

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

ВЕСЦІ

НАЦЫЯНАЛЬнай АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ МЕДЫЦЫНСКІХ НАВУК. 2024. Т. 21, № 1

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК. 2024. Т. 21, № 1

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
- 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 НАН 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. Строчкий** – Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь
- Д. В. Тапальский** – Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
- Л. П. Титов** – Республиканский научно-практический центр микробиологии и эпидемиологии, Минск, Республика Беларусь

Редакционный совет

- Эдуардас Алекнавичиус** – Национальный институт рака, Вильнюс, Литовская Республика
- Марк М. Ван Гулле** – Университет Лёвена, Лёвен, Королевство Бельгия
- Драган Дьюрич** – Институт медицинской физиологии Ричарда Бьюриана Университета Белграда, Белград, Республика Сербия
- Т. П. Ключник** – 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. 2024. Т. 21, № 1
Выходит на русском, белорусском и английском языках

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

Подписано в печать 08.02.2024. Выход в свет 28.02.2024. Формат 60×84¹/₈. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 10,23. Уч.-изд. л. 11,3. Тираж 38 экз. Заказ 25.
Цена номера: индивидуальная подписка – 13,34 руб., ведомственная подписка – 31,28 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, 2024

PROCEEDINGS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

MEDICAL SERIES, 2024, vol. 21, no. 1

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

Vasiliy 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 (*Leading 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 for Pulmonology and Tuberculosis, Minsk, Republic of Belarus

Sergei L. Kabak – Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Nina P. Kanunnikova – Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Republic of Belarus

Sergei A. Krasny – N. N. Alexandrov National Cancer Centre”, Minsk, Republic of Belarus

Natalia P. Mitkovskaya – Republican Scientific and Practical Centre of 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

Dmitry V. Tapalsky – Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Leonid P. Titov – Republican Scientific and Practical Centre of Microbiology and Epidemiology, Minsk, Republic of Belarus

Frantishek I. Vismont – Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Editorial Council

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 Centre 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

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, 2024, vol. 21, no. 1.

Printed in Russian, Belarusian and English languages

Editor *V. G. Kolosovskaya*

Computer imposition *Yu. A. Aheichyk*

It is sent of the press 08.02.2024. Appearance 28.02.2024. Format 60×84¹/₈. Offset paper. The press digital.

Printed pages 10.23. Publisher's signatures 11.3. Circulation 38 copies. Order 25.

Number price: individual subscription – 13.34 byn., departmental subscription – 31.28 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, 2024

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

ЗМЕСТ

КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА

Висмонт Ф. И. Участие центральных адренореактивных систем в регуляции детоксикационной функции печени и температуры тела при бактериальной эндотоксемии.....	7
Доронькина А. С., Рудак А. А., Жаворонок И. П., Богдан В. Г. Виртуальный скрининг биологической активности амидов жирных кислот.....	16
Рубникович С. П., Дедова Л. Н., Денисова Ю. Л., Соломевич А. С. Прогноз риска развития чувствительности дентина у стоматологических пациентов (<i>на англ. яз.</i>).....	26
Борисенко Т. Л., Снежицкий В. А., Курбат М. Н., Горчакова О. В., Копыцкий А. В. Распределение генотипов гена <i>SLC2A9</i> и его взаимосвязь с уровнем мочевого кислоты у пациентов с артериальной гипертензией и фибрилляцией предсердий.....	33
Шейбак В. М., Павлюковец А. Ю., Дорошенко Е. М. Триптофан и цинк: влияние совместного введения на гомеостаз свободных аминокислот плазмы.....	43
Цыганков А. М., Грибовская О. В., Мартинович В. П., Голубович В. П., Хайрулина Н. В., Янченко В. В. Активация короткими синтетическими пептидами лейкоцитов <i>in vitro</i> как этап создания лечебно-профилактических вакцин против COVID-19.....	53
Путятин А. Н., Ким Л. Б., Русских Г. С. Оценка метаболизма коллагенов при экспериментальном БЦЖ-индуцированном туберкулезном воспалении.....	62
Чижик В. А., Селицкий М. М., Пономарев В. В. Эффективность и безопасность первичного и повторного курсов терапии болезни Паркинсона аутологичными мезенхимальными стромальными клетками в долгосрочном периоде.....	68
Карлович Н. В., Шишко О. Н., Малышко М. А., Юренин Е. В., Мохорт Т. В. Канюлированный тест на пролактин в диагностике синдрома гиперпролактинемии.....	79

CONTENTS**CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE**

Vismont F. I. Participation of central adrenoreactive systems in the regulation of the liver detoxication function and body temperature in bacterial endotoxemia	7
Doronkina A. S., Rudak A. A., Zhavoronok I. P., Bogdan V. G. Virtual screening of the biological activity of fatty acid amides	16
Rubnikovich S. P., Dedova L. N., Denisova Yu. L., Solomevich A. S. Predicting the risk of dentin sensitivity development in dental patients	26
Barysenka T. L., Snezhitskiy V. A., Kurbat M. N., Gorchakova O. V., Kopytsky A. V. Distribution of the <i>SLC2A9</i> genotype and its association with the uric acid level in patients with arterial hypertension and atrial fibrillation	33
Sheybak V. M., Pavlyukovets A. Yu., Doroshenko E. M. Tryptophan and zinc: effect of co-administration on plasma free amino acid homeostasis	43
Tsygankov A. M., Gribovskaya O. V., Martinovich V. P., Golubovich V. P., Khairulina N. V., Yanchanka U. V. Activating the leukocytes by short synthetic peptides <i>in vitro</i> as a stage in the creation of treatment-prophylactic vaccines against COVID-19	53
Putyatina A. N., Kim L. B., Russkikh G. S. Assessing the collagen metabolism in experimental BCG-induced tuberculous inflammation	62
Chyzyk V. A., Sialitski M. M., Ponomarev V. V. Efficacy and safety of primary and repeated therapy courses of Parkinson's disease with autologous mesenchymal stromal cells in the long-term period	68
Karlovich N. V., Shishko O. N., Malyshko M. A., Yurenaya E. V., Mokhort T. V. Cannulated prolactin test in the diagnosis of the hyperprolactinemia syndrome	79

