта	Метод анализа	Наличие контаминации контрольной группы
3.72/20	Кролики, внутримышечно	ВЭЖХ-УФ**	Нет
1.32/21, 2.32/21	Кролики, перорально	ВЭЖХ-УФ**	Нет
1.41/21	Собаки, перорально	ВЭЖХ-УФ**	Нет
1.51/21	Крысы, внутрижелудочно	ВЭЖХ-МС/МС**	Нет, аналиты эндогенные
1.38/22	Яванские макаки, внутривенно	Мостиковый ИФА**	Да (0,8 % от количества образцов от животных контрольной группы)

Примечания: * — исследования, обсуждаемые в данной статье (БЭК 1.19/22 и 3.19/22 — исследование 1; 2.35/22 и 3.35/22 — исследование 2), не включены в таблицу; детальное изложение остальных исследований выходит за рамки обсуждаемой публикации, не имеет принципиального значения для предмета обсуждаемой работы, поэтому сведения о них (как и об исследуемых объектах и биоаналитических методиках, разработанных, валидированных и использованных во всех упоминаемых исследованиях), являющиеся конфиденциальной информацией, в статье не представлены;

** — ВЭЖХ-МС/МС — метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, ИФА — иммуноферментный анализ, ВЭЖХ-УФ — метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием.

Note: * — the studies discussed in this article (BEC 1.19/22 and 3.19/22 — study 1, 2.35/22 and 3.35/22 — study 2) are not included in the table; a detailed description of the remaining studies goes beyond the scope of the publication under discussion, is not of fundamental importance for the subject of the work under discussion, therefore information about them (as well as about the studied objects and bioanalytical techniques developed, validated and used in all mentioned studies), which are confidential information, are not presented in the article;

** — HPLC-MS/MS is a method of high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection, ELISA is enzyme immunoassay, HPLC is a UV method of high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection.

в экспериментальных пробах, что позволило исключить контаминацию *in vivo*. В целом, выявленный уровень контаминации экспериментальных проб признан незначительным и не оказавшим влияния на полноту получения и корректность интерпретации данных в этом исследовании.

В качестве корректирующих и профилактических мер, которые могут снизить или исключить контаминацию, предложены следующие:

1. Оптимизация организации работы лаборантов-исследователей, направленная на:

- исключение близкой по времени и месту выполнения работы одного сотрудника с животными, получающими разные дозы исследуемых объектов (рис. 2Б);

- регулярная смена СИЗ (прежде всего, перчаток), применение одноразовых расходных материалов (шприцы, дозаторы и иные устройства для

введения — в зависимости от пути введения исследуемых объектов; иглы, ватные/марлевые тампоны, и т. п., используемые при отборе биоматериала). По возможности, необходима смена на каждой временной точке для каждого животного.

2. Оптимизация преаналитического и аналитического этапов:

- последовательная работа с пробами от групп с меньшей дозой исследуемых объектов к группам с большей дозой;

- пробоподготовка и обработка проб в последовательности, соответствующей порядку (временной точке) отбора биоматериала;

- применение наконечников к механическим дозаторам, снабженных фильтром, препятствующим забросу пробы в дозатор;

- регулярная смена СИЗ (прежде всего, перчаток), применение одноразовых, индивидуальных

для каждой пробы расходных материалов (пробирки, вials, наконечники для дозаторов и др.);

- регулярное техническое обслуживание, очистка используемого аналитического оборудования.

Эти рекомендации были зафиксированы в карте оценки риска, разработанной в организации, и применены при выполнении исследования 2. В этом случае аналит не был обнаружен ни в одной из проб, полученных от животных группы 1 в первый день введения, был обнаружен только в одной пробе — в последний день введения. Контаминация одной пробы свидетельствовала об отсутствии контаминации животных. Контаминация носила случайный характер, ее уровень (0,83 %) признан незначительным и не оказавшим влияния на полноту получения и корректность интерпретации результатов в данном исследовании. Полученные результаты свидетельствовали об эффективности предложенных мер профилактики, что позволило включить их во внутренние нормативные документы организации (соответствующие инструкции, СОП) и совершенствовать документы системы менеджмента качества, а также повышать качество выполняемых исследований.

Согласно⁶ значительная контаминация животных контрольной группы может ставить под сомнение валидность исследования, а также «приводить к аннулированию результатов исследований вследствие их низкого качества или недостаточности данных, позволяющих провести интерпретацию профиля безопасности исследуемого вещества и оценки риска его применения для человека». Какой уровень контаминации следует считать значительным, а каким можно пренебречь, является ли критичной только контаминация животных или контрольных образцов в целом, нормативным документом не оговорено. По мнению [3], уровень

неправильности (inaccuracy) результатов анализа экспериментальных значений концентраций аналогичен таковому для проб контроля качества (КК) и составляет 15 %. На этом основании автор считает, что, если завышение результатов для группы, получавшей минимальную дозу, в связи с контаминацией не более 15 %, то такие данные приемлемы для оценки токсикокинетики. Не ясно, какой процент контрольных образцов с концентрациями аналита выше НПКО может быть обнаружен и допустимы (или необходимы) ли какие-то закономерности обнаружения таких проб у одного или нескольких животных для соблюдения этого условия. В работе [4] высказано мнение, что контаминацию можно признать незначительной, если ее уровень не превышает 10 % в контрольных образцах или если обнаруженные концентрации ниже, чем для группы, получавшей наименьшую дозу тестируемого препарата. С нашей точки зрения, при наличии случайного характера загрязнений уровень контаминации (определяемый как число контрольных образцов с концентрацией аналита выше НПКО), не превышающий 25 %, можно считать приемлемым. В целом, при выполнении токсикокинетических исследований важно минимизировать или полностью исключить контаминацию исследуемым веществом животных контрольной группы и получаемых от них биопроб.

Отдельного обсуждения заслуживает неоднозначность трактовки регуляторных документов по вопросу анализа контрольных образцов — он может не требоваться⁷ или быть выполнен одновременно с анализом образцов из экспериментальных групп⁸. По данным [5], только около 67 % компаний отбирают контрольные образцы при проведении исследований и около 20 % из них в дальнейшем не анализируют эти образцы.

