ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)

ВЕСЦІ
НАЦЫЯНАЛЬНАЙ АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ МЕДЫЦЫНСКІХ НАВУК. 2023. Т. 20, № 3

ИЗВЕСТИЯ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК. 2023. Т. 20, № 3

Журнал основан в 2004 г.

Выходит четыре раза в год

Учредитель – Национальная академия наук Беларуси

Журнал зарегистрирован в Министерстве информации Республики Беларусь,
свидетельство о регистрации № 393 от 18 мая 2009 г.

Журнал входит в Перечень научных изданий Республики Беларусь
для опубликования результатов диссертационных исследований,
включен в международную базу данных Scopus
и в базу данных Российского индекса научного цитирования (РИНЦ)

Главный редактор

Василий Генрихович Богдан –
Отделение медицинских наук Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Редакционная коллегия

О. О. Руммо (*заместитель главного редактора*) – Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии, Минск, Республика Беларусь
В. Г. Колосовская (*ведущий редактор журнала*)
Ф. И. Висмонт – Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь
М. А. Герасименко – Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии, Минск, Республика Беларусь
С. В. Губкин – Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
Г. Л. Гуревич – Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии, Минск, Республика Беларусь
Ю. Е. Еременко – Республиканский научно-практический центр оториноларингологии, Минск, Республика Беларусь

С. Л. Кабак – Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь
Н. П. Канунникова – Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, Гродно, Республика Беларусь
С. А. Красный – Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова, Минск, Республика Беларусь
Н. П. Митьковская – Республиканский научно-практический центр «Кардиология», Минск, Республика Беларусь
А. Г. Мойсеёнок – Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси, Гродно, Республика Беларусь
С. П. Рубникович – Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь
Р. Р. Сидорович – Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии, Минск, Республика Беларусь
А. В. Строцкий – Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь
Л. П. Титов – Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь

Редакционный совет

Эдуардас Алекнавичиус – Национальный институт рака, Вильнюс, Литовская Республика
Ю. В. Вороненко – Национальная медицинская академия последипломного образования имени П. Л. Шупика, Киев, Украина
Марк М. Ван Гулле – Университет Лёвена, Лёвен, Королевство Бельгия
Драган Дьюрич – Институт медицинской физиологии Ричарда Бьюриана Университета Белграда, Белград, Республика Сербия
Т. П. Клюшник – Научный центр психического здоровья, Москва, Российская Федерация
В. А. Кульчицкий – Центр мозга Института физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
Марк-Антуан Кусто – Анжерский университет, Анже, Французская Республика
А. И. Мартынов – Медицинский центр Управления делами Президента Российской Федерации, Москва, Российская Федерация
Н. Д. Савенкова – Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия, Санкт-Петербург, Российская Федерация
В. И. Стародубов – Российская академия наук, Москва, Российская Федерация
М. В. Угрюмов – Институт биологии развития имени Н. К. Кольцова Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
И. А. Чешик – Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси, Гомель, Республика Беларусь

Адрес редакции:
ул. Академическая, 1, к. 119, 220072, г. Минск, Республика Беларусь.
Тел.: + 375 17 272-19-19; e-mail: medvesti@mail.ru.
Сайт: vestimed.belnauka.by.

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ.
Серия медицинских наук. 2023. Т. 20, № 3
Выходит на русском, белорусском и английском языках

Редактор *В. Г. Колосовская*
Компьютерная верстка *Ю. А. Агейчик*

Подписано в печать 10.08.2023. Выход в свет 29.08.2023. Формат 60×84 $^{1}/_{8}$. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 10,23. Уч.-изд. л. 11,3. Тираж 42 экз. Заказ 164.
Цена номера: индивидуальная подписка – 12,80 руб., ведомственная подписка – 29,91 руб.

Издатель и полиграфическое исполнение:
Республиканское унитарное предприятие «Издательский дом «Беларуская навука».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя, распространителя печатных изданий
№ 1/18 от 02.08.2013. ЛП № 02330/455 от 30.12.2013. Ул. Ф. Скорины, 40, 220084, г. Минск, Республика Беларусь

© РУП «Издательский дом «Беларуская навука»,
Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук, 2023

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)

PROCEEDINGS
OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

MEDICAL SERIES, 2023, vol. 20, no. 3

The Journal was founded in 2004

Issued four times a year

Founder is the National Academy of Sciences of Belarus

The journal is registered on May 18, 2009 by the Ministry of Information of the Republic of Belarus in the State Registry of Mass Media, reg. no. 393

The Journal is included in The List of Journals for Publication of the Results of Dissertation Research in the Republic of Belarus, in the Scopus international database and in the Russian Science Citation Index (RSCI) database

Editor-in-Chief

Vasily G. Bogdan –
Department of Medical Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Editorial Board

Oleg O. Rummo (*Associate Editor-in-Chief*) – Minsk Scientific-Practical Center of Surgery, Transplantation and Hematology, Minsk, Republic of Belarus
Valentina G. Kolosovskaya (*Managing Editor*)
Yulia E. Eremenko – Republican Center for Research and Practice in Otolaryngology, Minsk, Republic of Belarus
Mikhail A. Gerasimenko – Republican Scientific-Practical Center of Traumatology and Orthopedics, Minsk, Republic of Belarus
Gennady L. Gurevich – Republican Scientific and Practical Center of Pulmonology and Tuberculosis, Minsk, Republic of Belarus
Siarhei V. Hubkin – Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
Sergey L. Kabak – Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus
Nina P. Kanunnikova – Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Republic of Belarus
Siarhei A. Krasny – N. N. Alexandrov National Cancer Centre, Minsk, Republic of Belarus
Natalya P. Mitkovskaya – Republican Scientific and Practical Center "Cardiology", Minsk, Republic of Belarus
Andrey G. Moiseenok – Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Republic of Belarus
Sergey P. Rubnikovich – Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus
Ryszard R. Sidorovich – Republican Research and Practical Center of Neurology and Neurosurgery, Minsk, Republic of Belarus
Alexander V. Strotsky – Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Leonid P. Titov – Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus
Frantishek I. Vismont – Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

E d i t o r i a l C o u n c i l

Eduardas Aleknavicius – National Cancer Institute, Vilnius, Republic of Lithuania
Igor A. Cheshik – Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus
Mark-Antoine Custaud – University of Angers, Angers, French Republic
Dragan Djuric – Richard Buryan Medical Physiology Institute of the University of Belgrade, Belgrade, Republic of Serbia
Mark M. Van Hulle – University of Leuven, Leuven, Kingdom of Belgium
Tatiana P. Klyushnik – Mental Health Research Center, Moscow, Russian Federation
Vladimir A. Kulchitsky – Brain Center of the Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
Anatoly I. Martynov – Medical Center of the Administration of the President of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation
Nadezhda D. Savenkova – St. Petersburg State Pediatric Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation
Vladimir I. Starodubov – Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
Mikhail V. Ugryumov – Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
Yuri V. Voronenko – National Medical Academy of Postgraduate Education named after P. L. Shupik, Kyiv, Ukraine

Address of the Editorial Office:
1, Akademicheskaya Str., room 119, 220072, Minsk, Republic of Belarus.
Phone: + 375 17 272-19-19; e-mail: medvesti@mail.ru.
Website: vestimed.belnauka.by.

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS.
Medical series, 2023, vol. 20, no. 3.

Printed in Russian, Belarusian and English languages

Editor *V. G. Kolosovskaya*
Computer imposition *Yu. A. Aheichyk*

It is sent of the press 10.08.2023. Appearance 29.08.2023. Format 60×84 $^{1}/_{8}$. Offset paper. The press digital.
Printed pages 10.23. Publisher's signatures 11.3. Circulation 42 copies. Order 164.
Number price: individual subscription – 12.80 byn., departmental subscription – 29.91 byn.

Publisher and printing execution:
Republican unitary enterprise "Publishing House "Belaruskaya Navuka"
Certificate on the state registration of the publisher, manufacturer, distributor of printing editions
No. 1/18 dated August 2, 2013. License for the press No. 02330/455 dated December 30, 2013.
Address: 40, F. Skorina Str., Minsk, 220084, Republic of Belarus.

© RUE "Publishing House "Belaruskaya Navuka",
Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series, 2023

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)

ЗМЕСТ

КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА

Доронькина А. С., Жаворонок И. П., Богдан В. Г. Профиль про- и противовоспалительных цитокинов при введении амидов жирных кислот с этаноламином и глицином в условиях моделированной периферической нейропатии 183

Кадушкин А. Г., Таганович А. Д., Мовчан Л. В., Зафранская М. М., Шман Т. В. Миграция Т-лимфоцитов крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких к хемокинам RANTES и IP-10 под влиянием азитромицина 191

Батян А. Н., Волонцевич В. Н., Гончарова Е. В., Демешко П. Д., Лемешевский В. О. Влияние перерывов в процессе лучевой терапии на отдаленные результаты лечения опухолей головы и шеи I–III стадии в отсутствие хирургического и химиолучевого лечения 205

Пашкевич С. Г., Рубникович С. П., Кузнецова Т. Е., Кузьменко Е. В., Миронова Г. П., Тихонович О. Г., Гладкова Ж. А., Жогаль К. Н., Сердюченко Н. С., Грищенков А. С. Морфоструктурные изменения в мозге экспериментальных животных после применения мезенхимальных стволовых клеток в модели воспаления височно-нижнечелюстного сустава 216

Полякова Е. А., Стёганцева М. В., Гурьянова И. Е., Луцкович Д. В., Скоповец Е. Я., Любушкин А. В., Володащик Т. П., Казак В. И., Скибо Ю. В., Белевцев М. В. Диагностическая значимость определения продуктов реаранжировок Т- и В-клеточных рецепторов TREC и KREC у пациентов с врожденными ошибками иммунитета 226

Кузнецов О. Е. Генеалогическая диагностика новообразований на основе систем искусственного интеллекта (*на англ. яз.*) 236

Пузан Н. Д., Беляковский В. Н., Чешик И. А., Михайлов И. В. Влияние ионизирующего излучения (лучевой терапии) на структурно-функциональное состояние сывороточного альбумина у больных раком шейки матки 243

Кравченко Е. В., Ольгомец Л. М., Саванец О. Н., Бородина К. В., Пустюльга Е. С., Голубович В. П., Зильберман Р. Д., Бизунок Н. А., Дубовик Б. В. Влияние пролинсодержащих олигопептидов на поведение аутбредных мышей ICR в тесте Forced Swim 256

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)

CONTENTS

CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE

Doronkina A. S., Zhavoronok I. P., Bogdan V. G. Profile of pro- and anti-inflammatory cytokines during injection of fatty acid amides with ethanolamine and glycine in modeling peripheral neuropathy 183

Kadushkin A. G., Tahanovich A. D., Movchan L. V., Zafranskaya M. M., Shman T. V. Impact of azithromycin on the migration of peripheral blood T lymphocytes from patients with chronic obstructive pulmonary disease to RANTES and IP-10 191

Batyan A. N., Valantsevich V. N., Hancharova K. V., Dziameshka P. D., Lemiasheuski V. O. Influence of interruptions in radiation therapy on long-term results of treatment of stage I–III head and neck cancers in the absence of surgical and chemoradiotherapy 205

Pashkevich S. G., Rubnikovich S. P., Kuznetsova T. E., Kuzmenko E. V., Mironova G. P., Tikhonovich O. G., Gladkova Zh. A., Zhogal K. N., Serdyuchenko N. S., Grishchenkov A. S. Morphostructural changes in the brain of experimental animals after using mesenchymal stem cells in the temporomandibular joint inflammation model 216

Polyakova E. A., Stegantseva M. V., Guryanova I. E., Lutskovich D. V., Skapavets K. Y., Liubushkin A. V., Volodashchik T. P., Kazak V. I., Skibo Yu. V., Belevtsev M. V. Diagnostic significance of determining TREC and KREC T- and B-cell receptor rearrangement products in patients with inborn immune errors 226

Kuzniatsou A. E. Genealogical diagnostics of neoplasms based on artificial intelligence systems 236

Puzan N. D., Belyakovskiy V. N., Cheshik I. A., Mihailov I. V. Effect of ionizing radiation (radiation therapy) on the structural and functional state of serum albumin with cervical cancer 243

Kravchenko E. V., Olgomets L. M., Savanets O. N., Borodina K. V., Pustyulga E. S., Golubovich V. P., Zilberman R. D., Bizunok N. A., Dubovik B. V. Effect of proline-containing oligopeptides on the behavior of outbred ICR mice in the Forced Swim Test 256

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)

КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА

CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE

УДК 547.327:547.295.9:612.884
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-3-183-190

Поступила в редакцию 26.04.2022
Received 26.04.2022

А. С. Доронькина[1], И. П. Жаворонок[1], В. Г. Богдан[2]

[1]Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь
[2]Отделение медицинских наук НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ПРОФИЛЬ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ АМИДОВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ С ЭТАНОЛАМИНОМ И ГЛИЦИНОМ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАННОЙ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕЙРОПАТИИ

Аннотация. Изучено влияние амидов жирных кислот с этаноламином и глицином при блокаде мембранных орфанных GPR18, GPR55 и ядерных PPARα рецепторов на уровень про- и противовоспалительных цитокинов у крыс с экспериментальной периферической нейропатией. Показано, что противовоспалительное действие PEA и SEA у экспериментальных животных с нейропатией осуществляется через ядерные PPARα рецепторы. Вместе с тем PGlyA не обладает антиинфломаторными эффектами в модели периферической нейропатии у крыс.

Ключевые слова: пальмитоилэтаноламид, стеароилэтаноламид, пальмитамид глицина, интерлейкин-6, интерлейкин-10

Для цитирования: Доронькина, А. С. Профиль про- и противовоспалительных цитокинов при введении амидов жирных кислот с этаноламином и глицином в условиях моделированной периферической нейропатии / А. С. Доронькина, И. П. Жаворонок, В. Г. Богдан // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2023. – Т. 20, № 3. – С. 183–190. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-3-183-190

Anastasya S. Doronkina[1], Irina P. Zhavoronok[1], Vasily G. Bogdan[2]

[1]Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
[2]Department of Medical Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

PROFILE OF PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES DURING INJECTION OF FATTY ACID AMIDES WITH ETHANOLAMINE AND GLYCINE IN MODELING PERIPHERAL NEUROPATHY

Abstract. The effect of fatty acid amides during the blockade of membrane orphan GPR18, GPR55 and nuclear PPARα receptors on the level of pro- and anti-inflammatory cytokines in rats with experimental peripheral neuropathy was studied. It has been proven that the anti-inflammatory action of PEA and SEA in experimental animals with neuropathy is carried out through nuclear PPARα receptors. However, PGlyA has no anti-inflamatory effects in a rat model of peripheral neuropathy.

Keywords: palmitoylethanolamide, stearoylethanolamide, palmitoylglycine, nociceptive sensitivity, gait patterns, interleukin-6, interleukin-10

For citation: Doronkina A. S., Zhavoronok I. P., Bogdan V. G. Profile of pro- and anti-inflammatory cytokines during injection of fatty acid amides with ethanolamine and glycine in modeling peripheral neuropathy. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2023, vol. 20, no. 3, pp. 183–190 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-3-183-190

Введение. Одной из актуальных проблем современной неврологии является поражение периферических нервов у больных сахарным диабетом, онкологическими заболеваниями при химиотерапии, а также при инфекциях и травмах. Симптомы нейропатической боли проявляются онемением в руках и ногах, которое переходит в ланценирующие боли (напоминающие электрический разряд), мышечную слабость, судороги, ощущение жара или холода.

© Доронькина А. С., Жаворонок И. П., Богдан В. Г., 2023

Описанные проявления нейропатии (НП) обусловливают нейровоспаление, медиаторами которого являются интерлейкин-1β (ИЛ-1β), фактор некроза опухоли-α (ФНОα), интерлейкин-6 (ИЛ-6) и другие провоспалительные цитокины, которые индуцируют патологические процессы в периферической нервной системе и, несмотря на свой ограниченный жизненный цикл, обладают высокой агрессивностью в отношении клеток хозяина. Торможение синтеза и инактивация провоспалительных цитокинов осуществляются за счет повышения пула противовоспалительных цитокинов, а именно интерлейкина-4 (ИЛ-4), интерлейкина-10 (ИЛ-10), интерлейкина-13 (ИЛ-13) и некоторых других. Баланс между про- и противовоспалительными цитокинами является важным компонентом патогенеза, определяющим выраженность патологических реакций, и прогностически значим для определения исхода воспаления [1].

Нейровоспаление трудно поддается лечению с помощью существующих терапевтических средств, и, как следствие, требуется поиск других соединений, которые будут эффективны в купировании боли и воспаления, но в то же время не будут оказывать побочного действия на организм.

Одним из перспективных направлений медико-биологических исследований на сегодняшний день является изучение в области физиологии и биохимии липидных аутокоидов – амидов жирных кислот (FAAs). Эта весьма обширная, непрерывно обновляющаяся и пополняющаяся группа биогенных веществ к настоящему времени насчитывает сотни отдельных представителей. Они участвуют в модуляции высвобождения нейротрансмиттеров, функционировании клеточных энергетических систем и вовлечены в регуляцию различных патологических процессов, включая боль и воспаление. К наиболее распространенным представителям этой группы соединений в организме млекопитающих можно отнести пальмитоилэтаноламид (PEA), стеароилэтаноламид (SEA), пальмитамид глицина (PGlyA).

В современной научной литературе имеются данные о том, что пальмитоилэтаноламид способен снижать уровень провоспалительных [2] и повышать уровень противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови пациентов с НП на фоне воспаления легких и онкологических заболеваний [3], восстанавливая тем самым баланс между секрецией про- и противовоспалительных цитокинов. В настоящее время не существует единого понимания принципа антиинфломаторного действия FAAs. В этой связи актуальным является изучение механизмов модуляции FAAs на уровень соответствующих цитокинов при НП, сопровождающейся нейровоспалением, что позволит в разрезе проводимой работы углубить понимание механизмов реализации антиноцицептивных и противовоспалительных эффектов данных веществ.

Целью исследования являлось изучение закономерностей изменения соотношения про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови крыс с периферической мононейропатией после курсового введения амидов жирных кислот на фоне фармакологической блокады орфанных (GPR18, GPR55) и ядерных PPARα рецепторов.

Материалы и методы исследования. *Лабораторные животные.* Экспериментальные исследования выполнены на 90 крысах-самцах линии Wistar массой 200–220 г, которые содержались в условиях вивария Института физиологии НАН Беларуси. Все животные находились в контролируемых условиях окружающей среды на стандартном рационе, имели свободный доступ к воде и пище. Эксперименты проводили с соблюдением правовых и этических норм обращения с животными в соответствии с национальными и международными стандартами качества планирования и проведения исследований на лабораторных животных (протокол биоэтической комиссии Института физиологии НАН Беларуси № 1 от 26.01.2023 г. [5]).

Исследуемые вещества. FAAs – PEA, SEA и PGlyA (синтезированы в лаборатории химии липидов Института биоорганической химии НАН Беларуси), PSB-CB5 (Tocris, Великобритания), GW6471 и O-1918 (Cayman chemical, США) растворяли в комбинированном растворителе, состоящем из этанола. FAAs, а также антагонисты к ядерным PPARα и орфанным рецепторам являются труднорастворимыми соединениями, поэтому для их введения использовали комплексный растворитель, состоящий из Tween 80 (Sigma, США), этанола и апирогенного физиологического раствора в соотношении 1 : 1 : 8. Введение FAAs (PEA, SEA, PGlyA) осуществляли внутрибрюшинно в дозе 1,5 мг/кг в 1 мл растворителя на 8–14-е сутки, а на 14-е сутки, за 10 мин до введения

одного из FAAs, также внутрибрюшинно вводили один из антагонистов к соответствующим рецепторам в дозе 1,0 мг/кг в 1 мл растворителя.

Моделирование периферической НП осуществляли хирургическим путем в асептических условиях. Все хирургические манипуляции проводили под общей анестезией (20 мг/кг тиопентала натрия внутривенно, растворенного в апирогенном физиологическом растворе) («Синтез», Россия). Выбривали шерсть в области бедра и голени крысы и обрабатывали подготовленное поле 5 %-ным спиртовым раствором йода. Для местной анестезии использовали 1 %-ный раствор лидокаина гидрохлорида (30–40 мкл на крысу) (Борисовский завод медицинских препаратов, Беларусь). После наркотизации тиопенталом натрия крыс фиксировали в положении лежа на правом боку. В проекции прохождения седалищного нерва с наружной стороны бедра выполняли разрез кожи длиной 1,0 см, мышечный слой раздвигали пинцетом, минимально травмируя мышечные волокна, находили седалищный нерв и накладывали на него три лигатуры на расстоянии 1 мм друг от друга, используя нить «Сургикрол», USP 3/0 («Футберг», Беларусь). Кожу сшивали непрерывным матрацным швом. Готовый шов обрабатывали 1 %-ным раствором бриллиантового зеленого («Белмедпрепараты», Беларусь). Для предупреждения инфицирования крысам подкожно вводили растворенный в воде для инъекций антибиотик Цефтриаксон (Борисовский завод медицинских препаратов, Беларусь) в дозе 200 мг/кг. До полного пробуждения от наркоза животные находились под наблюдением в индивидуальных боксах.

Животные были разделены на следующие группы: 1 – здоровые крысы (контроль 1) (n = 5); 2 – животные с НП (контроль 2) (n = 5); 3 – НП + растворитель (n = 5); 4 – НП + PEA (n = 5); 5 – НП + SEA (n = 5); 6 – НП + PGlyA (n = 5); 7 – НП + антагонист GPR18 (PSB-CB5) (n = 5); 8 – НП + PSB-CB5 + PEA (n = 5); 9 – НП + PSB-CB5 + SEA (n = 5); 10 – НП + PSB-CB5 + PGlyA (n = 5); 11 – НП + антагонист PPARα (GW6471) (n = 5); 12 – НП + GW6471 + PEA (n = 5); 13 – НП + GW6471 + SEA (n = 5); 14 – НП + GW6471 + PGlyA (n = 5); 15 – НП + антагонист GPR55 (O-1918) (n = 5); 16 – НП + O-1918 + PEA (n = 5); 17 – НП + O-1918 + SEA (n = 5); 18 – НП + O-1918 + PGlyA (n = 5).

По окончании срока эксперимента крыс всех групп подвергали эвтаназии путем декапитации с помощью гильотины на фоне седации тиопенталом натрия и производили забор периферической крови. Цельную кровь через 1 ч после забора центрифугировали (3000 об/мин, 20 мин) и выделяли сыворотку. Замороженную сыворотку до тестирования хранили при температуре –20 ºС.

Концентрацию цитокинов в сыворотке крови крыс экспериментальных групп оценивали иммуноферментным методом на ИФА-анализаторе BioTekELx80 (США). Уровень ИЛ-6 определяли с использованием набора ИФА фирмы BT LAB (Китай) (серийный № E0135Ra), уровень ИЛ-10 – с помощью набора ИФА фирмы Cloud-Clone Corp (США) (серийный № 76637E45C3). Результат выражали в пикограммах/мл (пг/мл).

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью пакетов программ OriginPro 9.1 (Origin Lab Corp., США) и Statistica 10.0 (Statsoft, Россия). Проверку гипотезы о нормальном распределении количественных показателей осуществляли по критерию Шапиро–Уилка ($p < 0{,}05$). Анализ статистической значимости количественных признаков определяли с помощью непараметрического теста Манна–Уитни для независимых выборок в парных сравнениях. Данные представлены в виде медианы (Me) и интервального размаха с указанием 25-го и 75-го процентилей. В процессе обработки данных уровень статистической значимости оценивали при $p < 0{,}05$.

Результаты и их обсуждение. Согласно полученным данным, отмечена достоверная разница ($p < 0{,}05$) в уровне исследуемых цитокинов у животных с периферической НП (контроль 2) по сравнению с этим показателем у здоровых крыс (контроль 1). Установлено, что в сыворотке крови крыс с патологией седалищного нерва статистически значимо увеличилась концентрация провоспалительного ИЛ-6 (в 3,15 раза, $p < 0{,}002$) и снизилось содержание противоспалительного ИЛ-10 (в 2,22 раза, $p < 0{,}013$), что свидетельствуют о дисбалансе продукции про- и противовоспалительных цитокинов. Преобладание секреции провоспалительного ИЛ-6 при относительной недостаточности выработки противовоспалительного ИЛ-10 указывает на течение патологиче-

ского процесса воспалительной этиологии в организме экспериментального животного и является подтверждением развития смоделированной периферической НП (см. таблицу).

При курсовом введении амидов жирных кислот крысам с НП отмечены статистически значимые различия исследуемых показателей в сравнении с группой контроля 2. Уровень ИЛ-6 после курсового введения PEA в дозе 1,5 мг/кг снизился в 1,44 раза ($p < 0,009$), а после инъекций SEA в аналогичных экспериментальных условиях – в 1,43 раза ($p < 0,002$) (рис. 1). Концентрация ИЛ-10 в сыворотке крови крыс после введения PEA возросла в 5,58 раза ($p < 0,009$), после введения SEA – в 6,66 раза ($p < 0,002$) (рис. 2). Полученные данные позволяют предположить наличие противовоспалительных эффектов у рассматриваемых соединений. После курсового введения PGlyA крысам с мононейропатией статистически значимых различий исследуемых показателей относительно группы контроля 2 получено не было (см. таблицу).

Уровень ИЛ-6 и ИЛ-10 в сыворотке после курсового внутрибрюшинного введения FAAs (PEA, SEA and PGlyA) в дозе 1,5 мг/кг, фармакологической блокады орфанных (GPR18, GPR55) и ядерных PPARα рецепторов, Me [25 %–75 %]

Concentration of IL-6 and IL-10 in serum after a course of intraperitoneal injections of FAAs (PEA, SEA, and PGlyA) at a dose of 1.5 mg/kg, pharmacological blockade of orphan (GPR18, GPR55) and nuclear PPARα receptors, Me [25 %–75 %]

Группа	ИЛ-6, пг/л	ИЛ-10, пг/л
Интактные	2,50 (2,20; 2,90)	1,20 (0,60; 1,30)
Нейропатия	8,17 (7,55; 8,75)*	0,60 (0,45; 0,75)*
НП + растворитель	8,20 (7,85; 8,55)*	0,83 (0,75; 0,95)*
НП + PEA	4,50 (3,20; 5,35)*#^&	3,75 (1,80; 4,43)*#^&
НП + SEA	4,95 (4,42; 5,10)*#^§	3,70 (3,00; 4,10)*#^§
НП + PGlyA	5,75 (4,18; 6,58)#^	0,90 (0,60; 2,10)
НП + PSB-CB5	8,00 (6,95; 8,00)	1,80 (1,20; 1,80)
НП + PSB-CB5 + PEA	4,90 (4,40; 5,05)	2,80 (2,00; 3,20)
НП + PSB-CB5 + SEA	4,80 (4,30; 5,15)	3,90 (3,15; 4,05)
НП + PSB-CB5 + PGlyA	5,30 (4,50; 6,30)	1,80 (1,50; 1,90)
НП + GW6471	7,20 (7,00; 7,65)	1,20 (0,90; 1,20)
НП + GW6471 + PEA	6,10 (5,95; 6,48)	1,10 (0,90; 1,45)
НП + GW6471 + SEA	6,80 (6,70; 7,05)	0,90 (0,45; 1,35)
НП + GW6471 + PGlyA	5,60 (4,93; 6,05)	1,80 (1,50; 2,00)
НП + O-1918	7,00 (6,95; 7,20)	1,20 (0,60; 1,50)
НП + O-1918 + PEA	4,95 (4,60; 5,23)	2,65 (2,25; 2,93)
НП + O-1918 + SEA	4,85 (4,65; 5,00)	3,90 (3,82; 4,40)
НП + O-1918 + PGlyA	6,00 (5,43; 6,35)	1,80 (1,05; 2,55)

П р и м е ч а н и е. Достоверность различий ($p < 0,05$): * – по сравнению с группой здоровых животных, # – по сравнению с группой НП, ^ – по сравнению с группой НП + растворитель, & – по сравнению с группой НП + GW6471 + PEA, § – по сравнению с группой НП + GW6471 + SEA.

В следующей группе животных на 14-е сутки после курсового введение амидов жирных кислот, за 10 мин до крайней инъекции FAAs, внутрибрюшинно вводили антагонист к GPR18 рецепторам (PSB-CB5). Статистически значимых различий показателей ИЛ-6 и ИЛ-10 в сыворотке крови крыс после применения PEA, SEA и PGlyA на фоне фармакологической блокады GPR18 рецепторов в сравнении с группами НП + FAAs (PEA, SEA или PGlyA) получено не было (рис. 1, 2).

В группе НП + PSB-CB5 + PEA отмечено достоверное снижение уровней ИЛ-6 (в 1,42 раза, $p < 0,002$) и ИЛ-10 (в 4,21 раза, $p < 0,009$) относительно группы контроля 2. В то же время в группе НП + PSB-CB5 + SEA наблюдалась схожая тенденция – снижение показателя ИЛ-6 (в 1,42 раза, $p < 0,002$) и увеличение ИЛ-10 (в 5,88 раза, $p < 0,002$) в сравнении группой НП (контроль 2) (см. таблицу).

Схожий результат был получен после фармакологической блокады GPR55 рецепторов посредством введения антагониста О-1918 в дозе 1 мг/кг на 14-е сутки курсового введения FAAs крысам с периферической НП. При анализе показателей группы НП + О-1918 + PEA отмечено статистически значимое снижение ИЛ-6 (в 1,34 раза, $p < 0{,}001$) (рис. 1) и увеличение ИЛ-10 (в 4,21 раза, $p < 0{,}002$) (рис. 2) относительно аналогичных показателей в группе крыс с НП,

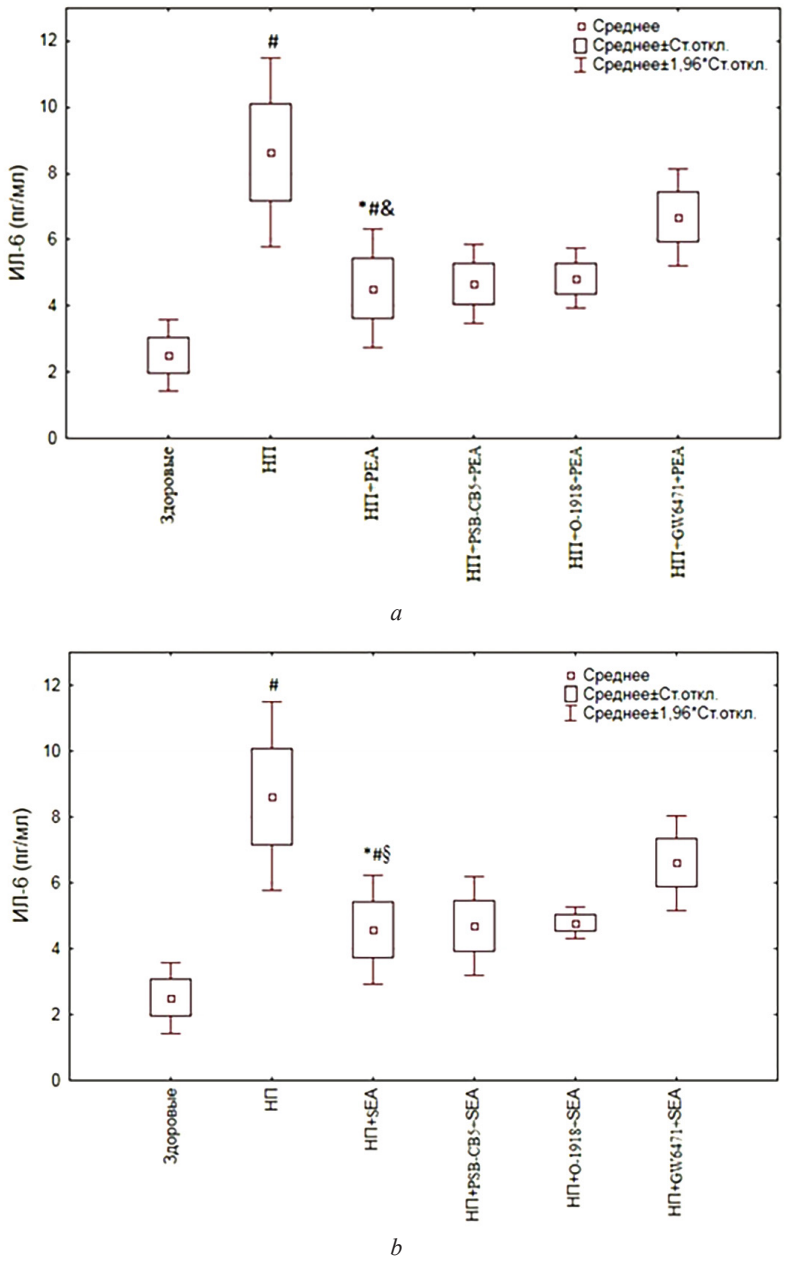


Рис. 1. Уровень концентрации ИЛ-6 (пг/мл) в сыворотке крови крыс с периферической нейропатией после курсового введения PEA (*a*) и SEA (*b*) в дозе 1,5 мг/кг и фармакологической блокаде орфанных (GPR18, GPR55) и ядерных PPARα рецепторов (1 мг/кг). Достоверность различий ($p < 0{,}05$):
* – по сравнению с группой здоровых животных, # – по сравнению с группой НП,
^ – по сравнению с группой НП + растворитель, & – по сравнению с группой НП + GW6471+ PEA,
§ – по сравнению с группой НП + GW6471+ SEA

Fig. 1. Concentration of IL-6 (pg/ml) in the blood serum in rats with peripheral neuropathy after a course of intraperitoneal injections of PEA (*a*) and SEA (*b*) at a dose of 1.5 mg/kg and pharmacological blockade of orphan (GPR18, GPR55) and nuclear PPARα receptors (1 mg/kg). Significance of differences ($p < 0.05$): * – compared with the group of healthy rats, # – compared with the neuropathy group, & – compared with the NP + GW6471 + PEA group, § – compared with the NP + GW6471 + SEA group

а в группе НП + О-1918 + SEA – снижение уровня ИЛ-6 (в 1,41 раза, $p < 0,006$) (см. рис. 1) и повышение содержание ИЛ-10 (в 6,21 раза, $p < 0,002$) (рис. 2) по сравнению с контролем 2 (см. таблицу).

Согласно указанному выше, PEA и SEA при фармакологической блокаде орфанных GPR18 и GPR55 рецепторов у крыс с периферической НП оказывали противовоспалительный эффект, что отражалось в статистически значимом снижении уровня ИЛ-6 и повышении содержания ИЛ-10 в сыворотке крови экспериментальных животных. Таким образом, полученные данные показывают,

a

b

Рис. 2. Уровень концентрации ИЛ-10 (пг/мл) в сыворотке крови крыс с периферической нейропатией после курсового введения PEA (*a*) и SEA (*b*) в дозе 1,5 мг/кг. Достоверность различий ($p < 0,05$):
* – по сравнению с группой Интактные, # – по сравнению с группой Нейропатия, ^ – по сравнению с группой НП + физраствор, & – по сравнению с группой НП + GW6471 + PEA, § – по сравнению с группой НП + GW6471 + SEA

Fig. 2. Concentration of IL-10 (pg/ml) in the blood serum in rats with peripheral neuropathy after a course of intraperitoneal injections of PEA (*a*) and SEA (*b*) at a dose of 1.5 mg/kg and pharmacological blockade of orphan (GPR18, GPR55) and nuclear PPARα receptors (1 mg/kg). Significance of differences ($p < 0.05$):
* – compared with the group of healthy rats, # – compared with the neuropathy group, & – compared with the NP + GW6471 + PEA group, § – compared with the NP + GW6471 + SEA group

References

1. Wang X.-M., Lehky T. J., Brell J. M. Discovering cytokines as targets for chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy. *Cytokine*, 2012, vol. 59, no. 1, pp. 3–9. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.03.027

2. Peritore A. F., D'Amico R., Siracusa R., Cordaro M., Fusco R., Gugliandolo E. [et al.]. Management of acute lung injury: palmitoylethanolamide as a new approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, vol. 24, no. 11, art. 5533. https://doi.org/10.3390/ijms22115533

3. Tagne A. M., Fotio Y., Lin L., Squire E., Ahmed F., Ibne Rashid T., Azari E. K., Piomelli D. Palmitoylethanolamide and hemp oil extract exert synergistic anti-nociceptive effects in mouse models of acute and chronic pain. *Pharmacological Research*, 2021, vol. 167, art. 105545. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105545

4. Dang H. Th., Kang G. J., Yoo E. S., Hong J., Choi J. S., Kim H. S., Chung H. Y., Jung J. H. Evalution of endogenous fatty acid and their synthetic analogues as potential anti-inflammatory leads. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2016, vol. 19, no. 4, pp. 1520–1527. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.12.046

5. On the approval of veterinary and sanitary rules for the reception, care and autopsy of experimental animals in vivariums of research institutes, stations, laboratories, educational institutions, as well as in nurseries: Resolution of the Ministry of agriculture and food of the Republic of Belarus, May 21, 2010, N 36. *National Legal Internet Portal of the Republic of Belarus.* Available at: https://pravo.by/document/?guid=3961&p0=W210p0118 (accessed 21.06.2023) (in Russian).

Информация об авторах

Доронькина Анастасия Сергеевна – аспирант, мл. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: doronkina_nastasya1995@mail.ru

Жаворонок Ирина Петровна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: iri8308@yandex.ru

Богдан Василий Генрихович – д-р мед. наук, профессор, академик-секретарь Отделения медицинских наук НАН Беларуси (пр-т Независимости, 66, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: medic@presidium.bas-net.by

Information about the authors

Anastasya S. Doronkina – Postgraduate student, Junior Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: doronkina_nastasya1995@mail.ru

Irina P. Zhavoronok – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: iri8308@yandex.ru

Vasily G. Bogdan – D. Sc. (Med.), Professor, Academician-Secretary of the Department of Medical Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus (66, Nezavisimosti Ave., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: medic@presidium.bas-net.by

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 616.24-036.12-085.33:612.112.94
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-3-191-204

Поступила в редакцию 14.09.2022
Received 14.09.2022

А. Г. Кадушкин[1], А. Д. Таганович[1], Л. В. Мовчан[2], М. М. Зафранская[3], Т. В. Шман[2]

[1]Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь
[2]Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь
[3]Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь

МИГРАЦИЯ Т-ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ К ХЕМОКИНАМ RANTES И IP-10 ПОД ВЛИЯНИЕМ АЗИТРОМИЦИНА

Аннотация. Характерный для хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) воспалительный процесс сопровождается миграцией Т-лимфоцитов из крови в дыхательные пути. Подавление хемотаксиса Т-клеток с помощью лекарственных средств может ослабить воспалительную реакцию у пациентов с ХОБЛ.

Целью настоящего исследования являлось определение способности комбинации азитромицина и глюкокортикоидов влиять на миграцию Т-клеток крови пациентов с ХОБЛ.

Процентное содержание Т-лимфоцитов, экспрессирующих хемокиновые рецепторы CCR5, CCR6, CCR7, CXCR3, CXCR4, CXCR6, анализировали методом проточной цитометрии в периферической крови 54 курящих пациентов с ХОБЛ, 21 курящего здорового человека и 20 здоровых некурящих лиц, а также в бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) 7 курящих пациентов с ХОБЛ и 7 здоровых курильщиков. Дополнительно определяли миграцию Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов крови пациентов с ХОБЛ (n = 8) к хемокинам RANTES (10 нМ) и IP-10 (10 нМ) при их инкубации с азитромицином (10 мкг/мл) и будесонидом (10 нМ).

Проведенные исследования показали повышение процентного содержания Т-лимфоцитов, экспрессирующих хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR5, в периферической крови курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению с таковым у здоровых курильщиков и здоровых некурящих людей, а также в БАЛЖ курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению с аналогичным показателем у здоровых курящих людей. В периферической крови и БАЛЖ показатели относительного количества Т-клеток, содержащих хемокиновые рецепторы CXCR4, CXCR6, CCR6 и CCR7, не различались у пациентов с ХОБЛ и здоровых людей. Будесонид подавлял только миграцию цитотоксических Т-лимфоцитов к RANTES. Азитромицин самостоятельно и в сочетании с будесонидом ингибировал миграцию Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов крови в направлении RANTES и IP-10. При этом способность азитромицина супрессировать миграцию Т-клеток в комбинации с будесонидом и без него превосходила эффективность одного будесонида.

Полученные данные свидетельствуют о значении рецепторов CXCR3 и CCR5 в привлечении Т-клеток в легкие пациентов с ХОБЛ и демонстрируют способность азитромицина ингибировать миграцию Т-лимфоцитов.

Ключевые слова: хемотаксис, азитромицин, Т-лимфоциты, CXCR3, CCR5, RANTES, IP-10

Для цитирования: Миграция Т-лимфоцитов крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких к хемокинам RANTES и IP-10 под влиянием азитромицина / А. Г. Кадушкин [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2023. – Т. 20, № 3. – С. 191–204. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-3-191-204

Aliaksei G. Kadushkin[1], Anatoli D. Tahanovich[1], Lyudmila V. Movchan[2], Marina M. Zafranskaya[3], Tatsiana V. Shman[2]

[1]Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus
[2]Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Borovliany, Minsk region, Republic of Belarus
[3]International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

IMPACT OF AZITHROMYCIN ON THE MIGRATION OF PERIPHERAL BLOOD T LYMPHOCYTES FROM PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE TO RANTES AND IP-10

Abstract. The inflammatory process specific for chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is accompanied by T lymphocyte migration from peripheral blood to the respiratory tract. Suppression of T cell chemotaxis by drugs may attenuate the inflammatory response in patients with COPD.

The aim of this study was to determine the ability of azithromycin in combination with glucocorticoids to affect the migration of blood T cells in patients with COPD.

The percentage of T lymphocytes expressing chemokine receptors CCR5, CCR6, CCR7, CXCR3, CXCR4, CXCR6 was analyzed by flow cytometry in the peripheral blood of 54 smokers with COPD, 21 healthy smokers, and 20 healthy non-smokers, as well as in bronchoalveolar lavage (BAL) of 7 smokers with COPD and 7 healthy smokers. Additionally, we determined the effect of azithromycin (10 μg/ml) and budesonide (10 nM) on the migration of peripheral blood T helper cells and cytotoxic T lymphocytes from patients with COPD (n = 8) to chemokines RANTES (10 nM) and IP-10 (10 nM).

The percentage of T lymphocytes expressing chemokine receptors CXCR3 and CCR5 increased in the peripheral blood of COPD smokers compared with healthy smokers and healthy non-smokers, as well as in the BAL of COPD smokers compared with healthy smokers. The proportion of T cells expressing chemokine receptors CXCR4, CXCR6, CCR6, and CCR7 did not differ in the peripheral blood and the BAL between COPD patients and healthy controls. Budesonide only inhibited the migration of cytotoxic T lymphocytes to RANTES. Azithromycin, alone and combined with budesonide, inhibited the migration of T helper cells and cytotoxic T lymphocytes to both RANTES and IP-10. Moreover, the inhibitory effect of azithromycin, in combination with budesonide and without it, on the T cell migration was significantly greater than the effect of budesonide alone.

Our results suggest a role for CXCR3 and CCR5 in T cell recruitment into the lungs of COPD patients and demonstrate the ability of azithromycin to inhibit T lymphocyte migration.

Keywords: chemotaxis, azithromycin, T lymphocytes, CXCR3, CCR5, RANTES, IP-10

For citation: Kadushkin A. G., Tahanovich A. D., Movchan L. V., Zafranskaya M. M., Shman T. V. Impact of azithromycin on the migration of peripheral blood T lymphocytes from patients with chronic obstructive pulmonary disease to RANTES and IP-10. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2023, vol. 20, no. 3, pp. 191–204 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-3-191-204

Введение. В настоящее время глобальная распространенность хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) среди людей в возрасте 30–79 лет составляет 10,3 %, что эквивалентно 391,9 млн человек [1]. При этом более половины всех случаев заболевания могут быть даже не диагностированы [2].

Характерный для ХОБЛ воспалительный процесс сопровождается увеличением количества Т-хелперов 1-го типа и цитотоксических Т-лимфоцитов, инфильтрирующих дыхательные пути [3]. Эти клетки способствуют развитию эмфиземы путем секреции гранзима В и перфоринов [4] и увеличивают интенсивность воспаления [5–7]. Показано, что около трети всех Т-лимфоцитов пациентов с ХОБЛ, расположенных в подслизистой основе бронхов, экспрессируют субъединицу p65 фактора транскрипции NF-κB [5], способного индуцировать транскрипцию провоспалительных цитокинов. У пациентов с 1–2-й степенью тяжести ХОБЛ в подслизистой основе бронхов также обнаружено повышение количества Т-клеток, экспрессирующих фосфорилированный (активный) фактор транскрипции STAT4, вовлеченный в индукцию синтеза интерферона γ, по сравнению с курящими и некурящими здоровыми людьми [6, 7]. Более того, у пациентов, страдающих ХОБЛ, продукция провоспалительных цитокинов Т-лимфоцитами легких, выделенными из бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) или биоптатов бронхов, оказалась выше, чем у здоровых курящих и некурящих людей [8, 9].