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

КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА

CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE

УДК [616.36+612.55]:616-022:612.181.6
<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-1-7-15>

Поступила в редакцию 20.11.2023
Received 20.11.2023

Ф. И. Висмонт

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

УЧАСТИЕ ЦЕНТРАЛЬНЫХ АДРЕНОРЕАКТИВНЫХ СИСТЕМ В РЕГУЛЯЦИИ ДЕТОКСИКАЦИОННОЙ ФУНКЦИИ ПЕЧЕНИ И ТЕМПЕРАТУРЫ ТЕЛА ПРИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЭНДОТОКСИНЕМИИ

Аннотация. Известно, что от функционального состояния печени, ее детоксикационной функции во многом зависят выраженность эндотоксинемии и температура тела. Показано, что в условиях действия на организм чрезвычайных раздражителей адренореактивные системы гипоталамуса оказывают значительное влияние на все процессы жизнедеятельности, в частности на детоксикацию и терморегуляцию.

Цель исследования – выяснение значимости центральных адренореактивных систем в регуляции детоксикационной функции печени и температуры тела при бактериальной эндотоксинемии.

Методы исследования: физиологические, биохимические, фармакологические.

В опытах на крысах и кроликах показано, что направленность и характер изменений температуры тела при действии бактериального липополисахарида (эндотоксина *E. coli*) зависят от выраженности эндотоксинемии, состояния детоксикационной функции печени. Выявлено, что при введении бактериального эндотоксина в организм в следовых концентрациях температура тела и активность процессов детоксикации повышаются, а при выраженной эндотоксинемии – снижаются. Установлено, что направленность и характер изменений температуры тела и процессов детоксикации в условиях развития эндотоксинемии зависят от ее выраженности. Обнаружено, что в зависимости от функционального состояния печени крыс, ее детоксикационной функции (одно- или трехкратная заправка животных четыреххлористым углеродом) одна и та же доза бактериального эндотоксина может приводить к повышению температуры тела, не оказывая на нее влияния или вызывая гипотермию. Установлено, что активность α - и β -адренореактивных систем гипоталамической области мозга имеет значение в регуляции процессов детоксикации и температуры тела при бактериальной эндотоксинемии. Снижение активности α -адренорецепторов в мозге в условиях действия бактериального эндотоксина, по-видимому, является одним из пусковых механизмов в цепи процессов, приводящих к повышению температуры тела и активности детоксикационной функции печени.

Ключевые слова: центральные адренореактивные системы, детоксикационная функция печени, температура тела, бактериальная эндотоксинемия

Для цитирования: Висмонт, Ф. И. Участие центральных адренореактивных систем в регуляции детоксикационной функции печени и температуры тела при бактериальной эндотоксинемии / Ф. И. Висмонт // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2024. – Т. 21, № 1. – С. 7–15. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-1-7-15>

Frantisek I. Vismont

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

PARTICIPATION OF CENTRAL ADRENOREACTIVE SYSTEMS IN THE REGULATION OF THE LIVER DETOXICATION FUNCTION AND BODY TEMPERATURE IN BACTERIAL ENDOTOXINEMIA

Abstract. It is known that the severity of endotoxemia and the body temperature level largely depends on the liver functional state and its detoxication function. It was shown that the adrenoactive systems of the hypothalamus under the influence of extreme irritants on the body have a pronounced effect on all vital processes and, in particular, on thermoregulation and detoxication.

The objective of the study was to determine the significance of central adrenoactive systems in the regulation of the liver detoxication function and body temperature during bacterial endotoxemia.

Research methods are: physiological, biochemical, pharmacological.

Experiments on rats and rabbits showed that the direction and nature of body temperature changes under the action of *E. coli* bacterial endotoxin depend on the severity of endotoxemia and the state of the liver detoxication function. It was revealed that when bacterial endotoxin is introduced into the body in trace concentrations, it increases, and with severe endotoxemia, the body temperature and the activity of detoxication processes decrease. It was established that the ambiguous direction and nature of body temperature and detoxication changes under the conditions of endotoxemia depend on its severity. It was revealed that depending on the liver functional state, its detoxication function (one- or three-fold inoculation of animals with carbon tetrachloride), the same dose of bacterial endotoxin can lead to increasing the rat body temperature, has no effect on it, or can cause hypothermia. It was established that the activity of α - and β -adrenoreactive systems of the hypothalamic region of the brain is important in the regulation of detoxication processes and body temperature during bacterial endotoxemia. A decrease in the activity of α -adrenergic receptors in the brain under the influence of bacterial endotoxin appears to be one of the triggers in the chain of processes leading to a body temperature increase and detoxication.