⁶ Рекомендации ЕАЭК № 10 от 21.05.2020 «О Руководстве по проведению доклинических исследований токсичности при повторном (многократном) введении действующих веществ лекарственных препаратов для медицинского применения».

Guideline on evaluation of control samples in nonclinical safety studies: checking for contamination with the test substance. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP), London, UK (2005). www.ema.europa.eu (21 May 2024).

⁷ Рекомендация ЕАЭК № 33 от 22.12.2020 «О Руководстве по изучению токсикокинетики и оценке системного воздействия в токсикологических исследованиях лекарственных препаратов».

⁸ Рекомендации ЕАЭК № 10 от 21.05.2020 «О Руководстве по проведению доклинических исследований токсичности при повторном (многократном) введении действующих веществ лекарственных препаратов для медицинского применения».

Guideline on evaluation of control samples in nonclinical safety studies: checking for contamination with the test substance. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP), London, UK (2005). www.ema.europa.eu (21 May 2024).

При описании результатов оценки токсичности и токсикокинетики некоторые авторы указывают на отсутствие контаминации по результатам анализа контрольных образцов [6], а в некоторых работах нет даже упоминания о том, что подобное было предусмотрено дизайном исследования [7]. Статья [8] вызвала активную дискуссию из-за высокого уровня концентраций эндогенного анализанта (лантана), который, по мнению оппонентов [9, 10], мог быть обусловлен контаминацией контрольных образцов в процессе содержания животных и выполнения биологической части эксперимента, отбора биоматериала, его обработки и анализа. В ответ авторы обосновали корректность полученных данных и результатов исследования, однако, ситуация является примером значимости корректного исключения возможной контаминации для дальнейшей интерпретации результатов всей работы.

Исходя из нашего опыта токсикокинетических исследований, анализ контрольных образцов необходимо выполнять одновременно с экспериментальными образцами, так как, если контрольные образцы анализировать отдельно (позднее, для получения дополнительной информации при интерпретации результатов³), возникает вопрос их долгосрочной стабильности. Период, для которого долгосрочную стабильность образцов следует подтвердить в ходе валидации биоаналитической методики, должен превышать период хранения проб в конкретном исследовании⁹. С учетом того, что валидационные испытания должны быть завершены до начала анализа образцов, проверяемый период долгосрочной стабильности не может быть неопределенно длительным (в практической работе обычно составляет от 14–30 дней до 1–3 месяцев). В любом случае велика вероятность несоблюдения данного требования при отложенном анализе контрольных образцов, что в итоге может приводить к недостоверным или сомнительным результатам.

В одной из немногих публикаций, посвященных практическим аспектам обсуждаемой проблемы, авторы обобщили опыт, накопленный компанией Novartis (Швейцария-Франция), и поделились результатами исследования по моделированию контаминации в зависимости от условий содержания животных контрольных и экспериментальных групп (в разных помещениях или в одном помещении в отдалении или вблизи друг от друга) [4]. Авторы отметили, что в связи с выявленной контаминацией контрольных образцов по требованию регулятора ряд исследований был проведен повторно. Результаты новых исследований, отличавшиеся от первоначальных отсутствием контаминации, имели аналогичные основные заключения и выводы [4]. По мнению авторов, это свидетельствовало о том, что контаминация преимущественно происходит *ex vivo*.

На аналитическом этапе исследований большее внимание уделяют проверке и доказательству отсутствия «эффекта переноса» (carryover) при эксплуатации сложного аналитического оборудования (хроматографов, масс-спектрометров и т. п.) [5, 11–13]. Контаминацию (contamination) или загрязнение, по мнению авторов работы [5], можно разделить на три категории: контаминация анализантом до пробоподготовки (т. е. до отбора от субъекта и переноса в пробирку), контаминация анализантом во время пробоподготовки (экстракции, очистки, переноса в автосамплер и т. п.) и «контаминация» за счет присутствия/регистрации при анализе проб похожих на аналит соединений. При выявлении возможных причин загрязнения и для его профилактики необходимо уделять внимание чистоте атмосферы (воздуха) помещений, исключать ошибки во время отбора образцов, их обработки, хранения, пробоподготовки, источником загрязнений могут быть реагенты, внутренние стандарты, оборудование. Все перечисленные формы могут проявляться случайно, без каких-либо закономерностей, что затрудняет их устранение [5].

⁹ Решение Совета ЕЭК № 85 «Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского Экономического Союза» от 03.11.2016.

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

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

¹⁰ Guideline on evaluation of control samples in nonclinical safety studies: checking for contamination with the test substance. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP), London, UK (2005). www.ema.europa.eu (21 May 2024).

Guidance Document for GLP inspectors and GLP test facilities Cross-contamination of control samples with test item in animal studies. European Commission. (Document date: 25/11/2004 — Publication date: 19/10/2015 <https://ec.europa.eu/docsroom/documents/13222>) (21 May 2024).

Наиболее поздняя публикация [3] представляет в большей степени взгляд на проблему со стороны регулятора и/или GLP (Good laboratory practice) инспектора. Автор отмечает, что процитированная выше работа [4] была первой и единственной статьей, в которой обозначалась проблема контаминации контрольных проб, обусловившая остановку регистрации ряда препаратов. Публикация и обсуждение этих результатов привели к появлению регуляторных документов¹⁰, посвященных необходимости оценки контаминации, и действиям по выявлению ее источников и предупреждению. Zimmer [3] рекомендует в биоаналитической лаборатории:

- применять тампонные тесты (смывы) на качество очистки помещения и оборудования;
- использовать одноразовые материалы везде, где возможно;
- применять СИЗ и их регулярно заменять (обязательно перед работой с контрольными образцами);
- при работе (взятии аликвоты) открывать сосу-ды с образцами по одному;
- обрабатывать контрольные пробы в первую очередь, до работы с экспериментальными пробами;
- включать дополнительные бланк-пробы при создании и выполнении аналитических серий, чтобы убедиться, что аналитическая система свободна от аналита к моменту начала анализа контрольных проб;
- проводить взятие навесок в весовой комнате, разделять ее с помещениями, где проводят «микрохимию» (пробоподготовку) и расположено аналитическое оборудование.

Оптимально расположение аналитической лаборатории в отдельном здании и ее снабжение индивидуальной вентиляционной системой.