Полагают, что основными хемокиновыми рецепторами, вовлеченными в перемещение Т-лимфоцитов в легкие пациентов с ХОБЛ, являются CXCR3 и CCR5 [10, 11]. В числе прочего на это указывают данные об их повышенной экспрессии на поверхности Т-лимфоцитов крови пациентов с ХОБЛ по сравнению с курящими и некурящими здоровыми людьми [12]. Однако в литературе можно встретить и противоположное мнение, основанное на отсутствии изменений в экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR3 и CCR5 на Т-лимфоцитах крови у пациентов с ХОБЛ по сравнению со здоровыми курильщиками и здоровыми некурящими людьми [13, 14], что ставит под сомнение влияние этих изменений на развитие ХОБЛ.

Помимо CXCR3 и CCR5, на поверхности Т-лимфоцитов крови здоровых людей выявлены и другие хемокиновые рецепторы, в частности CXCR4, CXCR6, CCR6, CCR7 [15]. Однако изменения их количества на поверхности Т-клеток и их значение в развитии и прогрессировании ХОБЛ пока не установлены [10, 11].

К сожалению, до сих пор не существует специфического лечения ХОБЛ, а методы, направленные на предупреждение ограничения воздушного потока, являются по своей сути паллиативными [16]. Для лечения пациентов со стабильным течением заболевания и во время обострений ХОБЛ используются ингаляционные кортикостероиды, бронходилататоры, антибиотики и другие лекарственные средства, которые имеют ряд ограничений в использовании, связанных с риском развития побочных эффектов [17–19]. Более того, противовоспалительные препараты,

включая глюкокортикоиды, оказались малоэффективны в подавлении воспалительного процесса при ХОБЛ [20]. Вместе с тем недавно появились сведения о способности макролидного антибиотика азитромицина потенцировать противовоспалительные эффекты кортикостероидов путем снижения продукции провоспалительных медиаторов мононуклеарными клетками крови пациентов с ХОБЛ [21, 22].

Азитромицин самостоятельно проявляет иммуномодулирующие свойства посредством супрессии синтеза и секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов [22, 23], замедляя тем самым перемещение Т-лимфоцитов в легкие. Кроме того, он может также ингибировать фосфорилирование киназы Akt [24], вовлеченной в развитие устойчивости к глюкокортикоидам. Однако его способность влиять на миграцию Т-клеток крови пациентов с ХОБЛ, сопряженную с одновременным воздействием глюкокортикоидов, не известна.

Целью настоящего исследования являлось определение способности комбинации азитромицина и глюкокортикоидов влиять на миграцию Т-клеток крови пациентов с хронической обструктивной болезнью легких.

Материалы и методы исследования. *Характеристика пациентов.* В настоящей работе были обследованы 54 курящих пациента с ХОБЛ, 21 курящий здоровый человек и 20 здоровых некурящих лиц (см. таблицу), в периферической крови которых определено процентное содержание Т-лимфоцитов, экспрессирующих хемокиновые рецепторы. Дополнительно была установлена экспрессия хемокиновых рецепторов на поверхности Т-лимфоцитов, расположенных в БАЛЖ. С этой целью в исследование были включены 7 курящих пациентов с ХОБЛ и 7 здоровых курильщиков. Оценку миграции Т-лимфоцитов к хемокинам RANTES и IP-10 проводили, используя периферическую кровь 8 курящих пациентов с ХОБЛ.

Характеристика участников исследования

Characteristics of study participants

Показатель	Экспрессия хемокиновых рецепторов					Хемотаксис
	Периферическая кровь			БАЛЖ		
	Курящие пациенты с ХОБЛ	Курящие здоровые люди	Некурящие здоровые люди	Курящие пациенты с ХОБЛ	Курящие здоровые люди	Курящие пациенты с ХОБЛ
Общее кол-во	54	21	20	7	7	8
Пол, м/ж	44/10	17/4	16/4	5/2	5/2	6/2
Возраст, лет	64,0 (59,8–69,0)	62,0 (55,0–65,5)	61,0 (54,0–66,0)	61,0 (58,0–73,0)	62,0 (59,0–67,0)	61,5 (59,0–68,3)
Активные курильщики/ экс-курильщики	26/28	12/9	0/0	4/3	3/4	4/4
Индекс курящего человека, пачка/лет	35,0 (22,0–42,8)	32,0 (21,0–36,0)	0	37,0 (32,0–43,0)	30,0 (20,0–50,0)	39,0 (16,3–43,8)
$ОФВ_1$, % от должного	44,0 (32,8–51,0)	102,0 (98,5–109,0)	101,5 (95,0–112,3)	51,0 (43,0–64,0)	102,0 (93,0–109,0)	53,5 (43,3–63,8)
$ОФВ_1$/ФЖЕЛ, %	57,0 (50,0–62,0)	82,0 (78,5–87,0)	84,0 (78,0–88,8)	53,0 (49,0–64,0)	82,0 (80,0–86,0)	59,0 (42,8–63,5)
Степень тяжести ХОБЛ (GOLD 1/2/3/4), кол-во пациентов	0/17/31/6	–	–	0/4/3/0	–	0/5/3/0

П р и м е ч а н и е. Данные представлены в абсолютных значениях или в виде медианы и интерквартильного размаха (25-й – 75-й процентили). $ОФВ_1$ – объем форсированного выдоха за первую секунду; ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких; GOLD – Глобальная инициатива по хронической обструктивной болезни легких. Приведенные в таблице значения $ОФВ_1$ и $ОФВ_1$/ФЖЕЛ для курящих пациентов с ХОБЛ получены после проведения бронходилатационной пробы.

Критериями включения пациентов в исследование являлись диагноз ХОБЛ, соответствующий критериям Глобальной инициативы по хронической обструктивной болезни легких (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, GOLD), возраст старше 40 лет; критериями исключения – наличие у пациентов с ХОБЛ других хронических заболеваний бронхолегочной системы,

аллергических и аутоиммунных заболеваний, злокачественных новообразований, декомпенсации сахарного диабета, нарушений свертывающей системы крови, ВИЧ-инфекции. Были также исключены из исследования пациенты, принимавшие системные глюкокортикоиды, перенесшие инфекционное заболевание или обострение ХОБЛ в течение 6 недель до начала исследования.

В контрольные группы вошли условно здоровые добровольцы с нормальным уровнем объема форсированного выдоха за первую секунду ($ОФВ_1$) и нормальной величиной отношения $ОФВ_1$ к форсированной жизненной емкости легких ($ОФВ_1$/ФЖЕЛ), не имевшие в анамнезе патологии бронхолегочной системы и других хронических заболеваний. Все здоровые курильщики, так же как и пациенты с ХОБЛ, имели индекс курящего человека >10 пачка/лет.

Пациенты с ХОБЛ и здоровые доноры были подробно информированы о целях и задачах исследования. Перед обследованием и забором крови все испытуемые дали письменное добровольное согласие на участие в исследовании. Проведение исследования было одобрено решением Комитета по биомедицинской этике учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» (протокол № 8 от 21.01.2019).

Анализ экспрессии хемокиновых рецепторов на Т-лимфоцитах периферической крови. Периферическую кровь у пациентов с ХОБЛ и здоровых людей забирали натощак в пробирку, содержащую К3 ЭДТА в качестве антикоагулянта. В ходе пробоподготовки образцов к 100 мкл крови добавляли моноклональные антитела к антигенам человека в одном из следующих сочетаний: (1) CXCR3 FITC / CCR5 PE / CD3 PE-DyLight 594 / CCR6 APC / CD45 APC-Cy7; (2) CXCR4 FITC / CCR7 PE / CD3 PE-DyLight 594 / CD45 APC-Cy7; (3) CXCR6 PE / CD3 PE-DyLight 594 / CD45 APC-Cy7 (Exbio, Прага, Чешская Республика; R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота, США). Соответствующие изотипические антитела, конъюгированные с флуорохромами FITC (флуоресцеин изотиоцианат), PE (фикоэритрин) или APC (аллофикоцианин), использовали в качестве контролей. Образцы инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 20 мин. Лизис эритроцитов осуществляли безотмывочным способом путем добавления 1 мл раствора Versalyse (Beckman Coulter, Марсель, Франция). Фенотипирование клеток проводили на проточном цитометре Navios с использованием программного обеспечения Kaluza (Beckman Coulter, Бреа, Калифорния, США). Образцы оценивали методом пошагового гейтирования. Сначала выделяли популяцию лимфоцитов крови, затем определяли Т-лимфоциты ($CD45^+CD3^+$ события). Далее анализировали экспрессию хемокиновых рецепторов на всей популяции Т-лимфоцитов.

Оценка экспрессии хемокиновых рецепторов на Т-лимфоцитах БАЛЖ. Бронхоскопию с аспирацией БАЛЖ выполняли гибким бронхоскопом (Olympus Optical Co Ltd, Япония) с соблюдением условий, описанных нами ранее [25]. БАЛЖ собирали в стерильные пластиковые контейнеры объемом 50 мл, помещали на лед и в течение 1 ч транспортировали в лабораторию для дальнейшего анализа. Слизь удаляли, используя фильтр с диаметром пор 100 мкм. В дальнейшем БАЛЖ дважды отмывали путем центрифугирования (400 g, 4 °C) в течение 10 мин, а осадок клеток ресуспендировали в культуральной среде RPMI 1640 (Gibco, Гранд Айленд, Нью-Йорк, США), содержащей 10 %-ную фетальную телячью сыворотку (ФТС, Capricorn Scientific, Эбсдорфергрунд, Германия). Клетки подсчитывали и оценивали их жизнеспособность. Количество жизнеспособных клеток доводили до $1 \cdot 10^6$/мл в культуральной среде RPMI 1640.

К 400 мкл клеточной суспензии, помещенной в пробирки для проточной цитометрии, добавляли моноклональные антитела к поверхностным антигенам в различных сочетаниях (CD45 APC-Cy7, CD3 PE-DyLight 594, Exbio; CXCR3 FITC, CXCR4 FITC, CXCR6 PE, CCR5 PE, CCR6 APC, CCR7 PE, R&D systems), а также изотипические антитела. Далее пробирки инкубировали в темноте на льду в течение 45 мин. Эритроциты лизировали, используя раствор Versalyse. По истечении 15 мин клетки отмывали, добавляя фосфатный солевой буфер (ФСБ, Cell Wash, BD Biosciences, Польша), содержащий 1 % ФТС, и фиксировали при помощи 500 мкл 1 %-ного раствора параформальдегида в ФСБ. Анализ клеток проводили на проточном цитометре Navios.

Выделение мононуклеарных клеток периферической крови. Периферическую кровь пациентов с ХОБЛ помещали в пробирку, содержащую антикоагулянт гепарин натрия. Используя раствор Lymphopure (Biolegend, Сан Диего, Калифорния, США), мононуклеарные клетки выделяли из периферической крови путем центрифугирования (800 g, 20 мин, комнатная температура)

в градиенте плотности 1,077 г/мл. Собранные клетки отмывали и ресуспендировали в концентрации $1 \cdot 10^6$/мл в культуральной среде RPMI 1640, содержащей 1 % ФТС.

Оценка миграции Т-клеток под влиянием лекарственных средств. Суспензию мононуклеарных клеток периферической крови объемом 1 мл помещали в стерильные пробирки и инкубировали с антибиотиком азитромицином (10 мкг/мл), глюкокортикоидом будесонидом (10 нМ) (оба препарата произведены компанией Glentham Life Sciences Ltd, Коршам, Уилтшир, Великобритания) или их комбинацией при 37 °С в увлажненной 5 % CO_2/95 % воздушной среде. Спустя 1 ч 100 мкл суспензии клеток помещали в верхние камеры (лунки) 24-луночного планшета, имеющие поры диаметром 5 мкм (Costar Corning, Корнинг, Нью-Йорк, США). Нижние камеры планшета наполняли буфером объемом 600 мкл, состоящим из культуральной среды RPMI 1640, 1 % ФТС и хемокинов IP-10 (10 нМ, Gibco, Карлсбад, Калифорния, США) или RANTES (10 нМ, R&D systems). Буфер без хемокинов использовали в качестве контроля. Планшеты инкубировали при 37 °С, 5 % CO_2/95 % атмосферного воздуха в течение 2 ч. Клетки, мигрировавшие в нижнюю камеру, собирали и отмывали при помощи ФСБ. Пробирки центрифугировали (500 g, комнатная температура) в течение 5 мин, после чего клетки ресуспендировали в ФСБ. Добавляли моноклональные антитела, конъюгированные с флуорохромами (CD3-FITC / CD4-PerCP-Cy5.5 / CD8-APC / CD45-APC Alexa Fluor 750 (Beckman Coulter; Exbio; BD Biosciences, Сан-Диего, Калифорния, США). Клетки инкубировали 20 мин в темноте при 4 °С, отмывали при помощи 3 мл ФСБ, содержащего 0,2 %-ный бычий сывороточный альбумин (BD Biosciences) и фиксировали с использованием 300 мкл 1 %-ного раствора параформальдегида. После настройки проточного цитометра Navios на среднюю скорость потока клеток подсчитывали количество Т-хелперов ($CD45^+CD3^+CD4^+$) и цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD45^+CD3^+CD8^+$) в течение 100 с.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы GraphPad Prism, версия 7.00 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США). Для сравнения между собой трех независимых выборок (при оценке экспрессии хемокиновых рецепторов на Т-клетках в периферической крови) использовали непараметрический тест Краскела–Уоллиса. В последующем показатели сравнивали попарно на основе критерия Данна. Различия в показателях двух независимых групп (для оценки экспрессии хемокиновых рецепторов на Т-клетках в БАЛЖ) определяли по значению непараметрического *U*-критерия Манна–Уитни. Результаты миграции Т-клеток анализировали методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим апостериорным попарным сравнением показателей с помощью критерия Тьюки. Различия считали статистически значимыми при $p < 0{,}05$.

Результаты и их обсуждение. В настоящей работе у курящих пациентов с ХОБЛ выявлено повышение процентного содержания Т-лимфоцитов крови, снабженных хемокиновыми рецепторами CXCR3 и CCR5, по сравнению с курящими и некурящими здоровыми людьми (рис. 1, 2). При этом различия в относительном количестве этих субпопуляций Т-лимфоцитов у здоровых курильщиков и здоровых некурящих людей отсутствовали. Такие результаты исследования исключают влияние курения и свидетельствуют о роли ХОБЛ в количественных изменениях субпопуляций Т-лимфоцитов крови, экспрессирующих CXCR3 и CCR5. Ранее нами были получены результаты, согласно которым у некурящих пациентов с ХОБЛ по сравнению с некурящими здоровыми людьми и у курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению со здоровыми курильщиками повышена экспрессия CXCR3 и CCR5 на Т-лимфоцитах крови [26]. Позднее в другом исследовании не обнаружено различий в процентном содержании $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов, несущих на своей поверхности рецепторы CXCR3 и CCR5, у курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению с курящими здоровыми и некурящими здоровыми людьми [13]. Однако авторы этой работы включили в группы сравнения лиц, которые были моложе пациентов с ХОБЛ, а экспрессия рецепторов CXCR3 и CCR5 на Т-лимфоцитах крови, как известно, может изменяться с возрастом [27, 28].

В настоящем исследовании нами оценена экспрессия рецепторов CXCR3 и CCR5 не только на Т-лимфоцитах крови, но и на Т-клетках, присутствующих в БАЛЖ (рис. 3). Относительное количество Т-лимфоцитов БАЛЖ, содержащих CXCR3 и CCR5, у курящих пациентов с ХОБЛ было выше, чем у курящих здоровых людей. Другие авторы выявили более высокую долю $CD8^+$ Т-лимфоцитов мокроты, экспрессирующих CXCR3, у курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению

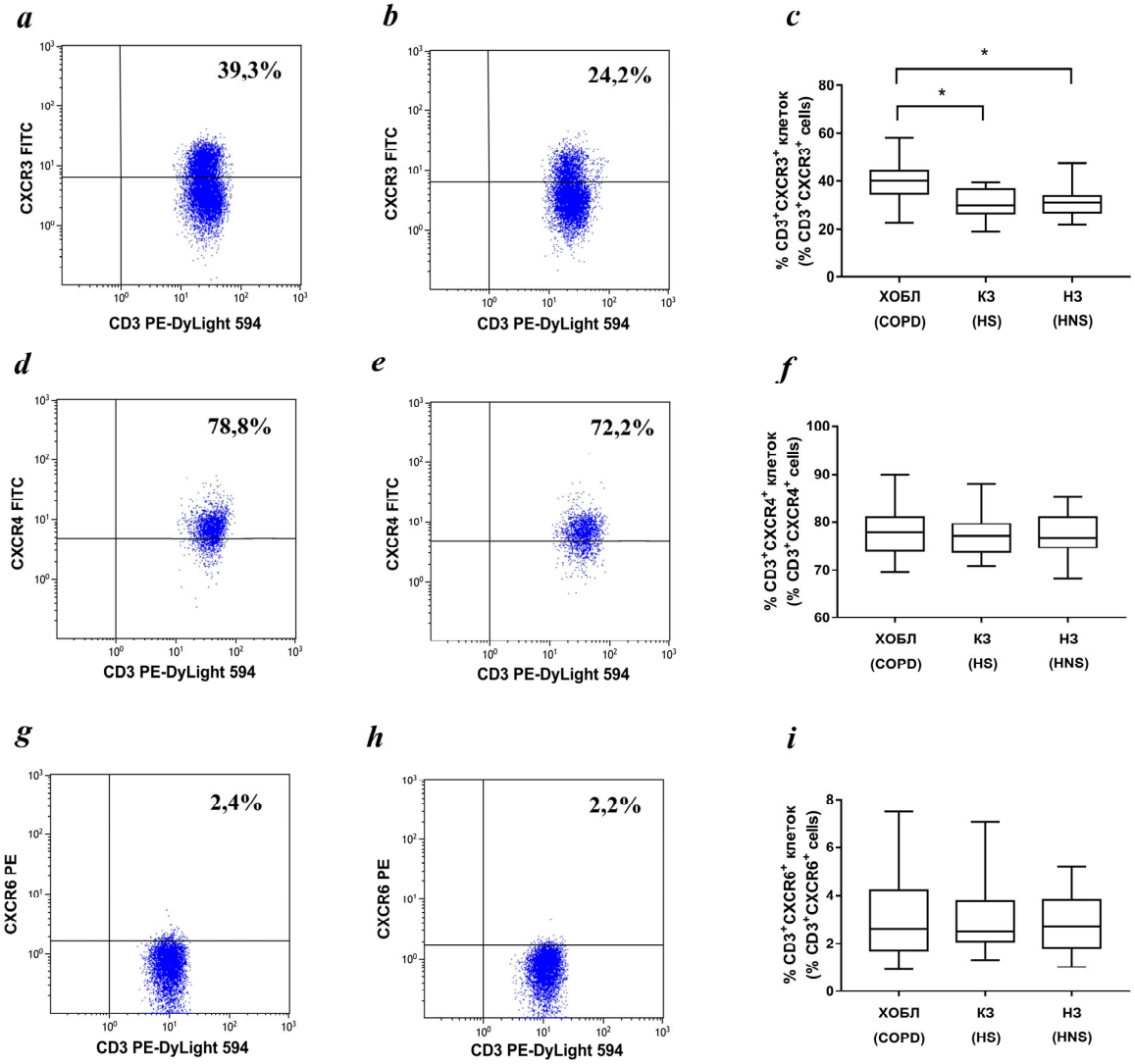


Рис. 1. Экспрессия хемокиновых рецепторов CXCR3, CXCR4 и CXCR6 на поверхности Т-лимфоцитов периферической крови. Определение региона $CXCR3^+$, $CXCR4^+$ и $CXCR6^+$ Т-лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии. Здесь и на рис. 2 показаны результаты фенотипирования, полученные при анализе Т-лимфоцитов периферической крови пациента с ХОБЛ (*a*, *d*, *g*) и здорового некурящего донора (*b*, *e*, *h*); на графиках *c*, *f*, *i* приведено процентное содержание Т-клеток, экспрессирующих хемокиновые рецепторы (относительно всех Т-лимфоцитов), в периферической крови обследованных лиц; диаграммы демонстрируют диапазон значений, медиану, 25-й и 75-й процентили. ХОБЛ – пациенты с хронической обструктивной болезнью легких, КЗ – курящие здоровые люди, НЗ – некурящие здоровые люди; * – $p < 0{,}05$ по сравнению с соответствующей контрольной группой

Fig. 1. Expression of chemokine receptors CXCR3, CXCR4, and CXCR6 on the surface of peripheral blood T lymphocytes. The region of $CXCR3^+$, $CXCR4^+$, and $CXCR6^+$ T cells was determined by flow cytometry. Here and in Fig. 2, the phenotyping analysis of peripheral blood T lymphocyte subsets from a COPD patient (*a*, *d*, *g*) and a healthy non-smoking donor (*b*, *e*, *h*) is presented; graphs *c*, *f*, *i* show the percentage of T cells expressing chemokine receptors (as percentage of all T lymphocytes) in the peripheral blood of the examined subjects; plots demonstrate range, median, 25th and 75th percentiles. COPD – patients with chronic obstructive pulmonary disease; HS – healthy smokers; HNS – healthy non-smokers; * – $p < 0.05$ compared with the corresponding control group

со здоровыми курящими людьми [29]. Еще в одном исследовании было продемонстрировано повышение относительного количества Т-лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы CXCR3 и CCR5, в БАЛЖ пациентов с ХОБЛ по сравнению с некурящими здоровыми людьми, при этом различия между пациентами с ХОБЛ и курящими здоровыми людьми отсутствовали [30]. Следует отметить, что в этой работе к пациентам с ХОБЛ относили лиц с показателем $ОФВ_1$/ФЖЕЛ, превышающим

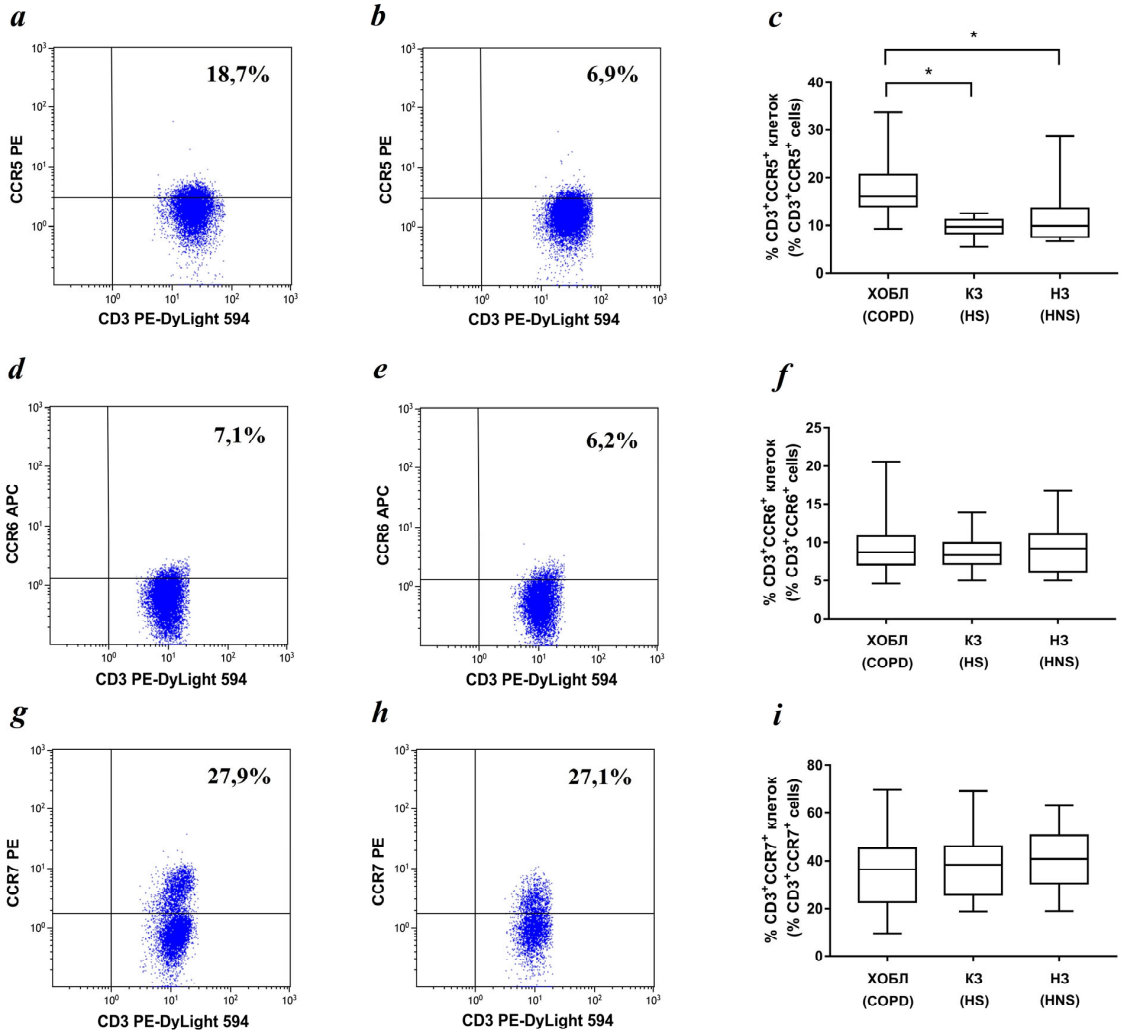


Рис. 2. Экспрессия хемокиновых рецепторов CCR5, CCR6 и CCR7 на поверхности Т-лимфоцитов периферической крови. Определение региона $CCR5^+$, $CCR6^+$ и $CCR7^+$ Т-лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии

Fig. 2. Expression of chemokine receptors CCR5, CCR6, and CCR7 on the surface of peripheral blood T lymphocytes. The region of $CCR5^+$, $CCR6^+$ and $CCR7^+$ T cells was determined by flow cytometry

70 %, хотя, согласно критериям GOLD, диагноз ХОБЛ выставляется лишь при значении $ОФВ_1$/ФЖЕЛ менее 70 % [31].

Миграция Т-лимфоцитов из крови в дыхательные пути осуществляется по градиенту концентрации хемокинов. При этом перемещение Т-клеток зависит не только от уровня экспрессии хемокиновых рецепторов, но и от их функционального состояния, концентрации хемокинов, эффективности взаимодействия рецептора и соответствующего лиганда, наличия факторов (ингибиторов, активаторов), препятствующих или способствующих лиганд-рецепторному связыванию [10, 11].

Для миграции Т-лимфоцитов, снабженных рецепторами CXCR3, требуется связь с хемокинами MIG (CXCL9), IP-10 (CXCL10), I-TAC (CXCL11), в то время как перемещение клеток, обладающих рецепторами CCR5, происходит при посредстве лигандов MIP-1α (CCL3), MIP-1β (CCL4) и RANTES (CCL5) [10]. Сообщается о повышенной экспрессии IP-10 в эпителии нижних дыхательных путей и стенке легочных артерий курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению со здоровыми курящими и некурящими людьми [32]. Экспрессия RANTES также была выше в подслизистой основе бронхов пациентов с ХОБЛ, имеющих 3–4-ю степень тяжести заболевания, чем у здоровых некурящих людей [33]. Немаловажно и то, что экспериментальные исследования подтвердили более активную миграцию мононуклеарных клеток периферической крови пациентов с ХОБЛ

к RANTES и IP-10 по сравнению с миграцией клеток здоровых курильщиков и здоровых некурящих людей [13]. Приведенные данные обосновывают патогенетическое значение лиганд-рецепторных пар CXCR3/IP-10 и CCR5/RANTES в перемещении Т-лимфоцитов из крови в дыхательные пути пациентов с ХОБЛ.

В дополнение к рецепторам CXCR3 и CCR5 в настоящей работе нами также проанализирована экспрессия хемокиновых рецепторов CXCR4, CXCR6, CCR6, CCR7 на поверхности Т-лимфоцитов крови и БАЛЖ. Однако как в крови, так и в БАЛЖ различий в процентном содержании Т-клеток, экспрессирующих эти рецепторы, между отдельными группами обследованных лиц не обнаружено. Тем не менее такие данные не исключают возможную роль этих рецепторов в миграции Т-клеток при ХОБЛ, поскольку в действительности Т-лимфоциты могут нести на своей

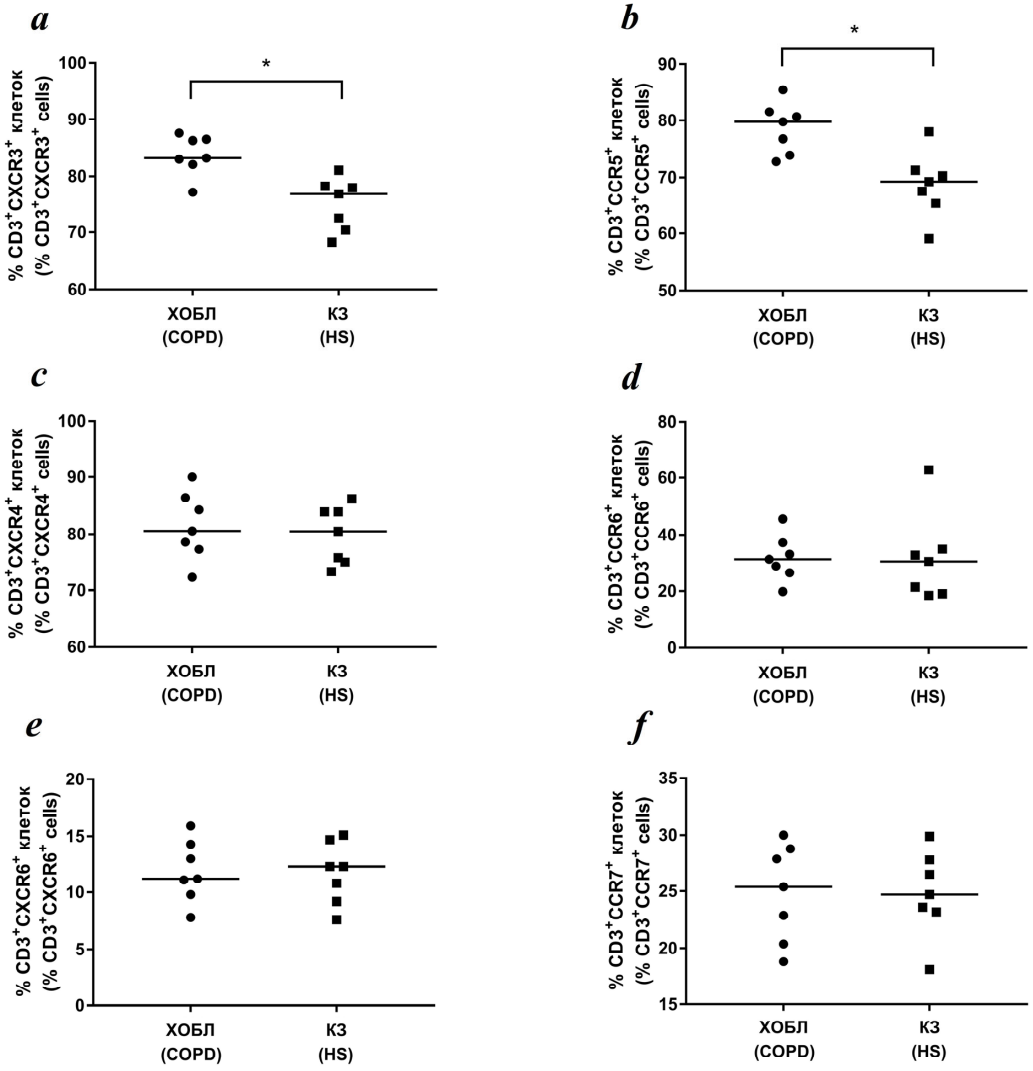


Рис. 3. Экспрессия хемокиновых рецепторов на поверхности Т-лимфоцитов бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ). На графиках приведено процентное содержание Т-клеток (относительно всех Т-лимфоцитов), экспрессирующих хемокиновые рецепторы CXCR3 (*a*), CCR5 (*b*), CXCR4 (*c*), CCR6 (*d*), CXCR6 (*e*) и CCR7 (*f*) в БАЛЖ обследованных лиц. Отдельные точки соответствуют значениям, полученным для каждого обследованного человека; горизонтальная черта демонстрирует медиану; ХОБЛ – пациенты с хронической обструктивной болезнью легких, КЗ – курящие здоровые люди; * – $p < 0{,}05$ по сравнению с контрольной группой

Fig. 3. Expression of chemokine receptors on the surface of T lymphocytes from bronchoalveolar lavage (BAL). The graphs show the percentage of T cells (in relation to all T lymphocytes) expressing chemokine receptors CXCR3 (*a*), CCR5 (*b*), CXCR4 (*c*), CCR6 (*d*), CXCR6 (*e*), and CCR7 (*f*) in the BAL of the examined subjects. Individual points correspond to the values obtained in each subject; the horizontal bar shows the median; COPD – patients with chronic obstructive pulmonary disease; HS – healthy smokers; * – $p < 0.05$ compared with the control group

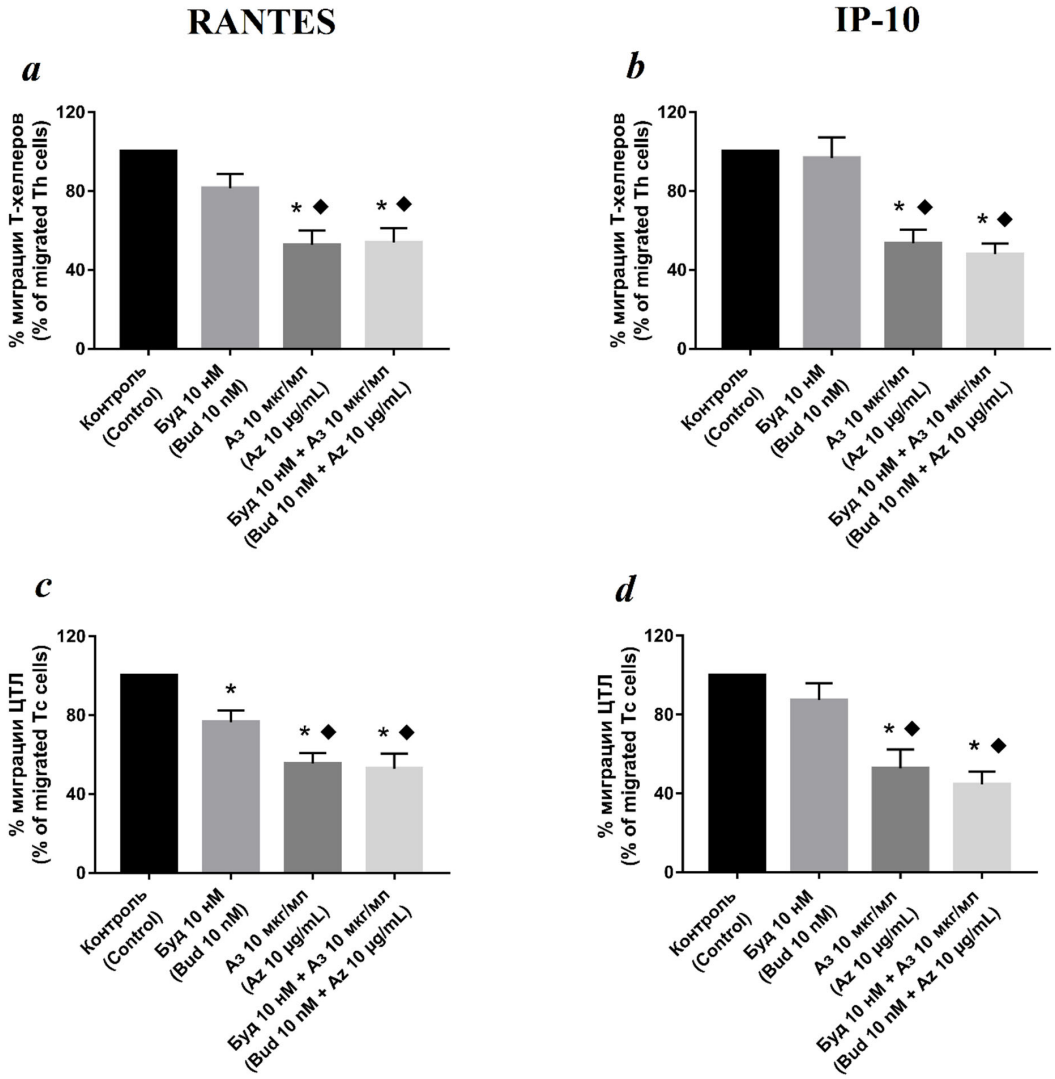


Рис. 4. Влияние азитромицина и будесонида на хемотаксис Т-лимфоцитов периферической крови пациентов с ХОБЛ в направлении RANTES и IP-10. На графиках показано влияние азитромицина (Аз, 10 мкг/мл), будесонида (Буд, 10 нМ) и их сочетания на миграцию Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), индуцированную 10 нМ RANTES (*a*, *c*) и 10 нМ IP-10 (*b*, *d*). Результаты представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего ($n = 8$); * – $p < 0{,}05$ по сравнению с контролем (клетками крови, находившимися в присутствии хемокина, но в отсутствие лекарственных средств); ♦ – $p < 0{,}05$ по сравнению с Буд 10 нМ

Fig. 4. Effect of azithromycin and budesonide on the chemotaxis of peripheral blood T lymphocytes from patients with COPD to RANTES and IP-10. Graphs show the effect of azithromycin (Az, 10 μg/ml), budesonide (Bud, 10 nM) and their combination on the migration of T helper cells (Th cells) and cytotoxic T lymphocytes (Tc cells) induced by 10 nM RANTES (*a*, *c*) and 10 nM IP-10 (*b*, *d*). Results are presented as a mean ± standard error of the mean ($n = 8$); * – $p < 0.05$ compared with control (blood cells in the presence of chemokine, but in the absence of drugs); ♦ – $p < 0.05$ compared with Bud 10 nM

поверхности одновременно несколько типов хемокиновых рецепторов и перемещение клеток происходит при участии каждого из них. Возможно, именно по этой причине селективные ингибиторы хемокиновых рецепторов пока так и не нашли применения при лечении пациентов с ХОБЛ [11, 34].

На следующем этапе работы нами оценено влияние лекарственных средств на перемещение Т-лимфоцитов крови пациентов с ХОБЛ к хемокинам RANTES и IP-10. Глюкокортикоид будесонид подавлял только миграцию цитотоксических Т-лимфоцитов в направлении RANTES, но не влиял на перемещение Т-хелперов к обоим хемокинам и цитотоксических Т-лимфоцитов к IP-10 (рис. 4), что свидетельствует об ограниченной эффективности глюкокортикоидов в отношении

миграции Т-клеток. О низкой чувствительности Т-лимфоцитов пациентов с ХОБЛ к кортикостероидам ранее сообщали и другие авторы [35, 36]. Так, M. Kaur с соавт. показали резистентность Т-клеток дыхательных путей пациентов с ХОБЛ к продукции интерферона γ под влиянием глюкокортикоида дексаметазона [35]. Другая научная группа продемонстрировала повышение продукции провоспалительных цитокинов (фактора некроза опухоли α и интерферона γ) $CD8^+$ Т-клетками периферической крови, БАЛЖ и бронхиальных смывов, выделенными от пациентов с ХОБЛ, независимо от приема ими ингаляционных кортикостероидов [36].

В настоящее время выявлен ряд препаратов, перспективных с точки зрения способности влиять на молекулярные пути развития стероидорезистентности при ХОБЛ. К ним можно отнести трициклический антидепрессант нортриптилин, метилксантин теофиллин, ингибитор фосфодиэстеразы 4 рофлумиласт, антиоксидантные препараты и макролидный антибиотик азитромицин [37]. Последний препарат привлек к себе особое внимание вследствие его способности снижать частоту обострений ХОБЛ при регулярном использовании пациентами в дозе 250 мг ежедневно или 500 мг 3 раза в неделю на протяжении 1 года [38, 39]. В настоящей работе азитромицин продемонстрировал лучший профиль супрессии миграции Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов, чем будесонид, превзойдя его по степени ингибирования. Добавление к клеточной суспензии обоих лекарственных средств приводило к подавлению миграции Т-клеток к RANTES и IP-10, сходному по силе действия с одним азитромицином.

Ранее нами показано, что комбинация азитромицина и будесонида по сравнению с одним азитромицином обладает одинаковой способностью подавлять секрецию мононуклеарными клетками крови интерлейкина 5 (ИЛ-5) и ИЛ-13. Вместе с тем сочетанное действие обоих лекарственных средств превосходило ингибирующую способность каждого из них по отдельности в отношении секреции ИЛ-4, ИЛ-8, тимического стромального лимфопоэтина [22]. С учетом данных, полученных в настоящей работе, такие результаты свидетельствуют в пользу избирательной способности азитромицина модулировать чувствительность клеток к кортикостероидам.

Заключение. Проведенные исследования позволили установить повышение процентного содержания Т-лимфоцитов, экспрессирующих хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR5, в периферической крови курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению со здоровыми курильщиками и здоровыми некурящими людьми. Относительное количество Т-клеток крови, содержащих хемокиновые рецепторы CXCR4, CXCR6, CCR6 и CCR7, не различалось между курящими пациентами с ХОБЛ, здоровыми курящими и некурящими людьми. Аналогичные результаты по отношению ко всем перечисленным хемокиновым рецепторам были получены и в БАЛЖ, при этом в качестве группы сравнения выступали лишь здоровые курильщики.

Будесонид подавлял миграцию цитотоксических Т-лимфоцитов крови к RANTES, но не влиял на перемещение этих клеток к IP-10 и Т-хелперов крови к RANTES и IP-10. Азитромицин самостоятельно и в сочетании с будесонидом ингибировал миграцию Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов крови в направлении RANTES и IP-10. При этом способность азитромицина супрессировать миграцию клеток в комбинации с будесонидом и без него превосходила эффективность одного будесонида.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке Государственной программы научных исследований «Фундаментальные и прикладные науки – медицине» (задание № 2.56).

Acknowledgements. The study was financially supported by the State Scientific Program “Fundamental and Applied Sciences for Medicine” (assignment no. 2.56).