Keywords: central adrenoreactive systems, detoxication function of the liver, body temperature, bacterial endotoxemia

For citation: Vismont F. I. Participation of central adrenoreactive systems in the regulation of the liver detoxication function and body temperature in bacterial endotoxemia. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2024, vol. 21, no. 1, pp. 7–15 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-1-7-15>

Введение. Всестороннее изучение процессов жизнедеятельности при различных состояниях и заболеваниях – важная задача современной медицины.

Общеизвестно, что ведущим универсальным звеном в патогенезе нарушений жизнедеятельности при различных состояниях и заболеваниях как инфекционной, так и неинфекционной природы является токсинемия, в частности бактериальная эндотоксинемия [1–4]. В последние годы все больше появляется данных о значимости токсинов бактериального происхождения в жизнедеятельности здорового и больного организма. Считается, что в небольших количествах поступающие в кровоток и циркулирующие там эндотоксины бактериального происхождения выполняют функцию «гормона адаптации», т. е. фактора приспособления к меняющимся условиям жизнедеятельности. Однако в больших количествах эти токсины в условиях недостаточности обезвреживающей (детоксикационной и эндотоксинэлиминирующей) функции клеток печени становятся патогенным фактором, запускающим механизмы развития целого ряда патологических состояний и болезней [5–7].

Основным источником эндотоксинов бактериального происхождения в организме человека и животных является кишечник, в котором только за одни сутки самообновляется до 1 кг микрофлоры. Поступающие в кровоток (в том числе из просвета кишечника) структурные компоненты микроорганизмов, включая эндотоксин, поскольку последний является облигатным компонентом клеточных мембран многих бактерий, во многом обезвреживаются или элиминируются гепатоцитами и клетками Купфера [8–10].

Нами установлено, что от функционального состояния печени, ее детоксикационной функции во многом зависит температура тела и выраженность эндотоксинемии [3, 11, 12].

Показано, что адренореактивные системы гипоталамуса в условиях действия на организм чрезвычайных раздражителей оказывают выраженное влияние на все процессы жизнедеятельности и, в частности, на терморегуляцию [13–15].

Однако участие центральных адренореактивных систем в регуляции детоксикационной функции печени и температуры тела при бактериальной эндотоксинемии не было объектом комплексных исследований.

Целью исследования было выяснение значимости центральных адренореактивных систем в регуляции детоксикационной функции печени и температуры тела при бактериальной эндотоксинемии.

Задачи исследования:

1. Исследовать детоксикационную функцию печени у крыс и кроликов в условиях бактериальной эндотоксинемии.
2. Изучить изменение содержания норадреналина в гипоталамической области мозга у крыс при бактериальной эндотоксинемии.
3. Установить характер изменений детоксикационной функции печени и температуры тела у животных в условиях острого токсического поражения печени четыреххлористым углеродом.

4. Выяснить особенности изменения температуры тела и процессов детоксикации у крыс при введении животным бактериального эндотоксина в условиях острого токсического поражения печени четыреххлористым углеродом.

5. Исследовать центральное действие норадреналина, клофелина и изопротеренола на процессы детоксикации и температуру тела при бактериальной эндотоксинемии.

6. Выяснить значение центральных α - и β -адренореактивных систем в регуляции детоксикационной функции печени и температуры тела при бактериальной эндотоксинемии.

Материалы и методы исследования. Опыты выполнены на взрослых ненаркотизированных белых крысах-самцах массой 160–220 г и кроликах обоего пола массой 2,5–3,0 кг. До постановки эксперимента животных адаптировали к условиям вивария. Они получали полноценный пищевой рацион в соответствии с нормами содержания лабораторных животных. Рацион крыс состоял из комбикорма КК-92/ПХЧ-5, количество которого определялось Нормами кормления лабораторных животных (О нормах кормления лабораторных животных и продуцентов: приказ Министерства здравоохранения СССР от 10 марта 1966 г. № 163 // Полн. собр. законодательства СССР [Электронный ресурс]. Режим доступа: www.ussrdoc.com. Дата доступа: 01.04.2012). Питьевой режим соответствовал принципу *ad libitum*.

В связи с имеющимися в литературе данными о том, что у животных в течение суток происходят значительные колебания уровня ряда гормонов и биогенных аминов в крови, которые сопровождаются изменениями в энергетическом и пластическом обмене, терморегуляции, опыты проводили в строго определенное время (8–12 ч утра). Все наблюдения производили в термонейтральных условиях (20–22 °С).

В работе использованы известные экспериментальные модели: бактериальной эндотоксинемии, острого токсического поражения печени четыреххлористым углеродом (CCl_4). Применяли современные биохимические и физиологические методы исследования, а также фармакологический подход с использованием веществ, влияющих на метаболизм и резервирование катехоламинов, и веществ, блокирующих функцию адренергических синапсов в ЦНС.

Для создания модели бактериальной эндотоксинемии использовали бактериальный липополисахарид (ЛПС) – эндотоксин *E. coli* (серия 0111:B4, Sigma, США), который вводили однократно: крысам – внутривентриально, кроликам – в краевую вену уха.

Острое токсическое поражение печени вызывали путем интрагастрального введения животным масляного раствора CCl_4 (приготовленного на подсолнечном масле в соотношении 1:1) в дозе 5,0 мл/кг крысам и 2,0 мл/кг кроликам.