В отношении биологической части исследования [Zimmer, 2016] рекомендует:

- раздельное содержание (в разных помещениях) животных разных групп;
- отдельные приспособления, инструменты и рабочие площади для выполнения манипуляций с животными контрольной группы;
- регулярную уборку помещений и практику тампонных тестов (смывов) по ее результатам;
- регулярную смену СИЗ при работе с животными;
- выполнение манипуляций с животными контрольной группы до работы с животными из групп, которым осуществляют введение исследуемых объектов;
- привлечение разного персонала при работе с животными контрольной группы или обязательно-

ный душ и смена одежды между работой с животными из групп, которым осуществляют введение исследуемых объектов, и с животными контрольной группы.

Схожие рекомендации можно найти, например, в документе¹¹, в том числе довольно любопытную и разумную — уменьшить количество касаний, манипуляций с образцом и минимизировать число сотрудников, работающих с пробами. Отметим, что наши рекомендации, сформулированные по итогам оценки риска контаминации контрольных образцов, в целом соответствовали позициям литературных источников, которые в совокупности фиксируют вполне логичные и очевидные действия по профилактике контаминации контрольных образцов.

Заключение

Оценка контаминации контрольных образцов является необходимым элементом подтверждения корректности исследований токсикокинетики, сопутствующим изучению токсичности лекарственных веществ и препаратов. Вместе с тем недостаточная проработка действующих регуляторных документов обуславливает необходимость обсуждения практических аспектов и совершенствования регуляторной базы. На основании экспериментального опыта сформулированы рекомендации по минимизации и профилактике контаминации контрольных образцов при выполнении биологической части, преаналитического и аналитического этапов исследований. Предположительно, при наличии случайного характера загрязнений, свидетельствующего об их *ex vivo* происхождении, уровень контаминации (определяемый как число контрольных образцов с концентрацией аналита выше НПКО), не превышающий 25 %, можно считать незначительным, то есть не ведущим к дальнейшему отклонению и аннуляции результатов всего исследования.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Список литературы / References

1. Welling PG. Differences between pharmacokinetics and toxicokinetics. *Toxicol Pathol.* 1995;23(2):143–7. DOI: 10.1177/019262339502300207.
2. Pozharitskaya O, Shikov A, Makarov V. Toxicokinetics — Methodological Approaches. Laboratory

¹¹ How to Avoid Contamination in Lab Samples. <https://www.aurorabiomed.com/how-to-avoid-contamination-in-lab-samples/> (21 May 2024).

- Animals for Science. 2019;1. <https://doi.org/10.29296/2618723X-2019-01-06> In Russian [Пожарицкая О.Н., Шиков А.Н., Макаров В.Г. Токсикокинетика — методологические подходы. Обзорная статья. Лабораторные животные для научных исследований. 2019; 1]. DOI: 10.29296/2618723X-2019-01-06.
3. Zimmer D. Drugs in control samples in nonclinical safety studies: a reconsideration. *Bioanalysis*. 2016; (10):1003–7. DOI: 10.4155/bio-2016-0066.
 4. Nicholls I, Kolopp M, Pommier F, et al. The presence of drug in control samples during toxicokinetic investigations--a Novartis perspective. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2005;42(2):172–8. DOI: 10.1016/j.yrtph.2005.03.004.
 5. Hill HM, Smith GT. Evaluation and Elimination of Carryover and/or Contamination in LC-MS Bioanalysis., In: *Handbook of LC-MS Bioanalysis (Best Practices, Experimental Protocols, and Regulations)*. Ed. by Li W, Zhang J, Tse F. 2013, 259–273. DOI: 10.1002/9781118671276.ch21.
 6. Maronpot RR, Ramot Y, Koyanagi M, et al. Ten-day and four-week toxicity and toxicokinetics studies of alpha-glycosyl isoquercitrin in juvenile Göttingen minipigs. *Toxicology Research and Application*. 2019;3. DOI: 10.1177/2397847319855087.
 7. Li Y, Liu TT, Jin HT, et al. A comparison of toxicity and toxicokinetics in rats and dogs following twenty-eight-day, repeat-dose oral administration of nifurtimox. *Toxicol Res (Camb)*. 2017;6(4):544–553. DOI: 10.1039/c7tx00061h.
 8. Lacour B, Lucas A, Auchère D, et al. Chronic renal failure is associated with increased tissue deposition of lanthanum after 28-day oral administration. *Kidney Int*. 2005;67(3):1062–9. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2005.00171.x.
 9. McLeod C, Cox A, Bramall N. The need for contamination control in studies on lanthanum biodisposition. *Kidney Int*. 2005;68(6):2906. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2005.00583_1.x.
 10. D’Haese PC, Behets GJ, De Broe ME, Damment SJ. Lanthanum pharmacokinetics: are rat data misleading? *Kidney Int*. 2005;68(6):2907–8. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2005.00583_3.x.
 11. Hughes NC, Wong EY, Fan J, Bajaj N. Determination of carryover and contamination for mass spectrometry-based chromatographic assays. *AAPS J*. 2007;9(3):E353–60. DOI: 10.1208/aapsj0903042.
 12. Clouser-Roche A, Johnson K, Fast D, Tang D. Beyond pass/fail: a procedure for evaluating the effect of carryover in bioanalytical LC/MS/MS methods. *J Pharm Biomed Anal*. 2008;47(1):146–55. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.12.019.
 13. Kim K, Lee H, Lee JJ, et al. Identification of a frit-related sample carryover in newborn screening by tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom Adv Clin Lab*. 2023;27:56–60. DOI: 10.1016/j.jmsacl.2023.01.001.
- Информация об авторах:**
- Косман Вера Михайловна, к.фарм.н., руководитель химико-аналитической лаборатории АО «НПО «Дом Фармации»;
- Карлина Марина Валерьевна, к.б.н., руководитель отдела технологии, кинетики и анализа лекарственных средств АО «НПО «Дом Фармации»;
- Петрова Елизавета Михайловна, младший научный сотрудник химико-аналитической лаборатории АО «НПО «Дом Фармации»;
- Макарова Марина Николаевна, д.м.н., директор АО «НПО «Дом Фармации»;
- Макаров Валерий Геннадиевич, д.м.н., профессор, научный руководитель АО «НПО «Дом Фармации».
- Authors information:**
- Vera M. Kosman, PhD, head of analytical laboratory, RMC “Home of Pharmacy”;
- Marina V. Karlina, PhD, head of department of technology, kinetics and analysis of drugs, RMC “Home of Pharmacy”;
- Elizaveta M. Petrova, junior researcher of analytical laboratory, RMC “Home of Pharmacy”;
- Marina N. Makarova, PhD, DSci (Medicine), director, RMC “Home of Pharmacy”;
- Valery G. Makarov, PhD, DSci (Medicine), Professor, scientific supervisor, RMC “Home of Pharmacy”.