Список использованных источников

1. Global, regional, and national prevalence of, and risk factors for, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in 2019: a systematic review and modelling analysis / D. Adeloye [et al.] // Lancet. Respir. Med. – 2022. – Vol. 10, N 5. – P. 447–458. https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00511-7

2. Underdiagnosis and overdiagnosis of chronic obstructive pulmonary disease / N. Diab [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2018. – Vol. 198, N 9. – P. 1130–1139. https://doi.org/10.1164/rccm.201804-0621CI

3. Brusselle, G. G. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease / G. G. Brusselle, G. F. Joos, K. R. Bracke // Lancet. – 2011. – Vol. 378, N 9795. – P. 1015–1026. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60988-4

4. Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8+ lymphocytes in patients with COPD / G. Chrysofakis [et al.] // Chest. – 2004. – Vol. 125, N 1. – P. 71–76. https://doi.org/10.1378/chest.125.1.71

5. Increased expression of nuclear factor-kappaB in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD / A. Di Stefano [et al.] // Eur. Respir. J. – 2002. – Vol. 20, N 3. – P. 556–563. https://doi.org/10.1183/09031936.02.00272002

6. Cosio, M. G. Autoimmunity, T-cells and STAT-4 in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease / M. G. Cosio // Eur. Respir. J. – 2004. – Vol. 24. – P. 3–5. https://doi.org/10.1183/09031936.04.00043104

7. STAT4 activation in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease / A. Di Stefano [et al.] // Eur. Respir. J. – 2004. – Vol. 24. – P. 78–85. https://doi.org/10.1183/09031936.04.00080303

8. Williams, M. The role of CD8+T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review / M. Williams, I. Todd, L. C. Fairclough // Inflamm. Res. – 2021. – Vol. 70, N 1. – P. 11–18. https://doi.org/10.1007/s00011-020-01408-z

9. A novel technique to explore the functions of bronchial mucosal T cells in chronic obstructive pulmonary disease: application to cytotoxicity and cytokine immunoreactivity / M. W. Lethbridge [et al.] // Clin. Exp. Immunol. – 2010. – Vol. 161, N 3. – P. 560–569. https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04198.x

10. Chemokines in COPD: From implication to therapeutic use / P. Henrot [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2019. – Vol. 20, N 11. – Art. 2785. https://doi.org/10.3390/ijms20112785

11. Tomankova, T. Chemokine receptors and their therapeutic opportunities in diseased lung: far beyond leukocyte trafficking / T. Tomankova, E. Kriegova, M. Liu // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. – 2015. – Vol. 308, N 7. – P. L603–L618. https://doi.org/10.1152/ajplung.00203.2014

12. Modification of surface antigens in blood CD8+ T-lymphocytes in COPD: effects of smoking / A. Koch [et al.] // Eur. Respir J. – 2007. – Vol. 29, N 1. – P. 42–50. https://doi.org/10.1183/09031936.00133205

13. Enhanced monocyte migration to CXCR3 and CCR5 chemokines in COPD / C. Costa [et al.] // Eur. Respir J. – 2016. – Vol. 47, N 4. – P. 1093–1102. https://doi.org/10.1183/13993003.01642-2015

14. Sputum T lymphocytes in asthma, COPD and healthy subjects have the phenotype of activated intraepithelial T cells (CD69+ CD103+) / M. J. Leckie [et al.] // Thorax. – 2003. – Vol. 58, N 1. – P. 23–29. https://doi.org/10.1136/thorax.58.1.23

15. Hughes, C. E. A guide to chemokines and their receptors / C. E. Hughes, R. J. B. Nibbs // FEBS J. – 2018. – Vol. 285, N 16. – P. 2944–2971. https://doi.org/10.1111/febs.14466

16. Pathological mechanism and targeted drugs of COPD / P. Guo [et al.] // Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis. – 2022. – Vol. 17. – P. 1565–1575. https://doi.org/10.2147/COPD.S366126

17. Inhaled corticosteroids in COPD: friend or foe? / A. Agusti [et al.] // Eur. Respir. J. – 2018. – Vol. 52, N 6. – Art. 1801219. https://doi.org/10.1183/13993003.01219-2018

18. Gupta, P. Potential adverse effects of bronchodilators in the treatment of airways obstruction in older people: recommendations for prescribing / P. Gupta, M. S. O'Mahony // Drugs Aging. – 2008. – Vol. 25, N 5. – P. 415–443. https://doi.org/10.2165/00002512-200825050-00005

19. Regional lung deflation with increased airway volume underlies the functional response to bronchodilators in chronic obstructive pulmonary disease / N. Tanabe [et al.] // Physiol. Rep. – 2019. – Vol. **7**, N 24. – Art. e14330. https://doi.org/10.14814/phy2.14330

20. Leung, J. M. Inhaled corticosteroids in COPD: the final verdict is…. / J. M. Leung, D. D. Sin // Eur. Respir. J. – 2018. – Vol. 52, N 6. – Art. 1801940. https://doi.org/10.1183/13993003.01940-2018

21. The effect of glucocorticoids in combination with azithromycin or theophylline on cytokine production by NK and NKT-like blood cells of patients with chronic obstructive pulmonary disease / A. G. Kadushkin [et al.] // Biochem. Moscow Suppl. Ser. B. – 2021. – Vol. 15, N 4. – P. 337–344. https://doi.org/10.1134/S1990750821040053

22. Azithromycin modulates release of steroid-insensitive cytokines from peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic obstructive pulmonary disease / A. Kadushkin [et al.] // Adv. Respir. Med. – 2022. – Vol. 90, N 1. – P. 17–27. https://doi.org/10.5603/ARM.a2022.0002

23. Immunomodulation by macrolides: therapeutic potential for critical care / T. D. Y. Reijnders [et al.] // Lancet Respir. Med. – 2020. – Vol. 8, N 6. – P. 619–630. https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30080-1

24. A novel macrolide/fluoroketolide, solithromycin (CEM-101), reverses corticosteroid insensitivity via phosphoinositide 3-kinase pathway inhibition / Y. Kobayashi [et al.] // Br. J. Pharmacol. – 2013. – Vol. 169, N 5. – P. 1024–1034. https://doi.org/10.1111/bph.12187

25. Популяционная перестройка В-лимфоцитов, экспрессирующих хемокиновые рецепторы, у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких / А. Г. Кадушкин [и др.] // Биомед. химия. – 2022. – Т. 68, № 2. – С. 134–143.

26. Популяционная перестройка Т-лимфоцитов, содержащих хемокиновые рецепторы, у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких / А. Г. Кадушкин [и др.] // Пульмонология. – 2013. – № 2. – С. 41–45.

27. The effect of aging and caloric restriction on murine CD8+ T cell chemokine receptor gene expression / R. Yung [et al.] // Immun. Ageing. – 2007. – Vol. 4. – Art. 8. https://doi.org/10.1186/1742-4933-4-8

28. T cell chemokine receptor expression in aging / R. Mo [et al.] // J. Immunol. – 2003. – Vol. 170, N 2. – P. 895–904. https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.2.895

29. Enhanced effector function of cytotoxic cells in the induced sputum of COPD patients / R. A. Urbanowicz [et al.] // Respir. Res. – 2010. – Vol. 11, N 1. – Art. 76. https://doi.org/10.1186/1465-9921-11-76

30. CD8 chemokine receptors in chronic obstructive pulmonary disease / L. J. Smyth [et al.] // Clin. Exp. Immunol. – Vol. 154, N 1. – P. 56–63. https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03729.x

31. Yawn, B. P. GOLD in practice: Chronic obstructive pulmonary disease treatment and management in the primary care setting / B. P. Yawn, M. L. Mintz, D. E. Doherty // Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis. – 2021. – Vol. 16. – P. 289–299. https://doi.org/10.2147/COPD.S222664

32. Increased expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand CXCL10 in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease / M. Saetta [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2002. – Vol. 165, N 10. – P. 1404–1409. https://doi.org/10.1164/rccm.2107139

33. Association of increased CCL5 and CXCL7 chemokine expression with neutrophil activation in severe stable COPD / A. Di Stefano [et al.] // Thorax. – 2009. – Vol. 64, N 11. – P. 968–975. https://doi.org/10.1136/thx.2009.113647

34. Lakshmi, S. P. Emerging pharmaceutical therapies for COPD / S. P. Lakshmi, A. T. Reddy, R. C. Reddy // Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis. – 2017. – Vol. 12. – P. 2141–2156. https://doi.org/10.2147/COPD.S121416

35. T lymphocyte insensitivity to corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease / M. Kaur [et al.] // Respir. Res. – 2012. – Vol. 13, N 1. – Art. 20. https://doi.org/10.1186/1465-9921-13-20

36. Hodge, G. Steroid resistant $CD8^{+}CD28^{null}$ NKT-like pro-inflammatory cytotoxic cells in chronic obstructive pulmonary disease / G. Hodge, S. Hodge // Front. Immunol. – 2016. – Vol. 7. – Art. 617. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00617

37. Кадушкин, А. Г. Молекулярные механизмы формирования стероидорезистентности у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких / А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович // Пульмонология. – 2016. – Т. 26, № 6. – С. 736–747.

38. Azithromycin maintenance treatment in patients with frequent exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COLUMBUS): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial / S. Uzun [et al.] // Lancet Respir. Med. – 2014. – Vol. 2, N 5. – P. 361–368. https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70019-0

39. Azithromycin for prevention of exacerbations of COPD / R. K. Albert [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2011. – Vol. 365, N 8. – P. 689–698. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1104623

References

1. Adeloye D., Song P., Zhu Y., Campbell H., Sheikh A., Rudan I. Global Respiratory Health Unit. Global, regional, and national prevalence of, and risk factors for, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in 2019: a systematic review and modelling analysis. *Lancet. Respiratory Medicine*, 2022, vol. 10, no. 5, pp. 447–458. https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00511-7

2. Diab N., Gershon A. S., Sin D. D., Tan W. C., Bourbeau J., Boulet L. P., Aaron S. D. Underdiagnosis and overdiagnosis of chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2018, vol. 198, no. 9, pp. 1130–1139. https://doi.org/10.1164/rccm.201804-0621CI

3. Brusselle G. G., Joos G. F., Bracke K. R. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*, 2011, vol. 378, no. 9795, pp. 1015–1026. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60988-4

4. Chrysofakis G., Tzanakis N., Kyriakoy D., Tsoumakidou M., Tsiligianni I., Klimathianaki M., Siafakas N. M. Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8+ lymphocytes in patients with COPD. *Chest*, 2004, vol. 125, no. 1, pp. 71–76. https://doi.org/10.1378/chest.125.1.71

5. Di Stefano A., Caramori G., Oates T., Capelli A., Lusuardi M., Gnemmi I. [et al.]. Increased expression of nuclear factor-kappaB in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *European Respiratory Journal*, 2002, vol. 20, no. 3, pp. 556–563. https://doi.org/10.1183/09031936.02.00272002

6. Cosio M. G. Autoimmunity, T-cells and STAT-4 in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal*, 2004, vol. 24, pp. 3–5. https://doi.org/10.1183/09031936.04.00043104

7. Di Stefano A., Caramori G., Capelli A., Gnemmi I., Ricciardolo F. L., Oates T., Donner C. F., Chung K. F., Barnes P. J., Adcock I. M. STAT4 activation in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal*, 2004, vol. 24, pp. 78–85. https://doi.org/10.1183/09031936.04.00080303

8. Williams M., Todd I., Fairclough L. C. The role of CD8+T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review. *Inflammation Research*, 2021, vol. 70, no. 1, pp. 11–18. https://doi.org/10.1007/s00011-020-01408-z

9. Lethbridge M. W., Kemeny D. M., Ratoff J. C., O'Connor B. J., Hawrylowicz C. M., Corrigan C. J. A novel technique to explore the functions of bronchial mucosal T cells in chronic obstructive pulmonary disease: application to cytotoxicity and cytokine immunoreactivity. *Clinical and Experimental Immunology*, 2010, vol. 161, no. 3, pp. 560–569. https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04198.x

10. Henrot P., Prevel R., Berger P., Dupin I. Chemokines in COPD: From implication to therapeutic use. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, vol. 20, no. 11, art. 2785. https://doi.org/10.3390/ijms20112785

11. Tomankova T., Kriegova E., Liu M. Chemokine receptors and their therapeutic opportunities in diseased lung: far beyond leukocyte trafficking. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2015, vol. 308, no. 7, pp. L603–L618. https://doi.org/10.1152/ajplung.00203.2014

12. Koch A., Gaczkowski M., Sturton G., Staib P., Schinköthe T., Klein E., Rubbert A., Bacon K., Wassermann K., Erdmann E. Modification of surface antigens in blood CD8+ T-lymphocytes in COPD: effects of smoking. *European Respiratory Journal*, 2007, vol. 29, no. 1, pp. 42–50. https://doi.org/10.1183/09031936.00133205

13. Costa C., Traves S. L., Tudhope S. J., Fenwick P. S., Belchamber K. B., Russell R. E., Barnes P. J., Donnelly L. E. Enhanced monocyte migration to CXCR3 and CCR5 chemokines in COPD. *European Respiratory Journal*, 2016, vol. 47, no. 4, pp. 1093–1102. https://doi.org/10.1183/13993003.01642-2015

14. Leckie M. J., Jenkins G. R., Khan J., Smith S. J., Walker C., Barnes P. J., Hansel T. T. Sputum T lymphocytes in asthma, COPD and healthy subjects have the phenotype of activated intraepithelial T cells (CD69+ CD103+). *Thorax*, 2003, vol. 58, no. 1, pp. 23–29. https://doi.org/10.1136/thorax.58.1.23

15. Hughes C. E., Nibbs R. J. B. A guide to chemokines and their receptors. *FEBS Journal*, 2018, vol. 285, no. 16, pp. 2944–2971. https://doi.org/10.1111/febs.14466

16. Guo P., Li R., Piao T. H., Wang C. L., Wu X. L., Cai H. Y. Pathological mechanism and targeted drugs of COPD. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 2022, vol. 17, pp. 1565–1575. https://doi.org/10.2147/COPD.S366126

17. Agusti A., Fabbri L. M., Singh D., Vestbo J., Celli B., Franssen F. M. E., Rabe K. F., Papi A. Inhaled corticosteroids in COPD: friend or foe? *European Respiratory Journal*, 2018, vol. 52, no. 6, art. 1801219. https://doi.org/10.1183/13993003.01219-2018

18. Gupta P., O'Mahony M. S. Potential adverse effects of bronchodilators in the treatment of airways obstruction in older people: recommendations for prescribing. *Drugs and Aging*, 2008, vol. 25, no. 5, pp. 415–443. https://doi.org/10.2165/00002512-200825050-00005

19. Tanabe N., Sato S., Muro S., Shima H., Oguma T., Tanimura K., Sato A., Hirai T. Regional lung deflation with increased airway volume underlies the functional response to bronchodilators in chronic obstructive pulmonary disease. *Physiological Reports*, 2019, vol. **7**, no. 24, art. e14330. https://doi.org/10.14814/phy2.14330

20. Leung J. M., Sin D. D. Inhaled corticosteroids in COPD: the final verdict is…. *European Respiratory Journal*, 2018, vol. 52, no. 6, art. 1801940. https://doi.org/10.1183/13993003.01940-2018

21. Kadushkin A. G., Tahanovich A. D., Movchan L. V., Kolesnikova T. S., Khadasouskaya A. V., Shman T. V. The effect of glucocorticoids in combination with azithromycin or theophylline on cytokine production by NK and NKT-like blood cells of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 2021, vol. 15, pp. 337–344. https://doi.org/10.1134/S1990750821040053

22. Kadushkin A., Tahanovich A., Movchan L., Talabayeva E., Plastinina A., Shman T. Azithromycin modulates release of steroid-insensitive cytokines from peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Advances in Respiratory Medicine*, 2022, vol. 90, no. 1, pp. 17–27. https://doi.org/10.5603/ARM.a2022.0002

23. Reijnders T. D. Y., Saris A., Schultz M. J., van der Poll T. Immunomodulation by macrolides: therapeutic potential for critical care. *Lancet. Respiratory Medicine*, 2020, vol. 8, no. 6, pp. 619–630. https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30080-1

24. Kobayashi Y., Wada H., Rossios C., Takagi D., Charron C., Barnes P. J., Ito K. A novel macrolide/fluoroketolide, solithromycin (CEM-101), reverses corticosteroid insensitivity via phosphoinositide 3-kinase pathway inhibition. *British Journal of Pharmacology*, 2013, vol. 169, no. 5, pp. 1024–1034. https://doi.org/10.1111/bph.12187

25. Kadushkin A. G., Tahanovich A. D., Movchan L. V., Zafranskaya M. M., Dziadzichkina V. V., Shman T. V. Population rearrangement of B-lymphocytes expressing chemokine receptors in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 2022, vol. 16, pp. 216–224 (in Russian). https://doi.org/10.1134/S1990750822030064

26. Kadushkin A. G., Shman T. V., Belevtsev M. V., Ibragimova Z. A., Taganovich A. D. Changes in T-lymphocyte population containing chemokine receptors in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Pulmonologiya = Pulmonologiya*, 2013, vol. 2, pp. 41–45 (in Russian).

27. Yung R., Mo R., Grolleau-Julius A., Hoeltzel M. The effect of aging and caloric restriction on murine CD8+ T cell chemokine receptor gene expression. *Immunity and Ageing*, 2007, vol. 4, art. 8. https://doi.org/10.1186/1742-4933-4-8

28. Mo R., Chen J., Han Y., Bueno-Cannizares C., Misek D. E., Lescure P. A., Hanash S., Yung R. L. T cell chemokine receptor expression in aging. *Journal of Immunology*, 2003, vol. 170, no. 2, pp. 895–904. https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.2.895

29. Urbanowicz R. A., Lamb J. R., Todd I., Corne J. M., Fairclough L. C. Enhanced effector function of cytotoxic cells in the induced sputum of COPD patients. *Respiratory Research*, 2010, vol. 11, no. 1, art. 76. https://doi.org/10.1186/1465-9921-11-76

30. Smyth L. J., Starkey C., Gordon F. S., Vestbo J., Singh D. CD8 chemokine receptors in chronic obstructive pulmonary disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 2008, vol. 154, no. 1, pp. 56–63. https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03729.x

31. Yawn B. P., Mintz M. L., Doherty D. E. GOLD in practice: Chronic obstructive pulmonary disease treatment and management in the primary care setting. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 2021, vol. 16, pp. 289–299. https://doi.org/10.2147/COPD.S222664

32. Saetta M., Mariani M., Panina-Bordignon P., Turato G., Buonsanti C., Baraldo S. [et al.]. Increased expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand CXCL10 in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2002, vol. 165, no. 10, pp. 1404–1409. https://doi.org/10.1164/rccm.2107139

33. Di Stefano A., Caramori G., Gnemmi I., Contoli M., Bristot L., Capelli A. [et al.]. Association of increased CCL5 and CXCL7 chemokine expression with neutrophil activation in severe stable COPD. *Thorax*, 2009, vol. 64, no. 11, pp. 968–975. https://doi.org/10.1136/thx.2009.113647

34. Lakshmi S. P., Reddy A. T., Reddy R. C. Emerging pharmaceutical therapies for COPD. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 2017, vol. 12, pp. 2141–2156. https://doi.org/10.2147/COPD.S121416

35. Kaur M., Smyth L. J., Cadden P., Grundy S., Ray D., Plumb J., Singh D. T lymphocyte insensitivity to corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Research*, 2012, vol. 13, no. 1, art. 20. https://doi.org/10.1186/1465-9921-13-20

36. Hodge G., Hodge S. Steroid Resistant $CD8^{+}CD28^{null}$ NKT-like pro-inflammatory cytotoxic cells in chronic obstructive pulmonary disease. *Frontiers in Immunology*, 2016, vol. 7, art. 617. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00617

37. Kadushkin A. G., Taganovich A. D. Molecular mechanisms of corticosteroid resistance in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Pulmonologiya = Pulmonologiya*, 2016, vol. 26, no. 6, pp. 736–747 (in Russian).

38. Uzun S., Djamin R. S., Kluytmans J. A., Mulder P. G., van't Veer N. E., Ermens A. A., Pelle A. J., Hoogsteden H. C., Aerts J. G., van der Eerden M. M. Azithromycin maintenance treatment in patients with frequent exacerbations of chronic

obstructive pulmonary disease (COLUMBUS): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet. Respiratory Medicine*, 2014, vol. 2, no. 5, pp. 361–368. https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70019-0

39. Albert R. K., Connett J., Bailey W. C., Casaburi R., Cooper J. A. Jr, Criner G. J. [et al.]. COPD Clinical Research Network. Azithromycin for prevention of exacerbations of COPD. *New England Journal of Medicine*, 2011, vol. 365, no. 8, pp. 689–698. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1104623

Информация об авторах

Кадушкин Алексей Геннадьевич – канд. мед. наук, доцент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220083, г. Минск, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0002-1620-8477. E-mail: kadushkyn@gmail.com

Таганович Анатолий Дмитриевич – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220083, г. Минск, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0002-0668-2888. E-mail: taganovich@bsmu.by

Мовчан Людмила Викторовна – канд. биол. наук, врач лабораторной диагностики. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0002-0441-0109. E-mail: movchan-l@mail.ru

Зафранская Марина Михайловна – д-р мед. наук, доцент, заведующий кафедрой. Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова Белорусского государственного университета (ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0002-8739-8300. E-mail: zafranskaya@gmail.com

Шман Татьяна Викторовна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0001-8669-8005. E-mail: shman@oncology.by

Information about the authors

Aliaksei G. Kadushkin – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220083, Minsk, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0002-1620-8477. E-mail: kadushkyn@gmail.com

Anatoli D. Tahanovich – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220083, Minsk, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0002-0668-2888. E-mail: taganovich@bsmu.by

Lyudmila V. Movchan – Ph. D. (Biol.), Doctor of Laboratory Diagnostics. Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., 223053, Borovliany, Minsk region, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0002-0441-0109. E-mail: movchan-l@mail.ru

Marina M. Zafranskaya – D. Sc. (Med.), Associate Professor, Head of the Department. International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University (23/1, Dolgobrodskaya Str., 220070, Minsk, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0002-8739-8300. E-mail: zafranskaya@gmail.com

Tatsiana V. Shman – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., 223053, Borovliany, Minsk region, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0001-8669-8005. E-mail: shman@oncology.by

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 616-006.61
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-3-205-215

Поступила в редакцию 02.04.2022
Received 02.04.2022

А. Н. Батян[1], В. Н. Волонцевич[2], Е. В. Гончарова[1], П. Д. Демешко[3], В. О. Лемешевский[1]

[1]Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь
[2]Брестский областной онкологический диспансер, Брест, Республика Беларусь
[3]Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова, аг. Лесной, Минский район, Республика Беларусь

ВЛИЯНИЕ ПЕРЕРЫВОВ В ПРОЦЕССЕ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ НА ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВЫ И ШЕИ I–III СТАДИИ В ОТСУТСТВИЕ ХИРУРГИЧЕСКОГО И ХИМИОЛУЧЕВОГО ЛЕЧЕНИЯ

Аннотация. Несмотря на то что опухоли головы и шеи очень чувствительны к лучевому лечению, у пациентов, завершивших курс лучевой терапии, отмечается высокая частота рецидивов и смертности от основного заболевания.

Целью исследования являлся анализ бессобытийной выживаемости пациентов (Event-free survival – EFS), окончивших курс лучевой терапии рака головы и шеи I–III стадии по радикальной программе, под влиянием ряда независимых факторов, таких как возраст, пол, суммарная очаговая доза, стадия заболевания, длительность перерыва в расщепленном курсе лучевой терапии.

Влияние длительности перерывов на выживаемость оценивалось путем анализа схем лечения пациентов, получавших лучевую терапию по поводу рака головы и шеи I–III стадии по радикальной программе с 2016 по 2018 г. в Брестском областном онкологическом диспансере. Статистическая обработка полученных данных включала в себя анализ методом регрессии Кокса. Для оценки исхода был проведен анализ данных методом Каплана–Майера.

При многофакторном анализе установлено, что наибольшую связь с бессобытийной выживаемостью имеет стадия заболевания ($p < 0{,}01$). Та же тенденция наблюдается и для продолжительности перерыва в лучевом лечении ($p < 0{,}05$). В группе пациентов с продолжительностью перерыва в лучевом лечении менее 3 недель накопленное выживание значительно выше, чем у пациентов, завершивших лечение с перерывом более 3 недель (80,00 % против 49,06 %). При длительности перерыва менее 3 недель клиническая стадия (T1–T3) не является фактором, влияющим на выживаемость пациентов.

Учет влияния перерывов в курсе лучевой терапии и понимание влияния контролируемых факторов имеет важное значение для выбора оптимальной стратегии лечения.

Ключевые слова: лучевая терапия, расщепленный курс лучевой терапии, опухоли головы и шеи, перерывы в лечении

Для цитирования: Влияние перерывов в процессе лучевой терапии на отдаленные результаты лечения опухолей головы и шеи I–III стадии в отсутствие хирургического и химиолучевого лечения / А. Н. Батян [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2023. – Т. 20, № 3. – С. 205–215. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-3-205-215

Anatoly N. Batyan[1], Vitali N. Valantsevich[2], Katsiaryna V. Hancharova[1], Pavel D. Dziameshka[3], Viktar O. Lemiasheuski[1]

[1]International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus
[2]Brest Regional Oncological Dispensary, Brest, Republic of Belarus
[3]N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus, Lesnoy, Minsk, Republic of Belarus

INFLUENCE OF INTERRUPTIONS IN RADIATION THERAPY ON LONG-TERM RESULTS OF TREATMENT OF STAGE I–III HEAD AND NECK CANCERS IN THE ABSENCE OF SURGICAL AND CHEMORADIOTHERAPY

Abstract. Despite the fact that head and neck tumors are very sensitive to radiation treatment, patients who have completed a course of radiation therapy have a high rate of recurrence and mortality from the underlying disease.

The aim of the study was to analyze the event-free survival of patients who completed a course of radiation therapy for stage I–III head and neck cancer according to a radical program under the influence of a number of independent factors such as age, gender, total focal dose, disease stage, duration of a break in a split course of radiation therapy.

The effect of the duration of interruption on survival was assessed by analyzing the treatment regimens for patients who received radiation treatment for stage I–III head and neck cancer according to a radical program from 2016 to 2018 at the Brest Regional Oncological Dispensary. Statistical processing of the obtained data included the analysis by the Cox regression method. Data were analyzed using the Kaplan–Meier method to evaluate the outcome.

In the multivariate analysis, it was found that the disease stage has the greatest relationship with event-free survival ($p < 0.01$). The same trend is observed for the duration of interruption in radiotherapy ($p < 0.05$). The cumulative survival was significantly higher in the group of patients with treatment interruption of less than 3 weeks compared to the group of patients who completed treatment more than 3 weeks apart (80.00 % vs 49.06 %). If the duration of the break is less than 3 weeks, the clinical stage (T1–T3) is not a factor influencing patient survival.

Accounting for the effect of interruptions in the course of radiotherapy and the understanding the influence of controllable factors is essential for optimal treatment strategies.

Keywords: radiotherapy, split course of radiotherapy, head and neck cancer, treatment interruptions

For citation: Batyan A. N., Valantsevich V. N., Hancharova K. V., Dziameshka P. D., Lemiasheuski V. O. Influence of interruptions in radiation therapy on long-term results of treatment of stage I–III head and neck cancers in the absence of surgical and chemoradiotherapy. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2022, vol. 20, no. 3, pp. 205–215 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-3-205-215

Введение. Лучевая терапия (ЛТ) играет важную роль в лечении опухолей головы и шеи. Рак гортани очень чувствителен к ЛТ, однако, несмотря на это, у пациентов отмечается высокая частота рецидивов и смертности от основного заболевания. В связи с этим уже с 1980-х годов и по настоящее время на мировом уровне ведется изучение факторов, влияющих на показатели выживаемости пациентов. Во многих исследованиях была показана роль общего времени курса ЛТ в местном регионарном контроле рака головы и шеи [1–4], но в то же время были получены и противоречивые результаты [5–7]. Причины перерывов в курсах ЛТ могут быть разнообразными и зависеть как от пациента и соблюдения им всех необходимых рекомендаций, так и от ситуаций, повлиять на которые ни пациент, ни лечащий врач не могут [8, 9]. Из всех факторов, которые могут оказывать влияние на исход лечения, можно выделить те, которыми можно управлять, чтобы контролировать заболевание. К ним относятся суммарная очаговая доза, время ожидания начала лучевого лечения и продолжительность курса ЛТ [8].

Для того чтобы определить стратегию действий в плане компенсации перерывов и необходимость в них, было проведено ретроспективное исследование. Нами сделано предположение, что перерывы в лучевом лечении более 3 недель будут коррелировать с худшей выживаемостью пациентов с заболеванием рака головы и шеи (злокачественные новообразования гортани, полости рта и глотки) I–III стадии в отсутствие хирургического и химиолучевого лечения.

Цель исследования – оценка прогностического эффекта при увеличении продолжительности перерыва в лечении и сравнение полученных результатов с данными аналогичных мировых исследований.

Материалы и методы исследования. Ретроспективный анализ схем лечения пациентов, прошедших курс ЛТ по радикальной программе (в отсутствие хирургического и химиолучевого лечения) по поводу гистологически верифицированного плоскоклеточного рака головы и шеи (злокачественные новообразования гортани, полости рта и глотки) I–III стадии, проведен с 2016 по 2018 г. в Брестском областном онкологическом диспансере. Пациенты с III стадией заболевания, включенные в данное исследование, не получали химиолучевое лечение в связи с наличием противопоказаний. Схемы лечения были восстановлены из базы данных планирующей системы Eclipse и сверены с реально реализованными на аппаратах ЛТ. Таким образом, нами были получены данные о фактических датах начала и окончания лечения на радиотерапевтических аппаратах, о длительности перерывов между этапами расщепленного курса ЛТ и о суммарно подведенной к опухоли дозе излучения. Интерес представляли также возраст пациентов, пол и стадия заболевания.

Проведение исследования одобрено комитетом по этике УЗ «Брестский областной онкологический диспансер», протокол № 29 от 04.06.2021.

Условиям отбора удовлетворяли всего 68 пациентов: они проходили только ЛТ при классическом фракционировании (2 Гр на очаг опухолевого поражения за сеанс, 5 сеансов облучения в неделю). Основные характеристики пациентов представлены в табл. 1. Мужчины составили 89,7 % пациентов, вошедших в выборку. Возраст пациентов был в пределах от 41 года до 88 лет. Среднее и медианное значения возраста на момент начала ЛТ совпадали и составили 63 и 62,5 года соответственно. ЛТ с перерывом в лучевом лечении менее 3 недель получили 15 пациентов,

у 53 пациентов перерыв в лечении составил более 3 недель. Медианное значение длительности перерыва составило 28 дней (разброс значений от 0 до 94 дней), а длительности наблюдения – 42 мес. (диапазон значений от 3 до 66 мес.).

ЛТ проводилась с использованием современных высокоэнергетических линейных ускорителей Synergy производства Elekta Ltd и Clinac iX фирмы Varian, а также радиотерапевтического кобальтового облучателя Terabalt (тип 80, модель ACS). Дозиметрические планы лечения создавались с использованием преимущественно 3D-CRT технологии планирования и с учетом критериев по изодозному покрытию опухоли и минимально возможным в данных условиях нагрузкам на наиболее чувствительные здоровые органы (доза облучения спинного мозга не превышала 45 Гр за все время лечения).

Таблица 1. **Общая характеристика пациентов**

Table 1. **Patient characteristics**

Показатель	Абс. значение	Удельный вес, %
Число пациентов	68	100
Возраст, лет:		
медиана	62,5	–
разброс значений	41–88	–
Пол:		
женский	7	10,3
мужской	61	89,7
Клиническая стадия:		
T1	24	35,3
T2	34	50,0
T3	10	14,7
Категория N:		
N0	64	94,1
N1	4	5,9

Объем опухоли (GTV), включающий как первичную опухоль, так и пораженные опухолью лимфоузлы и другие анатомические структуры, определяли на основании MRI/CT и/или PET/CT изображений. Всем пациентам выполнялась компьютерная томография (CT) для планирования в необходимом лечебном положении. Сканирование выполнялось на мультисрезовом компьютерном томографе модели Aquilion LB производства Toschiba. Толщина томографического слоя составляла 5 мм. Контуры целевых объемов облучения и критических органов вносились на каждом CT-скане. Клинический объем опухоли (CTV) включал GTV плюс дополнительный объем тканей (зоны высокого риска субклинического распространения опухоли) в 0,8–1,0 см во всех направлениях, а также уровни непораженных лимфатических узлов с риском субклинического распространения опухоли. Планируемый объем облучения (PTV) включал CTV плюс 0,3–0,5 мм во всех направлениях. Предписанная доза для планируемого объема облучения при традиционном режиме облучения составляла 68–74 Гр с применением расщепленного курса: после подведения к запланированному объему дозы облучения 40–50 Гр делался 2–4-недельный перерыв в лучевом лечении, после которого ЛТ продолжали в дополнительной дозе 30–20 Гр соответственно с уменьшенных полей ($б_{уст}$) с помощью дистанционного облучения.

Статистический анализ. Исходные данные представлены количественными и качественными признаками. Нормальность распределения проверялась при помощи критерия Шапиро–Уилка. Статистическая обработка полученных данных включала в себя анализ методом регрессии Кокса, что позволило выяснить связь переменных с выживаемостью объектов исследования и оценить влияние независимых переменных на вероятность наступления события. Далее для оценки исхода относительно времени был проведен анализ данных методом Каплана–Майера.

В качестве конечной точки отслеживания было выбрано наступление отрицательного события. Таким образом отслеживалась бессобытийная выживаемость Event-free survival (EFS). За дату наступления события были взяты следующие: дата прогресса в лимфоузлах, дата прогресса в костях, смерть от основного заболевания. Если для одного и того же пациента было несколько событий, то бралась дата наступления первого. Пациенты, умершие по причинам, не связанным с основным заболеванием, для которых не наступило ни одно из событий, были исключены из анализа. Таким образом, событие наступило для 30 (44,1 %) пациентов.

Пациенты были разделены на две группы. В первой группе находились те, у которых перерыв в лечении составлял менее 3 недель (15 человек, 22,1 %), а во второй – пациенты, у которых перерыв в лечении превышал 3 недели (53 человека, 77,9 %).

При статистической обработке результатов II и III стадии заболевания были объединены в общую группу из-за малочисленности последней.

Результаты и их обсуждение. Однофакторный анализ показал, что прогностическое значение для бессобытийной выживаемости имели продолжительность перерывов в лучевом лечении (менее 3 недель по сравнению с 3 неделями и более), а также показатели T и N (табл. 2).

Таблица 2. **Однофакторный анализ переменных в регрессии Кокса (68 пациентов)**

Table 2. **Prognostic factors by the univariate Cox regression model (68 patients)**

Переменные	EFS			
	B	SE	HR (95 % Cl)	*p*
Длительность перерыва	0,021	0,006	1,021 (1,009–1,034)	<0,001
Возраст	–0,025	0,018	0,975 (0,941–1,011)	0,173
СОД	–0,019	0,067	0,981 (0,861–1,117)	0,771
Пол:				0,205
женский	1			
мужской	–0,912	0,743	2,490 (0,580–10,685)	0,220
Клиническая стадия:				0,002
T1	1			
T2–T3	1,535	0,539	4,640 (1,615–13,336)	0,004
Категория N:				0,011
N0	1			
N1	1,309	0,550	3,704 (1,260–10,889)	0,017

Примечание. Здесь и в табл. 3: EFS – бессобытийная выживаемость, B – коэффициент регрессии, SE – стандартная ошибка, HR – отношение рисков, *p* – уровень значимости.

Значимых корреляций между характеристиками и продолжительностью перерыва в лучевом лечении не обнаружено.

При однофакторном анализе переменных установлено, что продолжительность перерыва в курсе ЛТ имеет сильную связь с бессобытийной выживаемостью (HR = 1,021 [95 % Cl, 1,009–1,034], $p = 0{,}000498$).

Таблица 3. **Многофакторный анализ переменных в регрессии Кокса (*n* = 68)**

Table 3. **Multivariate analyses of the factors based on the Cox regression model (*n* = 68)**

Переменные в финальной модели	EFS			
	B	SE	HR (95 % Cl)	*p*
Длительность перерыва	0,014	0,007	1,015 (1,001–1,029)	0,037
Клиническая стадия T	1,330	0,549	3,779 (1,288–11,089)	0,015
Категория N	0,494	0,632	1,638 (0,475–5,649)	0,435

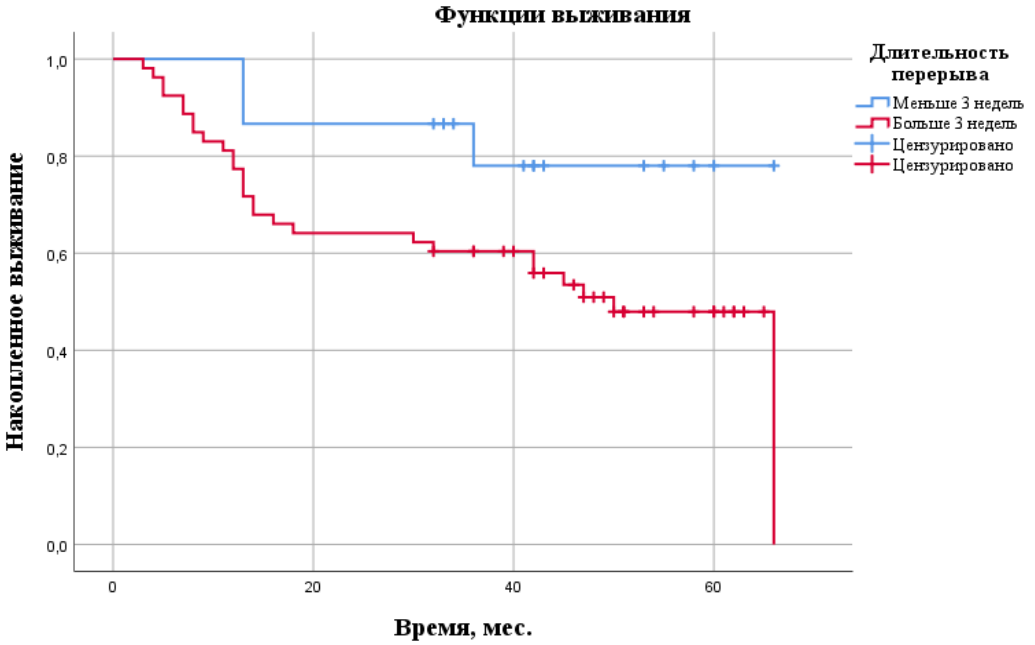


Рис. 1. Кривые Каплана–Майера для EFS в зависимости от длительности перерыва ($p_{\text{log-rank}}$ = 0,049)

Fig. 1. Kaplan–Meier curves of EFS with treatment interruption ($p_{\text{log-rank}}$ = 0.049)

Многофакторный анализ показал, что наибольшую связь с бессобытийной выживаемостью имеет стадия заболевания (табл. 3). Та же тенденция наблюдается и для продолжительности перерыва в лучевом лечении (HR = 1,015 [95 % Cl, 1,001–1,029], p = 0,037343).

Т а б л и ц а 4. **Среднее значение времени выживания и процент накопленного выживания в зависимости от длительности перерыва в лечении**

T a b l e 4. **Mean survival time and percentage of cumulative survival depending on the duration of treatment interruption**

Группирующий фактор	Число пациентов	Среднее значение времени выживания, мес. ± SE	EFS, %	$p_{\text{log-rank}}$
Перерыв менее 3 нед.	15	56,333 ± 5,034	80,000	0,049
Перерыв 3 нед. и более	53	42,095 ± 3,616	49,056	

Накопленное выживание в группе пациентов с продолжительностью перерыва в лучевом лечении менее 3 недель значительно выше, чем в группе пациентов, завершивших лечение с перерывом более 3 недель (80,00 % против 49,06 %; рис. 1, табл. 4).

Из табл. 5 видно, что в группе пациентов с длительностью перерыва менее 3 недель не наблюдается статистически значимой выживаемости в зависимости от клинической стадии заболевания ($p_{\text{log-rank}}$ = 0,133, см. рис. 2). В группе пациентов с длительностью перерыва 3 недели и более отмечается тенденция к накоплению выживания в зависимости от клинической стадии заболевания ($p_{\text{log-rank}}$ = 0,025, рис. 3). Когда группирующим фактором является клиническая стадия, статистически значимой разницы в выживаемости не наблюдалось при разной продолжительности перерывов в курсе ЛТ (рис. 4, 5).

По результатам нашего исследования отдаленные результаты лучевого лечения рака головы и шеи статистически значимо коррелируют с длительностью перерывов в расщепленном курсе ЛТ.

Таблица 5. **Среднее значение времени выживания и процент накопленного выживания в зависимости от длительности перерыва в лечении и стадий заболевания**

Table 5. **Mean survival time and percentage of cumulative survival depending on the duration of treatment interruptions and clinical stages**

Группирующий фактор	Подгруппа	Число пациентов	Ср. знач. времени выживания, мес. ± SE	EFS, %	$p_{\text{log-rank}}$
Перерыв менее 3 нед.	T1	9	62,667 ± 3,143	88,9	0,133
	T2–T3	6	31,667 ± 5,389	66,7	
Перерыв 3 нед. и более	T1	15	51,533 ± 5,449	80,0	0,025
	T2–T3	38	37,375 ± 4,197	36,8	
T1	Перерыв менее 3 нед.	9	62,667 ± 3,143	88,9	0,524
	Перерыв 3 нед. и более	15	51,533 ± 5,449	80,0	
T2–T3	Перерыв менее 3 нед.	6	31,667 ± 5,389	66,7	0,475
	Перерыв 3 нед. и более	38	37,375 ± 4,197	36,8	

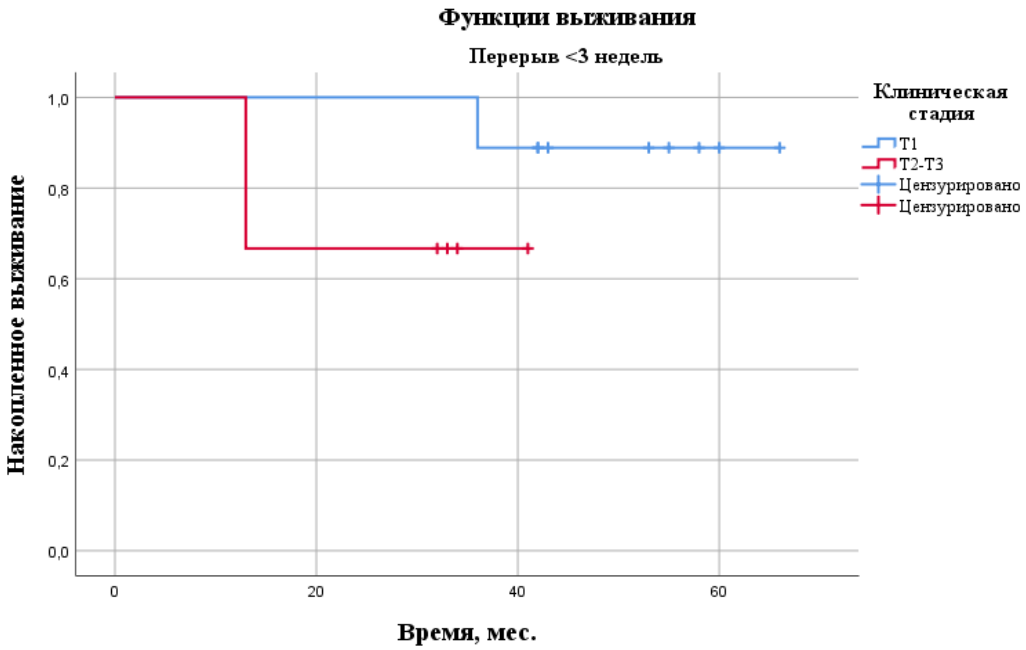


Рис. 2. Кривые Каплана–Майера для EFS при длительности перерыва менее 3 недель в зависимости от клинической стадии ($p_{\text{log-rank}}$ = 0,133)

Fig. 2. Kaplan–Meier curves for EFS with treatment interruption less than 3 weeks depending on the clinical stage ($p_{\text{log-rank}}$ = 0.133)

В нашем исследовании группа пациентов с длительностью перерыва менее 3 недель насчитывала в общей сложности 15 пациентов. Ее разбиение по стадиям заболевания привело к тому, что подгруппы оказались малочисленными (9 пациентов с I клинической стадией и 6 пациентов с II–III клинической стадией). Отсутствие статистической значимости может быть обусловлено малым количеством пациентов в анализируемых подгруппах, на которое повлияли ограничения, применяемые к выборке, и длительность наблюдения. Расширив длительность наблюдения и увеличив тем самым количество пациентов в подгруппах, можно было бы с большей достоверностью провести статистический анализ.