Взятие для исследований крови и ткани печени у животных проводилось сразу после декапитации. Кровь после декапитации собирали в охлажденные центрифужные пробирки с добавлением гепарина и центрифугировали 10 мин (5000 г при +4 °С). Полученную плазму отбирали пипеткой и использовали в дальнейшем для определения количества средних молекул (СМ) и степени токсичности крови (СТК). По содержанию в крови веществ группы СМ, степени токсичности плазмы крови и продолжительности наркотического сна (ПНС) судили о детоксикационной функции печени. Содержание СМ определяли с методом кислотно-этанольного осаждения (Способ определения веществ группы средних молекул в биологических жидкостях: а. с. 1520445 СССР, VRB F 01 № 33/50 / В. М. Мойн, В. В. Николайчик, В. В. Кирковский. № 4323421/28-14; заявлено 02.11.87; опубл. 07.11.89 // Открытия. Изобретения. 1989. № 41. С. 415.) и СТК-способом (Способ определения токсичности биологических жидкостей: а. с. 1146570 СССР, МКИ 6 ОI № 1/28 / О. А. Радькова, Г. А. Бояринов, И. Н. Балишина. № 3458007/28-13; заявлено 18.06.84; опубл. 23.03.85 // Открытия. Изобретения. 1985. № 41. С. 415). О ПНС у крыс (гексенал 100,0 мг/кг, внутривентриально) судили по времени нахождения животных в боковом положении.

Выделение гипоталамуса осуществляли при температуре 0...+4 °С. Ткань гипоталамуса замораживали в жидком азоте и хранили до использования при температуре –15 °С. Содержание норадреналина (НА) в гипоталамической области мозга определяли спектрофлуориметрическим методом, описанным R. Laverty, K. Taylor [16]. Для изучения скорости оборота НА в ткани гипоталамуса применяли ингибитор тирозингидроксилазы α -метил-п-тирозин (Regis, США) и ингибитор моноаминоксидазы паргалин (внутрибрюшинные инъекции).

Для изменения активности центральных адренореактивных систем мозга использовали адrenomиметики и адреноблокаторы, которые вводили однократно: крысам – под местной анестезией (5 %-ный новокаин подкожно) в правый боковой желудочек мозга в объеме 20 мкл; кроликам – в полость правого бокового желудочка через вживленные химиотроды в объеме, не превышающем 50 мкл. Были использованы: α -адреномиметик L-норадреналин битартрат моногидрат (Calbiochem, США), клофелин, мезатон, β -адреномиметик – изопротеренол битартрат дигидрат (Withrop, США), α -адреноблокатор феноксбензамин и β -адреноблокатор пропранолол (Ayerst Labs, США).

Ректальную температуру в прямой кишке (на глубине 3,0 и 5,0 см у крыс и кроликов соответственно) измеряли с помощью электротермометра ТПЭМ-1. В ряде опытов регистрацию температуры тела у крыс осуществляли при помощи телеметрической установки Mini Mitter (модель 4000, США).

Эксперименты на крысах и кроликах проводили в соответствии с этическими нормами обращения с животными. Полученные цифровые данные обрабатывали общепринятыми методами вариационной биологической статистики с помощью критерия Стьюдента. Все данные представляли в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего арифметического ($\bar{X} \pm S_x$). Достоверность результатов учитывали при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В опытах на крысах и кроликах показано, что направленность и характер изменений температуры тела при действии бактериального эндотоксина зависят от выраженности эндотоксинемии, состояния детоксикационной функции печени. Установлено, что при введении бактериального эндотоксина в организм в следовых концентрациях повышается, а при выраженной эндотоксинемии снижается температура тела и активность процессов детоксикации.

Так, введение в кровоток ЛПС кроликам (0,5 мкг/кг) или внутривентриально крысам (5,0 мкг/кг) вызывает развитие лихорадочной реакции. Внутривентриальное введение крысам ($n = 12$) ЛПС приводило к повышению температуры тела на 1,3; 1,2; 1,6; 1,3 и 0,6 °C ($p < 0,001$) через 120, 180, 240, 300 и 330 мин после инъекции эндотоксина, которая составляла $38,8 \pm 0,10$; $38,7 \pm 0,12$; $39,1 \pm 0,10$; $38,8 \pm 0,13$ и $38,1 \pm 0,12$ °C. Температура тела у кроликов ($n = 9$) через 30, 60, 120 и 180 мин после введения в кровоток ЛПС возрастала на 0,6; 1,3; 1,6 и 1,2 °C ($p < 0,001$) и составляла $39,2 \pm 0,12$; $39,9 \pm 0,10$; $40,2 \pm 0,11$ и $39,8 \pm 0,12$ °C соответственно.

Повышение температуры тела у крыс ($n = 8$) под влиянием ЛПС (5,0 мкг/кг) не сопровождалось (через 120 и 180 мин после инъекции эндотоксина) статистически значимыми изменениями СТК. Системное действие ЛПС через 180 мин после инъекции приводило к снижению содержания СМ на 15,8 % ($p < 0,05$). Содержание СМ в плазме крови у крыс (через 120 и 180 мин после внутривентриального введения физраствора) составляло $0,73 \pm 0,013$ и $0,071 \pm 0,011$ г/л соответственно.

Эндотоксин в большой дозе (50 мг/кг у крыс и 10 мг/кг у кроликов) вызывал выраженную гипотермию. Снижение температуры тела сопровождалось выраженной эндотоксинемией, снижением детоксикационной функции печени (значительно повышались уровень СМ в плазме крови, степень ее токсичности и ПНС) [3, 11].