РЕДКИЙ КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ СОЧЕТАННОГО ПОРАЖЕНИЯ ПОЧЕК, СВЯЗАННЫЙ С IGG4-АССОЦИИРОВАННЫМ СИСТЕМНЫМ ЗАБОЛЕВАНИЕМ

Лаврищева Ю. В.¹, Яковенко А. А.², Потапов И. В.¹

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

² 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

Контактная информация:

Лаврищева Юлия Владимировна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: lavrischeva@gmail.com

Статья поступила в редакцию 02.06.2024
и принята к печати 22.08.2024.

Резюме

При IgG4-ассоциированном заболевании часто поражаются несколько органов и тканей, особенно ткани почек, что характеризуется интерстициальным нефритом, обструктивной нефропатией и в редких случаях — гломерулопатией (включая мембранозную нефропатию).

IgG4-ассоциированное заболевание выделено в качестве самостоятельной нозологической формы в 2003 году, когда у пациентов с аутоиммунным панкреатитом 1 типа были обнаружены признаки системного поражения (вовлечение желчных путей, слюнных желез, забрюшинного пространства), а в 2012 году предложена первая международная номенклатура заболевания.

Клинические проявления IgG4-ассоциированного заболевания неспецифичны и разнообразны, что определяет трудности дифференциальной диагностики, в том числе с инфекциями и опухолями, и увеличивает срок от начала болезни до установления диагноза в среднем до 2 лет. IgG4-ассоциированное заболевание чаще развивается в среднем и пожилом возрасте. Распространенность среди мужчин выше, чем среди женщин. Так, у мужчин чаще встречаются аутоиммунный панкреатит 1 типа, ретроперитонеальный фиброз и тубулоинтерстициальный нефрит, а у женщин — сиалоаденит, дакриоаденит и тиреоидит.

В этой статье мы представляем клинический случай IgG4-ассоциированного системного заболевания с сочетанным поражением тубулоинтерстициального и гломерулярного компартментов ткани почки с нефротическим синдромом в качестве единственного начального проявления. Сочетание IgG4-тубулоинтерстициального нефрита с мембранозной нефропатией является крайне редкой патологией. Решающим в диагностике данного состояния явилась нефробиопсия, которая позволила назначить пациенту правильное и своевременное лечение.

Ключевые слова: мембранозная нефропатия, нефробиопсия, нефротический синдром, тубулоинтерстициальный нефрит, IgG4-ассоциированные заболевания.

Для цитирования: Лаврищева Ю.В., Яковенко А.А., Потапов И.В. Редкий клинический случай сочетанного поражения почек, связанный с IgG4-ассоциированным системным заболеванием. Трансляционная медицина. 2024; 11(4): 364-370. DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-4-364-370. EDN: CIAHCE

A RARE DELETERIOUS CASE OF CONCOMITANT RENAL DISEASE ASSOCIATED WITH IGG4-ASSOCIATED SYSTEMIC DISEASE

Yulia V. Lavrishcheva¹, Alexandr A. Jakovenko², Ilya V. Potapov¹

¹ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

² Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Yulia V. Lavrisheva,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.

E-mail: lavrisheva@gmail.com

Received 02 June 2024; accepted 22 August 2024.

Abstract

In IgG4-associated disease, several organs and tissues are often affected, especially kidney tissue, and is characterized by interstitial nephritis, obstructive nephropathy, and in rare cases glomerulopathy (including membranous nephropathy).

IgG4-associated disease was isolated as an independent nosological form in 2003, when patients with type 1 autoimmune pancreatitis were found signs of systemic damage (involvement of the biliary tract, salivary glands, retroperitoneal space), and in 2012 the first international nomenclature of the disease was proposed.

The clinical manifestations of IgG4-associated disease are nonspecific and diverse, which determines the difficulties of differential diagnosis, including infections and tumors, and increases the period from the onset of the disease to diagnosis to an average of 2 years. IgG4-associated disease is more likely to develop in middle age and old age. The prevalence of the disease is higher among men than among women. Thus, autoimmune pancreatitis type 1, retroperitoneal fibrosis and tubulointerstitial nephritis are more common in men, and sialoadenitis, dacryoadenitis and thyroiditis are more common in women.

In this article, we present a clinical case of IgG4-associated systemic disease with a combined lesion of the tubulo-interstitial and glomerular compartments of kidney tissue with nephrotic syndrome as the only initial manifestation. The combination of IgG4-tubulo-interstitial nephritis with membranous nephropathy is an extremely rare pathology. Nephrobiopsy was crucial in the diagnosis of this condition, which allowed the patient to be prescribed proper and timely treatment.

Key words: IgG4-associated diseases, membranous nephropathy, nephrobiopsy, nephrotic syndrome, tubulo-interstitial nephritis.

For citation: Lavrishcheva YuV, Jakovenko AA, Potapov IV. A rare deleterious case of concomitant renal disease associated with IgG4-associated systemic disease. Translational Medicine. 2024; 11(4): 364-370. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-4-364-370. EDN: CIAHCE

Список сокращений: ИГХ — иммуногистохимия, МСКТ — мультиспиральная компьютерная томография, ОАМ — общий анализ мочи, ОБП — органы брюшной полости, ОГК — органы грудной клетки, СОЭ — скорость оседания эритроцитов, СРБ — С-реактивный белок, ССО — сердечно-сосудистые осложнения, ФВ — фракция выброса, ХБП — хроническая болезнь почек, ХСН — хроническая сердечная недостаточность.