Другие исследования в плане изучения влияния длительности курса ЛТ на выживаемость пациентов демонстрируют результаты, аналогичные полученным нами, а именно статистически значимую зависимость выживаемости от наличия перерыва в курсе ЛТ. Так, в исследовании

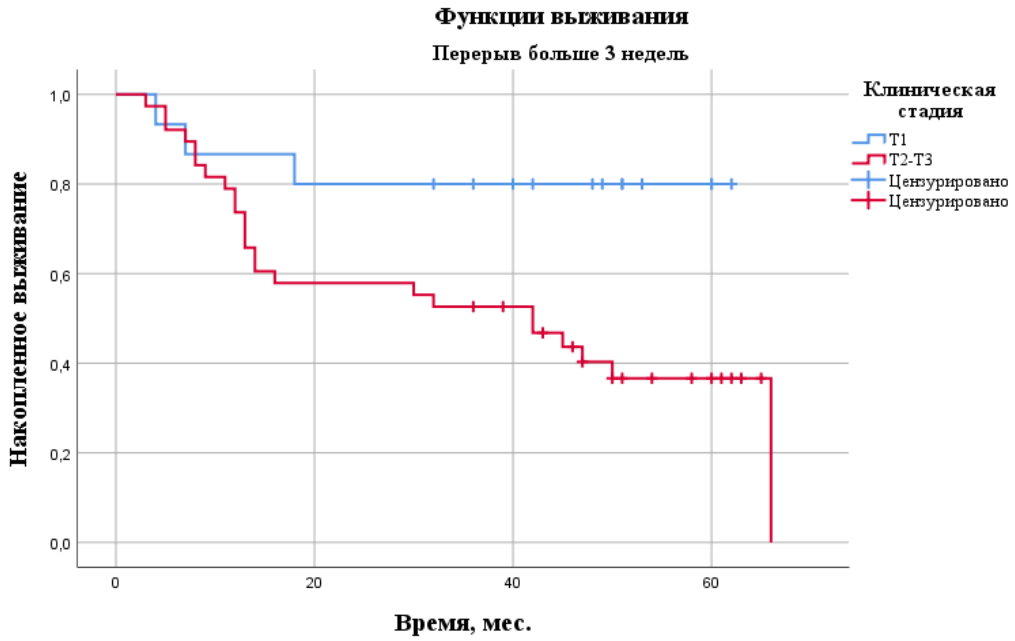


Рис. 3. Кривые Каплана–Майера для EFS при длительности перерыва 3 недели и более в зависимости от клинической стадии ($p_{\text{log-rank}} = 0{,}025$)

Fig. 3. Kaplan–Meier curves for EFS with treatment interruption ≥3 weeks or more depending on the clinical stage ($p_{\text{log-rank}} = 0.025$)

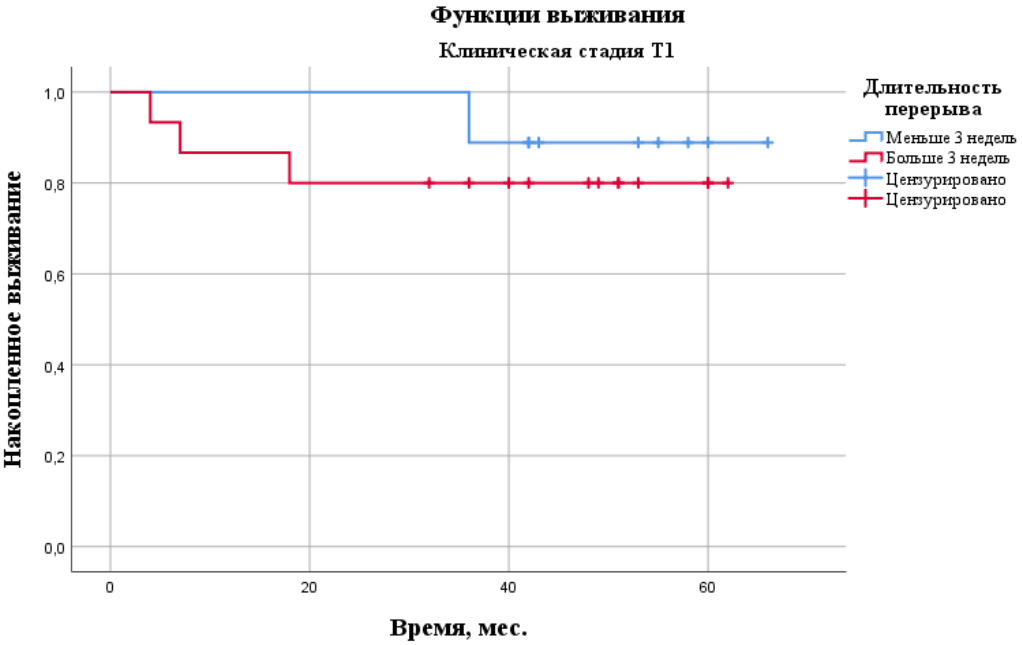


Рис. 4. Кривые Каплана–Майера для EFS при клинической стадии T1 в зависимости от длительности перерыва ($p_{\text{log-rank}} = 0{,}524$)

Fig. 4. Kaplan–Meier curves for EFS with clinical stage T1 depending on the duration of treatment interruption ($p_{\text{log-rank}} = 0.524$)

Yi-Jun Hua с соавт. [10] изучалось влияние длительности курса ЛТ фотонным излучением с модуляцией интенсивности на расчетную 5-летнюю локорегионарную выживаемость пациентов с раком носоглотки I–III стадии без рецидивов, выживаемость без отдаленных метастазов, выживаемость без прогрессирования и общую выживаемость пациентов, прошедших курс ЛТ с модуляцией интенсивности (ЛТМИ) длительностью 7 недель и менее по сравнению пациентами,

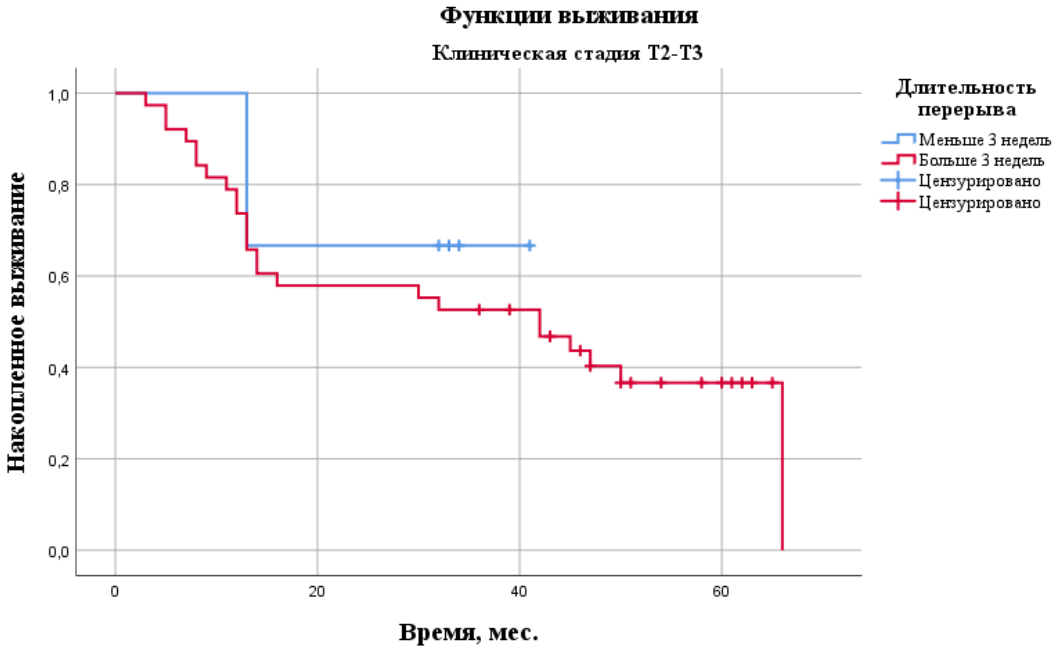


Рис. 5. Кривые Каплана–Майера для EFS при клинической стадии T2–T3 в зависимости от длительности перерыва

Fig. 5. Kaplan–Meier curves for EFS with clinical stage T2-T3 depending on the duration of treatment interruption ($p_{\text{log-rank}} = 0.475$)

прошедшими курс ЛТМИ длительностью более 7 недель. При этом показатель выживаемости составил: 93,2 % против 87,0 % ($p < 0{,}001$), 89,4 % против 84,4 % ($p = 0{,}016$), 79,8 % против 70,6 % ($p < 0{,}001$) и 87,2 % против 78,4 % ($p < 0{,}001$) соответственно. В исследовании сравнивались результаты, полученные в отсутствие перерыва в лучевом лечении и при его наличии, однако нет данных о длительности перерывов у всех пациентов, прошедших курсы химиотерапии. Похожие результаты получены в аналогичных исследованиях зарубежных авторов [11, 12].

В более ранних исследованиях по изучению зависимости выживаемости от длительности курса ЛТ, например в публикации [13], пациенты, получавшие лучевое лечение по поводу рака носоглотки I–II стадии, были разделены на группы с суммарной дозой излучения больше и меньше 75 Гр, а также с длительностью лечения больше и меньше 12 недель (медиана 11,6 недели, разброс значений от 7,8 до 20 недель). Лечение с дозой излучения более 75 Гр включало брахитерапию (5–15,5 Гр за 1–3 фракции с интервалом 1–2 недели). Пятилетние показатели составили 86,4 % для местного контроля, 84,7 % для безрецидивной выживаемости, 88,5 % для актуариальной выживаемости и 84,2 % для общей выживаемости. Группа лечения (сочетание времени и дозы облучения) была наиболее важным прогностическим фактором в соответствии с моделью пропорциональных рисков Кокса. У пациентов, получивших облучение в общей дозе ≤75 Гр, завершивших лучевое лечение менее чем за 12 недель, прогноз выживаемости был лучше, чем в других группах ($p < 0{,}01$).

Для изучения возможности подведения доз излучения с учетом потери биологического эффекта (LQ-модель) наибольший интерес представляли те перерывы в курсе ЛТ, которые были необходимы для стихания лучевых реакций и восстановления тканей для того, чтобы по завершении курса ЛТ пациент получил предписанную дозу излучения в полном объеме. Такие перерывы могут быть контролируемыми. Для этого необходимо использовать современные методы лучевой и сопроводительной терапии. К таким методам относится ЛТ с модулированной интенсивностью (IMRT), а также с объемной модулированной интенсивностью (VMAT), с помощью которых можно доставлять высокие дозы излучения к мишени, щадя соседние ткани и органы. Это позволит приблизиться к значениям по выживаемости пациентов, приведенным в исследовании Yi-Jun Hua и др. [10], и продолжить работу по изучению и улучшению параметров, влияющих

на качество лечения. В настоящее время во многих учреждениях такие методы облучения являются основными. За последние десятилетия с развитием визуализации и современных методов ЛТ результаты лечения опухолей головы и шеи значительно улучшились [14–17].

Внедрение в клиническую практику лечения локализаций головы и шеи учета влияния перерывов в курсе ЛТ и понимание влияния контролируемых факторов имеет важное значение для выбора оптимальных стратегий лечения.

Заключение. Однофакторный анализ переменных показал, что продолжительность перерыва в курсе лучевой терапии имеет сильную связь с бессобытийной выживаемостью ($p < 0{,}001$).

Многофакторный анализ показал, что наибольшую связь с бессобытийной выживаемостью имеет стадия заболевания. Та же тенденция характерна и для продолжительности перерыва в лучевом лечении ($p < 0{,}05$).

В группе пациентов с продолжительностью перерыва в лучевом лечении менее 3 недель накопленное выживание значительно выше, чем у пациентов, завершивших лечение с перерывом более 3 недель (80,00 % против 49,06 %).

В группе пациентов с длительностью перерыва менее 3 недель не наблюдается статистически значимой выживаемости в зависимости от клинических стадий заболевания ($p_{\text{log-rank}} = 0{,}133$). Это говорит о том, что при длительности перерыва менее 3 недель клиническая стадия (Т1–Т3) не является фактором, влияющим на выживаемость пациентов. Другая ситуация в группе пациентов с длительностью перерыва 3 недели и более. Здесь наблюдается тенденция к накоплению выживания в зависимости от клинической стадии заболевания ($p_{\text{log-rank}} = 0{,}025$). Инверсный анализ показал, что если группирующим фактором является клиническая стадия, то статистически значимой разницы в выживаемости при разной продолжительности перерывов не наблюдается.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Withers, H. R. The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy / H. R. Withers, J. M. G. Taylor, B. Maciejewski // Acta Oncologica. – 1988. – Vol. 27, N 2. – P. 131–146. https://doi.org/10.3109/02841868809090333

2. Further analysis of the time factor in squamous cell carcinoma of the tonsillar region / J. F. Fowler [et al.] // Radiother. Oncol. – 1990. – Vol. 19, N 3. – P. 237–244. https://doi.org/10.1016/0167-8140(90)90150-u

3. The effect of treatment duration on local control of squamous cell carcinoma of the tonsil and carcinoma of cervix / T. J. Keane [et al.] // Seminar Radiat. Oncol. – 1992. – Vol. 2, N 1. – P. 26–28. https://doi.org/10.1016/S1053-4296(05)80047-5

4. Esophageal cancer treated with radiotherapy: impact of total treatment time and fractionation / Y. Nishimura [et al.] // Int. J. Radiat. Oncol., Biol., Phys. – 1994. – Vol. 30, N 5. – P. 1099–1105. https://doi.org/10.1016/0360-3016(94)90315-8

5. Effect of time, dose and fractionation on local control of nasopharyngeal carcinoma / A. W. Lee [et al.] // Radiother. Oncol. – 1995. – Vol. 36, N 1. – P. 24–31. https://doi.org/10.1016/0167-8140(95)01579-6

6. Patterns of failure in carcinoma of the nasopharynx: I. Failure at the primary site / B. Vikram [et al.] // Int. J. Radiat. Oncol., Biol., Phys. – 1985. – Vol. 11, N 8. – P. 1455–1459. https://doi.org/10.1016/0360-3016(85)90332-3

7. Huang, S.-C. Nasopharyngeal cancer: study II / S.-C. Huang, G.-L. Chu // Int. J. Radiat. Oncol., Biol., Phys. – 1981. – Vol. 7, N 6. – P. 713–716. https://doi.org/10.1016/0360-3016(81)90462-4

8. Factors predict prolonged wait time and longer duration of radiotherapy in patients with nasopharyngeal carcinoma: a multilevel analysis / P.-C. Chen [et al.] // PloS ONE. – 2014. – Vol. 9, N 10. – P. e109930. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109930

9. The effect of interruptions and prolonged treatment time in radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma / D. L. Kwong [et al.] // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. – 1997. – Vol. 39, N 3. – P. 703–710. https://doi.org/10.1016/s0360-3016(97)00339-8

10. The effect of prolonged duration of intensity modulated radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma / Y.-J. Hua [et al.] // Front. Oncol. – 2021. – Vol. 11. – Art. 648637. https://doi.org/10.3389/fonc.2021.648637

11. Effect of treatment delay on outcome of patients with early-stage head-and-neck carcinoma receiving radical radiotherapy / A. Fortin [et al.] // Int. J. Radiat. Oncol., Biol., Phys. – 2002. – Vol. 52, N 4. – P. 929–936. https://doi.org/10.1016/s0360-3016(01)02606-2

12. Increased local failure risk with prolonged radiation treatment time in head and neck cancer treated with concurrent chemotherapy / D. M. Cannon [et al.] // Head and Neck. – 2014. – Vol. 36, N 8. – P. 1120–1125. https://doi.org/10.1002/hed.23419

13. Early stage nasopharyngeal carcinoma: radiotherapy dose and time factors in tumor control / J. T. Chang [et al.] // Jap. J. Clin. Oncol. – 1998. – Vol. 28, N 3. – P. 207–213. https://doi.org/10.1093/jjco/28.3.207

14. Matched case-control study of quality of life and xerostomia after intensity modulated radiotherapy or standard radiotherapy for head-and-neck cancer: Initial report / S. Jabbari [et al.] // Int. J. Radiat. Oncol., Biol., Phys. – 2005. – Vol. 63, N 3. – P. 725–731. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2005.02.045

15. Short term toxicity profile for 32 sinonasal cancer patients treated with IMRT. Can we avoid dry eye syndrome? / F. Claus [et al.] // Radiother. Oncol. – 2002. – Vol. 64, N 2. – P. 205–208. https://doi.org/10.1016/s0167-8140(02)00172-x

16. Intensity-modulated radiotherapy in the treatment of nasopharyngeal carcinoma: An update of the UCSF experience / N. Lee [et al.] // Int. J. Radiat. Oncol., Biol., Phys. – 2002. – Vol. 53, N 1. – P. 12–22. https://doi.org/10.1016/s0360-3016(02)02724-4

17. A prospective study of salivary function sparing in patients with head-and-neck cancers receiving intensity-modulated or three-dimensional radiation therapy: Initial results / K. S. Chao [et al.] // Int. J. Radiat. Oncol., Biol., Phys. – 2001. – Vol. 49, N 4. – P. 907–916. https://doi.org/10.1016/s0360-3016(00)01441-3

References

1. Withers H. R., Taylor J. M. G., Maciejewski B. The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy. *Acta Oncologica*, 1988, vol. 27, no. 2, pp. 131–146. https://doi.org/10.3109/02841868809090333

2. Fowler J. F., Tanner M. A., Bataini J. P., Asselain B., Bernier J., Lave C. Further analysis of the time factor in squamous cell carcinoma of the tonsillar region. *Radiotherapy and Oncology*, 1990, vol. 19, no. 3, pp. 237–244. https://doi.org/10.1016/0167-8140(90)90150-u

3. Keane T. J., Fyles A., O'Sullivan B., Barton M., Maki E., Sinrm J. The effect of treatment duration on local control of squamous cell carcinoma of the tonsil and carcinoma of cervix. *Seminar in Radiation Oncology*, 1992, vol. 2, no. 1, pp. 26–28. https://doi.org/10.1016/S1053-4296(05)80047-5

4. Nishimura Y., Ono K., Tsutsui K., Oya N., Okajima K., Hiraoka M., Abe M. Esophageal cancer treated with radiotherapy: impact of total treatment time and fractionation. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 1994, vol. 30, no. 5, pp. 1099–1105. https://doi.org/10.1016/0360-3016(94)90315-8

5. Lee A. W., Chan D. K., Fowler J. F., Poon Y. F., Foo W., Law S. C., O S. K., Tung S. Y., Chappell R. Effect of time, dose and fractionation on local control of nasopharyngeal carcinoma. *Radiotherapy and Oncology*, 1995, vol. 36, no. 1, pp. 24–31. https://doi.org/10.1016/0167-8140(95)01579-6

6. Vikram B., Mishra U. B., Strong E. W., Manolatos S. Patterns of failure in carcinoma of the nasopharynx: I. Failure at the primary site. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 1985, vol. 11, no. 8, pp. 1455–1459. https://doi.org/10.1016/0360-3016(85)90332-3

7. Huang S.-C., Chu G.-L. Nasopharyngeal cancer: study II. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 1981, vol. 7, no. 6, pp. 713–716. https://doi.org/10.1016/0360-3016(81)90462-4

8. Chen P.-C., Yang C.-C., Wu C.-J., Liu W.-S., Huang W.-L., Lee C.-C. Factors predict prolonged wait time and longer duration of radiotherapy in patients with nasopharyngeal carcinoma: a multilevel analysis. *PloS ONE*, 2014, vol. 9, no. 10, p. e109930. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109930

9. Kwong D. L., Sham J. S., Chua D. T., Choy D. T., Au G. K., Wu P. M. The effect of interruptions and prolonged treatment time in radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 1997, vol. 39, no. 3, pp. 703–710. https://doi.org/10.1016/s0360-3016(97)00339-8

10. Hua Y.-J., Ou-Yang Y.-F., Xiong Z., Xia L., Luo D.-H., Chen M.-Y. The effect of prolonged duration of intensity modulated radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma. *Frontiers in Oncology*, 2021, vol. 11, art. 648637. https://doi.org/10.3389/fonc.2021.648637

11. Fortin A., Bairati I., Albert M., Moore L., Allard J., Couture C. Effect of treatment delay on outcome of patients with early-stage head-and-neck carcinoma receiving radical radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 2002, vol. 52, no. 4, pp. 929–936. https://doi.org/10.1016/s0360-3016(01)02606-2

12. Cannon D. M., Geye H. M., Hartig G. K., Traynor A. M., Hoang T., McCulloch T. M., Wiederholt P. A., Chappell R. J., Harari P. M. Increased local failure risk with prolonged radiation treatment time in head and neck cancer treated with concurrent chemotherapy. *Head and Neck*, 2014, vol. 36, no. 8, pp. 1120–1125. https://doi.org/10.1002/hed.23419

13. Chang J. T., See L. C., Liao C. T., Chen L. H., Leung W. M., Chen S. W., Chen W. C. Early stage nasopharyngeal carcinoma: radiotherapy dose and time factors in tumor control. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 1998, vol. 28, no. 3, pp. 207–213. https://doi.org/10.1093/jjco/28.3.207

14. Jabbari S., Kim H. M., Feng M., A. Lin, Tsien C., Elshaikh M., Terrel J. E., Murdoch-Kinch C., Eisbruch A. Matched case-control study of quality of life and xerostomia after intensity modulated radiotherapy or standard radiotherapy for head-and-neck cancer: Initial report. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 2005, vol. 63, no. 3, pp. 725–731. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2005.02.045

15. Claus F., Boterberg T., Ost P., De Neve W. Short term toxicity profile for 32 sinonasal cancer patients treated with IMRT. Can we avoid dry eye syndrome? *Radiotherapy and Oncology*, 2002, vol. 64, no. 2, pp. 205–208. https://doi.org/10.1016/s0167-8140(02)00172-x

16. Lee N., Xia P., Quivery J. M., Sultanem K., Poon I., Akazawa C., Akazawa P., Weinberg V., Fu K. K. Intensity-modulated radiotherapy in the treatment of nasopharyngeal carcinoma: An update of the UCSF experience. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 2002, vol. 53, no. 1, pp. 12–22. https://doi.org/10.1016/s0360-3016(02)02724-4

17. Chao K. S., Deasy J. O., Markman J., Haynie J., Perez C. A., Purdy J. A., Low D. A. A prospective study of salivary function sparing in patients with head-and-neck cancers receiving intensity-modulated or three-dimensional radiation therapy: Initial results. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 2001, vol. 49, no. 4, pp. 907–916. https://doi.org/10.1016/s0360-3016(00)01441-3

Информация об авторах

Батян Анатолий Николаевич – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова Белорусского государственного университета (ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0002-2041-5575. E-mail: ant_b@tut.by

Волонцевич Виталий Николаевич – врач радиационный онколог. Брестский областной онкологический диспансер (ул. Медицинская, 6, 224027, г. Брест, Республика Беларусь). E-mail: valantsevich185@gmail.com

Гончарова Екатерина Викторовна – аспирант. Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова Белорусского государственного университета (ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0003-4383-2360. E-mail: katsiaryna.hancharova@gmail.com

Демешко Павел Дмитриевич – д-р мед. наук, доцент, гл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова (аг. Лесной, 223040, Минский район, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0002-1324-3656. E-mail: pdemeshko@me.com

Лемешевский Виктор Олегович – канд. с.-х. наук, доцент. Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова Белорусского государственного университета (ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0001-7757-1969. E-mail: lemeshonak@yahoo.com

Information about the authors

Anatoly N. Batyan – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University (23/1, Dolgobrodskaya Str., 220070, Minsk, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0002-2041-5575. E-mail: ant_b@tut.by

Vitali N. Valantsevich – radiation oncologist. Brest Regional Oncological Dispensary (6, Meditsinskaya Str., 224027, Brest, Republic of Belarus). E-mail: valantsevich185@gmail.com

Katsiaryna V. Hancharova – Postgraduate student. International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University (23/1, Dolgobrodskaya Str., 220070, Minsk, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0003-4383-2360. E-mail: katsiaryna.hancharova@gmail.com

Pavel D. Dziameshka – D. Sc. (Med.), Associate Professor, Chief Researcher. N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus (Lesnoy, 223040, Minsk region, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0002-1324-3656. E-mail: pdemeshko@me.com

Viktar O. Lemiasheuski – Ph. D. (Agricult.), Associate Professor. International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University (23/1, Dolgobrodskaya Str., 220070, Minsk, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0001-7757-1969. E-mail: lemeshonak@yahoo.com

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 611.81:616.716.4-002
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-3-216-225

Поступила в редакцию 27.03.2023
Received 27.03.2023

С. Г. Пашкевич[1], С. П. Рубникович[2,3], Т. Е. Кузнецова[1], Е. В. Кузьменко[3], Г. П. Миронова[1], О. Г. Тихонович[1], Ж. А. Гладкова[1], К. Н. Жогаль[1], Н. С. Сердюченко[1], А. С. Грищенков[3]

[1]Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь
[2]Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь
[3]Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Республика Беларусь

МОРФОСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МОЗГЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В МОДЕЛИ ВОСПАЛЕНИЯ ВИСОЧНО-НИЖНЕЧЕЛЮСТНОГО СУСТАВА

Аннотация. В статье приведены результаты структурно-функциональных преобразований в мозжечке, ядрах тройничного нерва и гиппокампе крыс-самцов линии Вистар на фоне введения в пространство Меккеля мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в модели воспаления височно-нижнечелюстного сустава (ВНЧС).

Цель исследования – уточнить влияние инъекций МСК в пространство Меккеля на морфоструктурные особенности мозжечка, ядер тройничного нерва и гиппокампа в модели воспаления ВНСЧ.

Показано, что введение МСК в пространство Меккеля в модели воспалительного процесса правого нижнего височно-челюстного сустава способствует восстановлению структуры ганглионарного слоя мозжечка, спинального ядра тройничного нерва и гиппокампа крыс к 28-м суткам. Это проявляется в увеличении плотности нейронов, снижении индекса нейродегенерации, а также в активации элементов глии.

Ключевые слова: крысы, мезенхимальные стволовые клетки, височно-нижнечелюстной сустав, адъювант Фрейнда, мозжечок, ядра тройничного нерва, гиппокамп, морфометрия

Для цитирования: Морфоструктурные изменения в мозге экспериментальных животных после применения мезенхимальных стволовых клеток в модели воспаления височно-нижнечелюстного сустава / С. Г. Пашкевич [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2023. – Т. 20, № 3. – С. 216–225. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-3-216-225

Svetlana G. Pashkevich[1], Sergey P. Rubnikovich[2,3], Tatyana E. Kuznetsova[1], Elena V. Kuzmenko[3], Galina P. Mironova[1], Olga G. Tikhonovich[1], Zhanna A. Gladkova[1], Kseniya N. Zhogal[1], Nikolay S. Serdyuchenko[1], Arseny S. Grishchenkov[3]

[1]Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
[2]Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus
[3]Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

MORPHOSTRUCTURAL CHANGES IN THE BRAIN OF EXPERIMENTAL ANIMALS AFTER USING MESENCHYMAL STEM CELLS IN THE TEMPOROMANDIBULAR JOINT INFLAMMATION MODEL

Abstract. The article presents the results of structural and functional transformations in cerebellum, trigeminal nuclei, and hippocampus of male Wistar rats against the background of injection of mesenchymal stem cells (MSCs) into Meckel's space in the temporomandibular joint (TMJ) inflammation model.

The aim of the study was to clarify the effect of MSCs injections into Meckel's space on the morphostructural features of cerebellum, trigeminal nuclei, and hippocampus in the TMJ inflammation model.

Injecting the mesenchymal stem cells into Meckel's space in an inflammatory model of the right lower temporomandibular joint promotes the structure restoration of the ganglionic layer of the cerebellum, the spinal nuclei of the trigeminal nerve, and the hippocampus of rats by the 28th day. This is manifested in increasing the neuronal density, decreasing the neurodegeneration index, and in activating glia elements.

Keywords: rats, mesenchymal stem cells, temporomandibular joint, Freund's adjuvant, cerebellum, trigeminal nuclei, hippocampus, morphometry

For citation: Pashkevich S. G., Rubnikovich S. P., Kuznetsova T. E., Kuzmenko E. V., Mironova G. P., Tikhonovich O. G., Gladkova Zh. A., Zhogal K. N., Serdyuchenko N. S., Grishchenkov A. S. Morphostructural changes in the brain of experimental animals after using mesenchymal stem cells in the temporomandibular joint inflammation model. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2023, vol. 20, no. 3, pp. 216–225 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-3-216-225

Введение. Важным клиническим фактором риска развития угрожающего жизни состояния – синдрома обструктивного апноэ во сне – являются воспалительные процессы в области височно-нижнечелюстных суставов (ВНЧС) [1–3]. Известно, что функции дыхания, кровообращения, поддержания постоянства внутренней среды организма регулируют структуры ствола головного мозга. Тригеминокардиальный рефлекс может возникать при надавливании на глазные яблоки, во время операционных процедур, в том числе в периорбитальной области, при резекции опухолей в области моста и мозжечка, а повреждение проекций афферентной иннервации в области верхней и нижней челюсти повышает вероятность снижения уровня артериального давления, развития брадикардии, асистолии, апноэ во время бодрствования, а также усиливает перистальтическую функцию желудочно-кишечного тракта [4, 5]. Поскольку центростремительные нервы в составе тригеминоспинального солитарного тракта от лицевой области способны активировать ноцицептивные соматовисцеральные и висцеро-висцеральные рефлексы, характерная для повышенной возбудимости системы тройничного нерва циркуляция возбуждения по замкнутому кругу проявляется различными дисфункциями: невралгией тройничного нерва, лицевыми болями, мигренеподобными состояниями, бруксизмом [5, 6]. Причем сонный бруксизм как более интенсивная форма ритмической активности жевательных мышц в 8 % случаев сопровождается остановкой работы сердца [3]. В связи с этим накапливаются сведения о том, что бруксизм, проявляясь гипервозбудимостью моторных центров мозга, в определенной степени относится не столько к патофизиологическим проявлениям, сколько к общефизиологическим [7].

Частота встречаемости бруксизма, по данным ВОЗ, приближается к показателю 4 человека на 100 000 населения [8]. Отмечают, что чаще всего у пациентов невралгии тройничного нерва имеют правостороннюю латерализацию и возникают вследствие сосудистых, эндокринно-обменных, аллергических и психических расстройств [9–11]. При прогрессировании отмечают нарушения процессов формирования памяти и концентрации внимания. Так, у пациентов с невралгиями тройничного нерва и другими хроническими болями фиксируют аномалии объема и микроструктуры центральной нервной системы в областях, связанных с восприятием боли, эмоций и консолидации памяти [12, 13]. По результатам магнитно-резонансной томографии 22 пациентов с правосторонней невралгией тройничного нерва и по итогам автоматической сегментации субполей гиппокампа с использованием FreeSurfer v6.0 здоровых людей выявлено значительное уменьшение объема ипсилатеральных CA1 и CA4 областей гиппокампа, зубчатой извилины, молекулярного слоя и области перехода гиппокамп–амигдала, сопровождающееся уменьшением объема ипсилатерального гиппокампа по сравнению со здоровым контролем. Таким образом, структурно-функциональные изменения, происходящие в гиппокампе, предполагают аберрантные процессы и реорганизацию нейронных связей, которые способствуют развитию и/или сохранению симптомов невралгии тройничного нерва [12].

В другом исследовании объемы гиппокампа после интенсивной терапии и лечения нормализовались в основном за счет CA2/CA3, CA4 областей и зубчатой извилины, которые участвуют в консолидации памяти и нейрогенезе [13]. Известно, что у взрослых людей нейрогенез необходим для обучения, сохранения или «забывания» воспоминаний, а снижение нейрогенеза является одним из клеточных механизмов развития депрессивного состояния [14]. Установлена способность мезенхимальных стволовых клеток (МСК) жировой ткани крыс мигрировать вдоль волокон краниальных нервов к участкам повреждения в головном мозге. При локализации нейродеструктивных процессов в области задней черепной ямки эффективно введение МСК в область окончаний тройничного нерва, ядра которого расположены в задней черепной ямке [15]. В экспериментах на половозрелых крысах-самцах линии Вистар в модели ВНЧС гистоструктуру и спонтанную электрическую активность в нервной ткани двух подъядер спинального ядра тройничного нерва (Sp5O и Sp5I) исследовали как с ипсилатеральной, так и с контрлатеральной стороны от места инъекции (справа) полного и неполного адъюванта Фрейнда. Установлено, что активация системы Т-хелперов второго типа и базофилов в рецептивных полях мандибулярных ветвей V пары черепно-мозговых нервов может сопровождаться не только нарушением гистоструктуры спинального ядра тройничного нерва, но и изменением условий передачи сигналов в его нейронных сетях. Предполагается, что поиск способов восстановления элементов глии позволит корректировать

установленные структурно-функциональные изменения [16]. Далее было установлено, что инъекция в ВНЧС 50 мкл раствора адъюванта Фрейнда через 7 сут ускоряет «забывание» выработанных условных рефлексов у крыс в тесте «челночная камера» [17]. Однократная инъекция МСК в пространство Меккеля через 10 мин после введения адьюванта Фрейнда способствует сохранности в течение 2 недель выработанного условного рефлекса избегания на уровне фоновых значений. Эффект улучшения процессов формирования памяти сохранялся до 42 сут наблюдения. В практическом аспекте полученные результаты свидетельствуют о важности своевременного лечения и санации ротовой полости. Установленные положительные эффекты МСК в отношении сохранности условных рефлексов избегания при моделировании воспаления ВНЧС обосновывают необходимость дальнейших исследований данного феномена [16, 17].

Цель исследования – уточнить влияние инъекций мезенхимальных стволовых клеток в пространство Меккеля на морфоструктурные особенности мозжечка, ядер тройничного нерва и гиппокампа в модели воспаления височно-нижнечелюстных суставов.

Материалы и методы исследования. Животных содержали в стандартных условиях вивария (температура воздуха 23 ± 1 °С, вентиляционный режим 30 мин/ч) при свободном доступе к воде и пище, на одинаковом рационе в соответствии с нормами содержания лабораторных животных, с соблюдением светового и шумового режимов и международных правил биоэтики. Предварительно крыс-самцов линии Вистар адаптировали к экспериментальным условиям и приучали к рукам исследователя. После начала действия наркоза (30 мг/кг нембутала и 500 мг/кг уретана) животным массой тела 300–320 г (n = 30) в правый ВНЧС медленно струйно вводили полный адъювант Фрейнда (Calbiochem, Behring Diagnostics, lot № 344289, lot № 2639) или апирогенный физиологический раствор (n = 6) в объеме 50 мкл.

В исследовании использовали МСК, выделенные из жировой ткани брюшной полости самок крыс линии Вистар (n = 6). МСК культивировали во флаконах на питательной среде F10 (Sigma-Aldrich, США), содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки (Sigma-Aldrich, США). Количество живых клеток в 1 мл клеточной суспензии подсчитывали в камере Горяева. Введение суспензии МСК в пространство Меккеля, где располагается узел Гассера тройничного нерва, осуществляли наркотизированным крысам. Для этого пальпировали ростральный участок скулового отростка верхней челюсти и определяли расположение инфраорбитального отверстия. Затем через это отверстие под углом 10º к срединной плоскости головы вводили стерильную хирургическую иглу (Troge, Германия) диаметром 0,4 мм. Иглу продвигали на 20–22 мм вглубь инфраорбитального канала до входа в пространство Меккеля. После этого осуществляли инъекцию 50 мкл суспензии МСК (концентрация 1,9 млн кл/мл).

Для проведения морфологических исследований нефиксированный мозг после глубокого замораживания (для исключения артефактов) помещали на криостатный блок. Фронтальные срезы мозга толщиной 7 мкм готовили на микротоме-криостате НМ 525 (Microm, Германия). Уровень срезов определяли по стереотаксическому атласу мозга крысы [18]. Для светооптического исследования срезы окрашивали тионином и толуидиновым синим по Нисслю. Криостатные срезы подсушивали на воздухе в течение 2–3 мин, а затем фиксировали в охлажденном 70 %-ном спирте в течение 1 ч. После фиксации срезы промывали в дистиллированной воде и окрашивали толуидиновым синим по Нисслю, согласно протоколу производителя (Biovitrum, Россия), 10 мин. Затем срезы промывали дистиллированной водой, помещали на 5−10 с в дифференцирующий раствор, быстро ополаскивали в 96 %-ном этаноле и заливали новой порцией 96 %-ного этанола на 1–4 мин. Процесс дифференцировки периодически контролировали под микроскопом. Затем препараты обезвоживали в 100 %-ном этаноле 60 с, просветляли в двух порциях ксилола (по 2 мин) и помещали в монтирующую среду.

Изучение микропрепаратов и изготовление микрофотографий осуществляли, используя микроскоп Altami LUM-1 с цифровой камерой, программным обеспечением и 40-кратным увеличением объектива. На гистологических препаратах, окрашенных по Нисслю, подсчитывали количество нейронов: неизмененных, со слабым изменением структуры, с грубыми нарушениями структуры и клеток-теней. Нейроны были разделены на 4 группы: 1) нейроны нормальные, неизмененные (НН); 2) слабоизмененные нейроны (СН) – в которых сохранилось ядро, но имелись

структурные или тинкториальные нарушения компонентов цитоплазмы (острое набухание, гиперхроматоз, хроматолиз, центральная тинкториальная ацидофилия и т. п.); 3) грубоизмененные нейроны (ГН) – сморщенные, с тяжелыми, гомогенизирующими и ишемическими изменениями и т. д.; 4) клетки-тени и нейроны отсутствующие (ОН) – те, которые исчезли, а на их месте остались очаги выпадения, разрежения или скопления глиоцитов [19, 20]. Далее рассчитывали процентное соотношение измененных нейронов и общего числа нейронов данного участка. Тяжесть поражения (ТП), объем поражения (ОП), степень поражения (СП) определяли по следующим формулам:

$$\text{ТП} = \frac{(\text{ГН} + \text{ОН}) \cdot 100}{\text{ГН} + \text{ОН} + \text{СН} + \text{НН}}; \text{ОП} = \frac{(\text{ГН} + \text{ОН} + \text{СН}) \cdot 100}{\text{ГН} + \text{ОН} + \text{СН} + \text{НН}}; \text{СП} = \frac{(2\text{ОН} + 2\text{ГН} + \text{СН}) \cdot 100}{2(\text{ГН} + \text{ОН} + \text{СН} + \text{НН})}.$$

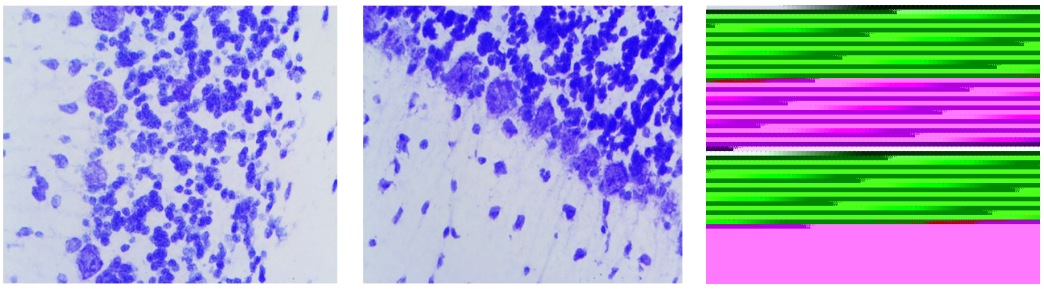
После вычисления ТП, ОП и СП подсчитывали процентное отношение нейронов с признаками нейродегенерации к общему числу нейронов, или индекс нейродегенерации (ИНД) [19, 20]. Также вычисляли глиальный индекс (ГИ) − отношение числа глиальных клеток к числу нейронов [19, 20]. Морфологическое исследование областей коры мозжечка, орального (Sp5O) подъядра спинального ядра тройничного нерва, а также CA1, CA2, CA3 и CA4 областей гиппокампа проводили у контрольных животных и на 21, 28, 35, 42 и 49-е сутки у тех крыс, которым внутрисуставно вводили полный адъювант Фрейнда и МСК.

Для статистической обработки данных применяли программы Statistica и Excel. Нормальность распределения определяли с помощью теста Шапиро–Уилка. Данные представляли в виде медианы (нижнего и верхнего квартиля – 25 %–75 %), для межгруппового сравнения использовали тест Манна–Уитни. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0{,}05$.

Результаты и их обсуждение. *Морфологические изменения в мозжечке крыс после введения полного адъюванта Фрейнда и мезенхимальных стволовых клеток.* Проведена визуальная оценка тинкториальных свойств клеток Пуркинье, их строения, формы и плотности расположения (рис. 1, *a*) в коре мозжечка. Показателем тяжести дегенеративных процессов служило наличие пикноморфных нейроцитов, клеток-теней, нейронов, подверженных сильной вакуолизации.

На 21-е сутки после введения полного адъюванта Фрейнда в область ВНЧС справа и инъекции МСК в пространство Меккеля справа (рис. 1) наблюдали увеличение плотности расположения клеток Пуркинье в ганглионарном слое по сравнению с контролем – от 20,78 (14,87; 23,96) до 28,45 (25,49; 31,94) мм ($p < 0{,}05$).

Только к 21-м суткам значительное число нейронов имело грубые структурные изменения, что отражалось в существенном увеличении ИНД (от 16 (0; 25) в контроле до 61 (5; 67), $p < 0{,}05$), а при дальнейшем наблюдении (с 28-х по 49-е сутки) не выявлено различий в плотности расположения нейронов (рис. 1, *c*) и значений ИНД по сравнению с контролем. Примечательно, что ГИ не имел существенных различий при всех сроках наблюдения.



a *b* *c*

Рис. 1. Клетки Пуркинье в ганглионарном слое коры мозжечка в контроле (*a*) и в модели воспаления височно-нижнечелюстного сустава крыс-самцов после инъекции в пространство Меккеля мезенхимальных стволовых клеток самок крыс на 21-е (*b*) и 49-е (*c*) сутки. Окраска: толуидиновый синий по Нисслю. ×400

Fig. 1. Purkinje cells in the ganglionic layer of the cerebellar cortex in the control (*a*) and in the inflammation temporomandibular joint model of male rats after injection of mesenchymal stem cells of female rats into Meckel's space by the 21th day (*b*) and by the 49th day (*c*). Staining: Nissl toluidine blue. ×400

Таким образом, введение мезенхимальных стволовых клеток в пространство Меккеля на фоне инъекции полного адъюванта Фрейнда в правый нижний височно-челюстной сустав в значительной степени способствует восстановлению структуры ганглионарного слоя мозжечка, спинального ядра тройничного нерва и гиппокампа крыс.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Jokubauskas, L. Relationship between obstructive sleep apnoea syndrome and sleep bruxism: a systematic review / L. Jokubauskas, A. Baltrušaitytė // J. Oral Rehabil. – 2017. – Vol. 44, N 2. – P. 144–153. https://doi.org/10.1111/joor.12468

2. Sleep bruxism is highly prevalent in adults with obstructive sleep apnea: a large-scale polysomnographic study / D. Li [et al.] // J. Clin. Sleep Med. – 2023. – Vol. 19, N 3. – P. 443–451. https://doi.org/10.5664/jcsm.10348

3. Анализ функционального состояния мышц челюстно-лицевой области у стоматологических пациентов с признаками бруксизма в сочетании с синдромом обструктивного апноэ во сне / С. П. Рубникович [и др.] // Докл. НАН Беларуси. – 2020. – Т. 64, № 3. – С. 341–349.

4. The influence of trigeminocardiac reflex on postoperative cardiac adverse events in patients undergoing cerebellopontine angle tumor resections: a case-control study / Y. Zhao [et al.] // World Neurosurg. – 2023. – Vol. 172. – P. e291–e298. https://doi.org/10.1016/j.wneu.2023.01.010

5. González, A. G. Sleep Apnea-Hypopnea Syndrome and Sleep Bruxism: A Systematic Review / A. G. González, J. Montero, C. G. Polo // J. Clin. Med. – 2023. – Vol. 12, N 3. – Art. 910. https://doi.org/10.3390/jcm12030910

6. Down syndrome: orofacial pain, masticatory muscle hypotonia, and sleep disorders / B. Dicieri-Pereira [et al.] // Sleep. – 2022. – Vol. 45, N 11. – Art. zsac181. https://doi.org/10.1093/sleep/zsac181

7. Рубникович, С. П. Современные методы ортопедического лечения в комплексной реабилитации пациентов с мышечно-суставными дисфункциями в сочетании с признаками бруксизма / С. П. Рубникович, А. С. Грищенков, Ю. Л. Денисова // Стоматолог. – 2020. – № 2. – С. 55–63.

8. Surgical management of post-traumatic trigeminal neuralgia – case report and review of the literature / D. E. Bandary [et al.] // J. Oral Maxillofac. Surg. – 2022. – Vol. 80, N 2. – P. 214–222. https://doi.org/10.1016/j.joms.2021.08.266

9. Sanner, F. Acute right-sided facial pain: a case report / F. Sanner // Int. Endod. J. – 2010. – Vol. 43, N 2. – P. 154–162. https://doi.org/10.1111/j.1365–2591.2009.01654.x

10. Incidence of trigeminal neuralgia: A population-based study in Central Sweden / T. S. Wettervik [et al.] // Eur. J. Pain. – 2023. – Vol. 27, N 5. – P. 580–587. https://doi.org/10.1002/ejp.2081

11. Somatosensory and trigeminal pathway abnormalities in Chinese patients with trigeminal neuralgia / Y. Li [et al.] // Odontology. – 2023. – Vol. 111, N 1. – P. 217–227. https://doi.org/10.1007/s10266-022-00737-1

12. Selective hippocampal subfield volume reductions in classic trigeminal neuralgia / M. F. Vaculik [et al.] // Neuroimage: Clin. – 2019. – Vol. 23. – Art. 101911. https://doi.org/10.1016/j.nicl.2019.101911

13. Pain relief reverses hippocampal abnormalities in trigeminal neuralgia / A. Noorani [et al.] // Pain. – 2022. – Vol. 23, N 1. – P. 141–155. https://doi.org/10.1016/j.jpain.2021.07.004

14. Altman, J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb / J. Altman // J. Comp. Neurol. – 1969. – Vol. 137, N 4. – P. 433–457. https://doi.org/10.1002/cne.901370404

15. Миграция периневрально введенных мезенхимальных стволовых клеток после травмы разной локализации у крыс / Ю. П. Токальчик [и др.] // Новости мед.-биол. наук. – 2018. – Т. 18, № 1. – С. 135–142.

16. Гладкова, Ж. А. Изучение структурно-функциональных особенностей спинального ядра тройничного нерва в модели воспаления височно-нижнечелюстных суставов крыс / Ж. А. Гладкова, Т. Е. Кузнецова, С. Г. Пашкевич // Новости мед.-биол. наук. – 2021. – Т. 21, №2. – С. 42–50.