Как известно, развитие эндотоксинемии зависит не только и не столько от поступления в кровоток избыточного количества эндотоксинов, сколько от недостаточности антиэндотоксиновой защиты и детоксикационной функции печени. Подтверждение было получено в опытах с введением ЛПС животным с функциональной недостаточностью печени, ее детоксикационной функции.

Результаты исследований показали, что в условиях острого токсического поражения печени, вызванного как одно-, так и трехкратным интрагастральным введением животным масляного раствора CCl_4 , угнетаются процессы детоксикации, снижается температура тела и развивается стойкая и выраженная гипотермия.

Так, через 12, 24 и 48 ч после введения в желудок масляного раствора CCl_4 (5,0 мл/кг) ректальная температура у крыс снижалась – соответственно на $1,0 \pm 0,12$ °C ($n = 12$, $p < 0,05$), $1,2 \pm 0,13$ °C ($n = 10$, $p < 0,05$) и $1,7 \pm 0,12$ °C ($n = 10$, $p < 0,05$). У кроликов интрагастральное введение раствора CCl_4 (2,0 мл/кг) вызывало снижение ректальной температуры на $1,2 \pm 0,11$ °C

($n = 7, p < 0,05$) и $1,6 \pm 0,12$ °C ($n = 7, p < 0,05$) через 12 и 24 ч соответственно. Длительность гипотермии составляла 4–5 сут. В опытах на крысах выявлено, что интрагастральное введение животным масляного раствора CCl_4 приводит к повышению в плазме крови уровня СМ и СТК. Концентрация СМ через 12 и 24 ч от момента затравки животных CCl_4 повышалась на 25,3 % ($n = 7, p < 0,05$) и 32,4 % ($n = 7, p < 0,05$). В этих условиях СТК была выше у опытных крыс по сравнению с таковой в контроле на 35,2 % ($n = 6, p < 0,05$) и 56,4 % ($n = 7, p < 0,05$) соответственно. ПНС у крыс через 12 и 24 ч после введения раствора CCl_4 возрастала по сравнению с аналогичным показателем у животных, которым интрагастрально вводили подсолнечное масло, на 25,0 % ($n = 7, p < 0,05$) и 20,5 % ($n = 6, p < 0,05$) соответственно. ПНС у животных ($n = 7$) в контроле (через 12 и 24 ч после введения в желудок подсолнечного масла в дозе 5,0 мл/кг) составила $24,8 \pm 2,08$ и $22,1 \pm 2,40$ мин соответственно.

Трехкратное интрагастральное введение животным масляного раствора CCl_4 вызывало у животных более выраженную и продолжительную гипотермию.

Установлено, что в условиях острого токсического поражения печени, вызванного однократным интрагастральным введением CCl_4 , лихорадочной реакции у крыс и кроликов на эндотоксин не возникает. Так, температура тела у крыс в контроле (через 24 ч после введения в желудок подсолнечного масла в дозе 5,0 мл/кг) под влиянием внутрибрюшинного введения ЛПС (5,0 мкг/кг) через 120 и 180 мин от момента введения эндотоксина повышалась на $1,4 \pm 0,10$ °C ($n = 10$) и $1,2 \pm 0,11$ °C ($n = 10$), а в опыте, в условиях предварительной (за сутки) однократной затравки животных CCl_4 через 2 и 3 ч после инъекции ЛПС, достоверно не изменялась. Температура тела у животных в контроле, получивших предварительно подсолнечное масло интрагастрально, через 120 и 180 мин после введения эндотоксина составляла $38,8 \pm 0,12$ °C ($n = 10$) и $38,5 \pm 0,11$ °C ($n = 10$) соответственно.

В опытах на кроликах установлено, что ЛПС в дозе 0,5 мкг/кг (через 60 и 120 мин после инъекции) при предварительном однократном введении в желудок подсолнечного масла (2,0 мл/кг), за 24 ч до инъекции эндотоксина, повышает температуру тела у животных ($n = 7$) на $1,1 \pm 0,18$ и $1,6 \pm 0,15$ °C соответственно. Обнаружено, что лихорадочная реакция у кроликов, вызванная введением в кровоток ЛПС, так же как и у крыс, не развивается в условиях предварительной (за 24 ч до инъекции ЛПС) затравки животных CCl_4 (2,0 мл/кг).

В опытах на крысах установлено, что действие в организме бактериального эндотоксина при остром поражении печени CCl_4 наряду с выявленными изменениями температуры тела усугубляет расстройство детоксикационной функции печени, вызываемое гепатотропным ядом. ПНС (гексенал 100 мг/кг, внутрибрюшинно) у крыс, предварительно (за сутки) затравленных CCl_4 (5,0 мл/кг), через 120 мин после внутрибрюшинной инъекции ЛПС (5,0 мкг/кг) увеличивалась по сравнению с таковой у животных контрольной группы (введение масляного раствора CCl_4 интрагастрально и физраствора внутрибрюшинно) на 23,2 % ($p < 0,05$) и составляла $39,0 \pm 4,56$ мин ($n = 7$). Длительность наркотического сна у крыс с токсическим поражением печени CCl_4 в контроле (через 120 мин после внутрибрюшинного введения физраствора) составляла $30,0 \pm 3,74$ мин ($n = 7$).