Введение

Повышенные уровни IgG4 в сыворотке крови были обнаружены у пациентов с аутоиммунным панкреатитом в 2001 году, а в 2003 году концепция заболевания, связанного с IgG4, была впервые предложена японскими авторами [1–3]. С тех пор IgG4-ассоциированные заболевания (IgG4-A3) постепенно признаются во всем мире. Патологические изменения при IgG4-A3 могут наблюдать-

ся в одном или нескольких органах или тканях, включая слизистые оболочки, слюнные железы, слезные железы, лимфатические узлы, щитовидную железу, легкие, средостение, желчевыводящие пути, поджелудочную железу, аорту, почки. В пораженных органах и тканях в большинстве случаев может наблюдаться инфильтрация IgG4-положительными плазматическими клетками, а в сыворотке крови возможно повышение уровня IgG4. При IgG4-ассоциированном заболевании почек в патологический процесс вовлекаются как почки, так и окружающие их органы и ткани. Главной особенностью повреждения почек является связанный с IgG4 тубулоинтерстициальный нефрит (IgG4-ТИН) [4, 5], на который приходится 15–24,6 % всех IgG-A3. В данной статье мы сообщаем о клиническом случае пациента с IgG4-ассоциированным заболеванием почек с нефротическим синдромом в качестве основного клинического проявления. Проводимая терапия IgG4-A3 глюкокортикоидами показала свою эффективность в уменьшении объема образования, но не повлияла на нефротический синдром. Дальнейшее гистологическое исследование ткани почки подтвердило диагноз IgG4-ассоциированного интерстициального поражения почек в сочетании с мембранозной нефропатией, в связи с чем протокол лечения был изменен, установлена его удовлетворительная терапевтическая эффективность.

Клинический случай

Мужчина 62 лет поступил в стационар с жалобами на одышку, приступы удушья, отеки нижних конечностей с предварительным диагнозом: сахарный диабет 2 типа; гипертоническая болезнь III стадии, риск сердечно-сосудистых осложнений (ССО) 4; ХСН IIa с ФВ 2–3 ф. к.; хронический гастрит; полипоз желудка; тяжелый аортальный стеноз; диабетическая нефропатия; ХБП C1A3.

В 2014 году пациент отметил увеличение шейных, подмышечных лимфатических узлов. 02.04.2015 выполнялась эксцизионная биопсия поднижнечелюстного лимфатического узла, при гистологическом исследовании выявлены морфологические признаки туберкулеза лимфатических узлов. Проводимая противотуберкулезная терапия была неэффективной. С 2016 года появилась одышка при физических нагрузках, а также приступы удушья. Проходил обследование (выписки не предоставлены), со слов больного, верифицирован диагноз бронхиальной астмы, получал ингаляционную бронхолитическую терапию — с положительным эффектом. С 2018 года нарастание одышки, появление отеков нижних конечностей.

Лабораторно в общем анализе мочи (ОАМ): белок 5 г/л, единичные лейкоциты, измененные эритроциты, гиалиновые цилиндры. По данным МСКТ органов грудной клетки (МСКТ ОГК) от 20.11.2018 выявлены множественные очаговые образования, увеличение лимфатических узлов. 21.11.2018 выполнена биопсия лимфатического узла средостения, при гистологическом исследовании которого выявлены признаки синусового гистиоцитоза. По данным МСКТ органов брюшной полости (МСКТ ОБП) от 08.2019: ниже почечных сосудов слева парааортально выявлена масса размерами 4,0*2,9 см. Лабораторно: суточная протеинурия 19,6 г/сут, в клиническом анализе крови эозинофилы — $1,8 \cdot 10^9/\text{л}$ (18,2 %), креатинин крови — 68 мкмоль/л, рАНЦА+++, сАНЦА+++. Специфическая терапия не проводилась. Пациент отметил нарастание одышки, отеков. Принимал мочегонные препараты. В апреле 2020 года пациент был госпитализирован в стационар, где при обследовании выявлены следующие изменения: СОЭ 76 мм/ч, СРБ — норма, гемоглобин — 113 г/л, общий белок — 46 г/л, альбумин — 22 г/л, креатинин крови — 70 мкмоль/л, АНФ, антитела к дсДНК, АНЦА — отрицательно. IgG 23 г/л (референсные значения 7–16 г/л), IgG4 2,91 г/л (референсные значения 1,35–1,44 г/л). Суточная потеря белка: 19,32 г/сут. МСКТ ОГК, ОБП, малого таза: выраженная лимфаденопатия средостения, гепатоспленомегалия, выраженная парааортальная, паравазальная инфильтрация, лимфаденопатия зоны сканирования с вовлечением левого мочеточника (обструкция) со снижением функции левой почки, развитием гидронефроза. Биопсия малой слюнной железы: хронический сиалоденит с наличием парадуктального скопления, содержащего более 50 лимфоцитов, при ИГХ исследовании — умеренное количество плазматических клеток (CD38+), в значительной части плазматических клеток определяется экспрессия IgG и IgG4. Согласно критериям ACR/EULAR от 2019 года, диагностировано IgG4-ассоциированное заболевание: гистологическое исследование малой слюнной железы (инфильтрация плазматическими клетками $> 10 \text{ IgG4+}$), нефробиопсия (демонстрирует разрозненные плазматические клетки, экспрессирующие CD138, IgG и IgG4), повышение уровня IgG4 в крови, поражение почек, поражение легких, поражение поджелудочной железы, поражение ретроперитонеального пространства.

В конце июня 2020 года начата терапия метилпреднизолоном 40 мг/сут, на фоне чего отмечал нарастание выраженности отеочного синдрома, одышки. Проводится постепенное снижение дозы ГКС. Август 2020 года — госпитализация в ста-

онар. В период госпитализации обращало на себя внимание наличие анасарки на фоне выраженного нефротического синдрома. Лабораторно: суточная потеря белка 15,99 г/сут, альбумин крови — 13 г/л, общий белок — 43 г/л, креатинин крови — 63 мкмоль/л, мочевины — 12,9 ммоль/л, СРБ — 107,4 мг/л. На фоне массивной диуретической терапии достигнут отчетливый положительный ответ (минус более 20 кг по массе тела), что позволило выполнить контрольное исследование МСКТ ОБП, по данным которой у пациента отмечается положительная динамика в виде уменьшения проявлений основного заболевания.