17. Особенности процессов запоминания в модели воспаления височно-нижнечелюстного сустава / Г. П. Миронова [и др.] // Новости мед.-биол. наук. – 2022. – Т. 22, № 1. – С. 174–179.

18. Paxinos, Y. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates / Y. Paxinos, C. Watson. – San Diego : Acad. Press, 1998. 256 p.

19. Молекулярная нейроморфология. Нейродегенерация М75 и оценка реакции нервных клеток на повреждение / Д. Э. Коржевский [и др.] ; под ред. Д. Э. Коржевского. – СПб. : СпецЛит, 2015. – 110 с.

20. Чубинидзе, А. И. К методике гистологического (морфологического) определения степени поражения центральной нервной системы / А. И. Чубинидзе // Архив патологии. – 1972. – № 11. – С. 77–78.

21. Different mossy fiber sprouting patterns in ILAE hippocampal sclerosis types / B. Schmeiser [et al.] // Epilepsy Res. – 2017. – Vol. 136. – P. 115–122. https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2017.08.002

References

1. Jokubauskas L., Baltrušaitytė A. Relationship between obstructive sleep apnoea syndrome and sleep bruxism: a systematic review. *Journal of Oral Rehabilitation*, 2017, vol. 44, no. 2, pp. 144–153. https://doi.org/10.1111/joor.12468

2. Li D., Kuang B., Lobbezoo F., de Vries N., Hilgevoord A., Aarab G. Sleep bruxism is highly prevalent in adults with obstructive sleep apnea: a large-scale polysomnographic study. *Journal of Clinical Sleep Medicine*, 2023, vol. 19, no. 3, pp. 443–451. https://doi.org/10.5664/jcsm.10348

3. Rubnikovich S. P., Baradina I. N., Denisova Yu. L., Samuilov I. V., Davydov M. V., Kul'chitskii V. A. Analysis of the functional state of the muscles of the maxillofacial region in dental patients with signs of bruxism in combination with obstructive sleep apnea. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2020, vol. 64, no. 3, pp. 341–349 (in Russian).

4. Zhao Y., Wang J., Li M., Ma T., Zhang X., Xu X., Zeng M., Peng Y. The influence of trigeminocardiac reflex on postoperative cardiac adverse events in patients undergoing cerebellopontine angle tumor resections: a case-control study. *World Neurosurgery*, 2023, vol. 172, pp. e291–e298. https://doi.org/10.1016/j.wneu.2023.01.010

5. González A. G., Montero J., Polo C. G. Sleep apnea-hypopnea syndrome and sleep bruxism: A systematic review. *Journal of Clinical Medicine*, 2023, vol. 12, no. 3, art. 910. https://doi.org/10.3390/jcm12030910

6. Dicieri-Pereira B., Gomes M. F., Giannasi L. C., Nacif S. R., Oliveira E. F., Salgado M. A. C., de Oliveira Amorim J. B., Oliveira W., Bressane A., de Mello Rode S. Down syndrome: orofacial pain, masticatory muscle hypotonia, and sleep disorders. *Sleep*, 2022, vol. 45, no. 11, art. zsac181. https://doi.org/10.1093/sleep/zsac181

7. Rubnikovich S. P., Grishchenkov A. S., Denisova Yu. L. Modern methods of orthopedic treatment in the complex rehabilitation of patients with muscular-articular dysfunctions in combination with signs of bruxism. *Stomatolog* [Dentist], 2020, no. 2, pp. 55–63 (in Russian).

8. Bandary D. E., Lustofin S. V., McLaren J. R., Dillon J. K. Surgical management of post-traumatic trigeminal neuralgia – case report and review of the literature. *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery*, 2022, vol. 80, no. 2, pp. 214–222. https://doi.org/10.1016/j.joms.2021.08.266

9. Sanner F. Acute right-sided facial pain: a case report. *International Endodontic Journal*, 2010, vol. 43, no. 2, pp. 154–162. https://doi.org/10.1111/j.1365–2591.2009.01654.x

10. Wettervik T. S., Snel D., Kristiansson P., Ericson H., Hamdeh S. A. Incidence of trigeminal neuralgia: A population-based study in Central Sweden. *European Journal of Pain*, 2023, vol. 27, no. 5, pp. 580–587. https://doi.org/10.1002/ejp.2081

11. Li Y., Yang G., Zhai X., Kang Y., Xie Q.-F. Somatosensory and trigeminal pathway abnormalities in Chinese patients with trigeminal neuralgia. *Odontology*, 2023, vol. 111, no. 1, pp. 217–227. https://doi.org/10.1007/s10266-022-00737-1

12. Vaculik M. F., Noorani A., Hung P. S.-P., Hodaie M. Selective hippocampal subfield volume reductions in classic trigeminal neuralgia. *NeuroImage*: *Clinical*, 2019, vol. 23, art. 101911. https://doi.org/10.1016/j.nicl.2019.101911

13. Noorani A., Hung P. S.-P., Zhang J. Y., Sohng K., Laperriere N., Moayedi M., Hodaie M. J. Pain relief reverses hippocampal abnormalities in trigeminal neuralgia. *Pain*, 2022, vol. 23, no. 1, pp. 141–155. https://doi.org/10.1016/j.jpain.2021.07.004

14. Altman J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology*, 1969, vol. 137, no. 4, pp. 433–457. https://doi.org/10.1002/cne.901370404

15. Tokal'chik Yu. P., Pashkevich S. G., Navitskaya V. V., Shan'ko Yu. G. Migration of perineurally injected mesenchymal stem cells after trauma of different localization in rats. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk = News of biomedical sciences*, 2018, vol. 18, no. 1, pp. 135–142 (in Russian).

16. Gladkova Zh. A., Kuznetsova T. E., Pashkevich S. G. Study of the structural and functional features of the spinal nucleus of the trigeminal nerve in the model of inflammation of the temporomandibular joints in rats. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk = News of biomedical sciences*, 2021, vol. 21, no. 2, pp. 42–50 (in Russian).

17. Mironova G. P., Kuz'menko E. V., Pashkevich S. G., Serdyuchenko N. S. Features of memory processes in the model of inflammation of the temporomandibular joint. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk = News of biomedical sciences*, 2022, vol. 22, no. 1, pp. 174–179 (in Russian).

18. Paxinos Y., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego, Academic Press, 1998. 256 p.

19. Korzhevskii D. E., Grigor'ev I. P., Kolos E. A., Sukhorukova E. G., Kirik O. V., Alekseeva O. S., Gusel'nikova V. V. *Molecular neuromorphology. M75 neurodegeneration and assessment of the response of nerve cells to damage.* Sankt-Peterburg, SpetsLit Publ., 2015. 110 p. (in Russian).

20. Chubinidze A. I. To the method of histological (morphological) determination of the degree of damage to the central nervous system. *Arkhiv patologii* [Archive of pathology], 1972, no. 11, pp. 77–78 (in Russian).

21. Schmeiser B., Li J., Brandt A., Zentner J., Doostkam S., Freiman T. M. Different mossy fiber sprouting patterns in ILAE hippocampal sclerosis types. *Epilepsy Research*, 2017, vol. 136, pp. 115–122. https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2017.08.002

Информация об авторах

Пашкевич Светлана Георгиевна – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: skypasht@mail.ru

Рубникович Сергей Петрович – член-корреспондент, д-р мед. наук, профессор, ректор. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: rubnikovich@mail.ru

Information about the authors

Svetlana G. Pashkevich – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: skypasht@mail.ru

Sergey P. Rubnikovich – Corresponding Member, D. Sc. (Med.), Professor, Rector. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: rubnikovichs@mail.ru

Кузнецова Татьяна Евгеньевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: tania_k@mail.ru

Кузьменко Елена Викторовна – канд. мед. наук, доцент. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: elena-stom@yandex.ru

Миронова Галина Павловна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь).

Тихонович Ольга Геннадьевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: tixon-ol@mail.ru

Гладкова Жанна Анатольевна – науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: gladkova_z@mail.ru

Жогаль Ксения Николаевна – мл. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ksenya.zhogal@gmail.com

Сердюченко Николай Сергеевич – член-корреспондент, д-р мед. наук, профессор, науч. консультант. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: temporo@mail.ru

Грищенков Арсений Сергеевич – канд. мед. наук, доцент, ст. преподаватель. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ip.arseny@gmail.com

Tatyana E. Kuznetsova – Ph. D. (Biol.). Leading Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tania_k@mail.ru

Elena V. Kuzmenko – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (Brovka Str., 3/3, 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: elena-stom@yandex.ru

Galina P. Mironova – Ph. D. (Biol.). Leading Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus).

Olga G. Tikhonovich – Ph. D. (Biol.). Leading Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tixon-ol@mail.ru

Zhanna A. Gladkova – Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: gladkova_z@mail.ru

Kseniya N. Zhogal – Junior Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ksenya.zhogal@gmail.com

Nikolay S. Serdyuchenko – Corresponding Member, D. Sc. (Med.), Professor, scientific consultant. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: temporo@mail.ru

Arseny S. Grishchenkov – Ph. D. (Med.), Associate Professor, Senior Lecturer. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, Brovka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ip.arseny@gmail.com

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 616-021.3-097-07:577.21
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-3-226-235

Поступила в редакцию 13.06.2022
Received 13.06.2022

Е. А. Полякова[1], М. В. Стёганцева[1], И. Е. Гурьянова[1], Д. В. Луцкович[1], Е. Я. Скоповец[1], А. В. Любушкин[1], Т. П. Володащик[1], В. И. Казак[1], Ю. В. Скибо[2], М. В. Белевцев[1]

[1]Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь
[2]Казанский федеральный университет, Казань, Российская Федерация

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОДУКТОВ РЕАРАНЖИРОВОК Т- И В-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ TREC И KREC У ПАЦИЕНТОВ С ВРОЖДЕННЫМИ ОШИБКАМИ ИММУНИТЕТА

Аннотация. Врожденные ошибки иммунитета, такие как первичные иммунодефициты у детей, представляют значимую проблему для здравоохранения, поэтому исключительно важным является совершенствование лабораторной диагностики данной патологии путем создания новых, эффективных методов раннего выявления нарушений, вовлекающих иммунные механизмы.

Цель данного исследования – оценка диагностической значимости определения количества копий кольцевых фрагментов ДНК Т- и В-клеточных рецепторов (TREC и KREC) посредством мультиплексной ПЦР в режиме реального времени у пациентов с генетически установленным диагнозом «первичный иммунодефицит».

Были исследованы образцы ДНК периферической крови здоровых детей (n = 98) в возрасте 0,0 (0–15,0) года, которые составили контрольную группу, и пациентов с генетически подтвержденным первичным иммунодефицитом (n = 95) в возрасте 7,2 (0,1–18,0) года.

Согласно полученным результатам, определение количества продуктов реаранжировок Т- и В-клеточных рецепторов (TREC и KREC) обладает высокой диагностической ценностью при тяжелой комбинированной иммунной недостаточности, синдромах хромосомной нестабильности, таких как атаксия-телеангиоэктазия и синдром Ниймегена, а также при заболеваниях, связанных с иммунной дисрегуляцией, агаммоглобулинемией. Определение продуктов TREC и KREC обладает низкой информативностью, а следовательно, не имеет диагностической значимости при таких видах первичных иммунодефицитов, как синдром Вискотта–Олдрича и хроническая гранулематозная болезнь.

Таким образом, определение продуктов реаранжировок рецепторов Т- и В-лимфоцитов (TREC и KREC) обладает высокой диагностической ценностью и может быть применимо в диагностике врожденных ошибок иммунитета, связанных с Т- и В-клеточной лимфопенией.

Ключевые слова: TREC, KREC, первичные иммунодефициты, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, ROC-анализ, диагностическая значимость

Для цитирования: Диагностическая значимость определения продуктов реаранжировок Т- и В-клеточных рецепторов TREC и KREC у пациентов с врожденными ошибками иммунитета / Е. А. Полякова [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2023. – Т. 20, № 3. – С. 226–235. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-3-226-235

Ekaterina A. Polyakova[1], Maria V. Stegantseva[1], Irina E. Guryanova[1], Dmitry V. Lutskovich[1], Katsiaryna Y. Skapavets[1], Aliaksandr V. Liubushkin[1], Tatiana P. Volodashchik[1], Victoria I. Kazak[1], Yulia V. Skibo[2], Mikhail V. Belevtsev[1]

[1]Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, v. Borovliany, Minsk region, Republic of Belarus
[2]Kazan Federal University, Kazan, Russian Federation

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF DETERMINING TREC AND KREC T- AND B-CELL RECEPTOR REARRANGEMENT PRODUCTS IN PATIENTS WITH INBORN IMMUNE ERRORS

Abstract. Inborn immunity errors such as primary immunodeficiencies in children represent a significant problem for public health, and it is undeniably important to improve the laboratory diagnosis of this pathology by creating new, effective methods for early detection of disorders involving immune mechanisms.

The ROC analysis was used to evaluate the diagnostic significance of determining the copy number of T- and B-cell receptor DNA circle fragments (TREC/KREC) by multiplex real-time PCR in patients with a genetically determined diagnosis of primary immunodeficiency.

Peripheral blood DNA samples of healthy children (*n* = 98) aged 0.0 (0–15.0) years, who constituted the control group, and of patients with genetically confirmed primary immunodeficiency (*n* = 95) aged 7.2 (0.1–18.0) years were examined.

It has been established that determining the number of T and B cell receptor rearrangement products (TREC and KREC) has a high diagnostic significance in severe combined immunodeficiency, chromosomal instability syndromes such as ataxia-teleangioectasia and Niimegen syndrome, diseases associated with immune dysregulation, agammoglobulinemia. Determining TREC and KREC is not informative in immunodeficiencies with non-lymphoid cell dysfunction or disorders that do not affect T- and B-cell receptor gene rearrangement such as the Wiskott–Aldrich syndrome and the chronic granulomatous disease.

Determining TREC, KREC has a high diagnostic significance and can be applied in diagnosis of congenital immunity errors associated with T- and B-cell lymphopenia.

Keywords: TREC, KREC, primary immunodeficiencies, real-time polymerase chain reaction, ROC assay, diagnostic significance

For citation: Polyakova E. A., Stegantseva M. V., Guryanova I. E., Lutskovich D. V., Skapavets K. Y., Liubushkin A. V., Volodashchik T. P., Kazak V. I., Skibo Yu. V., Belevtsev M. V. Diagnostic significance of determining TREC and KREC T- and B-cell receptor rearrangement products in patients with inborn immune errors. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2023, vol. 20, no. 3, pp. 226–235 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-3-226-235

Введение. Количественное определение внехромосомных кольцевых фрагментов ДНК Т-клеточного рецептора (TREC) (англ. *T-cell receptor excision circles*) и В-клеточного рецептора (KREC) (англ. *kappa-deleting recombination excision circles*) может быть применимо для мониторинга недавних тимических эмигрантов и неогенеза лимфоцитов костного мозга и сопровождаться высокой информативностью получаемых результатов [1]. TREC и KREC являются побочными продуктами эписомальной кольцевой ДНК, которые образуются при прохождении рецепторами наивных Т- и В-лимфоцитов процесса V(D)J рекомбинации, который контролируется генами антигенных рецепторов с активными или неактивными ядерными компартментами и изменениями в архитектуре хроматина. V(D)J рекомбинация происходит только в лимфоцитах, где она регулируется в контексте клональной специфичности [2, 3]. В этом контексте нарушается процесс образования TREC и KREC и, соответственно, отмечается их низкое содержание либо полное отсутствие [3].

Подбор праймеров и зондов, специфичных к эксцизионным фрагментам рецепторов Т- и В-лимфоцитов, а также создание калибраторов позволяют разработать количественный метод посредством ПЦР в режиме реального времени для определения значений TREC и KREC в периферической крови [4–6]. Исследование уровней TREC/KREC особенно значимо при врожденных ошибках иммунитета – первичных иммунодефицитах (ПИД), мониторинге иммунного восстановления при приобретенных иммунодефицитах, обусловленных трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, лучевой терапией, а также при скрининге новорожденных [7–11].

Дефекты V(D)J рекомбинации лежат в основе ПИД [12].

Согласно литературным данным, результаты проведенных исследований по выявлению ПИД с использованием определения TREC/KREC показали, что TREC коррелирует с Т-клеточной лимфопенией у детей с тяжелой комбинированной иммунной недостаточностью (ТКИН) [12], а KREC – с уровнем В-лимфоцитов у пациентов с Х-сцепленной агаммаглобулинемией [13, 14]. Некоторые формы ПИД, такие как комбинированные иммунодефициты, характеризующиеся лимфопенией Т- и В-лимфоцитов, также могут быть диагностированы с помощью метода количественного определения копий TREC и KREC [14].

Цель исследования – оценить диагностическую значимость определения количества копий кольцевых фрагментов ДНК Т- и В- клеточных рецепторов (TREC и KREC) с использованием мультиплексной ПЦР в режиме реального времени у пациентов с генетически установленным диагнозом первичного иммунодефицита.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования послужили образцы периферической крови 98 здоровых детей в возрасте 0,0 (0–15,0) года, которые составили контрольную группу, и 95 пациентов с ПИД в возрасте 7,2 (0,1–18,0) года (из них с ТКИН – 12 детей, с атаксией-телеангиоэктазией – 14, с синдромом Ниймегена – 17, с Х-сцепленной агаммаглобулинемией – 15, с заболеваниями иммунной дисрегуляции – 15, с синдромом Виксотта–Олдрича (СВО) – 10, с Х-сцеп-ленной хронической гранулематозной болезнью (ХГБ) – 12 пациентов).

Для ПЦР были использованы праймеры и флуоресцентные метки: прямой праймер ALB (5′-tgaacaggcgaccatgctt-3′), обратный праймер 5′-ctctccttctcagaaagtgtgcatat-3′, флуоресцентная метка 5′-FAM-tgctgaaacattcaccttccatgcaga-BHQ1-3′; для TREC – прямой праймер 5′-ccatgctgacacctctggtt-3′, обратный праймер cttcattcaccgttctcacga, флуоресцентная метка **HEX-**cacggtgatgcataggcacctgc-**BHQ1**-3′; для KREC – прямой праймер 5′-tcagcgcccattacgtttct-3′, обратный праймер 5′-gtgagggacacgcagcc-3′, флуоресцентная метка 5′-**ROX** -ccagctcttaccctagagtttctgcacgg-**BHQ2**-3′ («Праймтех», Беларусь) [11–13].

Количество TREC и KREC определяли методом ПЦР в режиме реального времени с использованием амплификатора CFX96 (Bio-Rad, США).

В качестве калибраторов использовали серийные разведения плазмидной ДНК, содержащей вставки альбумина (ALB), TREC и KREC, в концентрации 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 копий в 5 мкл.

Количественные значения TREC, KREC на 1 млн лейкоцитов периферической крови определяли по формуле

$$[\text{среднее (SQ) TREC (KREC)}/\text{среднее (SQ) ALB}/2] \cdot 1\,000\,000.$$

Реакционная смесь для ПЦР состояла из 12,5 мкл ArtMix («АртБиоТех», Беларусь), 6,25 мкл воды и смеси праймеров в концентрации 6 пмоль для прямого и обратного праймеров и 4 пмоль для флуоресцентной метки. Постановка опытов осуществлялась в двух повторах. Данные анализировали с помощью программы Real time RCR Data Analysis (Bio-Rad, США).

Для статистической обработки данных и построения графиков использовали программное обеспечение GraphPad Prizm 6.0.

Значимость статистических различий определяли с помощью непараметрического *U*-критерия Манна–Уитни (Mann–Whitney *U* test). Различия считали статистически значимыми при $p < 0{,}05$. Данные представлены в виде медианы (25 %–75 %).

Диагностическую значимость анализировали путем построения характеристических ROC-кривых и определения площади под кривой AUC (AUC – Area Under Curve).

Для интерпретации показателя площади под кривой использовали общепризнанную экспертную шкалу [15]. Значение AUC должно варьироваться в диапазоне от 0,5 до 1,0, для высокой информативности показатель должен быть близок к 1.

Результаты и их обсуждение. С целью определения значимости исследуемых показателей TREC и KREC для прогнозирования наличия иммунологических нарушений проведен анализ содержания данных показателей в периферической крови 95 пациентов с генетически подтвержденным диагнозом ПИД.

Для оценки диагностической значимости применения определения TREC/KREC были исследованы уровни данных показателей в образцах периферической крови 12 пациентов с диагнозом ТКИН с мутациями в генах *RAG1*, *IL2RG*, *IL7R*, *JAK3*, *ADA*. Контрольную группу составили здоровые дети ($n = 63$) той же возрастной категории.

В группе здоровых детей уровень TREC и KREC составил 34 814 (16 744–75 293) и 17 653 (7266,5–65991,5) копии соответственно в сравнении с группой пациентов с ТКИН ((Т-В–) и (Т-В+)), у которых значения TREC были значимо снижены в сравнении с контрольной группой ($p < 0{,}0001$, $U = 0$).

У пациентов с (Т-В–) и (Т-В+) ТКИН уровни TREC были также снижены в сравнении со здоровыми детьми того же возраста (Me = 0) ($p < 0{,}0001$, $U = 0$). У пациентов с (Т-В+) ТКИН уровни KREC значимо не отличались от показателей здоровых детей – 4834 (2750–9429) ($p = 0{,}98$, $U = 237$).

Для каждой группы была определена диагностическая значимость определения TREC/KREC (рис. 1).

$AUC_{TREC+KREC}$ для диагностики Т- и В-клеточной лимфопении у пациентов с ТКИН с иммунофенотипом (Т-В–) составила 1,00 ± 0,0 ($p < 0{,}0001$), диагностическая чувствительность и специфичность – 100 % (рис. 1, *a*). Для диагностики ТКИН у пациентов с (Т-В+) ТКИН AUC_{KREC} составила 0,68 ± 0,11 ($p = 0{,}09$), диагностическая чувствительность – 12,2 %, специфичность – 98,9 % (рис. 1, *b*).

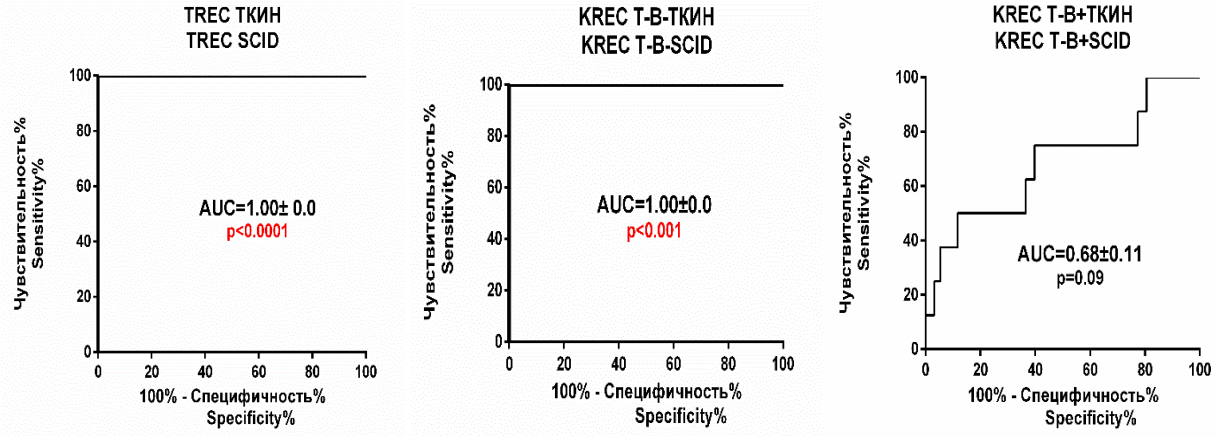


Рис. 1. ROC-кривые показателей TREC (*a*) и KREC (*b*) при определении диагностической значимости анализа при ТКИН

Fig. 1. ROC curves of TREC (*a*) and KREC (*b*) in determining the diagnostic significance of the assay for SCID diagnosis

По данным J. Spek van der с соавт., E. Rechavi с соавт., для диагностики ТКИН определение TREC в периферической крови имеет наивысшие специфичность и чувствительность в сравнении с данными, полученными при иммунофенотипировании, которые демонстрируют более низкие показатели как специфичности, так и чувствительности [16–18].

Молекулярной основой Х-сцепленной агаммаглобулинемии (Х-АГЕ) является нарушение развития В-лимфоцитов из-за мутации тирозинкиназы Брутона (*Btk*) на уровне пре-В-клеточного рецептора. Пациенты наследуют дефект, который не позволяет клеткам-предшественникам (В-клеткам) формировать зрелые циркулирующие В-лимфоциты в костном мозге, а следовательно, данные клетки не могут пролиферировать и дифференцироваться в антителопродуцирующие плазматические клетки во вторичных лимфоидных органах. У пациентов с Х-АГЕ отмечается отсутствие В-лимфоцитов (CD19+) с нормальным уровнем содержания Т-лимфоцитов (CD3+).

Согласно полученным нами данным, количество TREC и KREC в контрольной группе детей (n = 64) составило 66494,5 (44 506–97450,25) и 17387,5 (6543,5–62636,25) копии соответственно.

У пациентов обследованной группы количество копий TREC значимо не отличалось от их значений у здоровых детей – 16 468 (12179,5–37344,25) (p = 0,16, U = 329), а количество копий KREC было существенно снижено – до 34 (18,5–74,75) (p < 0,0001, U = 0).

Площадь под кривой AUC_{TREC} при анализе данных информативности у пациентов с Х-АГЕ составила 0,62 ± 0,07 (p = 0,16), диагностическая чувствительность и специфичность – 14

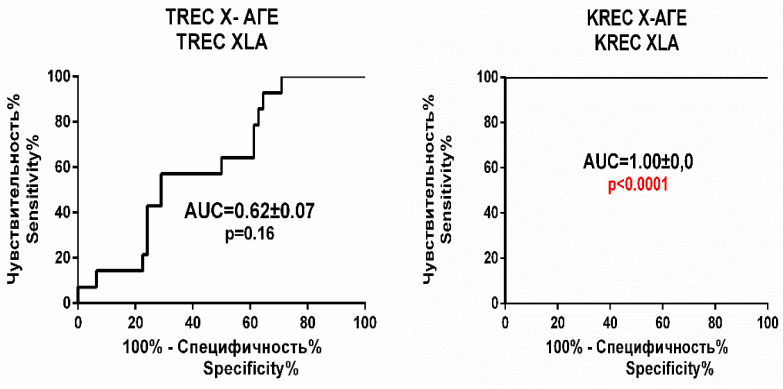


Рис. 2. ROC-кривые показателей TREC (*a*) и KREC (*b*) при определении диагностической значимости анализа при агаммаглобулинемии

Fig. 2. ROC curves of TREC (*a*) and KREC (*b*) in determining the diagnostic significance of the assay for agammaglobulinemia

и 93,6 % соответственно (рис. 2, *a*), под кривой AUC_{KREC} – 1,00 ± 0,0 ($p < 0,0001$), а диагностическая чувствительность и специфичность – 100 % (рис. 2, *b*). Это свидетельствует о высокой диагностической значимости определения именно уровней KREC в диагностике Х-АГЕ.

Атаксия-телеангиэктазия (АТ) и синдром Ниймегена представляют собой две разные, но тесно связанные между собой патологии, обусловленные дефектами репарации ДНК. Заболевания АТ и синдром Ниймегена схожи и включают хромосомную нестабильность, радиочувствительность и дефекты клеточного цикла, обычно вызываемые ионизирующим излучением [19, 20].

У пациентов с синдромами хромосомной нестабильности субпопуляционный состав минорных лимфоцитов может быть как нормальным, так и характеризоваться Т- и В-клеточной лимфопенией, которая прогрессирует с возрастом. В связи с этим заподозрить наличие данной патологии у пациентов только по данным иммунофенотипирования удается не всегда. Определение TREC и KREC, по данным ряда авторов может представлять собой реальную альтернативу и имеет высокую диагностическую ценность [20, 21].

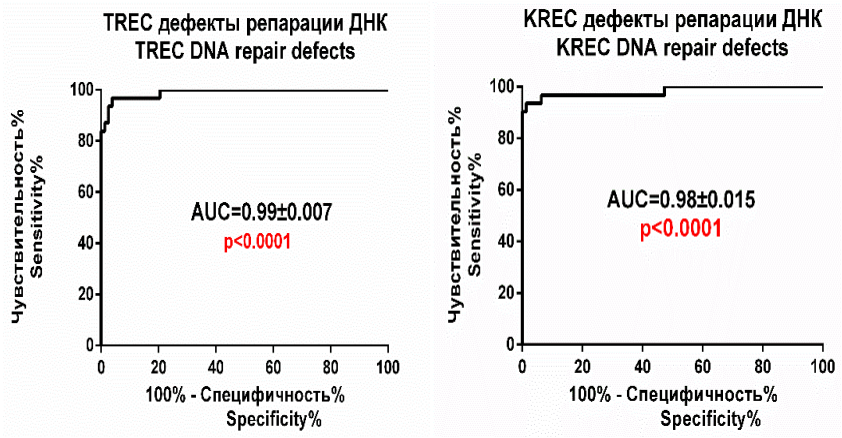
Нами были исследованы уровни TREC и TREC в группе пациентов с синдромами хромосомной нестабильности – АТ и синдромом Ниймегена с мутациями в генах *ATM* и *NBN*. Группу сравнения составили здоровые дети ($n = 78$) той же возрастной категории.

Медиана значений TREC и KREC в группе здоровых детей составила 31 835 (14574,25–62628,75) и 13 899 (6217,5–40313,75) копий соответственно. Значения копий TREC и KREC в исследуемой группе пациентов были значимо снижены относительно показателей контрольной группы – медиана значений TREC составила 199 (0–1440,5) копий ($p < 0,0001$, $U = 24$), KREC – 76 (0–369,0) копий ($p < 0,0001$, $U = 24$) .

AUC_{TREC} для диагностики Т- и В-клеточной лимфопении у пациентов с дефектами репарации ДНК составила 0,99 ± 0,007 ($p < 0,0001$), диагностическая чувствительность – 93,4 %, специфичность – 97,4 % (рис. 3, *a*). AUC_{KREC} составила 0,98 ± 0,015 ($p < 0,0001$)), диагностическая чувствительность – 93,5 %, специфичность – 98,7 % (рис. 3, *b*).

Полученные данные свидетельствуют о высокой диагностической значимости определения TREC/KREC в диагностическом процессе ПИД с синдромами хромосомной нестабильности, такими как АТ и синдром Ниймегена.

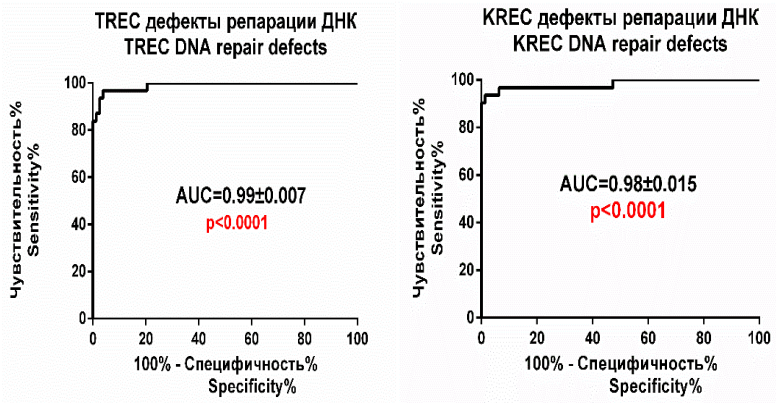
При заболеваниях иммунной дисрегуляции имеющиеся лимфоциты могут быть дисфункциональными, что способствует развитию чрезмерной аутореактивности и, как следствие, аутоиммунных заболеваний. Аутоиммунная полиэндокринопатия, кандидоз и эктодермальная дистрофия, аутоиммунный лимфопролиферативный синдром, полиэндокринопатия с нарушением иммунорегуляции – это нарушения, при которых аутоиммунитет является отличительной чертой клинической картины заболевания [22].



a *b*

Рис. 3. ROC-кривые показателей TREC (*a*) и KREC (*b*) при определении диагностической значимости анализа при синдромах хромосомной нестабильности

Fig. 3. ROC curves of TREC (*a*) and KREC (*b*) in determining the diagnostic significance of the analysis in diagnosis of chromosome instability syndromes



a *b*

Рис. 4. ROC-кривые показателей TREC (*a*) и KREC (*b*) при определении диагностической значимости анализа при синдромах с иммунной дисрегуляцией

Fig. 4. ROC curves of TREC (*a*) and KREC (*b*) in determining the diagnostic significance of the analysis in diagnosis of immune dysregulation syndromes

При проведении иммунофенотипирования минорных субпопуляций лимфоцитов не всегда удается выявить заболевания, связанные с иммунной дисрегуляцией. В диагностике данной патологии требуются как клинические, так и дополнительные лабораторные исследования [23].

По результатам нашего исследования в контрольной группе здоровых детей (n = 37) медиана значений TREC составила 16 493 (9154–29 364), KREC – 7231 (5090–11 917) копию.

Уровни TREC и KREC в исследуемой группе пациентов с мутациями в генах *PIK3CD*, *FAS*, *AIRE* были значимо снижены относительно показателей контрольной группы – медиана значений TREC и KREC составила 1678 (515,5–3115,5) (p < 0,0001, U = 4) и 1668 (299,50–3628,5) (p < 0,0001, U = 72) копий соответственно.

Площадь под кривой AUC_{TREC} составила 0,99 ± 0,007 (p < 0,0001), диагностическая чувствительность – 93,3 %, специфичность – 96,3 % (рис. 4, *a*). AUC_{KREC} составила 0,87 ± 0,06 (p < 0,0001), диагностическая чувствительность – 86,6 %, специфичность – 94,6 % (рис. 4, *b*).

Полученные данные свидетельствуют и высокой информативности применения анализа на определение уровней TREC/KREC в первичной диагностике заболеваний, связанных с иммунной дисрегуляцией.

При СВО наблюдается значительное нарушение функции как В-, так и Т-лимфоцитов. Данное заболевание обусловлено генетической поломкой в гене *WAS*, кодирующем белок, который играет основную роль в реорганизации актинового цитоскелета лимфоцитов, передаче сигналов и апоптозе, но не влияет на количество лимфоцитов [24].

Нами не выявлено значимых отличий между значениями TREC и KREC у пациентов с СВО с мутациями в гене *WAS* в сравнении с таковыми в контрольной группе, в которую были включены 98 здоровых детей. Так, значения TREC и KREC в группе контроля составили 40538,5 (17785,75–75 620) и 20 010 (7265,25–77567,25) соответственно, а в исследуемой группе пациентов – 11 459 (5377–41 502) (p = 0,18, U = 356) и 7443 (4255–16415,75) копии (p = 0,22, U = 375).

AUC_{TREC} для диагностики СВО составила 0,63 ± 0,1 (p = 0,16), чувствительность и специфичность – 30 и 78,1 % соответственно (рис. 4; 5, *a*). AUC_{KREC} составила 0,61 ± 0,09 (p = 0,23), чувствительность – 20,0 %, специфичность – 92,35 % (рис. 5, *b*).

С помощью ROC-анализа установлено, что значения диагностической чувствительности и специфичности были статистически не значимы. Это свидетельствует о невысокой ценности определения TREC/KREC у пациентов с СВО.

ХГБ представляет собой ПИД, вызванный дефектами в генах, кодирующих любой из компонентов НАДФН-оксидазы, ответственных за респираторный взрыв фагоцитарных лейкоцитов [25]. При данной патологии нарушение затрагивает клетки миелоидного ряда и не нарушает реаранжировку генов рецепторов лимфоцитов. Соответственно, количество копий TREC и KREC у таких пациентов в диапазоне нормы.

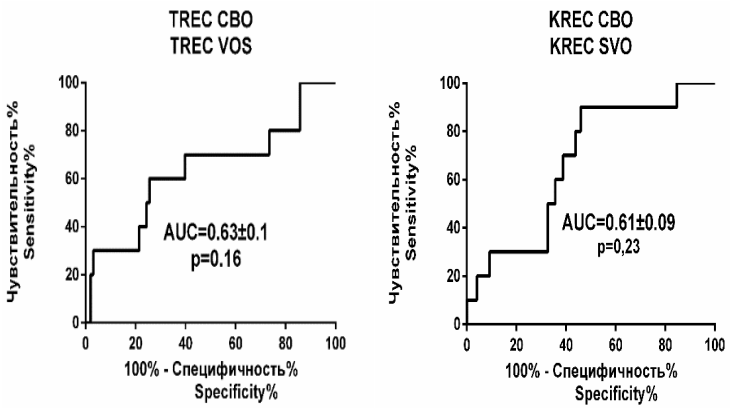


Рис. 5. ROC-кривые показателей TREC (*a*) и KREC (*b*) при определении диагностической значимости анализа при синдроме Вискотта–Олдрича

Fig. 5. ROC curves of TREC (A) and KREC (B) in determining the diagnostic significance of the analysis in diagnosis of the Wiskott–Aldrich syndrome

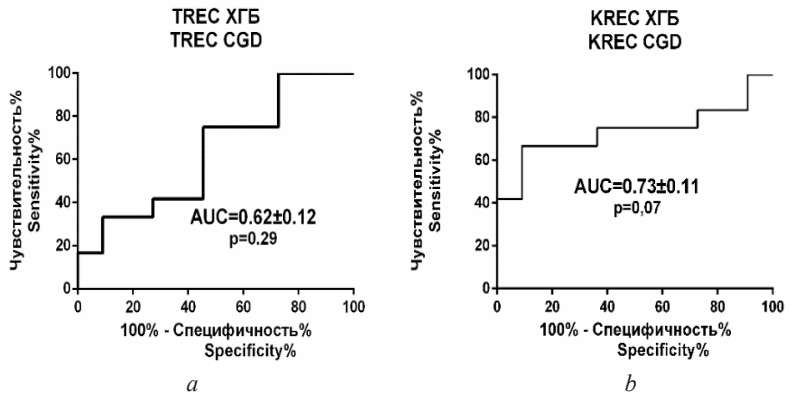


Рис. 6. ROC-кривые показателей TREC (*a*) и KREC (*b*) при определении диагностической значимости анализа при хронической гранулематозной болезни

Fig. 6. ROC curves of TREC (*a*) and KREC (*b*) in determining the diagnostic significance of the analysis in diagnosis of the chronic granulomatous disease

В исследованной контрольной группе здоровых детей (n = 11) уровни TREC и KREC составили 26 369 (14 859,5–30 416) и 7977 (5346,5–12595,5) копий.

Значимых различий между значениями TREC и KREC у пациентов с ХГБ с мутациями в гене *CYBB* в сравнении с здоровыми детьми не установлено. Количество TREC составило 26 369 (14 859,5–30 416) (p = 0,3, U = 49), а количество KREC – 18 012 (8814,5– 31 693) (p = 0,1, U = 35).

AUC_{TREC} составила 0,62 ± 0,012 (p = 0,29), диагностическая чувствительность – 33,4 % и специфичность – 90,1 % (рис. 6, *a*). AUC_{KREC} составила 0,73 ± 0,11 (p = 0,06), диагностическая чувствительность – 66,0 %, специфичность – 90,2 % (рис. 6, *b*).

С помощью ROC-анализа продемонстрировано, что определение TREC/KREC имеет низкую чувствительность и высокую специфичность, однако показатели диагностической чувствительности и специфичности статистически не значимы, что свидетельствует о низкой информативности определения TREC/KREC у пациентов с ХГБ.

Заключение. Представленные результаты оценки диагностической значимости ROC-анализа в выявлении врожденных ошибок иммунитета показали, что определение значений TREC и KREC имеет высокую диагностическую ценность, высокую чувствительность и специфичность в выявлении таких первичных иммунодефицитов, как тяжелая комбинированная иммунная недостаточность, синдромы хромосомной нестабильности, агаммаглобулинемия и заболевания, связанные с иммунной дисрегуляцией.

Определение уровней TREC и KREC обладает низкой информативностью и, соответственно, не имеет диагностической значимости при таких видах первичных иммунодефицитов, как синдром Вискотта–Олдрича и хроническая гранулематозная болезнь.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Puck, J. M. Laboratory technology for population-based screening for SCID in neonates: The winner Is T-cell Receptor Excision Circles (TRECs) // J. Allergy Clin. Immunol. – Vol. 129, N 3. – P. 607–616. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.01.032

2. Quantifying thymic export: combining models of naive T cell proliferation and TCR excision circle dynamics gives an explicit measure of thymic output / I. Bains [et al.] // J. Immunol. – 2009. – Vol. 183, N 7. – P. 4329–4336. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900743

3. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion / M. C. van Zelm [et al.] // J. Exp. Med. – 2007. – Vol. 204, N 3. – P. 645–655. https://doi.org/10.1084/jem.20060964

4. Detection of newly produced T and B lymphocytes by digital PCR in blood stored dry on nylon flocked swabs / M. V. Tessitore [et al.] // J. Transl. Med. – 2017. – Vol. 15, N 1. https://doi.org /10.1186/s12967-017-1169-9

5. Development of a multiplex real-time PCR assay for the newborn screening of SCID, SMA, and XLA / C. Gutierrez-Mateo [et al.] // Int. J. Neonatal Screen. – 2019. – Vol. 5, N 4. https://doi.org/10.3390/ijns5040039

6. Определение эксцизионных колец ДНК Т- и В-клеточного рецептора методом мультиплексной ПЦР в реальном времени : инструкция по применению / Е. А. Полякова [и др.]. – Минск, 2020. – 24 с.

7. van Zelm, M. C. Editorial: primary immunodeficiencies worldwide / M. C. van Zelm, A. Condino-Neto, M. R. Barbouche // Front. Immunol. – 2020. – Vol. 10. – Art. 3148. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03148

8. Use of V(D)J recombination excision circles to identify T- and B-cell defects and to monitor the treatment in primary and acquired immunodeficiencies / F. Serana [et al.] // J. Transl. Med. – 2013. – Vol. 11, N 119. https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-119

9. Newborn screening for severe combined immunodeficiency in 11 screening programs in the United States / A. Kwan [et al.] // JAMA. – 2014. – Vol. 312, N 7. – P. 729–738. https://doi.org/10.1001/jama.2014.9132

10. King, J. Newborn screening for primary immunodeficiency diseases: the past, the present and the future / J. King, J. F. Ludvigsson, L. Hammarström // Int. J. Neonatal Screen. – 2017. – Vol. 3, N 3. – Art. 19. https://doi.org/10.3390/ijns3030019

11. Neonatal screening in Europe revisited: an ISNS perspective on the current state and developments since 2010 / J. G. Loeber [et al.] // Int. J. Neonatal Screen. – 2021. – Vol. 7, N 1. – Art. 15. https://doi.org/10.3390/ijns7010015

12. Puck, J. M. Newborn screening for severe combined immunodeficiency and T-cell lymphopenia / J. M. Puck // Immunol. Rev. – 2019. – Vol. 287, N 1. – P. 241–252. https://doi.org/10.1111/imr.12729

13. Kappa-deleting recombination excision circle levels remain low or undetectable throughout life in patients with X-linked agammaglobulinemia / J. King [et al.] // Pediatr. Allergy Immunol. – 2018. – Vol. 29, N 4. – P. 453–456. https://doi.org/10.1111/pai.12893

14. Disturbed B and T cell homeostasis and neogenesis in patients with ataxia teleagiectasia / M. Kraus [et al.] // J. Clin. Immunol. – 2014. – Vol. 34, N 5. – P. 561–572. https://doi.org/10.1007/s10875-014-0044-1

15. Metz, C. E. Fundamental ROC Analysis / C. E. Metz // Handbook of Medical Imaging / eds. : J. Beutel, H. Kundel, R. Van Metter. – Bellingham, 2000. – Vol. 1 : Physics and Psychophysics. – P. 751–769.

16. TREC based newborn screening for severe combined immunodeficiency disease: A systematic review / Spek J. van der [et al.] // J. Clin. Immunol. – 2015. – Vol. 4, N 35. – P. 416–430. https://doi.org/10.1007/s10875-015-0152-6

17. First year of Israeli Newborn Screening for severe combined immunodeficiency-clinical achievements and insights / E. Rechavi [et al.] // Front. Immunol. – 2017, N 8. – Art. 1448. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01448

18. TREC and KREC levels as a predictors of lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry / I. A. Korsunskiy [et al.] // Front. Physiol. – 2019, N 9. – Art. 1877. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01877

19. Disturbed B and T cell homeostasis and neogenesis in patients with ataxia telangiectasia / M. Kraus [et al.] // J. Clin. Immunol. – 2014. – Vol. 34, N 5. – P. 561–572. https://doi.org/10.1007/s10875-014-0044-1

20. Nijmegen breakage syndrome detected by newborn screening for T cell receptor excision circles (TRECs) / J. P. Patel [et al.] // J. Clin. Immunol. – 2015. – Vol. 35, N 2. –P. 227–233.