Опыты также показали, что в зависимости от функционального состояния печени, ее детоксикационной функции (одно- или трехкратной затравки животных CCl_4) одна и та же доза ЛПС может приводить к повышению температуры тела у крыс, не оказывая на нее влияния или вызывать гипотермию [10, 11].

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что функциональное состояние печени и активность ее детоксикационной функции имеют важное значение в механизмах регуляции температуры тела при действии бактериального эндотоксина.

Принимая во внимание известные сведения о том, что центральные адренореактивные системы гипоталамической области мозга в условиях действия на организм чрезвычайных раздражителей оказывают влияние на все процессы жизнедеятельности, были основания полагать, что выявленные изменения в процессах детоксикации и температуры тела при бактериальной эндотоксинемии могут быть обусловлены изменениями функционального состояния и активности

адренореактивных систем в гипоталамусе, а также изменениями в центре регуляции вегетативных функций.

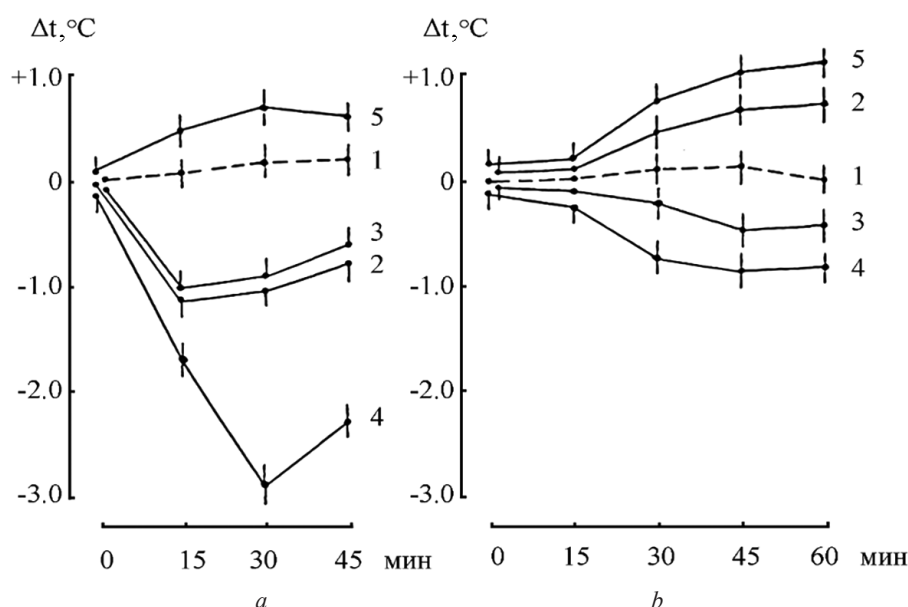
Выявлено, что введение кроликам бактериального эндотоксина в дозе 0,5 мкг/кг приводит к снижению в гипоталамусе содержания НА (на 30,7 % через 60 мин после введения в кровотоки ЛПС – до $0,95 \pm 0,099$ мкг/г ткани). Через 30 мин после введения ЛПС содержание НА в ткани гипоталамуса статистически значимо не изменялось.

Учитывая, что не содержание медиатора, а скорость его оборота является наиболее объективным критерием оценки функциональной активности нейромедиаторной системы, нами изучено влияние бактериального эндотоксина на содержание НА в гипоталамической области мозга у кроликов в условиях угнетения синтеза катехоламинов α -метил-*n*-тирозином и введения ингибитора распада катехоламинов паргирина. Как показали опыты, действие (30 мин) в организме бактериального эндотоксина в дозе 0,5 мкг/кг существенно не отражалось на скорости оборота НА в гипоталамусе.

Полученные данные дали основание полагать, что адренореактивные системы и НА гипоталамической области мозга участвуют в механизмах регуляции температуры тела и детоксикационной функции печени при бактериальной эндотоксинемии.

С целью выяснения значимости адренореактивных систем гипоталамуса в центральных механизмах регуляции температуры тела и детоксикационной функции печени при бактериальной эндотоксинемии изучено влияние возбуждения α - и β -адренореактивных систем мозга на температуру тела (см. рисунок) и процессы детоксикации.

Установлено, что введение в боковой желудочек мозга крыс ($n = 8$) водного раствора НА в дозе 1 мкг на животное приводит к повышению температуры тела (на 1,0 °C через 15 мин и на 0,9 °C через 30 мин). С увеличением дозы вводимого НА ответная реакция изменялась. Так,



Изменение температуры тела у крыс (а) и кроликов (б) после введения в желудочки мозга адреномиметиков: 1 – контроль (бидистиллированная вода, $n = 10$); 2 – норадреналин (10 мкг на крысу, $n = 16$, и 30 мкг на кролика, $n = 7$); 3 – мезатон (40 мкг на крысу, $n = 10$, и 50 мкг на кролика, $n = 7$); 4 – клофелин (10 мкг на крысу, $n = 12$, или 30 мкг на кролика, $n = 7$); 5 – изопротеренол (10 мкг на крысу, $n = 8$, или 50 мкг на кролика, $n = 7$). n – число опытов. Стрелкой обозначен момент введения в желудочки мозга препаратов или бидистиллированной воды (в контроле)