С учетом сохраняющегося нефротического синдрома, на фоне проводимой терапии, заподозрено наличие гломерулярного, а не характерного для IgG4-A3 тубулоинтерстициального повреждения, в связи с чем пациенту выполнена нефробиопсия. Гистологическое исследование проводилось методами стандартизованных светового, иммунофлюоресцентного и иммуногистохимического исследований. На световом уровне использованы окраска гематоксилином и эозином, PAS-реакция, окраска трихромом по Массону и импрегнация солями серебра по Джонсу. Представлены корковый и мозговой слои ткани почки; 16 клубочков, значительно увеличенных в размерах, без признаков гиперклеточности, полулуний, полного и сегментарного гломерулосклероза. Отмечается визуальное утолщение одноконтурной гломерулярной базальной мембраны и ее неравномерное импрегнирование солями серебра в виде зернистости, мелкой вакуолизации и сегментарной «шиповатости» вдоль наружного контура. Обращает на себя внимание крупноочаговый грубоволокнистый фиброз с полной утратой гистоархитектоники ткани почки. В участках сохранного канальцевого рисунка цитоплазма эпителия канальцев мелкозернистая, с сохраненной щеточной каймой. Стенки артериол и артерий мелкого калибра без патологических изменений. Прямое иммунофлюоресцентное исследование, выполненное на свежемороженых срезах с FITC-конъюгированными антителами к IgA, IgG, IgM, C1q, C3, фибриногену, легким цепям карпа и lambda, демонстрирует диффузную субэпителиальную гранулярную экспрессию IgG (++++), C1q (+), C3 (+), карпа (++++), lambda (++++). Иммуногистохимическое исследование, выполненное иммунопероксидазным методом на парафиновых срезах с антителами к CD138, IgG, IgG4, на малом увеличении (x100) продемонстрировало разрозненные плазматические клетки, экспрессирующие CD138, IgG и IgG4, в зоне крупноочагового интерстициального фиброза. На большом увеличении (x400) в зоне максимального скопления

клеток в поле зрения определяются 15–23 IgG4-положительные плазматические клетки. Соотношение IgG4/IgG составило примерно 1:1,5. В клубочках определяется субэпителиальная гранулярная экспрессия IgG и IgG4. В тубулярных базальных мембранах — мультифокальная умеренная гранулярная экспрессия IgG и IgG4.

На основании гистологических находок заключение сформулировано как «Сочетанное IgG4-ассоциированное поражение ткани почек: 1) диффузная мембранозная нефропатия, стадия I–II; 2) крупноочаговый IgG4-положительный интерстициальный фиброз с нарушением гистоархитектоники ткани почки в исходе IgG4-ассоциированного тубулоинтерстициального нефрита». Таким образом, материал нефробиопсии документирует сочетание довольно редкого варианта IgG4-ассоциированной почечной патологии в виде мембранозной нефропатии и частого ее варианта в виде тубулоинтерстициального нефрита, но в локализованной крупноочаговой форме и уже в стадии исхода в фиброз. Следует отметить, что в данном случае IgG4-ассоциированный интерстициальный фиброз в материале нефробиопсии не отражает степень тубулоинтерстициального фиброза в почке в целом, поскольку является очаговым и, что гораздо важнее, не сопровождается нарушением азотовыделительной функции почек.

Таким образом, наличие мембранозной нефропатии обуславливает выраженность протеинурии у данного пациента.

С учетом выявленных гистологических изменений было принято решение об инициации терапии циклоспорином в дозе 200 мг/сут. Продолжена терапия преднизолоном в дозе 5 мг (начальная доза 20 мг) и сопутствующая терапия (спиронолактон 75 мг/сут, фуросемид 40 мг 3 раза в сутки, ивабрадин 5 мг 2 раза в сутки, ацетилсалициловая кислота 100 мг /сут, инсулин по схеме).

В июле 2021 года плановая госпитализация. При обследовании выявлена минимальная активность основного заболевания. Снижение уровня суточной потери белка до 1,81 г/сут. Азотовыделительная функция не нарушена: креатинин крови — 80,6 мкмоль/л, мочевины — 8,7 ммоль/л, отсутствовала анемия: гемоглобин — 131 г/л. Отмечается выраженная положительная динамика в отношении нормализации уровня общего белка до 73 г/л, альбумина 34 г/л.

Контроль МСКТ ОБП и забрюшинного пространства: положительная динамика в сравнении с данными предыдущего исследования в виде полного регресса асцита, анасарки, субтотального регресса реактивных изменений клетчатки