21. Ataxia telangiectasia diagnosed on newborn screening-case cohort of 5 years' experience / A. B. Mandola [et al.] // Front. Immunol. – 2020. – Vol. 10. – Art. 2940. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02940_

22. Autoimmune and inflammatory manifestations occur frequently in patients with primary immunodeficiencies / A. Fischer [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. – 2017. – Vol. 140, N 5. – P. 1388–1393.e8. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.12.978

23. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee / S. G. Tangye [et al.] // J. Clin. Immunol. – 2020. – Vol. 40, N 1. – P. 24–64. https://doi.org/10.1007/s10875-019-00737-x

24. B cell-intrinsic deficiency of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) causes severe abnormalities of the peripheral B-cell compartment in mice / M. Recher [et al.] // Blood. – 2012. – Vol. 119, N 12. – P. 2819–2828. https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-379412

25. Enhanced inflammatory responses of chronic granulomatous disease leukocytes involve ROS independent activation of NFkappaB / J. Bylund [et al.] // Eur. J. Immunol. – 2007. – Vol. 37, N 4. – P. 1087–1096. https://doi.org/10.1002/eji.200636651

References

1. Puck J. M. Laboratory technology for population-based screening for SCID in neonates: The winner is T-cell Receptor Excision Circles (TRECs). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 129, no. 3, pp. 607–616. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.01.032

2. Bains I., Thiébaut R., Yates A. J., Callard R. Quantifying thymic export: combining models of naive T cell proliferation and TCR excision circle dynamics gives an explicit measure of thymic output. *Journal of Immunology*, 2009, vol. 183, no. 7, pp. 4329–4336. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900743

3. van Zelm, M. C., Szczepański T., van der Burg M., van Dongen J. J. M. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *Journal of Experimental Medicine*, 2007, vol. 204, no. 3, pp. 645–655. https://doi.org/10.1084/jem.20060964

4. Tessitore M. V., Sottini A., Roccaro A. M., Ghidini C., Bernardi S., Martellosio G., Serana F., Imberti L. Detection of newly produced T and B lymphocytes by digital PCR in blood stored dry on nylon flocked swabs. *Journal of Translational Medicine*, 2017, vol. 15, no. 1. https://doi.org/10.1186/s12967-017-1169-9

5. Gutierrez-Mateo C., Timonen A., Vaahtera K., Jaakkola M., Hougaard D. M., Bybjerg-Grauholm J. [et al.] Development of a multiplex real-time PCR assay for the newborn screening of SCID, SMA, and XLA. *International Journal of Neonatal Screening*, 2019, vol. 5, no. 4. https://doi.org/10.3390/ijns5040039

6. Polyakova E. A., Stegantseva M. V., Aleshkevich S. N., Zharankova Yu. S., Minakovskaya N. V., Ostroushko D. V., Beresten' S. A., Belevtsev M. V. *Determination of excision circles of T- and B-cell receptor DNA by multiplex real-time PCR: instructions for use.* Minsk, 2020. 24 p. (in Russian).

7. van Zelm M. C., Condino-Neto A., Barbouche M. R. Editorial: primary immunodeficiencies worldwide. *Frontiers in Immunology*, 2020, vol. 10, art. 3148. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03148

8. Serana F., Chiarini M., Zanotti C., Sottini A., Bertoli D., Bosio A., Caimi L., Imberti L. Use of V(D)J recombination excision circles to identify T- and B-cell defects and to monitor the treatment in primary and acquired immunodeficiencies. *Journal of Translational Medicine*, 2013, vol. 11, no. 119. https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-119

9. Kwan A., Abraham R. S., Currier R., Brower A., Andruszewski K., Abbott J. K., Baker M. Newborn screening for severe combined immunodeficiency in 11 screening programs in the United States. *JAMA*, 2014, vol. 312, no. 7, pp. 729–738. https://doi.org/10.1001/jama.2014.9132

10. King J., Ludvigsson J. F., Hammarström L. Newborn screening for primary immunodeficiency diseases: the past, the present and the future. *International Journal of Neonatal Screening*, 2017, vol. 3, no. 3, art. 19. https://doi.org/10.3390/ijns3030019

11. Loeber J. G., Platis D., Zetterström R. H., Almashanu Sh., Boemer F., Bonham J. R. [et al.] Neonatal screening in Europe revisited: an ISNS perspective on the current state and developments since 2010. *International Journal of Neonatal Screening*, 2021, vol. 7, no. 1, art. 15. https://doi.org/10.3390/ijns7010015

12. Puck J. M. Newborn screening for severe combined immunodeficiency and T-cell lymphopenia. *Immunological Reviews*, 2019, vol. 287, no. 1, pp. 241–252. https://doi.org/10.1111/imr.12729

13. King J., Borte S., Brodszki N., von Döbeln U., Edvard Smith C. I., Hammarström L. Kappa-deleting recombination excision circle levels remain low or undetectable throughout life in patients with X-linked agammaglobulinemia. *Pediatric Allergy and Immunology*, 2018, vol. 29, no. 4, pp. 453–456. https://doi.org/10.1111/pai.12893

14. Kraus M., Lev A., Simon A. J., Levran I., Nissenkorn A., Levi Y. B. [et al.] Disturbed B and T cell homeostasis and neogenesis in patients with ataxia teleagiectasia. *Journal of Clinical Immunology*, 2014, vol. 34, no. 5, pp. 561–572. https://doi.org/10.1007/s10875-014-0044-1

15. Metz C. E. Fundamental ROC Analysis. *Handbook of Medical Imaging. Vol. 1. Physics and Psychophysics*. Bellingham, 2000, pp. 751–769.

16. van der Spek J., Groenwold R. H. H., van der Burg M., van Montfrans J. M. TREC based newborn screening for severe combined immunodeficiency disease: A systematic review. *Journal of Clinical Immunology*, 2015, no. 4, no. 35, pp. 416–430. https://doi.org/10.1007/s10875-015-0152-6

17. Rechavi E., Lev A., Simon A. J., Stauber T., Daas S., Saraf-Levy T. [et al.]. First year of Israeli Newborn Screening for severe combined immunodeficiency – Clinical achievements and insights. *Frontiers in Immunology*, 2017, no. 8, art. 1448. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01448

18. Korsunskiy I. A., Blyuss O., Gordukova M., Davydova N., Gordleeva S., Molchanov R. [et al.] TREC and KREC levels as a predictors of lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Frontiers in Physiology*, 2019, no. 9, art. 1877. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01877

19. Kraus M., Lev A., Simon A. J., Levran I., Nissenkorn A., Levi Y. B. [et al.]. Disturbed B and T cell homeostasis and neogenesis in patients with ataxia telangiectasia. *Journal of Clinical Immunology*, 2014, vol. 34, no. 5, pp. 561–572. https://doi.org/10.1007/s10875-014-0044-1

20. Patel J. P., Puck J. M., Srinivasan R., Brown C., Sunderam U., Kundu K., Brenner S. E., Gatti R. A., Church J. A. Nijmegen breakage syndrome detected by newborn screening for T cell receptor excision circles (TRECs). *Journal of Clinical Immunology*, 2015, vol. 35, no. 2, pp. 227–233. https://doi.org/10.1007/s10875-015-0136-6

21. Mandola A. B., Reid B., Sirror R., Brager R., Dent P., Chakroborty P., Bulman D. E., Roifman C. M. Ataxia telangiectasia diagnosed on newborn screening-case cohort of 5 years' experience. *Frontiers in Immunology*, 2020, vol. 10, art. 2940. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02940

22. Fischer A., Provot J., Jais J.-P., Alcais A., Mahlaoui N. Autoimmune and inflammatory manifestations occur frequently in patients with primary immunodeficiencies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology,* 2007, vol. 140, no. 5, pp. 1388–1393.e8. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.12.978

23. Tangye S. G., Al-Herz W., Bousfiha A., Chatila T., Cunningham-Rundles Ch., Etzioni A. [et al.] Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *Journal of Clinical Immunology*, 2020, vol. 40, no. 1, pp. 24–64. https://doi.org/10.1007/s10875-019-00737-x

24. Recher M., Burns S. O., de la Fuente M. A., Volpi S., Dahlberg C., Walter J. E. [et al.] B cell-intrinsic deficiency of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) causes severe abnormalities of the peripheral B-cell compartment in mice. *Blood*, 2012, vol. 119, no. 12, pp. 2819–2828. https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-379412

25. Bylund J., MacDonald K. L., Brown K. L., Mydel P., Collins L. V., Hancock R. E. W., Speert D. P. Enhanced inflammatory responses of chron K. L. ic granulomatous disease leukocytes involve ROS independent activation of NFkappaB. *European Journal of Immunology*, 2007, vol. 37, no. 4, pp. 1087–1096. https://doi.org/10.1002/eji.200636651

Информация об авторах

Полякова Екатерина Александровна – науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0002-0706-6622. E-mail: polyakovakat86@gmail.com

Стёганцева Мария Владимировна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0002-8692-3767. E-mail: Stsegantsevam@gmail.com

Гурьянова Ирина Евгеньевна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000- 0002-9696-3949. E-mail:guryanovairina1985@gmail.com

Луцкович Дмитрий Викторович – науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0002-3998-8023. E-mail: lutskovichdm@gmail.com

Скоповец Екатерина Ярославовна – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрун-зенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0002-4510-6760. E-mail: Skopovets@yandex.ru

Любушкин Александр Владимирович – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0002-6127-7404. E-mail: sasha36601@yandex.by

Володащик Татьяна Петровна – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0003-1523-0725. E-mail: tvolodashchik@gmail.com

Казак Виктория Игоревна – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0003-2153-3204. E-mail: vk250998@gmail.com

Скибо Юлия Валерьевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет (ул. Кремлевская, 18, г. Казань, Республика Татарстан, Российская Федерация). https://orcid.org/0000-0001-8082-2511. E–mail: yuliya_ksu@mail.ru

Белевцев Михаил Владимирович – канд. биол. наук, доцент, заместитель директора. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0001-9533-4705. E-mail: belevtcev_m@mail.ru

Information about the authors

Ekaterina A. Polyakova – Researcher. Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., 223053, Borovliany, Minsk region, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0002-0706-6622. E-mail: polyakovakat86@gmail.com

Maria V. Stegantseva – Ph. D. (Biol.). Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., 223053, Borovliany, Minsk region, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0002-8692-3767. E-mail: Stsegantsevam@gmail.com

Irina E. Guryanova – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., 223053, Borovliany, Minsk region, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0002-9696-3949. E-mail: guryanovairina1985@ gmail.com

Dmitry V. Lutskovich – Researcher. Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., 223053, Borovliany, Minsk region, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0002-3998-8023. E-mail: lutskovichdm@gmail.com

Katsiaryna Y. Skapavets – Junior Researcher**.** Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., 223053, Borovliany, Minsk region, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0002-4510-6760. E-mail: Skopovets@yandex.ru

Aliaksandr V. Liubushkin – Junior Researcher. Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., 223053, Borovliany, Minsk region, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0002-6127-7404. E-mail: sasha36601@yandex.by

Tatiana P. Volodashchik – Junior Researcher. Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., 223053, Borovliany, Minsk region, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0003-1523-0725. E-mail: tvolodashchik@gmail.com

Victoria I. Kazak – Junior Researcher. Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., 223053, Borovliany, Minsk region, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0003-2153-3204. E-mail: vk250998@gmail.com

Yulia V. Skibo – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Privolzhsky) Federal University (18, Kremlevskaya Str., Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation). https://orcid.org/ 0000-0001-8082-2511. E-mail: yuliya_ksu@mail.ru

Mikhail V. Belevtsev – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Deputy Director. Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., 223053, Borovliany, Minsk region, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0001-9533-4705. E-mail: belevtcev_m@mail.ru

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
UDC 616-006.6:[577.2:004.9]-07-084
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-3-236-242 Received 16.11.2022

Aleh E. Kuzniatsou

Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Republic of Belarus

GENEALOGICAL DIAGNOSTICS OF NEOPLASMS BASED ON ARTIFICIAL INTELLIGENCE SYSTEMS

Abstract. The compilation and analysis of the patient's genealogies is one of the methods of population genetics, which makes it possible to identify a predisposition to a particular oncological pathology. At present, it is relevant to prove the feasibility of developing and introducing into clinical practice a comprehensive method for diagnosing and preventing tumors based on data from genetic counseling, molecular biological research and modern artificial intelligence technologies. An information-analytical system is proposed that allows analyzing the patient's data obtained during the consultation, with the possibility of supplementing them with information from the medical history and the results of the study. The proposed information system is able to analyze of the genealogy and give a preliminary conclusion about the risk of a tumor process in the patient's family members, according to the algorithms of the morbidity accumulated in the region.

Keywords: oncology, genetic counseling, artificial intelligence, diagnostic system

For citation: Kuzniatsou A. E. Genealogical diagnostics of neoplasms based on artificial intelligence systems. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2023, vol. 20, no. 3, pp. 236–242 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-3-236-242

О. Е. Кузнецов

Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, Гродно, Республика Беларусь

ГЕНЕАЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА НОВООБРАЗОВАНИЙ НА ОСНОВЕ СИСТЕМ ИСКУССТВЕННОГО ИНТЕЛЛЕКТА

Аннотация. Составление и анализ родословных – один из методов популяционной генетики, позволяющий выявить предрасположенность к той или иной онкологической патологии. В настоящее время актуальным является доказательство целесообразности разработки и внедрения в клиническую практику комплексного метода диагностики и профилактики опухолей на основе данных генетического консультирования, молекулярно-биологических исследований и современных технологий искусственного интеллекта. Предложена информационно-аналитическая система, позволяющая анализировать данные пациента, полученные в ходе консультирования, с возможностью дополнения их информацией из медицинской истории и результатами исследования. Предлагаемая информационная система способна анализировать родословную и давать предварительное заключение о наличии риска возникновения опухолевого процесса у членов семьи пациента по алгоритмам накопленной в регионе заболеваемости.

Ключевые слова: онкология, генетическое консультирование, искусственный интеллект, диагностическая система

Для цитирования: Кузнецов, О. Е. Генеалогическая диагностика новообразований на основе систем искусственного интеллекта / О. Е. Кузнецов // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2023. – Т. 20, № 3. – С. 236–242. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-3-236-242

Introduction. According to the latest World Health Organization (WHO) estimates, more than 60 % of countries are currently implementing their own eHealth strategies, both nationally and regionally. The Ministry of Health of the Republic of Belarus has developed the concept of e-health. The concept presents the basic principles of building an e-health system in the country and the possibilities for its integration into a nationwide automated information system. It is planned that during its implementation a centralized health information system (CHIS) will be created. This will create opportunities for the formation and maintenance of a single information archive of patients and the prompt provision of medical data. In addition, a clinical decision information support system will be introduced. [1]

Oncological diseases steadily occupy a leading place in the structure of mortality of the population. Despite the fact that the incidence of death from cancer increases with age, neoplasms remain one of the leading causes of death among the young population [2].

© Кузнецов О. Е., 2023

In recent years, there have been changes in the statistics of oncological morbidity: breast cancer (11.7 %) has surpassed lung cancer (11.4 %) in frequency of detection, followed by colorectal cancer (10 %), prostate cancer (7.3 %), stomach cancer (5.6 %) and liver cancer (4.7 %) [3–5].

Belarus does not differ much in terms of morbidity and mortality from neighboring countries: about 50,000 patients with newly diagnosed cancer are diagnosed annually. The country is included in the group of countries with relatively low incidence rates, but at the same time, over the past decade, the incidence has tripled [6].

It is generally accepted that about 10 % of neoplasms are classified as hereditary forms. These include both inherited oncological syndromes and families in which close relatives are affected by various forms of cancer. Of all new cancer cases, about 16 % are associated with various types of chronic infections caused by viruses [7, 8].

With the development of molecular-genetic research in oncology, it became possible to detect and track early (preclinical) forms of cancer, which makes it possible to form and carry out timely preventive measures for people at risk. The compilation and analysis of pedigrees, taking into account etiopathogenetic factors confirmed by molecular genetic studies, is one of the most important methods of population genetics, which makes it possible to identify a predisposition to a particular pathology.

In oncology, as in no other area of medicine, the cost of a diagnostic error is high. The main difficulty lies in the early detection of a malignant process. Recently, scientists have begun to actively use artificial intelligence for diagnostics. Artificial intelligence (AI) systems, which have recently appeared in medicine, are, in our opinion, one of the promising areas in global healthcare. Artificial intelligence technologies today are changing the global healthcare system, allowing to re-evaluate and modernize the diagnostic system, as well as generally improve the quality of healthcare services while reducing costs for medical clinics [9, 10].

The use of smart systems can improve the accuracy of diagnosis, as shown in the Frost & Sullivan study, where artificial intelligence technologies increase the accuracy of diagnosis by 30–40 %. Pathologist Andy Beck from Harvard Medical School believes that the continued use of AI technologies will reduce the level of errors in diagnosis by 85 % [11].

Observing such changes in the medical field, many experts express concern and fear that “smart” systems will take the place of a person. Artificial intelligence is unlikely to ever replace the doctor. Thanks to the system, which has absorbed and analyzed a huge amount of information, the doctor will be able to perform his work more efficiently and successfully. A significant number of decisions in the field of oncology, in our opinion, will be based on the study of databases: criteria for the manifestation of the disease, research results, etc. It follows from this how important it is to create and expand databases, to record in them a variety of cases of disease, criteria for their manifestation and make this data set available for study. The use of such bases for the development and improvement of “smart” diagnostic systems will help specialists move towards the goal: a future where cases of cancer detection in the last stages or misdiagnosis will become nonsense [12].

The available domestic information developments in the field of artificial intelligence on this issue are not complete to date.

It seems expedient to develop and put into practice an integrated method for diagnosing and preventing malignant tumors based on artificial intelligence systems (medical information system). This scientific and practical direction is based on the proof of the contribution of genealogical counseling and molecular biology methods to the diagnosis and prevention of malignant tumors, as well as the reduction of mortality.

The aim of the study is the evaluation of algorithms for predicting oncological risk (genealogical) based on an artificial intelligence system.

Materials and research methods. The material of the study was data on the incidence of patients (age, year of development of the disease and year of death, gender, incidence of relatives) available in the regional oncological registry, information obtained during counseling when contacting a healthcare institution, and data from a molecular biological study of individuals, both with existing malignant tumor, and in its absence, as well as data of persons with a clinical risk of developing a tumor process, including hereditary tumors.

The study was carried out in the Grodno region (2015–2021): population, hospital screening and screening of the oncological register of patients in the region (data of the oncological register for the period 1960–2007). The study included individuals diagnosed with colorectal cancer, ovarian cancer and breast cancer. Completeness of coverage – 13,182 people: 612 patients of the oncological dispensary who applied for medical help, including 196 people hospitalized for differential diagnosis of the process, 12,570 practically healthy respondents. Thanks to the survey method (data on diseases of relatives were provided), the family history of 10,706 respondents was processed (including 401 people based on the results of hospital screening). To study the clinical and genealogical features of the tumor, 865 (47.2 %) of 1833 patients with diagnosed tumors were selected for analysis in the registry.

The implementation of measures for early detection and possible prevention of tumor processes is based on the algorithm of theorems of elementary probability theory and methods of statistical analysis, which allow determining the probability of an event, provided that another statistically interdependent event has occurred [13].

To carry out activities, a computerized information and analytical system for recording and monitoring oncological diseases (SMS) was implemented, which allows analyzing patient data obtained during counseling, with the possibility of supplementing them with information from the oncological register and data from laboratory genetic examination [14].

The information-analytical system for registration and monitoring of oncological diseases (IMS) is implemented as a computer information-analytical program in the Microsoft SQL Server environment. SQL Server is a relational database management system (RDBMS) developed by Microsoft Corporation. The main query language used is Transact-SQL. Transact-SQL is an implementation of the ANSI/ISO standard for Structured Query Language (SQL) with extensions, used to work with databases ranging in size from personal to large, enterprise scale.

The IMS allows you to process accumulated data, including on the basis of drawing up pedigrees, calculate, analyze and give a preliminary conclusion about the risk of a malignant tumor in the respondent and his family members according to risk algorithms, calculate the population risk, assign the patient to clinical risk groups, export data for subsequent further analysis. Since the information stored in the IMS database is confidential, persons who are allowed access to the system are registered and receive personalized access (login, password).

Implemented in the software package, artificial intelligence methods and analysis methods based on probability theory (Bayes formula) make it possible to determine the likelihood of a possible tumor process, provided that another interdependent event has occurred, and, based on statistical analysis, calculate the population risk for a given nosological form. diseases.

To maintain and track information, the modularity of the program block was developed and taken into account: “registration”, “relative”, “family tree”, “cancer registry”, “examination”, “diseases”, “screening”, “risk”.

Results and its discussion. Based on the known risk factors for the development of tumors and taking into account the significant factors of their development (age; chronic diseases; carriage of mutations – the risk of developing a tumor throughout life is 80–85 %), “family oncological history”, which is a significant diagnostic sign and often not analyzed [15], we analyzed the above factors to evaluate possible algorithms for predicting oncological risk.

Analysis of the results of respondents during population, hospital screening and cancer registry screening made it possible to distribute patients into groups: no oncological risk, suspected presence of a tumor, and high oncological risk. The results obtained are shown in the Table.

Oncological risk among individuals at hospital, population screening, and cancer registry screening

Group	*n*	%
Cancer Registry Screening:		
high cancer risk	7	1,68
suspicion of a tumor	95	22,84
no cancer risk	314	75,48
total	416	
Hospital screening:		
high cancer risk	13	6,63
suspicion of a tumor	53	27,04
no cancer risk	130	66,32
total	196	
Population screening:		
high cancer risk	10	0,08
suspicion of a tumor	52	0,41
no cancer risk	12 508	99,51
total	12 570	

As can be seen, among people with a diagnosed malignant neoplasm (colorectal cancer, ovarian cancer, breast cancer), when screening the region's cancer registry, the incidence of people with a high risk of developing a tumor process was 1.68 % of the total number ($p < 0.05$). In the analysis of persons being treated in a hospital (hospital screening), 13 patients were identified with a high oncological risk of developing a tumor and 53 with a suspected presence of a neoplasm: 6.63 % and 27.04 %, respectively.

Calculation of the population risk (for healthy children of the proband, siblings of the proband, children of the siblings of the proband), which is carried out on the basis of the Bayes formula in several stages, was carried out automatically based on the coefficients generated by the "intelligent" system. First, the degree of risk of developing tumors (in points) in a healthy proband is determined in the event that his relative suffers from an oncological disease. For this, the formula is used:

$$x = \mathrm{Log}(ya/zb),$$

where a – population in the region, b – general oncological incidence in the region, z – number of persons with a given category of relationship (in the IMS database), y – the number of patients with a malignant process among persons of this category of kinship (in the IMS database), x – degree of risk (in points).

The risk coefficient for a patient/proband to get sick is 0.384 if the father is sick, 0.494 for the mother, 0.398 for the sister, 0.435 for the brother, 0.043 for the mother's sister, and 0.046 for the father's sister. The presence of two or more oncological diseases in one of the relatives increases the risk of disease in the proband. The degree of this additional risk is calculated by the formula:

$$x_1 = \mathrm{Log}(y_1 c/zd),$$

where z – the number of persons with this category of relationship (in the IMS database), y_1 – the number of patients with two or more oncological diseases among persons with this category of kinship (in the IMS database), c – number of persons of the same sex as the affected relative in the cancer registry, d – the number in the oncology register of persons of the same sex as the diseased relative who suffer from two or more oncological diseases, x_1 – the degree of additional risk associated with the presence of two or more oncological diseases in relatives (in points).

According to our data, the degree of additional risk for a proband to get sick if his father suffers from two or more oncological diseases is 0.245, mother – 0.220, sister – 0.202, brother – 0.046, mother's sister – 0.022.

It is also known that the risk of developing tumors in a proband increases if his relatives (one of the relatives) developed oncological diseases at a younger age. The additional risk associated with the age at which relatives fell ill is calculated by the formula:

$$x_2 = \mathrm{Log}(n_i c/zk_i),\ i = 1, 2, 3,$$

where z – the number of persons with this category of relationship (in the IMS database), n_i – the number of persons with a given category of kinship who developed the disease in the i age range (in the IMS database), c – number of persons of the same sex as the affected relative in the cancer registry, k_i – the number of persons in the cancer registry of the same sex as the sick relative who developed the disease in the "i" age range, x_2 – the degree of additional risk associated with the age at which the oncological disease developed in a relative (in points), $i = 1, 2, 3$ correspond to the age range of 20–29 years old, 30–39 years old, 40–49 years old.

The additional risk for the proband to get sick, associated with the age at which the oncological disease developed in his parents, is:

if the father was diagnosed in the age range of 20–29 years – 0.109, from 30 to 39 years – 0.070, from 40 to 49 years – 0.090.

if the mother is diagnosed in the age range of 20–29 years – 0.030, from 30 to 39 years – 0.250, from 40 to 49 years – 0.243.

General (population) risk (R) is determined by the formula $\mathrm{R} = 10^{(x+x_1+x_2)}$.

The assessment of the general risk allows to determine how many times the risk of developing tumors is higher in a patient/proband compared to persons whose heredity is not burdened with oncological diseases.

The analysis algorithm began with entering the patient/proband data into a software electronic form. The information contained in the questionnaire is entered into the program manually (with direct survey, personal computer, Windows software environment), the system automatically assigns information about the time, date of creation of the questionnaire and the number of the questionnaire. Data of the contingent that has passed the preliminary survey, screening or has already applied for medical care in an oncological healthcare institution (hospital screening, registry screening) can be imported from the oncological registry, if available. The search is performed automatically by key letters or words, which is important because it is not always possible to accurately identify the letters if the person's handwriting is illegible. As additional search criteria, the use of the date of birth, the number of the patient's medical or outpatient card has been implemented. If the proband is registered in the register, a request "register data" will appear on the screen, which will contain the information already available, as well as (if available) passport data of persons whose last name, first name, patronymic (or their fragments) match the search criteria.

After the choice is made, all the necessary information, including place of residence, personal number, clinical diagnosis (diagnoses), disease code according to the International Classification of Diseases of the 10th revision (ICD-10), medical record number, laboratory data (histological, cytological, molecular biological), as well as the number under which the patient is registered in the registry, are imported into the IMS database. At the next stage, the registration (questionnaire) of data on the relatives of the proband and the possible presence of oncological diseases is performed. For each of the relatives suffering from malignant neoplasms, an electronic questionnaire "diseases of relatives" is filled out, similar to the "passport data" form, and data from the register is also imported, if available.

The clinical risk group for the presence of a predisposition to the development of, for example, breast or colon cancer, as well as the results of a laboratory study on possible gene mutations, are entered into the appropriate fields of the database using ready-made directories. The system also carries out intelligent control and does not allow entering dubious data, as well as duplicating the registration of the same patient/proband/relative.

The IMS software package provides and implements the ability to visualize the pedigree, which greatly facilitates the process of assigning a proband and/or its relative to the group of clinical risk of developing a tumor process. When constructing a pedigree, generally accepted symbols are used (see Figure).

The proposed intellectual information system is capable of analyzing pedigrees and issuing a preliminary conclusion on the risk of a malignant tumor in family members according to planned and programmed algorithms.

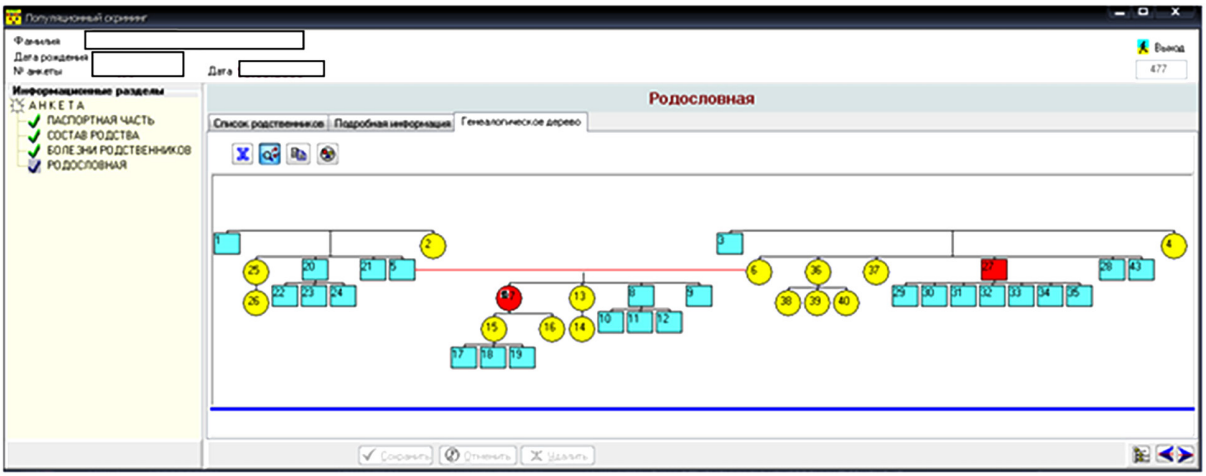
So, for example, the applied diagnostic criteria:

A. Colorectal Cancer (CRC):

in the pedigree 3 cases of CRC. Conclusion: "high risk of colorectal cancer";

in the pedigree 2 cases of CRC. Conclusion: "medium risk of colorectal cancer";

in the pedigree 1 case of CRC and 1 or more cases of cancer of another localization that does not meet the previous criteria (that is, not breast cancer, not OC, not CRC). Conclusion: "low risk of colorectal cancer";



"Pedigree", section "screening", screen view

in the pedigree 1 case of CRC that does not meet the previous criteria. Conclusion: "population risk of colorectal cancer".

B. breast cancer (BC):

in the pedigree 3 cases of breast cancer and/or even one case of breast cancer in a man. Conclusion: "high risk of breast cancer";

in the pedigree 2 cases of breast cancer. Conclusion: "medium risk of breast cancer";

in the pedigree 1 case of breast cancer under the age of 40 years, and/or breast cancer is combined with other tumors (primary multiple variant). Conclusion: "low risk of breast cancer";

in the pedigree 1 case of breast cancer that does not meet the previous criteria. Conclusion: "population risk of breast cancer";

any of the above options in combination with the presence of mutations in the BRCA 1/2 gene. Conclusion: "very high risk of breast cancer".

C. ovarian cancer (OC):

in the pedigree 3 cases of OC. Conclusion: "high risk of ovarian cancer";

in the pedigree 2 cases of OC. Conclusion: "medium risk of ovarian cancer";

in the pedigree 1 case of OC under the age of 40 years, and/or OC combined with other tumors (primary multiple variant). Conclusion: "low risk of ovarian cancer";

in the pedigree 1 case of OC that does not meet the previous criteria. Conclusion: "population risk of ovarian cancer";

any of the above options in combination with mutations in the BRCA 1/2 gene. Conclusion: "very high risk of ovarian cancer".

D. Breast cancer and ovarian cancer (BC/OC):

in the pedigree 2 cases of breast cancer and / or even one case of breast cancer in a man, along with one case of ovarian cancer. Conclusion: "high risk of breast/ovarian cancer";

in the pedigree 1 case of breast cancer + 2 cases of ovarian cancer. Conclusion: "high risk of breast/ovarian cancer";

in the pedigree 1 case of breast cancer and 1 case of ovarian cancer. Conclusion: "medium risk of breast/ovarian cancer";

any of the above options in combination with the presence of mutations in the BRCA gene. Conclusion: "very high risk of breast/ovarian cancer".

The system automatically generates conclusions on all entered questionnaires and algorithms, which not only facilitates the search for persons in need of medical advice, but also forms certain risk groups for further analysis. The final decision to assign the proband and/or relatives to any risk group is made by a specialist after studying the pedigree.

Almost all indicators used to calculate population risk, with the exception of the population in the region, can be obtained directly from the IMS. This allows you to make the system self-learning, intelligent. Using the directory system, you can set almost any conditions for searching for information in the database (arbitrary query). The IMS uses generally accepted standard reference books: for making a diagnosis – ICD-10, for indicating the place of residence, etc.

To provide information support for outpatient (dispensary) monitoring of persons with an increased risk of developing a tumor process, the software package provides for a "monitoring" section. The section allows you to create a list of people who need to be monitored using targeted queries (selection for monitoring of healthy people, for example, relatives of the proband who have an increased risk of developing a tumor), people suffering from cancer and registered during hospital screening.

Conclusion. Organizational and scientific and methodological forms of providing consultative medical care to the population remain, although studied, but relatively in demand, so any experience in this area is of undoubted value.

It is advisable to introduce into clinical practice an integrated approach in monitoring and identifying individuals with tumor pathology, as well as in diagnosing and preventing tumors based on modern information "intelligent" systems, taking into account precision molecular biological markers.

The proposed algorithms, based on the coefficients generated by the "intelligent" system, made it possible to identify a high risk of developing a tumor process (colorectal cancer, ovarian cancer, breast cancer) in almost 0.5 % of the region's population. The frequency of identifying individuals with a high

risk of developing cancer is higher in hospital screening than in the regional cancer registry screening ($p < 0.002$). According to the results of the study (hospital, population screening and registry screening), out of the total number of persons, the share of those included in the high-risk group for developing cancer was 8.39 %. These persons (including relatives) need further dynamic monitoring for the purpose of prevention, early diagnosis and effective treatment in case of detection of cancer forms, as well as an in-depth study of the clinical, morphological and molecular biological features of tumor forms.

The democratization of innovative technologies, in particular artificial intelligence, in such an important area as healthcare is a key goal for IT-developers in the world. "Smart" algorithms will make it possible to achieve a high level of accuracy in diagnosing diseases in the early stages, and, consequently, will prevent the disease or increase the effectiveness of treatment. All "smart" algorithms are created by people. Therefore, forms of such assistance to the population are valuable.

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

References

1. *Order of the Ministry of Health of the Republic of Belarus "On Approval of the Concept for the Development of Electronic Health in the Republic of Belarus".* March 20, 2018, no. 244 (in Russian).

2. Cherstvoi E. D., Kravtsova G. I., Furmanchuk A. V., Gerasimovich A. I., Grigor'ev D. G., Demidchik Yu. E., Dubrovskii A. Ch., Kletskii S. K., Letkovskaya T. A., Nerovnya A. M., Sachivko N. V. *Tumors and tumor-like processes in children*. Minsk, Asar Publ., 2002. 399 p. (in Russian).

3. Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 2020, vol. 70, no. 1, pp. 7–30. https://doi.org/10.3322/caac.21590

4. *World Health Organization (WHO). Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000–2019. WHO; 2020.* Available at: who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death (accessed 11.04.2022).

5. Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. American Cancer Society. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 2021, vol. 71, no. 3, pp. 209–249. https://doi.org/10.3322/caac.21660

6. *The Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) – International Agency for Research of Cancer, IARC.* Available at: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020 (accessed 14.04.2022).

7. Plummer M., de Martel C., Vignat J., Ferlay J., Bray F., Franceschi S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Global Health*, 2016, vol. 4, no. 9, pp. e609–e616. https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30143-7

8. Kuznetsov O. E., Tsyrkunov V. M. Virus-associated hepatocellular liver cancer. *Gepatologiya i gastroenterologiya* [Hepatology and gastroenterology], 2021, vol. 5, no. 1, pp. 17–24 (in Russian).

9. Crawford K. *Atlas of AI: Power, Politics, and the Planetary Costs of Artificial Intelligence*. New Haven, Yale University Press, 2021. 336 p.

10. Kuznetsov O. E., Shpakov A. I. Diagnostics and prevention of oncological diseases based on genetic counseling and modern information technologies. *Voprosy organizatsii i informatizatsii zdravookhraneniya* [Issues of organization and informatization of healthcare], 2019, no. 4, pp. 60–65 (in Russian).

11. Muller V. C., Bostrom N. *Future Progress in Artificial Intelligence: A Survey of Expert Opinion. Fundamental Issues of Artificial Intelligence.* Cham, 2016, pp. 555–572.

12. Weinberger M. *How Microsoft's top scientists have built a big business in hacking healthcare – and helped a lot of people along the way. Business Insider. 2018.* Available at: http://www.businessinsider.com/peter-lee-microsoft-research-healthcare-next-interview-2018-2 (accessed 22.03.2022).

13. Kahneman D., Slovic P., Tversky A. (eds.). *Judgment under Uncertainty: Heuristics and Biases.* Cambridge, Cambridge University Press (21st.), 2005. 555 p.

14. Kuznetsov O. E. *Information system for accounting and monitoring of oncological diseases: pt. 675.* Belarus. S20140041. 20.06.2014. Official Bulletin. Center for Intellectual Property (in Russian).

15. Lynch H. T., Smyrk T., Lynch J. F. Molecular genetics and clinical-pathological features of hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome): historical journey from pedigree anecdote to molecular genetic confurmation. *Oncology*, 1998, no. 55, no. 2, pp. 103–108. https://doi.org/10.1159/000011843

Information about the author

Aleh E. Kuzniatsou – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Director. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (7, Antonii Tyzengauz Sq., 230012, Grodno, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0002-1348-8688. E-mail: olegkuznetsov@inbox.ru

Информация об авторе

Кузнецов Олег Евгеньевич – канд. биол. наук, доцент, директор. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (пл. Антония Тызенгауза, 7, 230012, г. Гродно, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0002-1348-8688. E-mail: olegkuznetsov@inbox.ru

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 616-006.04; 57.043
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-3-243-255

Поступила в редакцию 25.11.2022
Received 25.11.2022

Н. Д. Пузан[1], В. Н. Беляковский[2], И. А. Чешик[1], И. В. Михайлов[2]

[1]Институт радиобиологии НАН Беларуси, Гомель, Республика Беларусь
[2]Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Республика Беларусь

ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ (ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ) НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА У БОЛЬНЫХ РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ

Аннотация. Флуоресцентным методом исследования установлено, что общая концентрация альбумина находится в пределах нормальных значений как для здоровых, так и для онкобольных на протяжении всего курса лучевой терапии. Анализ показателей, характеризующих структурно-функциональное состояние сывороточного альбумина (эффективная концентрация альбумина, резерв связывания альбумина и индекс токсичности) у больных раком шейки матки, показал, что количество полноценно функционирующего белка статистически достоверно снижается при сравнении с таковым в группе здоровых людей.

При изучении влияния лучевой терапии на структурно-функциональное состояние сывороточного альбумина онкобольных определено следующее: в 57 % случаев значения показателя индекса токсичности, характеризующего заполнение альбуминовых центров токсичными лигандами, увеличиваются после курса лучевой терапии, а в 43 % − уменьшаются; после 1-го сеанса лучевой терапии определяется дальнейшая динамика показателя индекса токсичности после лечения; возможно, место проживания пациента является определяющим фактором при развитии индивидуальной реакции транспортной системы сывороточного альбумина на действие терапевтических доз ионизирующего излучения.

Определение альбуминовых показателей, характеризующих структурно-функциональное состояние сывороточного альбумина, в частности индекса токсичности, у больных раком шейки матки, следует использовать в качестве индивидуального диагностического и прогностического критерия в динамике наблюдения за пациентами, проходящими лучевую терапию.

Ключевые слова: общая концентрация альбумина, эффективная концентрация альбумина, резерв связывания альбумина, индекс токсичности, лучевая терапия, рак шейки матки

Для цитирования: Влияние ионизирующего излучения (лучевой терапии) на структурно-функциональное состояние сывороточного альбумина у больных раком шейки матки / Н. Д. Пузан [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2023. – Т. 20, № 3. – С. 243–255. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-3-243-255

Natallia D. Puzan[1], Vasiliy N. Belyakovskiy[2], Igor A. Cheshik[1], Igor V. Mihailov[2]

[1]Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus
[2]Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

EFFECT OF IONIZING RADIATION (RADIATION THERAPY) ON THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATE OF SERUM ALBUMIN WITH CERVICAL CANCER

Abstract. The study of the literature on the detoxification properties of an albumin molecule and a prognostic value of determining albumin indicators allows us to conclude that it is undoubtedly important to assess the structural and functional properties of albumin in cancer patients at all stages of the diagnostic and treatment process already at the present time. At the same time, the lack of information makes it necessary and promising to widely introduce the fluorescent method for assessing total and effective albumin concentrations in the clinical and scientific work of oncologists.

Therefore, the aim of our work was to study the effect of radiation therapy on the structural and functional state of serum albumin in patients with cervical cancer.

In order to study radiation-induced changes in serum albumin when irradiated with therapeutic doses of ionizing radiation, the biological material (blood) of 28 people from the Gomel region was used: 1st group (control) – 13 healthy people; 2nd group – 15 patients diagnosed with cervical cancer who underwent remote gamma therapy (30 Gy). The collection of biological material in the 2nd group was carried out as follows: upon admission to patient treatment; after the 1st session of radiotherapy (2 Gy); after the 3rd session of radiotherapy (6 Gy); after the 5th session of radiotherapy (10 Gy); after the 7th session of radiotherapy (14 Gy); after the 10th session of radiotherapy (20 Gy), and after the 15th session of radiotherapy (30 Gy).

According to A. Gryzunov, G. E. Dobretsov's method, the following indicators were determined: total albumin concentration (TAC) − the number of albumin molecules capable of binding toxic ligands is equal to the albumin concentration determined in any other way; effective albumin concentration (EAC) − the number of albumin binding centers is unoccupied by

toxic ligands; the reserve of albumin binding (RAB) − it reflects the degree of structural modification of the protein; the index of toxicity (IT) − it characterizes the filling of albumin centers with toxic ligands.

The total albumin concentration is within normal values, both for healthy and cancer patients throughout the course of radiation therapy. The analysis of the indicators characterizing the structural and functional state of serum albumin (EAC, RAB, and IT) in patients with cervical cancer showed that the amount of fully functioning protein statistically significantly decreases when compared with a group of healthy people.

When studying the effect of radiation therapy on the structural and functional state of serum albumin in cancer patients, the following was determined:

in 57 % of cases, the values of the IT indicator increase after a course of radiotherapy, and in 43 % − decrease;

after the 1st session of radiotherapy, further dynamics of IT after treatment is determined: if after 2 Gy the values of the IT indicator increase, then by the end of therapy this indicator will be higher than that when entering treatment, and, conversely, if after 2 Gy the values of the IT indicator decrease, then after the course of radiotherapy this indicator will be less than that when entering treatment;

it is possible that the patient's place of residence is a determining factor in the development of an individual reaction of the serum albumin transport system to the effect of therapeutic doses of ionizing radiation.

The determination of albumin indicators characterizing the structural and functional state of serum albumin, in particular, the index of toxicity in patients with cervical cancer should be used as an individual diagnostic and prognostic criterion in the dynamics of observation of patients undergoing radiation therapy.

Keywords: total albumin concentration, effective albumin concentration, reserve of albumin binding, index of toxicity, radiation therapy, cervical cancer

For citation: Puzan N. D., Belyakovskiy V. N., Cheshik I. A., Mihailov I. V. Effect of ionizing radiation (radiation therapy) on the structural and functional state of serum albumin with cervical cancer. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2023, vol. 20, no. 3, pp. 243–255 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-3-243-255

Введение. В 2010 г. во всем мире было зарегистрировано 454 000 случаев заболевания раком шейки матки и 200 000 смертей [1]. В 2013 г. у 485 000 женщин был диагностирован данный тип рака и 236 000 пациентов умерли от этой злокачественной опухоли [2, 3]. В 2018 г. было 570 000 случаев заболевания раком шейки матки и 311 000 смертей [4]. В этом же году центры по контролю и профилактике заболеваний Соединенных Штатов сообщили о глобальной заболеваемости раком шейки матки в 12 831 вновь диагностированном случае и о 4207 смертях [5]. Из всей этой статистики 85 % случаев приходится на развивающиеся страны, а пик заболеваемости падает на возрастную группу 40–45 лет [6]. Несмотря на значительное улучшение в лечении рака шейки матки и принятие эффективных профилактических мер, таких как скрининг на вирус папиломы человека и вакцинация, общий прогноз у женщин с данной опухолью остается плохим [7].

В настоящее время наиболее эффективными методами лечения являются лучевая терапия (ЛТ) [4, 8–14], химиотерапия [9, 10, 12, 13] и хирургические методы [8, 10, 12, 13].

Что касается ЛТ, то она основана на способности ионизирующего излучения повреждать жизненного важные структуры клетки, прежде всего ДНК, в результате чего они теряют способность к делению и погибают. Различают летальные, сублетальные и потенциально летальные виды повреждений. Окружающие опухоль нормальные ткани, в первую очередь соединительная, способны обеспечивать резорбцию погибших опухолевых клеток и замещение образовавшегося дефекта рубцом (репарация). По этой причине при применении ЛТ стремятся к избирательному уничтожению опухолевых клеток и сохранению окружающих их нормальных тканей [15].

Для полного или частичного уничтожения злокачественных опухолей необходима достаточно высокая доза излучения. Доза, которая способна тотально разрушать опухоли, в среднем составляет 60–80 Гр, хотя в зависимости от радиочувствительности отдельных опухолей колеблется в широких пределах – от 30 до 100 Гр, достигая даже 120 Гр. Подведение таких больших доз лимитируется опасностью повреждения окружающих опухоль нормальных тканей [15].