Body temperature changes in rats (a) and rabbits (b) after administrating adrenergic agonists into the ventricles of the brain: 1 – control (double-distilled water, $n = 10$); 2 – norepinephrine (10 μg per rat, $n = 16$, and 30 μg per rabbit, $n = 7$); 3 – mesatone (40 μg per rat, $n = 10$, and 50 μg per rabbit, $n = 7$); 4 – clonidine (10 μg per rat, $n = 12$, or 30 μg per rabbit, $n = 7$); 5 – isoproterenol (10 μg per rat, $n = 8$, or 50 μg per rabbit, $n = 7$). n is the number of experiments. The arrow indicates the moment of injecting drugs or double-distilled water into the ventricles of the brain (control)

введение в боковые желудочки мозга водного раствора НА в дозе 4,0 мкг на животное ($n = 7$) не отражалось на температуре тела. Центральное действие НА в дозе 10 мкг через 30 мин после инъекции сопровождалось у животных ($n = 8$) понижением ректальной температуры тела (на $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p < 0,02$, через 15 мин после инъекции) по сравнению с контролем.

Введение в желудочки мозга крыс ($n = 7$) НА в дозе 20 мкг на животное приводило через 15 и 30 мин после инъекции к значительному снижению ректальной температуры и угнетению процессов детоксикации. Уже через 15 мин температура тела крыс ($n = 10$) снижалась с $37,0 \pm 0,09$ до $35,9 \pm 0,18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Содержание СМ в плазме крови и СТК возрастали – на $22,1\%$ ($n = 8$, $p < 0,05$) и $19,4\%$ ($n = 8$, $p < 0,01$) соответственно.

В опытах на кроликах ($n = 7$) показано, что введение в полость III желудочка НА в дозе 30 мкг приводит к слабовыраженной гипертермии и статистически не значимому снижению уровня СМ в плазме крови и СТК. Так, ректальная температура через 30 и 60 мин после инъекции повышалась на $0,4$ и $0,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ соответственно.

Учитывая гетерогенность синапсов, можно предположить, что НА в разных дозах (что определяет скорость и степень диффузии веществ из желудочков мозга к различным участкам мозга) влияет на различные, в зависимости от доступности, центральные адренорецепторы, функциональное назначение которых в регуляции температуры тела и процессов детоксикации не одинаково [12, 14]. Данное предположение подтверждается результатами, полученными при введении в желудочки мозга крыс и кроликов адреномиметиков, взаимодействующих преимущественно с α - и β -адренорецепторами.

Опыты показали, что центральное действие α -адреномиметиков клофелина (10 мкг) и мезатона (40 мкг) у крыс сопровождается снижением ректальной температуры, а введение в желудочки мозга β -адреномиметика изопротеренола (10 мкг) приводит к повышению температуры тела и активности процессов детоксикации. В опытах на кроликах также установлено, что при введении в желудочки мозга клофелина (30 мкг) и мезатона (50 мкг) температура тела животных понижается, а при введении изопротеренола (50 мкг) – повышается. В частности, введение крысам ($n = 10$) клофелина (10 мкг) приводило к быстрому снижению ректальной температуры (на $1,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ через 15 мин и на $2,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ через 30 мин после инъекции). Центральное действие мезатона (40 мкг) у животных ($n = 8$) проявлялось снижением температуры тела на $1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ через 15 мин и на $0,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ через 30 мин после введения препарата. Напротив, введение в желудочки мозга изопротеренола (10 мкг) сопровождалось повышением на $0,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($n = 8$, $p < 0,05$) температуры тела через 30 мин после инъекции.

Центральное действие клофелина, наряду с изменением температуры тела, сопровождается понижением, а при введении изопротеренола – повышением активности процессов детоксикации. Так, через 30 мин после введения в желудочки мозга клофелина (30 мкг) концентрация в крови СМ повышалась на $28,2\%$ ($n = 8$, $p < 0,05$), а после введения изопротеренола (50 мкг) снижалась на $19,8\%$ ($n = 7$, $p < 0,05$). ПНС у крыс через 30 мин после инъекции клофелина возрастала по сравнению с таковой у животных, которым вводили в желудочки мозга бидистиллированную воду, на $23,4\%$ ($p < 0,05$, $n = 7$), а после введения изопротеренола снижалась на $17,6\%$ ($p < 0,05$, $n = 7$). Уровень СМ в плазме крови и СТК составляли в контроле через 30 мин после введения в желудочки мозга бидистиллированной воды $0,76 \pm 0,014$ г/л и $1,4 \pm 0,13$ ед. ПНС у животных ($n = 7$) в контроле (через 30 мин после введения в правый боковой желудочек мозга бидистиллированной воды) составила $27,6 \pm 3,14$ мин.

Как показали последующие опыты, лихорадочная реакция крыс ($n = 10$), вызванная действием в организме бактериального эндотоксина, не предупреждается предварительным (за 30 мин до инъекции ЛПС) введением в системы желудочков мозга как α -адреноблокатора феноксифамина (100 мкг), так и β -адреноблокатора пропранолола (100 мкг). Не выявлено статистически значимых отличий в процессах детоксикации, скорости развития эндотоксиновой лихорадки у кроликов ($n = 8$) в условиях предварительного введения в систему желудочков мозга как α -адреноблокатора феноксифамина, так и β -адреноблокатора пропранолола.

Заключение. Таким образом, полученный экспериментальный материал позволяет предположить, что НА участвует в центральных тормозных и активирующих нейронных системах,

регулирующих температуру тела и активность процессов детоксикации. Угнетающее влияние НА на центральные механизмы, регулирующие температуру тела и активность процессов детоксикации, по-видимому, осуществляется через α -адренорецепторы, а активирующее – через β -адренорецепторы.