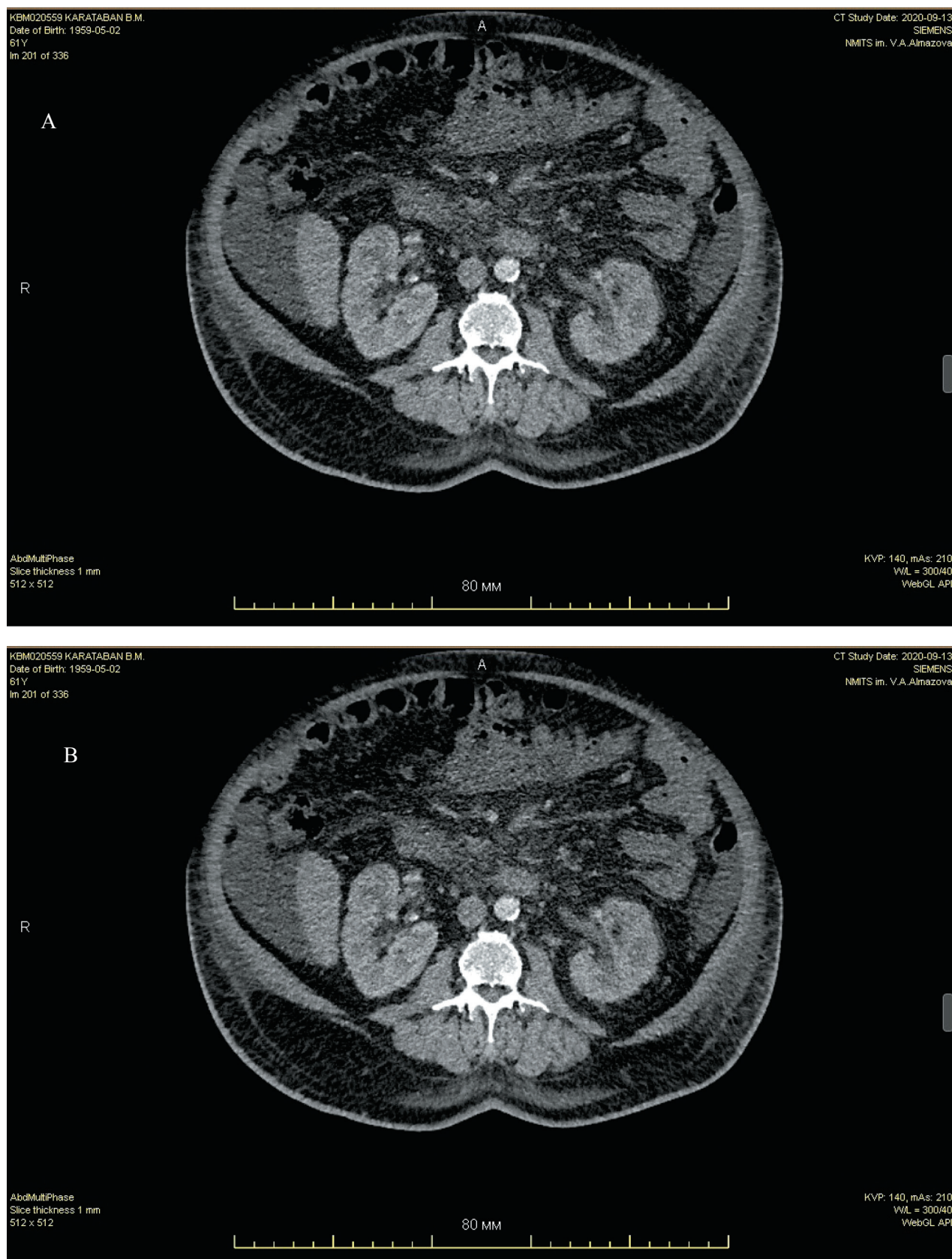


Рис. 1. Данные МСКТ ОБП и забрюшинного пространства: А — до терапии циклоспорином, В — после терапии циклоспорином

Figure 1. Data multispiral abdominal CT scan and of the retroperitoneum: A — before cyclosporine therapy, B — after cyclosporine therapy

в зоне сканирования. Уменьшение размеров парааортальных инфильтратов. Значительный регресс объема лимфаденопатии. Сохраняется лимфаденопатия зоны сканирования, утолщение стенок лоханок и мочеточников. Нельзя исключить стеноз средней трети левого мочеточника в толще инфильтрата (ранее выявленного) (рис. 1: А — до терапии циклоспорином, В — после терапии циклоспорином).

Учитывая хорошую клинико-лабораторную динамику со стороны основного заболевания, рекомендовано продолжить снижение дозы ГКС до полной отмены и заменить базисный препарат на азатиоприн.

С августа 2021 года по настоящее время пациент получает азатиоприн 50 мг по 1 таблетке 3 раза в день, прием преднизолона на сегодня полностью прекращен.

Клинический диагноз

Основное заболевание: IgG4-ассоциированное системное заболевание с поражением почек (мембранозная нефропатия I–II; крупноочаговый интерстициальный фиброз в исходе тубулоинтерстициального нефрита), поднижнечелюстных слюнных желез, сосудов (циркулярная инфильтрация вокруг н/брыжеечной артерии), лимфатических узлов (лимфаденопатия шейных, внутрибрюшинных, внутригрудных, паховых л/у и л/у средостения), легких (множественные очаговые образования).

Осложнения: ретроперитонеальный фиброз с вовлечением левого мочеточника; левосторонний уретерогидронефроз; ХБП С2.

Сопутствующий: сахарный диабет 2 типа; гипертоническая болезнь III стадии, риск ССО 4; тяжелый аортальный стеноз; ХСН IIa с ФВ 2–3 ф. к.

Заключение

Ассоциированные с IgG4 заболевания представляют собой новую группу аутоиммунной патологии, характеризующуюся наличием аутоантител подкласса IgG4. Важное значение в диагностике IgG4-ассоциированного заболевания имеют результаты гистологического и иммуногистохимического исследований, которые позволяют выявить характерные гистологические изменения и увеличение количества IgG4-позитивных плазматических клеток в тканях [6, 7].

Данная группа заболеваний имеет большой набор клинических проявлений, благодаря множественному поражению органов, включая часто поражение поджелудочной железы, слюнных желез, щитовидной железы, легких, забрюшинного пространства, почек.

Ретроперитонеальный фиброз (РПФ) — наиболее частое проявление IgG4-A3. РПФ, связанный с IgG4-A3, следует дифференцировать со вторичным РПФ на фоне туберкулезного поражения, саркоидоза, онкологических заболеваний, лимфомой Ходжкина и неходжкинской лимфомой, саркомой, карциномой кишечника, желудка.

Необходимо проводить дифференциальный диагноз с системными васкулитами. Важно помнить, что наличие положительных антител к цитоплазме нейтрофилов возможно в рамках перекрестного синдрома [8].

Стоит отметить, что одним из самых важных моментов для уточнения диагноза при данном заболевании является гистологическое исследование, определение уровня IgG4 в крови [9]. В частности, пациенту выполнены гистологическое исследование малой слюнной железы и нефробиопсия, благодаря которым удалось точно установить диагноз и назначить оптимальную терапию.

Системное аутоиммунное заболевание, связанное с иммуноглобулином G4 (IgG4) с поражением почек, обычно проявляется как острый или хронический тубулоинтерстициальный нефрит и представляет собой типичную гистологическую форму заболевания почек, связанного с IgG4.

У пациентов с IgG4-ТИН была выраженная гипокплементемия, уровни сывороточного С3 и С4, как при системной красной волчанке и смешанной криоглобулинемии [10]. Причина развития гипокплементемии не совсем ясна, так как сам IgG4 связывается с компонентом плохо.