Начиная с 1920-х годов при ЛТ принят режим традиционного, или классического, фракционирования, заключающегося в подведении разовых очаговых доз в 1,8–2,0 Гр ежедневно 5 раз в неделю до достижения суммарной очаговой дозы [15]. Но даже при таком щадящем варианте облучения возникают выраженные лучевые реакции со стороны здоровых тканей [15, 16].

Следует также отметить, что ни в отчет НКРЗ за 2009 г., ни в отчет НКРЗ за 2019 г. дозы от ЛТ не включались в расчетные дозы облучения населения, поскольку оценка эффективной дозы для населения, проходящего ЛТ, является более сложной, чем для других видов медицинского облучения [17].

Многочисленными исследованиями установлено, что при поражении организма опухолью происходит мобилизация липидов из жировой ткани, а также из мышц сердца и печени. Механизм этой мобилизации схож с таковым при хроническом стрессе. Подобная перестройка гомеостаза не может не отразиться на состоянии альбумина [18].

Показано, что альбумин *in vivo* подвергается многим реакциям, которые могут повлиять на его структуру и, следовательно, на его взаимодействие с другими веществами. Одной из таких реакций *in vivo* является окисление, которое усиливается при наличии заболевания, особенно рака. Раковые клетки производят гораздо больше активных форм кислорода (АФК), чем неизмененные клетки. Затем концентрация свободных радикалов увеличивается, что порождает окислительный стресс. АФК оказывают разрушительное действие на белки, липиды клеточных мембран и нуклеиновые кислоты. Влияние свободных радикалов на структуру белков проявляется в модификации аминокислотных остатков и простетических групп в сложных белках. Прямым эффектом окисления белка является разрушение полипептидной цепи и образование поперечных связей между одной или несколькими полипептидными цепями. Эти изменения приводят к увеличению или потере биологической активности. Тирозины и остатки триптофана, которые представлены в основных сайтах связывания альбумина, очень чувствительны к окислению. Что касается сывороточного альбумина человека (HSA), то он представляет собой смесь меркаптальбумина (HMA, восстановленная форма, потенциально важная мишень для окислительного стресса) и немеркаптальбумина (HNA, окисленная форма) [19].

Турецкие ученые [20] показали, что уровни модифицированного ишемией альбумина выше при очень тяжелых заболеваниях, связанных с воспалением и окислительным стрессом (например, у больных раком желудка, предстательной железы, мягких тканей и нейробластомой).

Китайские ученые [21] отметили, что уровень предоперационного альбумина является прогностическим фактором при некоторых видах рака.

Российские ученые установили, что у больных раком желудка 4-й степени значительно снижается связывающая способность альбумина – до 76–85 %. Поэтому для оценки диагностической значимости и информативности показателей, характеризующих связывающую способность альбумина, необходимо продолжить исследования этого показателя у пациентов с онкологией [18].

Изучение литературы по вопросу дезинтоксикационных свойств молекулы альбумина и прогностического значения альбуминовых показателей позволяет сделать вывод о несомненной важности оценки в настоящее время структурно-функциональных свойств альбумина у онкологических пациентов на всех этапах диагностического и лечебного процесса. В то же время недостаточность сведений требует широкого внедрения флуоресцентного метода оценки общей и эффективной концентраций альбумина в клиническую и научную работу онкологов [22].

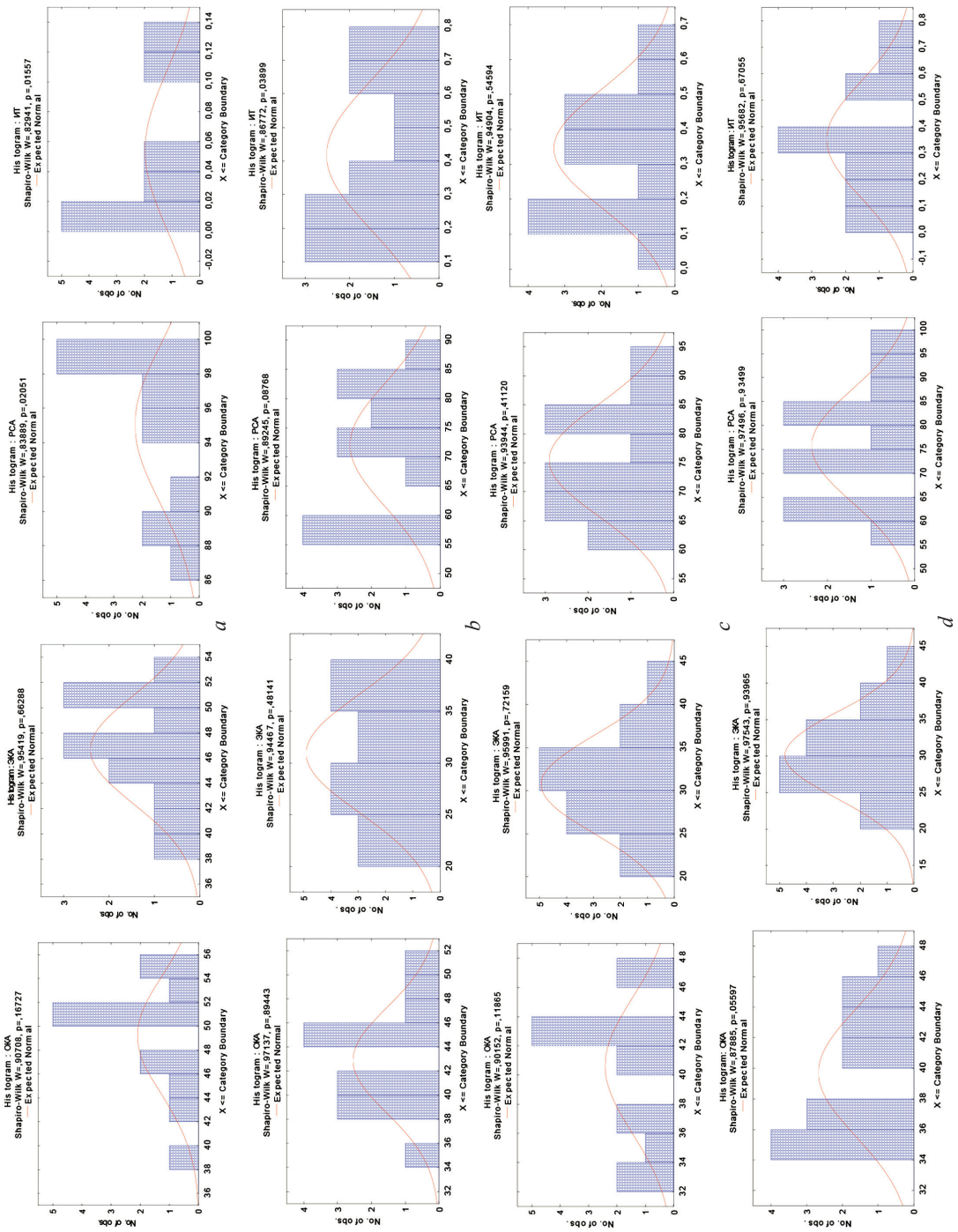
Цель нашей работы – изучение влияния лучевой терапии на структурно-функциональное состояние сывороточного альбумина у больных раком шейки матки.

Материалы и методы исследования. С целью изучения радиационно-индуцируемых изменений сывороточного альбумина при облучении терапевтическими дозами ионизирующего излучения использовался биологический материал (кровь) 28 человек из Гомельской области:

1-я группа (контроль) – 13 здоровых лиц;

2-я группа – 15 пациентов с диагнозом «рак шейки матки», проходивших дистанционную гамма-терапию (30 Гр) на аппарате «ЛУ» или «Рокус-М». Данная группа была разделена на две подгруппы (2-А – 14 человек, 2-Б – 1 человек). Забор биологического материала проводился следующим образом:

2_0 – при поступлении на стационарное лечение;
2_1 – после 1-го сеанса ЛТ (2 Гр);
2_3 – после 3-го сеанса ЛТ (6 Гр);
2_5 – после 5-го сеанса ЛТ (10 Гр);
2_7 – после 7-го сеанса ЛТ (14 Гр);
2_{10} – после 10-го сеанса ЛТ (20 Гр);
2_{15} – после 15-го сеанса ЛТ (30 Гр).


a
b
c
d
ИТ
PCA
ЭКА
ОКА
No. of obs.
X <= Category Boundary
Expected Normal

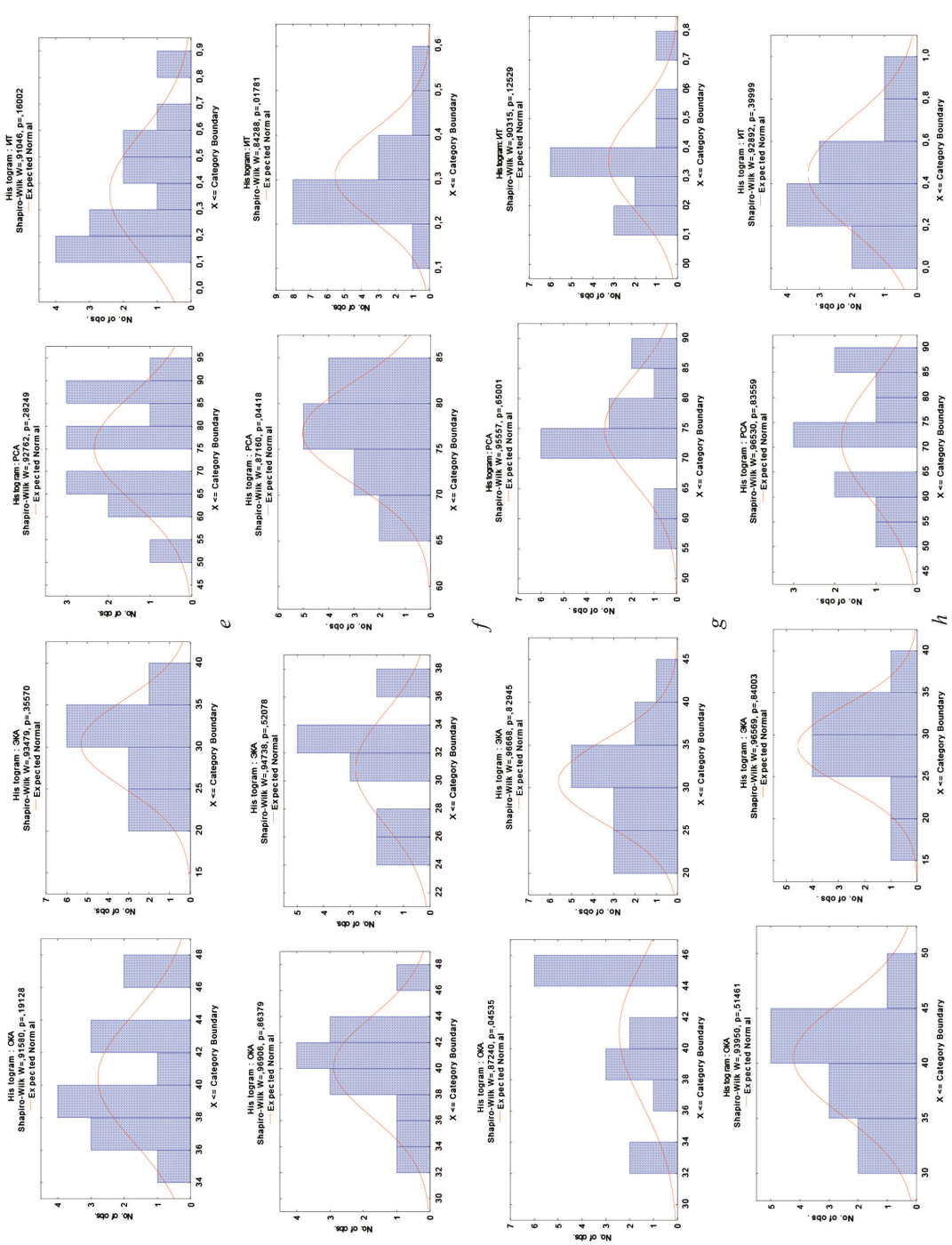


Рис. 1. Гистограммы распределения значений альбуминовых показателей (ОКА, ЭКА, РСА и ИТ) в группах: *a* – 1 (здоровые); *b* – 2_0-А (онкобольные при поступлении на лечение); *c* – 2_1-А (после 2 Гр); *d* – 2_3-А (после 6 Гр); *e* – 2_5-А (после 10 Гр); *f* – 2_7-А (после 14 Гр); *g* – 2_{10}-А (после 20 Гр); *h* – 2_{15}-А (после 30 Гр)

Fig. 1. Distribution histograms of the values of albumin indicators (TAC, EAC, RAB, and IT) in groups: *a* – 1 (healthy); *b* – 2_0-A (cancer patients on admission to treatment); *c* – 2_1-A (after 2 Gy); *d* – 2_3-A (after 6 Gy); *e* – 2_5-A (after 10 Gy); *f* – 2_7-A (after 14 Gy); *g* – 2_{10}-A (after 20 Gy); *h* – 2_{15}-A (after 30 Gy)

В день забора биологического материала (кровь) с разрешения обследуемых помимо общих показателей, назначенных лечащим врачом, в образцах крови пациентов дополнительно изучались показатели структурно-функционального состояния сывороточного альбумина.

Во всех пробах с помощью набора реактивов «ЗОНД-Альбумин» (НИМВЦ «Зонд», РФ) по стандартной методике [18] на спектрофлуориметре СМ 2203 Solar (РБ) определяли:

общую концентрацию альбумина (ОКА) − количество молекул альбумина, способных связывать токсические лиганды, соответствует концентрации альбумина, определенной любым другим способом;

эффективную концентрацию альбумина (ЭКА) − количество незанятых токсическими лигандами центров связывания альбумина;

резерв связывания альбумина (РСА = ЭКА/ОКА·100 %) − отражает степень структурной модификации белка;

индекс токсичности (ИТ = ОКА/ЭКА−1) − характеризует заполнение альбуминовых центров токсичными лигандами.

Работа выполнялась при стабильной температуре (+23 °С) в кюветном отделении прибора, так как изменение температуры может повлиять на структурное и физико-химическое состояние сывороточного альбумина [23].

Полученные результаты анализировали с помощью программы Statistica 7.0 следующим образом:

проверка соответствия полученных групп данных закону нормального распределения (использовали *W*-тест Шапиро–Уилка, так как в выборках было менее 50 обследуемых);

статистическая обработка всех данных с помощью параметрического *t*-теста Стьюдента для независимых переменных (этот метод анализа был выбран потому, что все полученные данные соответствовали закону нормального распределения).

Для анализа результатов (представлены в виде таблиц и рисунков) использовали программы Statistica 7.0 и Microsoft Excel 2010.

Результаты и их обсуждение. Все полученные данные вначале были проверены на соответствие закону нормального распределения *W*-тестом Шапиро–Уилка. Гистограммы распределения значений альбуминовых показателей (ОКА, ЭКА, РСА и ИТ) приведены на рис. 1.

Так как все данные соответствовали закону нормального распределения, статистическая обработка была выполнена с помощью параметрического *t*-теста Стьюдента для независимых переменных (табл. 1).

У здоровых лиц ОКА в организме взрослого человека составляет 35–55 г/л, а альбуминовые центры свободны от токсических лигандов, поэтому ЭКА близка к ОКА, РСА близок к 100 %, а ИТ – к нулю. При различных заболеваниях из-за заполнения альбуминовых центров токсинами ЭКА становится ниже ОКА, а величина ИТ возрастает [18].

Как видно из представленных данных (табл. 1), ОКА находится в пределах нормальных значений как для здоровых лиц (1-я группа), так и для онкобольных на протяжении всего курса ЛТ (2_0-А–2_{15}-А группы).

Анализ ЭКА (табл. 1) в группе 2_0-А показал, что у больных раком шейки матки количество полноценно функционирующего белка статистически достоверно снижается (на 33,8 % при сравнении с группой здоровых лиц). Данное утверждение также подтверждается статистически достоверным отличием значений РСА и ИТ (при сравнении с группой здоровых лиц): РСА у онкобольных ниже на 24,2 %, а ИТ выше на 720 %.

По мнению авторов данного метода исследования альбумина, чем выше ИТ, тем больше свободных токсинов в крови, подлежащих детоксикации. Что касается РСА, то чем меньше этот показатель, тем в большей степени изменена конформация молекулы и тем меньше свободных центров связывания [24].

Следовательно, в организме онкобольных наблюдается большое количество токсинов, подлежащих детоксикации, количество главного транспортно-детоксикационного белка крови (альбумина) находится в норме, однако «качество» данного белка сильно отличается от такового у здоровых людей.

Таблица 1. **Значения альбуминовых показателей в сыворотке крови 1 и 2-А групп, среднее ± станд. откл.**

Table 1. **Albumin indicator values in the blood serum of groups 1 and 2-A, mean ± stand. deviation**

Группа	ОКА, г/л	ЭКА, г/л	РСА, %	ИТ, отн. ед.
1 (здоровые)	49,20 ± 4,93	46,68 ± 4,29	95,06 ± 4,59	0,05 ± 0,05
2_0-*A* (до лечения)	42,89 ± 4,38	30,93 ± 5,69**	72,07 ± 10,64**	0,41 ± 0,22**
2_1-*A* (2 Гр)	40,64 ± 4,62	30,71 ± 5,64**	75,44 ± 9,60**	0,34 ± 0,16**
2_3-*A* (6 Гр)	39,71 ± 4,18	30,10 ± 5,81**	75,74 ± 11,82**	0,35 ± 0,21**
2_5-*A* (10 Гр)	40,44 ± 3,99	30,36 ± 5,25**	75,20 ± 11,92**	0,36 ± 0,23**
2_7-*A* (14 Гр)	40,14 ± 3,85	30,87 ± 3,99**	76,80 ± 5,54**	0,30 ± 0,10**
2_{10}-*A* (20 Гр)	41,04 ± 4,58	30,71 ± 4,98**	74,87 ± 8,73**	0,35 ± 0,17**
2_{15}-*A* (30 Гр)	40,49 ± 5,19	28,65 ± 4,80**	71,26 ± 11,95**	0,44 ± 0,26**

Примечание. Достоверность показателей указана при сравнении с группой здоровых лиц (1-я группа): * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Также следует отметить, что после курса ЛТ у некоторых пациентов наблюдается увеличение значений показателя ИТ (8 человек), а у некоторых – уменьшение (6 человек). Динамика изменения значений ИТ у онкобольных (в целой группе – 14 чел.; в группе пациентов, у которых наблюдалось увеличение значений ИТ, – 8 чел.; в группе пациентов, у которых наблюдалось уменьшение значений ИТ, – 6 чел.) на протяжении всего курса ЛТ представлена на рис. 2.

Исходя из полученных данных видно, что уже после 1-го сеанса ЛТ (2_1-А группа) определяется дальнейшая динамика ИТ после лечения: если после введения 2 Гр значения данного показателя увеличиваются, то и к окончанию терапии ИТ будет выше, чем при поступлении на лечение, и наоборот – если после введения 2 Гр значения ИТ уменьшаются, то и после курса ЛТ данный показатель будет меньше.

Чтобы попытаться понять, почему же в 57 % случаев (8 человек из 14) происходит увеличение значений показателя ИТ после курса ЛТ, а в 43 % (6 человек из 14) – уменьшение его значений, обратились к дополнительным параметрам, таким как стадия заболевания (рак шейки матки), наличие сопутствующих заболеваний и район проживания в Гомельской области.

Что касается сопутствующих заболеваний, то здесь в группу сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) были включены артериальная гипертензия и ишемическая болезнь сердца, а в группу желудочно-кишечных заболеваний (ЖКЗ) – гастрит, панкреатит, холецистит и пиелонефрит.

На рис. 3–5 представлены данные по группе онкобольных (8 человек), у которых наблюдалось увеличение значений показателя ИТ после курса ЛТ.

На рис. 6–8 представлены данные по группе онкобольных (6 человек), у которых наблюдалось уменьшение значений показателя ИТ после курса ЛТ.

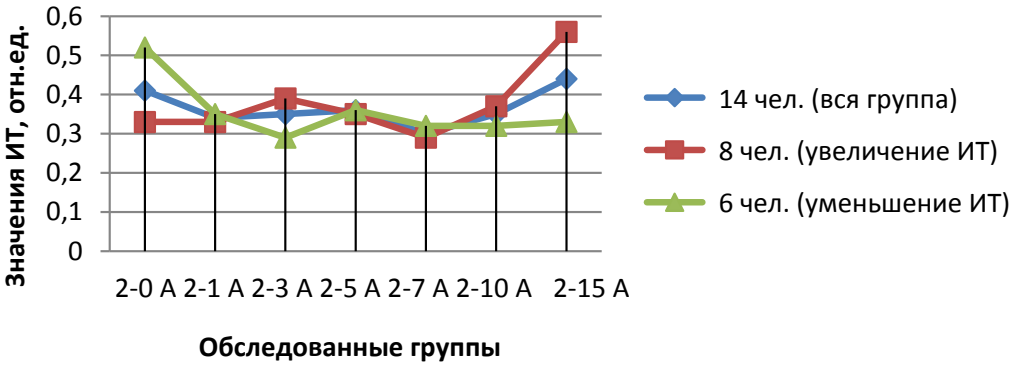


Рис. 2. Динамика изменения значений показателя ИТ

Fig. 2. Dynamics of changes in the IT indicator values

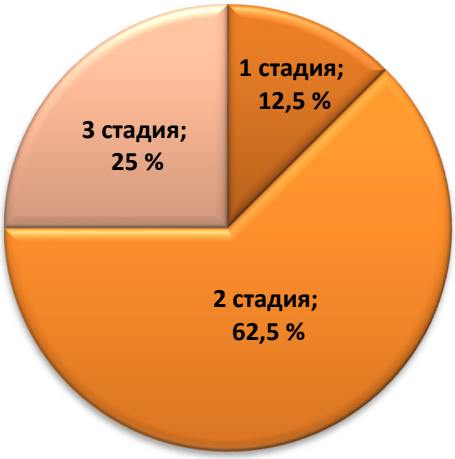


Рис. 3. Структура стадий заболевания в группе, где наблюдается увеличение значений показателя ИТ (8 человек)

Fig. 3. Structure of the disease stages in the group with an increase in the IT indicator values (8 patients)



Рис. 4. Структура сопутствующих заболеваний в группе, где наблюдается увеличение значений показателя ИТ (8 человек)

Fig. 4. Structure of the concomitant diseases in the group with an increase in the IT indicator values (8 patients)

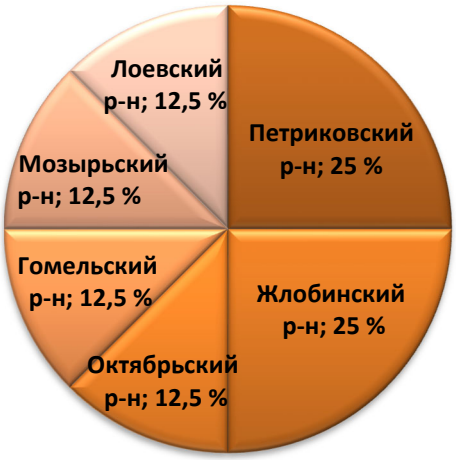


Рис. 5. Доля пациентов с увеличением значений показателя ИТ в зависимости от района проживания (8 человек)

Fig. 5. Proportion of patients with an increase in the IT indicator values depending on the area of residence (8 patients)



Рис. 6. Структура стадий заболевания в группе, где наблюдается уменьшение значений показателя ИТ (6 человек)

Fig. 6. Structure of the disease stages in the group with a decrease in the IT indicator values (6 patients)

Таким образом, в 57 % случаев в группе больных раком шейки матки после курса ЛТ наблюдается увеличение значений показателя ИТ и преобладание следующих показателей:

стадия заболевания – 2 (62,5 %);

сопутствующие заболевания – ССЗ (62,5 %);

район проживания – Жлобинский и Петриковский (по 25 %).

Что касается остальных 43 % случаев, то в группе больных раком шейки матки, у которых после курса ЛТ наблюдается уменьшение значений показателя ИТ, преобладали следующие показатели:

стадия заболевания – 2 (83,3 %);

сопутствующие заболевания – ССЗ + ЖКЗ (49,9 %);

районы проживания – Рогачевский и Гомельский (по 50 %).

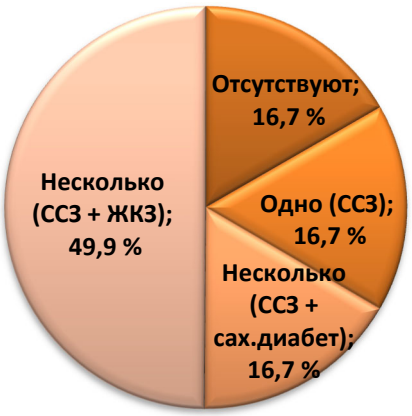


Рис. 7. Структура сопутствующих заболеваний в группе, где наблюдается уменьшение значений показателя ИТ (6 человек)

Fig. 7. Structure of the concomitant diseases in the group with a decrease in the IT indicator values (6 patients)



Рис. 8. Доля пациентов с уменьшением значений показателя ИТ в зависимости от района проживания (6 человек)

Fig. 8. Proportion of the patients with a decrease in the IT indicator values depending on the area of residence (6 patients)

Следовательно, можно предположить, что само место проживания пациента является определяющим фактором при развитии индивидуальной реакции транспортной системы сывороточного альбумина на действие терапевтических доз ионизирующего излучения.

Согласно данным Н. Г. Власовой с соавт. [25], средняя доза облучения населения, усредненная за период 2001–2004 гг., в Жлобинском районе составила 0,087 мЗв/год, в Петриковском – 0,046 мЗв/год, а в Рогачевском и Гомельском районах в несколько раз больше – 0,208 и 0,167 мЗв/год соответственно.

Сопоставление полученных нами данных и результатов Н. Г. Власовой с соавт. позволяет сделать следующие выводы: проживание на территории с меньшей дозой облучения (Жлобинский и Петриковский районы) будет способствовать более медленной элиминации токсинов из организма больных раком шейки матки при прохождении курса ЛТ (наблюдалось увеличение значений показателя ИТ), и наоборот, проживание на территории с большей дозой облучения (Рогачевский и Гомельский районы) будет способствовать более быстрой элиминации токсинов из организма больных раком шейки матки при прохождении курса ЛТ (наблюдалось уменьшение значений показателя ИТ).

Особый интерес представляет 2-Б группа, куда входила пациентка, у которой при снижении уровня ОКА выявлено повышение ЭКА после 10-го сеанса ЛТ (табл. 2). Подобный случай был описан нами при изучении структурно-функционального состояния сывороточного альбумина у беременных в норме и при патологии [26].

Таблица 2. **Значения альбуминовых показателей в сыворотке крови пациентов 2-Б группы**

Table 2. **Albumin indicator values in the blood serum of group 2-B**

Группа	ЭКА, г/л	ОКА, г/л	РСА, %	ИТ, отн. ед.
2_0-*Б* (до лечения)	29,59	41,27	71,70	0,39
2_1-*Б* (2 Гр)	27,24	42,78	63,67	0,57
2_3-*Б* (6 Гр)	32,53	45,18	72,00	0,39
2_5-*Б* (10 Гр)	28,05	40,50	69,26	0,44
2_7-*Б* (14 Гр)	22,94	38,95	58,90	0,70
2_{10}-*Б* (20 Гр)	49,84	44,69	111,52	–0,10
2_{15}-*Б* (30 Гр)	32,18	41,10	78,30	0,28

Альбумин является одним из основных транспортных белков сыворотки крови и представлен большим количеством конформеров, отличающихся по свойствам от нативного белка. Для белковой цепи характерно большое количество пространственных структур: каждый аминокислотный остаток имеет около 10 возможных конформаций, т. е. цепь из 100 остатков включает порядка 10^{100} различных структур. Таким образом, белок принимает «свою» пространственную конформацию из 10^{100} возможных. При этом молекула белка может «почувствовать» стабильность конформации только попав прямо в нее, так как отклонение даже на 0,1 нм может очень сильно повысить энергию цепи в плотной белковой глобуле [26].

Возможно, под действием факторов окружающей среды для молекулы альбумина выгоднее и быстрее принять одну из множества конформаций, чем сразу отвечать синтезом дополнительных молекул. Как мы полагаем, это имеет место в случае превышения значений ЭКА над значениями ОКА, хотя, по определению, ОКА должна быть равна ЭКА [26].

С другой стороны, это может быть процесс «развертывания» молекулы альбумина и увеличение количества доступных для зонда центров связывания. Подобное явление было описано в работе Ю. А. Грызунова с соавт. [18], которые, изучая влияние метаболитов на связывание зонда с альбумином, наблюдали увеличение интенсивности флуоресценции зонда К-35 при определении ЭКА, что, по мнению авторов, связано с ростом числа центров связывания в «загруженной» молекуле белка [26].

При существующем объеме информации данное транзиторное состояние (превышение значений ЭКА над значениями ОКА) можно рассматривать как одно из проявлений компенсаторной реакции организма на молекулярном уровне. Гетерогенная полифункциональная система сывороточного альбумина, как и любая другая функциональная система, находится в состоянии динамического равновесия (ЭКА↔ОКА), осуществляя компенсаторно-приспособительные реакции организма по поддержанию и сохранению гомеостаза [26].

Таким образом, данная научно-исследовательская работа наглядно демонстрирует тот факт, что определение альбуминовых показателей, характеризующих структурно-функциональное состояние сывороточного альбумина (ЭКА, РСА и ИТ), в частности ИТ, у больных раком шейки матки, следует использовать в качестве индивидуального диагностического и прогностического критерия в динамике наблюдения за пациентами, проходящими ЛТ.

Выводы

1. Общая концентрация альбумина находится в пределах нормальных значений как для здоровых лиц, так и для онкобольных на протяжении всего курса лучевой терапии. Анализ показателей, характеризующих структурно-функциональное состояние сывороточного альбумина (эффективная концентрация альбумина, резерв связывания и индекс токсичности) у больных раком шейки матки, показал, что количество полноценно функционирующего белка статистически достоверно снижается в сравнении с таковым в группе здоровых лиц.

2. При изучении влияния лучевой терапии на структурно-функциональное состояние сывороточного альбумина онкобольных установлено следующее:

в 57 % случаев значения показателя индекса токсичности, характеризующего заполнение альбуминовых центров токсичными лигандами, увеличиваются после курса лучевой терапии, а в 43 % − уменьшаются;

после 1-го сеанса лучевой терапии определяется дальнейшая динамика показателя индекса токсичности после лечения: если после введения 2 Гр значения данного показателя увеличиваются, то и к окончанию терапии индекс токсичности будет выше, чем при поступлении на лечение, и наоборот, если после введения 2 Гр значения показателя индекса токсичности уменьшаются, то и после курса лучевой терапии данный показатель будет меньше, чем при поступлении на лечение;

возможно, место проживания пациента является определяющим фактором при развитии индивидуальной реакции транспортной системы сывороточного альбумина на действие терапевтических доз ионизирующего излучения.

3. Определение альбуминовых показателей, характеризующих структурно-функциональное состояние сывороточного альбумина, в частности индекса токсичности, у больных раком шейки матки, следует использовать в качестве индивидуального диагностического и прогностического критерия в динамике наблюдения за пациентами, проходящими лучевую терапию.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Cervical cancer patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) is sensitive to cisplatinum and resistant to nab-paclitaxel / T. Murakami [et al.]. // Anticancer Res. – 2017. – Vol. 37, N 1. – P. 61–65. https://doi.org/10.21873/anticanres.11289

2. Nomogram predicting overall survival in operable cervical cancer patients / R.-R. Zheng [et al.] // Int. J. Gynecol. Cancer. – 2017. – Vol. 27, N 5. – P. 987–993. https://doi.org/10.1097/IGC.0000000000000987

3. Tumor-targeting *Salmonella typhimurium* A1-R overcomes nab-paclitaxel resistance in a cervical cancer PDOX mouse model / K. Miyake [et al.]. // Arch. Gynecol. Obstet. – 2019. – Vol. 229, N 6. – P. 1683–1690. https://doi.org/10.1007/s00404-019-05147-3

4. Inhibiting the PI3K/AKT/mTOR signalling pathway with copper oxide nanoparticles from *Houttuynia cordata* plant: attenuating the proliferation of cervical cancer cells / H. Chen [et al.] // Artific. Cells, Nanomed. Biotechnol. – 2021. – Vol. 49, N 1. – P. 240–249. https://doi.org/10.1080/21691401.2021.1890101

5. Prognostic value of systemic hemato-immunological indices in uterine cervical cancer: a systemic review, meta-analysis, and meta-regression of observational studies / X. Han [et al.] // Gynecol. Oncol. – 2021. – Vol. 160, N 1. – P. 351–360. https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2020.10.011

6. Modified Glasgow prognostic score is an independent prognostic factor in patients with cervical cancer undergoing chemoradiotherapy / Y. Xiao [et al.] // Int. J. Clin. Exp. Pathol. – 2015. – Vol. 8, N 5. – P. 5273–5281.

7. Wang, J. Identification and validation of potential mRNA-microRNA-long-noncoding RNA (mRNA-miRNA-lncRNA) prognostic signature for cervical cancer / J. Wang, C. Zhang // Bioengineered. – 2021. – Vol. 12, N 1. – P. 898–913. https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1890377

8. Ермакова, Н. А. Роль химиотерапии на различных этапах лечения рака шейки матки / Н. А. Ермакова // Практ. онкология. – 2002. – Т. 3, № 3. – С. 211–219.

9. Deterioration of nutritional status of patients with locally advanced cervical cancer during treatment with concomitant chemoradiotherapy / M. Sanchez [et al.] // J. Hum. Nutr. Diet. – 2019. – Vol. 32, N 4. – P. 480–491. https://doi.org/10.1111/jhn.12649

10. T-box transcription factor TBX1, targeted by microRNA-6727-5p, inhibits cell growth and enhances cisplatin chemosensitivity of cervical cancer cells through AKT and MAPK pathways / H. Liu [et al.] // Bioengineered. – 2021. – Vol. 12, N 1. – P. 565–577. https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1880732

11. Uracil-5-yl *O*-sulfamate: an illusive radiosensitizer. Pitfalls in modeling the radiosensitizing derivatives of nucleobases / P. Spisz [et al.] // J. Phys. Chem. B. – 2020. – Vol. 124, N 27. – P. 5600–5613. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.0c03844

12. Al-Musywel, H. A. Effect of gold nanoparticles on radiation doses in tumor treatment: a Monte Carlo study / H. A. Al-Musywel, A. Laref // J. Lasers Med. Sci. – 2017. – Vol. 32, N 9. – P. 2073–2080. https://doi.org/10.1007/s10103-017-2329-0

13. Powathil, G. G. Towards predicting the response of a solid tumour to chemotherapy and radiotherapy treatments: clinical insights from a computational model / G. G. Powathil, D. J. A. Adamson, M. A. J. Chaplain // PLOS Comp. Biol. – 2013. – Vol. 9, N 7. – P. e1003120. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003120

14. Rational design of cancer-targeted BSA protein nanoparticles as radiosensitizer to overcome cancer radioresistance / Y. Huang [et al.] // ACS Appl. Mater. Interfaces. – 2014. – Vol. 6, N 21. – P. 19217–19228. https://doi.org/10.1021/am505246w

15. Артемова, Н. А. Нетрадиционные режимы фракционирования дозы как модификатор лучевой терапии у больных раком легкого / Н. А. Артемова // Здравоохранение. – 2008. – № 1. – С. 24–29.

16. Chemical and biological basis for development of novel radioprotective drugs for cancer therapy / R. Checker [et al.] // Free Rad. Res. – 2021. – Vol. 55, N 5. – P. 595–625. https://doi.org/10.1080/10715762.2021.1876854

17. Patient radiation exposure: imaging during radiation oncology procedures: executive summary of NCRP Report No. 184 / M. T. Milano [et al.] // J. Am. Coll. Radiol. – 2020. – Vol. 17, N 9. – P. 1176–1182. https://doi.org/10.1016/j.jacr.2020.02.002

18. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине : сб. ст. / под ред. Ю. А. Грызунова, Г. Е. Добрецова. – М. : Ириус, 1994. – 226 с.

19. The influence of oxidative stress on serum albumin structure as a carrier of selected diazaphenothiazine with potential anticancer activity / M. Maciazek-Jurzyk [et al.] // Pharmaceuticals. – 2021. – Vol. 14, N 3. – P. 285. https://doi.org/10.3390/ph14030285.

20. Ischemia-modified albumin: could it be a new oxidative stress biomarker for colorectal carcinoma? / H. Y. Ellidag [et al.]. // Gut and Liver. – 2013. – Vol. 7, N 6. – P. 675–680. https://doi.org/10.5009/gnl.2013.7.6.675

21. Systemic inflammatory score predicts overall survival in patients with cervical cancer / M. Xu [et al.]. // J. Cancer. – 2021. – Vol. 12, N 12. – P. 3671–3677. https://doi.org/10.7150/jca.56170

22. Афанасьева, А. Н. Клиническое значение определения альбуминовых показателей у онкологических больных / А. Н. Афанасьева, В. А. Евтушенко // Анестезиология и реаниматология. – 2004. – № 6. – С. 64–68.

23. Нямаа, Д. Влияние среды на функциональные и структурные свойства сывороточных альбуминов. II. Влияние температуры на N-форму сывороточного альбумина человека / Д. Нямаа, О. Бат-Эрдэнэ, Э. А. Бурштейн // Молекуляр. биология. – 1984. – Т. 18, вып. 4. – С. 972–977.

24. Афанасьева, А. Н. Влияние интраоперационной лучевой терапии на альбуминовые показатели крови больных раком желудка / А. Н. Афанасьева, В. А. Евтушенко // Рос. онколог. журн. – 2006. – № 2. – С. 41–44.

25. Дозы облучения населения Гомельской области от основных источников радиационного воздействия, в том числе медицинской рентгенодиагностики / Н. Г. Власова [и др.]. // Проблемы здоровья и экологии. – 2006. – № 3 (9). – С. 7–18.

26. Клиническое значение определения состояния центров связывания сывороточного альбумина при беременности / Н. Д. Луковская [и др.]. // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2008. – № 3. – С. 58–63.

References

1. Murakami T., Murata T., Kawaguchi K., Kiyuna T., Igarashi K., Hwang H. K. [et al.]. Cervical cancer patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) is sensitive to cisplatinum and resistant to nab-paclitaxel. *Anticancer Research*, 2017, vol. 37, no. 1, pp. 61–65. https://doi.org/10.21873/anticanres.11289

2. Zheng R.-R., Huang X.-W., Liu W.-Y., Lin R.-R., Zheng F.-Y., Lin F. Nomogram predicting overall survival in operable cervical cancer patients. *International Journal of Gynecological Cancer*, 2017, vol. 27, no. 5, pp. 987–993. https://doi.org/10.1097/IGC.0000000000000987

3. Miyake K., Murata T., Murakami T., Zhao M., Kiyuna T., Kawaguchi K. [et al.]. Tumor-targeting *Salmonella typhimurium* A1-R overcomes nab-paclitaxel resistance in a cervical cancer PDOX mouse model. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 2019, vol. 229, no. 6, pp. 1683–1690. https://doi.org/10.1007/s00404-019-05147-3

4. Chen H., Feng X., Gao L., Mickymaray S., Paramasivam A., Alfaiz F. A., Almasmoum H. A., Ghaith M. M., Almaimani R. A., Ibrahim I. A. A. Inhibiting the PI3K/AKT/mTOR signalling pathway with copper oxide nanoparticles from *Houttuynia cordata* plant: attenuating the proliferation of cervical cancer cells. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2021, vol. 49, no. 1, pp. 240–249. https://doi.org/10.1080/21691401.2021.1890101

5. Han X., Liu S., Yang G., Hosseinifard H., Imani S., Yang L., Maghsoudloo M., Fu S., Wen Q., Liu Q. Prognostic value of systemic hemato-immunological indices in uterine cervical cancer: a systemic review, meta-analysis, and meta-regression of observational studies. *Gynecologic Oncology*, 2021, vol. 160, no. 1, pp. 351–360. https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2020.10.011

6. Xiao Y., Ren Y.-K., Cheng H.-J., Wang L., Luo S.-X. Modified Glasgow prognostic score is an independent prognostic factor in patients with cervical cancer undergoing chemoradiotherapy. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2015, vol. 8, no. 5, pp. 5273–5281.

7. Wang J., Zhang C. Identification and validation of potential mRNA-microRNA-long-noncoding RNA (mRNA-miRNA-lncRNA) prognostic signature for cervical cancer. *Bioengineered*, 2021, vol. 12, no. 1, pp. 898–913. https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1890377

8. Ermakova N. A. The role of chemotherapy at various stages of cervical cancer treatment. *Prakticheskaya onkologiya* [Practical oncology], 2002, vol. 3, no. 3, pp. 211–219 (in Russian).

9. Sánchez M., Castro-Eguiluz D., Luvián-Morales J., Jiménez-Lima R., Aguilar-Ponce J. L., Isla-Ortiz D., Cetina L. Deterioration of nutritional status of patients with locally advanced cervical cancer during treatment with concomitant chemoradiotherapy. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 2019, vol. 32, no. 4, pp. 480–491. https://doi.org/10.1111/jhn.12649

10. Liu H., Song M., Sun X., Zhang X., Miao H., Wang Y. T-box transcription factor TBX1, targeted by microRNA-6727-5p, inhibits cell growth and enhances cisplatin chemosensitivity of cervical cancer cells through AKT and MAPK pathways. *Bioengineered*, 2021, vol. 12, no. 1, pp. 565–577. https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1880732

11. Spisz P., Zdrowowicz M., Kozak W., Chomicz-Mańka L., Falkiewicz K., Makurat S. [et al.]. Uracil-5-yl *O*-sulfamate: an illusive radiosensitizer. Pitfalls in modeling the radiosensitizing derivatives of nucleobases. *Journal of Physical Chemistry B*, 2020, vol. 124, no. 27, pp. 5600–5613. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.0c03844

12. Al-Musywel H. A., Laref A. Effect of gold nanoparticles on radiation doses in tumor treatment: a Monte Carlo study. *Journal of Lasers in Medical Science*, 2017, vol. 32, no. 9, pp. 2073–2080. https://doi.org/10.1007/s10103-017-2329-0

13. Powathil G. G., Adamson D. J. A., Chaplain M. A. J. Towards predicting the response of a solid tumour to chemotherapy and radiotherapy treatments: clinical insights from a computational model. *PLOS Computational Biology*, 2013, vol. 9, no. 7, p. e1003120. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003120

14. Huang Y., Luo Y., Zheng W., Chen T. Rational design of cancer-targeted BSA protein nanoparticles as radiosensitizer to overcome cancer radioresistance. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2014, vol. 6, no. 21, pp. 19217–19228. https://doi.org/10.1021/am505246w

15. Artemova N. A. Unconventional dose fractionation regimens as a modifier of radiation therapy in patients with lung cancer. *Zdravookhranenie* [Healthcare], 2008, no. 1, pp. 24–29 (in Russian).

16. Checker R., Patwardhan R. S., Jayakumar S., Maurya D. K., Bandekar M., Sharma D., Sandur S. K. Chemical and biological basis for development of novel radioprotective drugs for cancer therapy. *Free Radical Research*, 2021, vol. 55, no. 5, pp. 595–625. https://doi.org/10.1080/10715762.2021.1876854

17. Milano M. T., Mahesh M., Mettler F. A., Elee J., Vetter R. J. Patient radiation exposure: imaging during radiation oncology procedures: executive summary of NCRP Report No. 184. *Journal of the American College of Radiology*, 2020, vol. 17, no. 9, pp. 1176–1182. https://doi.org/10.1016/j.jacr.2020.02.002

18. Gryzunov Yu. A., Dobretsov G. E. (eds.). *Serum albumin in clinical medicine: a collection of articles.* Moscow, Irius Publ., 1994. 226 p. (in Russian).

19. Maciążek-Jurczyk M., Morak-Młodawska B., Jeleń M., Kopeć W., Szkudlarek A., Owczarzy A., Kulig K., Rogóż W., Pożycka J. The influence of oxidative stress on serum albumin structure as a carrier of selected diazaphenothiazine with potential anticancer activity. *Pharmaceuticals*, 2021, vol. 14, no. 3, p. 285. https://doi.org/10.3390/ph14030285

20. Ellidag H. Y., Bulbuller N., Eren E., Abusoglu S., Akgol E., Cetiner M., Yılmaz N. Ischemia-modified albumin: could it be a new oxidative stress biomarker for colorectal carcinoma? *Gut and Liver*, 2013, vol. 7, no. 6, pp. 675–680. https://doi.org/10.5009/gnl.2013.7.6.675

21. Xu M., Wu Q., Cai L., Sun X., Xie X., Sun P. Systemic inflammatory score predicts overall survival in patients with cervical cancer. *Journal of Cancer*, 2021, vol. 12, no. 12, pp. 3671–3677. https://doi.org/10.7150/jca.56170

22. Afanas'eva A. N., Evtushenko V. A. Clinical value of determination of albumin values in cancer patients. *Anesteziologiya i reanimatologiya* [Anesthesiology and intensive care], 2004, no. 6, pp. 64–68 (in Russian).

23. Nyamaa D., Bat-Erdene O., Burstein E. A. The influence of the medium on the functional and structural properties of serum albumins. II. The effect of temperature on the N-form of human serum albumin. *Molekulyarnaya biologiya* [Molecular biology], 1984, vol. 18, no. 4, pp. 972–977 (in Russian).

24. Afanas'eva A. N., Evtushenko V. A. The effect of intraoperative radiotherapy on albumin blood count in patients with gastric cancer. *Rossiiskii onkologicheskii zhurnal* [Russian journal of oncology], 2006, no. 2, pp. 41–44 (in Russian).

25. Vlasova N. G., Kuznetsov B. K., Visenberg Yu. V., Leshcheva S. V., Eventova L. N., Matskevich S. A., Kalinin D. I. Doses in Gomel population due to main sources of radiation, including chernobyl and medicine radiology. *Problemy zdorov'ya i ekologii = Health and environmental issues*, 2006, no. 3 (9), pp. 7–18 (in Russian).

26. Lukovskaya N. D., Gromyko N. L., Baranovskaya E. I., Malenchenko A. F. Clinical significance of determining the state of serum albumin binding centers during pregnancy. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2008, no. 3, pp. 58–63 (in Russian).

Информация об авторах

Пузан Наталья Дмитриевна – науч. сотрудник. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, г. Гомель, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0002-1518-7715. E-mail: natali_lu@tut.by

Беляковский Василий Николаевич – д-р мед. наук, профессор. Гомельский государственный медицинский университет (ул. Ланге, 5, 246000, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: vnbel55@mail.ru

Чешик Игорь Анатольевич – канд. мед. наук, доцент, директор. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: igor.cheshik@gmail.com

Михайлов Игорь Викторович – канд. мед. наук, доцент, заведующий кафедрой. Гомельский государственный медицинский университет (ул. Ланге, 5, 246000, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: igor-mikhailov-2014@yandex.ru

Information about the authors

Natallia D. Puzan – Researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyuninsky Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0002-1518-7715. E-mail: natali_lu@tut.by

Vasiliy N. Belyakovskiy – D. Sc. (Med.), Professor. Gomel State Medical University (5, Lange Str., 246000, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: vnbel55@mail.ru

Igor A. Cheshik – Ph. D. (Med.), Associate Professor, Director. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyuninsky Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: igor.cheshik@gmail.com

Igor V. Mihailov – Ph. D. (Med.), Associate Professor, Head of the Department. Gomel State Medical University (5, Lange Str., 246000, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: igor-mikhailov-2014@yandex.ru

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 615.015.1:599.323.4
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-3-256-264

Поступила в редакцию 10.02.2023
Received 10.02.2023

Е. В. Кравченко[1], Л. М. Ольгомец[1], О. Н. Саванец[1], К. В. Бородина[1], Е. С. Пустюльга[1], В. П. Голубович[1], Р. Д. Зильберман[1], Н. А. Бизунок[2], Б. В. Дубовик[2]

[1]Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь
[2]Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

ВЛИЯНИЕ ПРОЛИНСОДЕРЖАЩИХ ОЛИГОПЕПТИДОВ НА ПОВЕДЕНИЕ АУТБРЕДНЫХ МЫШЕЙ ICR В ТЕСТЕ FORCED SWIM

Аннотация. С помощью теста принудительного плавания (Forced Swim Test) изучено влияние пролинсодержащих олигопептидов N-Ac-DSer-Pro-DArg-Gly-NH_2 (B-4), N-Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH_2 (B-5), N-Ac-Tyr-Pro-Arg-Gly-NH_2 (B-7) и Pro-Gly на показатели поведения мышей-самцов ICR. Установлено, что N-Ac-DSer-Pro-DArg-Gly-NH_2 (1,0 мкг/кг) увеличивает интенсивность активного плавания, наиболее выраженно – в последние 2 мин тестирования (период максимального утомления), т. е. препятствует «поведению отчаяния».

Ключевые слова: N-Ac-DSer-Pro-DArg-Gly-NH_2, N-Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH_2, Pro-Gly, тест принудительного плавания, мыши

Для цитирования: Влияние пролинсодержащих олигопептидов на поведение аутбредных мышей ICR в тесте Forced Swim // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2023. – Т. 20, № 3. – С. 256–264. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-3-256-264

Elena V. Kravchenko[1], Lyubov M. Olgomets[1], Oksana N. Savanets[1], Kseniya V. Borodina[1], Egor S. Pustyulga[1], Vladimir P. Golubovich[1], Roman D. Zilberman[1], Natalia A. Bizunok[2], Boris V. Dubovik[2]

[1]Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
[2]Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

EFFECT OF PROLINE-CONTAINING OLIGOPEPTIDES ON THE BEHAVIOR OF OUTBRED ICR MICE IN THE FORCED SWIM TEST

Abstract. The effect of proline-containing oligopeptides N-Ac-DSer-Pro-DArg-Gly-NH_2 (B-4), N-Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH_2 (B-5), N-Ac-Tyr-Pro-Arg-Gly-NH_2 (B-7), and Pro-Gly on the behavior of male ICR mice in the Forced Swim Test was studied. N-Ac-DSer-Pro-DArg-Gly-NH_2 (1.0 mcg/kg, i.n) increased the intensity of active swimming, most pronounced – during the last 2 minutes of testing (maximum fatigue period), i.e., it prevented the behavior of "despair".

Keywords: N-Ac-DSer-Pro-DArg-Gly-NH_2, N-Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH_2, Pro-Gly, Forced Swim Test, mice

For citation: Kravchenko E. V., Olgomets L. M., Savanets O. N., Borodina K. V., Pustyulga E. S., Golubovich V. P., Zilberman R. D., Bizunok N. A., Dubovik B. V. Effect of proline-containing oligopeptides on the behavior of outbred ICR mice in the Forced Swim Test. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2023, vol. 20, no. 3, pp. 256–264 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-3-256-264

Введение. Значимость диагностики, профилактики и терапии когнитивных расстройств (КР) обусловлена широкой распространенностью указанной патологии, высоким социально-экономическим бременем для общества, возможностью достижения существенной экономической и социальной выгоды при своевременном и эффективном лечении. Депрессия относится к числу 12 модифицируемых факторов риска развития КР, в том числе таких, как низкий уровень образования в молодости; снижение слуха, артериальная гипертензия и ожирение в среднем возрасте; курение, гиподинамия, социальная изоляция и сахарный диабет у лиц старше 65 лет; употребление алкоголя; черепно-мозговая травма и загрязнение воздуха. Их нивелирование может способствовать снижению риска деменции в популяции на 40 % [1]. У пациентов пожилого и старческого возраста депрессивный синдром выступает в качестве фактора риска развития деменции [1, 2], продрома [1] или следствия КР [2]. По данным двух систематических обзоров (2017 и 2018 гг.), применение антидепрессантов для лечения депрессии при деменции в сравнении с плацебо не приводит к статистически достоверному улучшению состояния пациентов [1].

Ранее нами было показано, что пролинсодержащие тетрапептиды, синтезированные в лаборатории прикладной биохимии Института биоорганической химии НАН Беларуси, существенно снижают продолжительность иммобилизации крыс-самцов линии Wistar в парадигме «принудительное плавание» – Forced Swim Test (FST) [3]. Фармакологическое действие N-Ac-DSer-Pro-DArg-Gly-NH_2 (в дозе 1,0 мкг/кг) и N-Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH_2 (в дозах 0,1; 1,0; 10,0 мкг/кг) в FST было сходным с эффектом референтного лекарственного средства флуоксетин, что указывало на антидепрессивноподобное влияние указанных пептидов [3].

Несмотря на то что FST не является в полной мере моделью депрессии у человека, в академических исследованиях и при разработке лекарственных средств этот метод рассматривается как важный инструмент, поскольку характеризуется надежностью, высокой пропускной способностью и прогностической достоверностью при скрининге новых соединений.

В тесте FST с использованием крыс можно четко разграничить плавательное поведение (*swimming*) и вскарабкивание (*climbing*), что позволяет различать соединения, влияющие на серотонинергическую и норадренергическую системы соответственно. FST на крысах предполагает два последовательных сеанса – пре-тест и тест [4]. Попадая в воду, животные вначале проявляют бурную двигательную активность, направленную на поиск выхода из аверсивной стрессорной ситуации, но затем прекращают эти попытки и совершают незначительные движения, необходимые для поддержания головы над поверхностью воды, либо зависают в характерной позе, оставаясь полностью неподвижными (это расценивается как проявление отчаяния, подавленности, депрессивноподобного состояния). Вместе с тем увеличение продолжительности иммобилизации некоторыми авторами рассматривается как переход к экономии ресурсов организма посредством выбора пассивной стратегии поведения [5]. «Выученная иммобильность», обнаруживающаяся при повторном помещении крыс в условия FST, может объясняться тем, что стрессирующая ситуация уже знакома животному; в этом случае применимы критерии, используемые для описания феномена габитуации [6]: при первом помещении животного в стрессирующую ситуацию оно обучается принимать неподвижную позу, а во время повторной экспозиции «вспоминает» иммобильность [7]. «Мышиная» версия теста принудительного плавания дает результаты уже в первые сутки опыта [4], что позволяет исключить получение псевдопозитивного эффекта вследствие влияния фактора обучения.

Для подтверждения ранее выявленного антидепрессивноподобного действия пролинсодержащих тетрапептидов В-4 и В-5 и их структурного аналога нами изучена эффективность этих соединений в тесте FST на мышах. Помимо тетрапетидов в исследование был включен дипептид Pro-Gly, структурно родственный циклопролилглицину (ЦПГ). ЦПГ, как и его аналоги (цикло-L-пипеколилглицин (ГЗК-001) и (S)-тетрагидро-2Н-пирроло[1,2-е]имидазол-1,3-дион (ГЗК-002)) в экспериментах на мышах проявлял антидепрессивноподобную активность, сопоставимую с действием флуоксетина [8].

Целью данного исследования являлось изучение влияния пролинсодержащих олигопептидов на поведение мышей в тесте принудительного плавания (Forced Swim Test).

Материалы и методы исследования. Экспериментальные исследования антидепрессивноподобного действия 4 олигопептидов проведены на 98 аутбредных мышах-самцах ICR. Фармакологическую активность пролинсодержащих олигопептидов изучали в опытах на животных, содержавшихся в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде в соответствии с требованиями Санитарных правил и норм 2.1.2.12-18-2006. После доставки из сектора биоиспытаний мышей метили водостойким маркером.

Соединения N-Ac-DSer-Pro-DArg-Gly-NH_2 (В-4), N-Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH_2 (В-5) и N-Ac-Tyr-Pro-Arg-Gly-NH_2 (В-7) были синтезированы в лаборатории прикладной биохимии Института биоорганической химии НАН Беларуси. В-4 и В-5 применяли интраназально (и/н) в дозах 0,1; 1,0 и 10,0 мкг/кг; В-7 – и/н в дозе 1,0 мкг/кг. Дипептид Pro-Gly (P0880, сер. номер BCBV9787, Sigma Aldrich, США) вводили внутрибрюшинно (в/б) в дозах 0,1 и 0,5 мг/кг. Тетрапептиды применяли в объеме 1 мкл/10 г массы тела, дипептид – в объеме 0,1 мл/10 г массы тела; растворитель (дистиллированная вода, ДВ) животным контрольной группы 1 (контроль-1) вводили и/н, животным контрольной группы 2 (контроль-2) – в/б в том же объеме, что и в тестируемых образцах.

Исследования проводили в два этапа.

Этап 1. С целью снижения влияния индивидуальных адаптивно-приспособительных реакций грызунов на результаты исследования проводили экспресс-оценку типологических особенностей мышей. До тестирования в FST выявляли особей с высоким уровнем зоосоциального контактирования (ВУК) с интрудером в условиях однократного территориального конфликта в микроколонии по схеме «десять резидентов ICR, один интрудер»; к числу особей с ВУК относили грызунов с тремя и более зоосоциальными контактами, включая обнюхивание, аллогруминг, атаки [9]. Тетрапептиды и дипептид применяли за 20–45 мин до FST. Сведения о формировании групп, способах введения, дозах тестируемых соединений, числе животных в группах сравнения приведены в табл. 1.

Этап 2. Для моделирования «поведения отчаяния» у грызунов использовали парадигму «принудительное плавание» (FST) с использованием установки Kinder Scientific Company LLC Forced Swim Systems, MotorMonitor (Kinder Scientific Company LLC, США). Условия эксперимента соответствовали модифицированному методу Porsolt [4]. При проведении эксперимента продолжительностью 6 мин животное помещали в цилиндр с водой таким образом, чтобы оно не могло ни выбраться из сосуда, ни найти в нем опору в виде касания дна лапками или хвостом. Установка представляла собой цилиндрический бассейн (диаметр сосуда – 10 см, высота – 30 см), уровень воды в котором составлял 20,5 см, на протяжении эксперимента поддерживалась температура 23–25 °С [4].

Таблица 1. **Схема исследования олигопептидов в Forced Swim Test (FST) с использованием мышей ICR**

Table 1. **Schematic of oligopeptide studies in the Forced Swim Test (FST) using ICR mice**

Группа	Доза	Путь введения	Этап 1. Типирование/*n* в субпопуляции		Этап 2. FST/*n*
			Активные (ВУК)	Пассивные	
Контроль-1 (ДВ)	–	и/н	6 (86 %)	1 (14 %)	7
Контроль-2 (ДВ)	–	в/б	17 (85 %)	3 (15 %)	20
В-4	0,1 мкг/кг	и/н	6 (86 %)	1 (14 %)	7
	1,0 мкг/кг		6 (86 %)	1 (14 %)	7
	10,0 мкг/кг		3 (50 %)	3 (50 %)	6
В-5	0,1 мкг/кг	и/н	3 (37,5 %)	5 (62,5 %)	8
	1,0 мкг/кг		5 (62,5 %)	3 (37,5 %)	8
	10,0 мкг/кг		6 (75 %)	2 (25 %)	8
В-7	1,0 мкг/кг	и/н	5 (71 %)	2 (29 %)	7
Pro-Gly	0,1 мг/кг	в/б	9 (90 %)	1 (10 %)	10
	0,5 мг/кг		9 (90 %)	1 (10 %)	10

Примечание. Здесь и в остальных таблицах: ДВ – дистиллированная вода; *n* – число животных в группе; ВУК – три и более зоосоциальных контакта у особей.

В ходе эксперимента автоматически регистрировались следующие показатели: а) активное плавание с измерением показателя *Basic movements*, выражаемого в условных единицах (мышь совершает энергичные движения всеми лапами, активно перемещаясь внутри емкости по горизонтали – «борьба, барахтанье»); б) мелкие движения (*Fine movements*) (усл. ед.) – «пассивное плавание», животное совершает движения головой либо слабые гребки лапками для поддержания тела на плаву (без смещения центра туловища); в) латентный период (ЛП) первого акта иммобилизации (полное отсутствие плавательных движений на протяжении не менее 2 с подряд) при регистрации в период с 1-й по 6-ю минуту (секунду) или ЛП иммобилизации за последние 4 мин (с) наблюдения; г) продолжительность иммобилизации (с).

Продолжительность «мышиной» версии FST составляет 6 мин; для оценки антидепрессивноподобного действия анализируются только последние 4 мин теста [4]. Это связано с тем, что

большинство мышей очень подвижны в первые 2 мин FST, и потенциальные эффекты терапии могут «маскироваться» энергичной двигательной реакцией, направленной на поиск выхода из аверсивной ситуации.

Анализ данных проводили с использованием общепринятых статистических методов, статистическую обработку цифровых показателей – с помощью программного обеспечения Origin 6.1 (Origin Lab Corporation, США, 2000), Biostat 4.03 (Glantz S.A., 1998). Для сравнения двух независимых выборок применяли критерий Манна–Уитни, для сравнения зависимых – критерий Уилкоксона. При наличии трех и более групп использовали критерий Крускала–Уоллиса, а также ранговый дисперсионный анализ Фридмана для зависимых выборок с последующей обработкой данных методом апостериорных сравнений по критерию Ньюмена–Кейлса. Для анализа качественных признаков применяли точный критерий Фишера. Данные представляли в виде $X \pm S_x$.

Результаты и их обсуждение. Статистически значимых различий между особями с различными фенотипами поведения не выявлено; как правило, большинство грызунов относились к когорте ВУК (три и более зоосоциальных контакта) (табл. 1). После первоначальных интенсивных попыток избегания стрессирующей ситуации мыши прекращали «борьбу», отмечалось пассивное плавание или иммобилизация. Существенные межгрупповые различия по показателям «активное плавание», «пассивное плавание», «ЛП первой иммобилизации» при анализе поведения животных за 6 мин, а также по показателям «ЛП иммобилизации» и «продолжительность иммобилизации» с 3-й по 6-ю минуту не выявлены (табл. 2, 3).

При введении В-4 (N-Ac-DSer-Pro-DArg-Gly-NH_2; 0,1 и 1,0 мкг/кг) имела место тенденция к возрастанию подвижности грызунов, в меньшей степени она проявлялась при введении В-5 (в тех же дозах) и В-7 (1,0 мкг/кг) (табл. 2, 4, 5). При введении В-4 (но не В-5 и В-7) в вышеназванных дозах отмечалось запаздывание принятия неподвижной позы (на 16,0–22,3 % относительно контроля-1) и отчетливое сокращение продолжительности иммобилизации (на 29,6–30,4 % относительно контроля-1) (табл. 3). Поскольку у мышей контрольных групп 1 (n = 7) и 2 (n = 20) уровни стрессогенности процедуры введения в условиях и/н и в/б введения были сопоставимымы, а продолжительность иммобилизации существенно не отличалась (74,3 ± 9,5 и 69,8 ± 8,7 с соответственно (табл. 3)), мы сочли возможным сопоставить значения показателя «число мышей с продолжительностью иммобилизации менее 30 с» для объединенного контроля (n = 27) и испытуемых образцов. Выявлены достоверные различия при сравнении В-4 (1,0 мкг/кг) и объединенного контроля (точный критерий Фишера, p = 0,003).

Таблица 2. **Влияние однократного введения пролинсодержащих тетрапептидов (и/н) и дипептида (в/б) на поведение мышей ICR в FST за 6 мин наблюдения**

Table 2. **Effect of a single administration of proline-containing tetrapeptides (intranasally – i. n.) and dipeptide (intraperitoneally – i. p.) on the behavior of ICR mice in the FST for 6 observation minutes**

Группа	Доза	Число животных	Активное плавание		Пассивное плавание		ЛП первой иммобилизации	
			усл. ед.	в % к контролю	усл. ед.	в % к контролю	с	в % к контролю
Контроль-1 (ДВ)		7	377,9 ± 22,6	100	77,0 ± 4,7	100	71,9 ± 21,3	100
В-4	0,1 мкг/кг	7	445,1 ± 53,7	117,8	106,3 ± 9,9	138,1	116,7 ± 27,3	162,3
	1,0 мкг/кг	7	462,4 ± 50,8	122,4	93,6 ± 5,7	121,6	83,3 ± 10,4	115,9
	10,0 мкг/кг	6	385,0 ± 77,7	101,9	82,5 ± 11,1	107,1	72,0 ± 19,8	100,1
В-5	0,1 мкг/кг	8	391,6 ± 51,5	103,6	88,9 ± 10,8	115,5	86,3 ± 16,2	120,0
	1,0 мкг/кг	8	446,1 ± 38,2	118,0	79,4 ± 5,3	103,1	69,0 ± 13,5	96,0
	10,0 мкг/кг	8	406,6 ± 39,2	107,6	72,0 ± 7,7	93,5	77,8 ± 21,6	108,2
В-7	1,0 мкг/кг	7	402,7 ± 48,5	106,6	75,7 ± 10,6	98,3	70,4 ± 19,8	97,9
Контроль-2 (ДВ)		20	410,1 ± 21,4	100	87,3 ± 7,0	100	98,1 ± 13,0	100
Pro-Gly	0,1 мг/кг	10	382,1 ± 36,1	93,2	85,3 ± 5,9	97,7	58,8 ± 8,8	59,9
	0,5 мг/кг	10	348,9 ± 33,4	85,1	79,0 ± 7,1	90,5	60,0 ± 12,0	61,2

Таблица 3. **Влияние однократного введения пролинсодержащих тетрапептидов (и/н) и дипептида (в/б) на поведение мышей ICR в FST (за период с 3-й по 6-ю минуту)**

Table 3. **Effect of a single administration of proline-containing tetrapeptides (i.n.) and dipeptide (i. p.) on the behavior of ICR mice in the FST (for a period of 3 to 6 minutes)**

Группа	Доза	Число животных	ЛП иммобилизации		Продолжительность иммобилизации		Число мышей с продолжительностью иммобилизации менее 30 с
			с	в % к контролю	с	в % к контролю	
Контроль-1 (ДВ)		7	136,1 ± 7,5	100	74,3 ± 9,5	100	0 (0,0 %)
В-4	0,1 мкг/кг	7	157,9 ± 15,5	116,0	52,3 ± 13,7	70,4	2 (28,6 %)
	1,0 мкг/кг	7	166,4 ± 31,0	122,3	51,7 ± 18,3	69,6	4 (57,1 %)
	10,0 мкг/кг	6	151,7 ± 13,3	111,5	75,7 ± 31,2	101,9	2 (33,3 %)
В-5	0,1 мкг/кг	8	133,0 ± 3,9	97,7	73,3 ± 18,7	98,7	2 (25,0 %)
	1,0 мкг/кг	8	133,8 ± 8,0	98,3	62,5 ± 8,8	84,1	1 (12,5 %)
	10,0 мкг/кг	8	136,0 ± 5,8	99,9	64,5 ± 12,1	86,8	1 (12,5 %)
В-7	1,0 мкг/кг	7	139,3 ± 6,2	102,4	71,1 ± 16,8	95,7	1 (14,3 %)
Контроль-2 (ДВ)		20	144,5 ± 8,0	100	69,8 ± 8,7	100	1 (5,0 %)
Pro-Gly	0,1 мг/кг	10	134,0 ± 6,3	92,7	83,6 ± 12,2	119,8	1 (10,0 %)
	0,5 мг/кг	10	128,6 ± 2,9	89,0	88,2 ± 13,1	126,4	0 (0,0 %)

В-4, введенный в дозе 1,0 мкг/кг (но не 0,1 и 10,0 мкг/кг), статистически достоверно усиливал в сравнении с контролем-1 интенсивность активного плавания мышей ICR на 5-й минуте наблюдения, что хорошо согласуется с ранее полученными нами данными в экспериментах на крысах линии Wistar [3] (см. табл. 4). Тенденция к повышению *Basic movements* отмечалась при введении В-4 в дозах 0,1 и 1,0 мкг/кг на 3, 4, 5 и 6-й минутах, а также с 3-й по 6-ю минуту (табл. 4).

В-4 (0,1 мкг/кг) вызывал статистически значимую стимуляцию пассивного плавания (*Fine movements*) в сравнении с контролем-1 за период с 3-й по 6-ю минуту ($p < 0,05$) (табл. 5). Тенденция к увеличению интенсивности пассивного плавания относительно уровня контроля-1 отмечена для В-4, вводимого в дозах 0,1 и 1,0 мкг/кг на 3, 4, 5 и 6-й минутах наблюдения, а в период с 3-й по 6-ю минуту – в дозе 1,0 мкг/кг (табл. 5). Влияние В-5 на указанный показатель было дозозависимым: незначительное усиление пассивного плавания в сравнении с контролем-1 или отсутствие эффекта отмечено после его применения в дозах 0,1 и 1,0 мкг/кг, снижение на 5-й минуте в сравнении с 3-й минутой наблюдения – при введении в дозе 10,0 мкг/кг. Pro-Gly (0,1 и 0,5 мг/кг) несущественно ослаблял подвижность мышей в FST в сравнении с контролем-2 (см. табл. 2–5). В отличие от животных группы контроль-2, характеризующихся снижением числа мелких движений к концу наблюдения, у особей, получавших Pro-Gly в обеих дозах, существенного уменьшения *Fine movements* не выявлено, их поведение было более стабильным, нежели у грызунов, получавших растворитель (табл. 5).

Таким образом, в проведенном исследовании на мышах ICR в FST подтвержден антидепрессивноподобный эффект В-4, выявленный ранее в экспериментах с использованием крыс [3]. Дополнительным преимуществом В-4 является его хронотропное действие в отношении ультрадианных ритмов крыс линии Wistar, подвергшихся принудительному плаванию [10], и циркадных ритмов мышей ICR на фоне процедуры FST [11], а также облегчение неассоциативного обучения (габитуации) у стрессированных особей Wistar с пассивным фенотипом поведения [12], неустойчивых к действию стресса [13]. Следовательно, именно В-4 целесообразно взять за основу в качестве перспективного пролинсодержащего олигопептида для профилактики когнитивных расстройств.

В экспериментах на мышах корректорное действие В-5 (1,0 мкг/кг), выразившееся в снижении продолжительности иммобилизации и усилении *Basic movements* грызунов в FST, не достигало уровня статистической значимости, что можно объяснить межвидовыми различиями в чувствительности к указанному тетрапептиду. Отсутствие ожидаемого эффекта у Pro-Gly может быть связано с использованием иной, нежели в цитируемой нами научной литературе, линии мышей (Balb/c [8], а не ICR), а также другого режима введения (не двухнедельное [8], а однократное применение).

Таблица 4. **Влияние однократного введения пролинсодержащих тетрапептидов (и/н) и дипептида (в/б) на активное плавание (*Basic movements*) мышей ICR в FST (с 3-й по 6-ю минуту)**

Table 4. **Effect of a single administration of proline-containing tetrapeptides (i.n.) and dipeptide (i. p.) on the active swimming (*Basic movements*) of ICR mice in the FST (for a period of 3 to 6 minutes)**

Группа	Доза	Число животных	Активное плавание (усл. ед.)/мин регистрации (в % к контролю)				
			3-я минута	4-я минута	5-я минута	6-я минута	с 3-й по 6-ю минуту
Контроль-1 (ДВ)		7	54,1 ± 7,1 (100)	44,3 ± 6,9 (100)	43,1 ± 7,2 (100)	43,0 ± 5,5 (100)	184,6 ± 17,1 (100)
В-4	0,1 мкг/кг	7	67,3 ± 12,6 (124,4)	62,0 ± 10,0 (140,0)	53,9 ± 8,3 (125,1)	45,0 ± 7,5^{0} (104,7)	228,1 ± 35,9 (123,6)
	1,0 мкг/кг	7	58,9 ± 15,4 (108,9)	63,3 ± 12,4 (142,9)	78,4 ± 12,1* (181,9)	62,6 ± 11,3 (145,6)	263,1 ± 38,4 (142,5)
	10,0 мкг/кг	6	59,3 ± 15,0 (109,6)	49,2 ± 13,7 (111,1)	51,7 ± 14,6 (120,0)	39,7 ± 11,2^{0} (92,3)	199,8 ± 53,2 (108,2)
В-5	0,1 мкг/кг	8	51,8 ± 10,6 (95,7)	54,8 ± 10,1 (123,7)	48,6 ± 8,5 (112,8)	46,6 ± 9,1 (108,4)	201,8 ± 35,6 (109,3)
	1,0 мкг/кг	8	59,5 ± 10,0 (110,0)	44,5 ± 3,8 (100,5)	69,8 ± 8,7 (161,9)	56,4 ± 6 (131,2)	230,1 ± 17,8 (124,6)
	10,0 мкг/кг	8	58,1 ± 8,6 (107,4)	55,1 ± 10,3 (124,4)	44,9 ± 11,7 (104,2)	47,0 ± 4,7 (109,3)	205,1 ± 25,9 (111,1)
В-7	1,0 мкг/кг	7	57,0 ± 11,5 (105,4)	49,0 ± 12,1 (110,6)	54,4 ± 9,2 (126,2)	48,0 ± 8,87 (111,6)	208,4 ± 40,1 (112,9)
Контроль-2 (ДВ)		20	63,9 ± 5,6 (100)	54,3 ± 4,8 (100)	46,0 ± 4,4$^{@}$ (100)	40,4 ± 3,9$^{@\,\#}$ (100)	204,6 ± 15,6 (100)
Pro-Gly	0,1 мг/кг	10	46,3 ± 10,2 (72,5)	51,5 ± 7,9 (94,8)	49,1 ± 7,4 (106,7)	47,0 ± 10,2 (116,3)	193,9 ± 27,1 (94,8)
	0,5 мг/кг	10	47,8 ± 8,1 (74,8)	42,9 ± 6,2 (79,0)	36,5 ± 5,2 (79,3)	35,5 ± 5,6 (87,9)	162,7 ± 22,3 (79,5)

Примечание. Различия статистически значимы по сравнению: * – с контролем-1, $p < 0,05$, критерий Крускала–Уоллиса (анализ двух групп: В-4, 1,0 мкг/кг; контроль-1); 0 – со значениями показателя на 3-й минуте наблюдения, $p < 0,05$, критерий Уилкоксона; @ – со значениями показателя на 3-й минуте наблюдения, $^{\#}$ – то же на 4-й минуте наблюдения, критерий Фридмана с последующей обработкой данных методом апостериорных сравнений по критерию Ньюмена–Кейлса.

Таблица 5. **Влияние однократного введения пролинсодержащих тетрапептидов (и/н) и дипептида (в/б) на пассивное плавание (*Fine movements*) мышей ICR в FST (с 3-й по 6-ю минуту)**

Table 5. **Effect of a single administration of proline-containing tetrapeptides (i.n.) and dipeptide (i. p.) on the passive swimming (*Fine movements*) of ICR mice in the FST (for a period of 3 to 6 minutes)**

Группа	Доза	Число животных	Пассивное плавание (усл. ед.)/мин регистрации (в % к контролю)				
			3-я минута	4-я минута	5-я минута	6-я минута	с 3-й по 6-ю минуту
Контроль-1 (ДВ)		7	13,1 ± 1,7 (100)	11,3 ± 1,6 (100)	11,3 ± 2,3 (100)	11,4 ± 1,3 (100)	47,1 ± 4,7 (100)
В-4	0,1 мкг/кг	7	17,3 ± 2,0 (132,1)	16,1 ± 1,8 (142,5)	18,1 ± 1,5 (160,2)	14,0 ± 2,5 (122,8)	65,6 ± 5,6* (139,3)
	1,0 мкг/кг	7	13,9 ± 2,6 (106,1)	16,7 ± 3,4 (147,8)	18,1 ± 1,5 (160,2)	16,0 ± 1,9 (140,4)	62,4 ± 4,7 (132,5)
	10,0 мкг/кг	6	13,5 ± 2,6 (103,1)	11,3 ± 2,4 (100)	14,3 ± 3,3 (126,5)	10,3 ± 1,9 (90,4)	49,5 ± 8,9 (105,1)
В-5	0,1 мкг/кг	8	13,1 ± 1,8 (100)	15,0 ± 3,4 (132,7)	15,8 ± 3,0 (139,8)	12,1 ± 2,3 (106,1)	56,0 ± 9,0 (118,9)

Окончание табл. 5

Группа	Доза	Число животных	Пассивное плавание (усл. ед.)/мин регистрации (в % к контролю)				
			3-я минута	4-я минута	5-я минута	6-я минута	с 3-й по 6-ю минуту
	1,0 мкг/кг	8	12,9 ± 1,5 (98,5)	11,5 ± 1,1 (101,8)	11,9 ± 1,3 (105,3)	13,8 ± 1,9 (121,1)	50,0 ± 3,6 (106,2)
	10,0 мкг/кг	8	15,9 ± 2,6 (121,4)	12,4 ± 1,9 (109,7)	8,0 ± 1,2# (70,8)	10,6 ± 1,4 (93,0)	46,9 ± 6,0 (99,6)
В-7	1,0 мкг/кг	7	10,6 ± 2,0 (80,9)	12,6 ± 2,1 (111,5)	13,6 ± 2,7 (120,4)	11,3 ± 2,2 (99,1)	48,0 ± 8,2 (101,9)
Контроль-2 (ДВ)		20	14,1 ± 1,2@ (100)	13,4 ± 1,5@ (100)	12,8 ± 2,0@ (100)	9,9 ± 1,2 (100)	50,2 ± 4,6 (100)
Pro-Gly	0,1 мг/кг	10	11,7 ± 1,4 (83,0)	11,7 ± 1,5 (87,3)	12,4 ± 1,3 (96,9)	10,7 ± 1,6 (108,1)	46,5 ± 3,8 (92,6)
	0,5 мг/кг	10	14,1 ± 2,6 (100)	12,0 ± 1,4 (89,6)	11,5 ± 2,0 (89,8)	10,7 ± 1,1 (108,1)	48,3 ± 5,2 (96,2)

П р и м е ч а н и е. Различия статистически значимы по сравнению: * – с контролем-1, $p < 0{,}05$, критерий Крускала–Уоллиса с последующей обработкой данных методом апостериорных сравнений по критерию Данна (анализ только трех групп: В-4, 1,0 мкг/кг; В-4, 0,1 мкг/кг; контроль), # – со значениями показателя на 3-й минуте наблюдения, @ – то же на 6-й минуте, критерий Фридмана с последующей обработкой данных методом апостериорных сравнений по критерию Ньюмена–Кейлса.

Заключение. В ходе изучения влияния 4 пролинсодержащих олигопептидов на показатели поведения мышей самцов ICR в тесте принудительного плавания (FST) установлено, что наиболее выраженным эффектом характеризовался В-4 (N-Ac-DSer-Pro-DArg-Gly-NH_2; 1,0 мкг/кг, и/н), способствующий сокращению продолжительности иммобилизации на 30,4 % относительно контроля-1 и статистически значимому усилению интенсивности активного плавания.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Dementia prevention, intervention, and care / G. Livingston [et al.] // 2020 report of the Lancet Commission. Lancet. – 2020. – Vol. 396, N 10248. – P. 413–446. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30367-6

2. Strategies for dementia prevention: latest evidence and implications / G. Rakesh [et al.] // Ther. Adv. Chronic Dis. – 2017. – Vol. 8, N 8–9. – P. 121–136. https://doi.org/10.1177/2040622317712442

3. Синтез и исследование антидепрессивных свойств новых аналогов аргинин-вазопрессина / К. В. Бородина // Биоорг. химия. – 2022. – Т. 48, № 3. – С. 357–370.

4. The Mouse Forced Swim Test / A. Can [et al.] // J. Vis. Exp. – 2012. – Vol. 59. – P. e3638. https://doi.org/10.3791/3638

5. Molendijk, M. L. Immobility in the forced swim test is adaptive and does not reflect depression / M. L. Molendijka, E. R. de Kloet // Psychoneuroendocrinology. – 2015. – Vol. 62. – P. 389–391. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.08.028

6. Learned immobility is also involved in the forced swimming test in mice / A. Parra [et al.] // Psicothema. – 1999. – Vol. 11, N 2. – P. 239–246.

7. Learned immobility explains the behavior of rats in the forced swimming test / J. M. de Pablo [et al.] / Physiol. Behav. – 1989. – Vol. 46, N 2. – P. 229–237. https://doi.org/10.1016/0031-9384(89)90261-8

8. Антидепрессивноподобная активность аналогов циклопролилглицина и участие серотониновых, глутаматных и ГАМК-рецепторов в механизме ее реализации / А. А. Абдуллина [и др.] // Эксперим. и клин. фармакология. – 2019. – Т. 82, № 6. – С. 8–15.

9. Кравченко, Е. В. Особенности габитуации исследовательско-ориентировочной активности у мышей с различным типом зоосоциального контактирования и влияние на нее лейцил-пролина гидрохлорида / Е. В. Кравченко, В. М. Насек, И. В. Жебракова // Новости мед.-биол. наук. – 2019. – № 2. – С. 24–28.

10. Влияние синтетических аналогов фрагмента аргинин-вазопрессина на ультрадианные ритмы активности крыс / О. Н. Саванец [и др.] // Молодежь в науке – 2021 : тез. докл. XVIII Междунар. науч. конф. молодых ученых, Минск, 27–30 сент. 2021 г. : в 2 ч. / Нац. акад. наук Беларуси, Совет молодых ученых ; редкол. : В. Г. Гусаков (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2021. – Ч. 2. – С. 70–72.

11. Исследование хронотропных свойств новых аналогов аргинин-вазопрессина / О. Н. Саванец [и др.] // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики : рецензир. ежегод. сб. науч. тр. : в 2 т. / М-во здравоохр. Респ. Беларусь, Бел. гос. мед. ун-т ; редкол. : С. П. Рубникович, В. А. Филонюк. – Минск, 2022. – Т. 2, вып. 12 : Фундаментальная наука – медицине. Фармация. – С. 205–210.

12. N-Ac-DSer-Pro-DArg-Gly-NH_2 усиливает способность к габитуации вертикальной двигательной активности у крыс Wistar с пассивной стратегией поведения / А. А. Пилюцкая [и др.] // Фундаментальная наука в современной медицине – 2022 : сб. материалов науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых / Бел. гос. мед. ун-т ; под ред. С. П. Рубниковича [и др.]. – Минск : БГМУ, 2022. – С. 217–220.

13. Усиление N-Ac-DSer-Pro-DArg-Gly-NH_2 процессов имплицитной памяти (габитуация локомоторной активности) у крыс Wistar, неустойчивых к воздействию стресса / Н. А. Бизунок [и др.] // Актуальные проблемы современной медицины и фармации – 2022 : сб. тез. докл. LXXVI Междунар. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых, Минск, 20–21 апр. 2022 г. / Бел. гос. мед. ун-т ; под ред. С. П. Рубниковича, В. А. Филонюка. – Минск : БГМУ, 2022. – С. 1197.

References

1. Livingston G., Huntley J., Sommerlad A., Ames D., Ballard C., Banerjee S. [et al.] Dementia prevention, intervention, and care. *2020 report of the Lancet Commission. Lancet*, 2020, vol. 396, no. 10248, pp. 413–446. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30367-6

2. Rakesh G., Szabo S. T., Alexopoulos G. S., Zannas A. S. Strategies for dementia prevention: latest evidence and implications. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, 2017, vol. 8, no. 8–9, pp. 121–136. https://doi.org/10.1177/2040622317712442

3. Borodina K. V., Savanets O. N., Pustyulga E. S., Martinovich V. P., Kravchenko E. V., Olgomets L. M., Golubovich V. P. Synthesis and investigation of the antidepressant properties of novel analogs of arginine-vasopressin. *Bioorganicheskaya khimiya* [Bioorganic chemistry], 2022, vol. 48, no. 3, pp. 357–370 (in Russian).

4. Can A., Dao D. T., Arad M., Terrillion C. E., Piantadosi S. C., Gould T. D. The Mouse Forced Swim Test. *Journal of Visualized Experiments*, 2012, vol. 59, p. e3638. https://doi.org/10.3791/3638

5. Molendijk M. L., de Kloet E. R. Immobility in the forced swim test is adaptive and does not reflect depression. *Psychoneuroendocrinology*, 2015, vol. 62, pp. 389–391. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.08.028

6. Parra A., Vinader-Caerols C., Monleón S., Simón V. M. Learned immobility is also involved in the forced swimming test in mice. *Psicothema*, 1999, vol. 11, no. 2, pp. 239–246.

7. de Pablo J. M., Parra A., Segovia S., Guillamón A. Learned immobility explains the behavior of rats in the forced swimming test. *Physiology and Behavior*, 1989, vol. 46, no. 2, pp. 229–237. https://doi.org/10.1016/0031-9384(89)90261-8

8. Abdullina A. A., Vasil'eva E. V., Kondrakhin E. A., Kolyasnikova K. N., Kuznetsova E. A., Gudasheva T. A., Kovalev G. I. Antidepressant-like effects of cycloprolylglycine analogs and the involvement of serotonin-, glutamate-, and GABA-receptors in their mechanisms. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya* [Experimental and clinical pharmacology], 2019, vol. 82, no. 6, pp. 8–15 (in Russian).

9. Kravchenko E. V., Nasek V. M., Zhebrakova I. V. Features of habituation of exploratory-orienting activity in mice with different types of zoosocial contact and the effect of leucyl-proline hydrochloride on it. *Novosti mediko-biologicheskih nauk* [News of boimedical sciences], 2019, no. 2, pp. 24–28 (in Russian).

10. Savanets O. N., Borodina K. V., Ol'gomets L. M., Kravchenko E. V., Golubovich V. P., Petrov P. T. Influence of synthetic analogues of the arginine-vasopressin fragment on ultradian activity rhythms in rats. *Molodezh' v nauke – 2021: tezisy dokladov XVIII Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii molodykh uchenykh (Minsk, 27–30 sentyabrya 2021 goda). Chast' 2* [Youth in Science – 2021: Abstracts of the XVIII International scientific conference of young scientists (Minsk, September 27–30, 2021). Pt. 2]. Minsk, 2021, pp. 70–72 (in Russian).

11. Savanets O. N., Kravchenko E. V., Ol'gomets L. M., Pilyutskaya A. A., Borodina K. V., Pustyul'ga E. S., Golubovich V. P., Bizunok N. A. Study of the chronotropic properties of new analogues of arginine-vasopressin. *BGMU v avangarde meditsinskoi nauki i praktiki: retsenziruemyi ezhegodnyi sbornik nauchnykh trudov. Tom. 2. Vypusk 12. Fundamental'naya nauka – meditsine. Farmatsiya* [BSMU at the forefront of medical science and practice: a peer-reviewed annual collection of scientific papers. Vol. 2. Iss. 12. Fundamental science – medicine. Pharmacy]. Minsk, 2022, pp. 205–210 (in Russian).

12. Pilyutskaya A. A., Kravchenko E. V., Ol'gomets L. M., Savanets O. N., Borodina K. V., Golubovich V. P., Zil'berman R. D., Bizunok N. A. N-Ac-DSer-Pro-DArg-Gly-NH_2 enhances the ability to habituate vertical locomotor activity in Wistar rats with a passive behavioral strategy. *Fundamental'naya nauka v sovremennoi meditsine – 2022: materialy nauchno-prakticheskoi konferentsii studentov i molodykh uchenykh (Minsk, fevral'–mart 2022 goda)* [Fundamental science in modern medicine – 2022: materials of the scientific and practical conference of students and young scientists (Minsk, February–March 2022)]. Minsk, 2022, pp. 217–220 (in Russian).

13. Bizunok N. A. Pilyutskaya A. A., Kravchenko E. V., Ol'gomets L. M., Savanets O. N., Borodina K. V., Golubovich V. P., Zil'berman R. D. Amplification of N- Ac-DSer-Pro-DArg-Gly-NH_2 of implicit memory processes (habituation of locomotor activity) in stress-resistant Wistar rats. *Aktual'nye problemy sovremennoi meditsiny i farmatsii – 2022: sbornik tezisov dokladov LXXVI Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii studentov i molodykh uchenykh (20–21 aprelya 2022 goda, Minsk)* [Actual problems of modern medicine and pharmacy – 2022: collection of abstracts of the LXXVI International scientific and practical conference of students and young scientists (April 20–21, 2022, Minsk)]. Minsk, 2022, p. 1197 (in Russian).

Информация об авторах

Кравченко Елена Валериевна – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kravchenko@iboch.by

Ольгомец Любовь Михайловна – ст. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: olgomets@iboch.by

Саванец Оксана Николаевна – мл. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: savanets@iboch.by

Бородина Ксения Владимировна – науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: borodina@iboch.by

Пустюльга Егор Сергеевич – науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Pustyulga@iboch.by

Голубович Владимир Петрович – д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: golubovich@iboch.by

Зильберман Роман Дмитриевич – ст. науч. сотрудник, заведующий лабораторией. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: labtox@iboch.by

Бизунок Наталья Анатольевна – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: bizunokna@yandex.ru

Дубовик Борис Валентинович – д-р мед. наук, профессор. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: dubovik@bsmu.by

Information about the authors

Elena V. Kravchenko – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Leading Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kravchenko@iboch.by

Lyubov M. Olgomets – Senior Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: olgomets@iboch.by

Oksana N. Savanets – Junior Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: savanets@iboch.by

Kseniya V. Borodina – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: borodina@iboch.by

Egor S. Pustyulga – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Pustyulga@iboch.by

Vladimir P. Golubovich – Dr. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus).). E-mail: golubovich@iboch.by

Roman D. Zilberman – Senior Researcher, Head of the Laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: labtox@iboch.by

Natalia A. Bizunok – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: bizunokna@yandex.ru

Boris V. Dubovik – D. Sc. (Med.), Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dubovik@bsmu.by