IgG4-сопряженная мембранозная нефропатия встречается намного реже, чем ТИН. Иногда их можно обнаружить одновременно [11]. В исследовании 9 пациентов с IgG4-сопряженным мембранозным ГН у 5 выявлен IgG4-сопряженный ТИН, у 7 присутствовали другие проявления IgG4-A3 [12]. Ни у одного из пациентов при биопсии не выявлено аутоантител к рецепторам фосфолипазы A2, хотя они определяются у всех лиц с первичным мембранозным ГН.

В данной статье мы представляем клинический случай IgG4-ассоциированного системного заболевания с сочетанным поражением тубулоинтерстициального и гломерулярного компартментов ткани почки с нефротическим синдромом в качестве единственного начального проявления. Клиническая картина течения заболевания у пациента отличалась многообразием симптоматики, что привело к необходимости дифференциальной диагностики между системными васкулитами, туберкулезом, саркоидозом. Пациенту выполнено обширное лабораторное и инструментальное

исследование, включая биопсию малой слюнной железы. Согласно критериям ACR/EULAR от 2019 года, диагностировано IgG4-ассоциированное заболевание. На фоне проводимой патогенетической терапии наблюдался регресс симптомов основного заболевания, но сохранялся нефротический синдром.

Учитывая нетипичную клиническую картину в виде прогрессирующего нефротического синдрома на фоне регресса основного заболевания, пациенту выполнена нефробиопсия, по результатам которой была подтверждена мембранозная нефропатия, что в сочетании IgG4-ТИН является крайне редкой патологией.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Список литературы/ References

1. Koneczny I. A New Classification System for IgG4 Autoantibodies. *Front Immunol.* 2018; 9: 97. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00097.
2. Huijbers MG, Querol LA, Niks EH, et al. The expanding field of IgG4-mediated neurological autoimmune disorders. *Eur J Neurol.* 2015; 22(8): 1151–1161. DOI: 10.1111/ene.12758.
3. Zykova A, Novikov P, Brovko M, et al. IgG4-related disease: the state of art. *Klinicheskaya farmakologiya I terapiya = Clin Pharmacol Ther* 2020;29(3):4–13. In Russian [Зыкова А.С., Новиков П.И., Бровко М.Ю. и др. IgG4-ассоциированное заболевание: что изменилось к 2020 году. Клиническая фармакология и терапия, 2020;29(3):4–13.] DOI: 10.32756/0869-5490-2020-3-4-13.
4. Zakharova EV, Vorobjova OA. Immunoglobulin g4-related disease, presented with retroperitoneal fibrosis and monoclonal gammopathy: case report and mini review. *Urol Nephrol Open Access J.* 2015;2(5):168–173. DOI: 10.15406/unoaj.2015.02.00058.
5. Voloshinova EV, Vorobyeva OA, Tsaturova KN. A clinical case of IgG4-related disease. *Nephrology and Dialysis.* 2018;20(1):92–99. In Russian [Волошинова Е.В., Воробьева О.А., Цатурова К.Н. Поражение почек при IgG4-ассоциированной болезни (Клиническое наблюдение). Нефрология и диализ. 2018;20(1): 92–99]. DOI: 10.28996/1680-4422-2018-1-92-99.
6. Huijbers MG, Plomp JJ, van der Maarel SM, et al. IgG4-mediated autoimmune diseases: a niche of antibody-mediated disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 2018;1413(1): 92–103. DOI: 10.1111/nyas.13561.
7. Vasilenko VV, Vinogradov DL, Burlakova AS. IgG4-related disease: condition of the problem. *The Russian Archives of Internal Medicine.* 2017;7(2):95–106.

In Russian [Василенко В.В., Виноградов Д.Л., Бурлакова А.С. IgG4-сопряженная патология: состояние проблемы. Архив внутренней медицины. 2017;7(2):95–106]. DOI: 10.20514/2226-6704-2017-7-2-95-106.

8. Takahashi N, Ghazale AH, Smyrk TC, et al. Possible association between IgG4-Associated systemic disease with or without autoimmune pancreatitis and non-Hodgkin lymphoma. *Pancreas.* 2009;38(5):523–526. DOI: 10.1097/MPA.0b013e31819d73ca.

9. Saeki T, Nishi S, Imai N, et al. Clinicopathological characteristics of patients with IgG4-related tubulointerstitial nephritis. *Kidney Int.* 2010;78(10):1016–1023. DOI: 10.1038/ki.2010.271.

10. Syedyshev SH, Vasiliev VI, Kovrigina AM. Diagnosis of a new nosological group: IgG4-associated systemic disease. *Nuchno-prakticheskaya revmatologiya. The collection of materials II Congress of Rheumatology Russia, April 26–29, 2011. Yaroslavl. P. 70.* In Russian [Седышев С.Х., Васильев В.И., Ковригина А.М. Диагностика новой нозологической группы: IgG4-ассоциированное системное заболевание. Научно-практическая ревматология. Сборник материалов II конгресса ревматологов России, 26–29 апреля 2011. Ярославль. С. 70].

11. Wallace ZS, Deshpande V, Mattoo H, et al. IgG4-Related Disease: Clinical and Laboratory Features in One Hundred Twenty-Five Patients. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(9):2466–2475. DOI: 10.1002/art.39205.

12. Cheuk W, Lee KC, Chong LY, et al. IgG4-related Sclerosing disease: a potential new etiology of cutaneous pseudolymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2009;33(11):1713–1719. DOI: 10.1097/PAS.0b013e3181b201de.

Информация об авторах:

Лаврищева Юлия Владимировна, к.м.н., доцент кафедры факультетской терапии с клиникой ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Яковенко Александр Александрович, к.м.н., доцент кафедры нефрологии и диализа ФПО ФГБОУ ВО «ПСПБГМУ им. акад. И. П. Павлова» Минздрава России;

Потапов Илья Владимирович, студент VI курса Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Authors information:

Yulia V. Lavrisheva, PhD, Associate Professor of the Department of Faculty Therapy with the clinic, Almazov National Medical Research Centre;

Alexandr A. Jakovenko, PhD, Associate Professor of the Department of Nephrology and Dialysis, Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University;

Ilya V. Potapov, sixth year student, Institute of Medical Education of Almazov National Medical Research Centre.