Следовательно, можно заключить, что активность α - и β -адренореактивных систем гипоталамической области мозга имеет значимость в формировании процессов детоксикации и характера ответной терморегуляторной реакции организма на действие бактериального эндотоксина. Снижение активности α -адренорецепторов мозга в условиях действия ЛПС, по-видимому, является одним из пусковых механизмов в цепи процессов, приводящих к повышению температуры тела и активности процессов детоксикации.

Таким образом, полученные данные дают основание утверждать, что активность α - и β -адренореактивных систем гипоталамической области мозга имеет значимость в регуляции процессов детоксикации и температуры тела при бактериальной эндотоксинемии. При этом направленность и характер изменений температуры тела и процессов детоксикации в условиях развития эндотоксинемии зависят от ее выраженности и во многом обусловлены изменением активности адренореактивных систем гипоталамической области мозга. Снижение активности α -адренорецепторов мозга в условиях бактериальной эндотоксинемии, по-видимому, является одним их механизмов в цепи процессов, приводящих к повышению температуры тела и детоксикационной функции печени.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Яковлев, М. Ю. «Эндотоксиновая агрессия» как предболезнь или универсальный фактор патогенеза заболеваний человека и животных / М. Ю. Яковлев // Успехи соврем. биологии. – 2003. – Т. 123, № 1. – С. 31–40.
2. Bahador, M. From therapy to experimental model: a hundred years of endotoxin administration to human subjects / M. Bahador, A. S. Cross // J. Endotoxin Res. – 2007. – Vol. 13, N 5. – P. 251–279. <https://doi.org/10.1177/0968051907085986>
3. Висмонт, Ф. И. Эндотоксинемия, дизрегуляция и формирование предболезни / Ф. И. Висмонт // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2018. – Т. 15, № 1. – С. 7–16.
4. Munford, R. S. Endotoxemia – menace, marker, or mistake? / R. S. Munford // J. Leukocyte Biol. – 2016. – Vol. 100, N 4. – P. 687–698. <https://doi.org/10.1189/jlb.3ru0316-151r>
5. Bacterial endotoxin activity in human serum is associated with dyslipidemia, insulin resistance, obesity, and chronic inflammation / M. I. Lassenius [et al.] // Diabetes Care. – 2011. – Vol. 34, N 8. – P. 1809–1815. <https://doi.org/10.2337/dc10-2197>
6. Яковлев, М. Ю. Системная эндотоксинемия / М. Ю. Яковлев. – М.: Наука, 2021. – 184 с.
7. Raetz, C. R. Lipopolysaccharide endotoxins / C. R. Raetz, C. Whitfield // Annu. Rev. Biochem. – 2002. – Vol. 71. – P. 635–700. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>
8. Аниховская, И. А. Кишечный эндотоксин и стресс в адаптации и старении / И. А. Аниховская, И. М. Салахов, М. Ю. Яковлев // Вестн. РАЕН. – 2016. – Т. 16, № 1. – С. 19–24.
9. Яковлев, М. Ю. Роль кишечной микрофлоры и недостаточность барьерной функции печени в развитии эндотоксинемии и воспаления / М. Ю. Яковлев // Казан. мед. журн. – 1988. – Т. 69, № 5. – С. 353–358.
10. Висмонт, Ф. И. Участие клеток Купфера и гепатоцитов в формировании терморегуляторных реакций организма на действие эндотоксина / Ф. И. Висмонт, К. Н. Грищенко // Здравоохранение. – 2001. – № 8. – С. 29–31.
11. Висмонт, Ф. И. Роль эндотоксинемии в формировании тиреоидного статуса организма и терморегуляции / Ф. И. Висмонт // Здравоохранение. – 2011. – № 9. – С. 26–29.
12. Висмонт, Ф. И. Эндотоксинемия и дизрегуляторная патология / Ф. И. Висмонт, А. Ф. Висмонт // Новости мед.-биол. наук. – 2008. – № 1–2. – С. 41–46.
13. Висмонт, Ф. И. Формирование «установочного» уровня регуляции температуры тела при эндотоксиновой лихорадке / Ф. И. Висмонт, А. Ф. Висмонт // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2020. – Т. 17, № 1. – С. 28–37.
14. Висмонт, Ф. И. Роль центральных адренореактивных систем в регуляции липидного обмена у животных в условиях перегревания и простагландиновой лихорадки / Ф. И. Висмонт // Здравоохранение Беларуси. – 1981. – № 9. – С. 61–62.
15. Висмонт, Ф. И. О роли центральных адренореактивных систем в механизмах антипиретического действия акупунктуры при эндотоксиновой лихорадке у кроликов / Ф. И. Висмонт, Е. А. Третьякович // Мед. журн. – 2007. – № 4 (22). – С. 45–47.
16. Laverty, R. The fluorometric assay of catecholamines and related compounds / R. Laverty, K. Taylor // Anal. Biochem. – 1968. – Vol. 22, N 2. – P. 269–279. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90316-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90316-3)

References

1. Yakovlev M. Yu. “Endotoxin aggression” as a premorbid state or universal pathogenesis factor of human and animal diseases. *Uspekhi sovremennoi biologii* [Advances in modern biology], 2003, vol. 3, no. 1, pp. 31–40 (in Russian).
2. Bahador M., Cross A. S. From therapy to experimental model: a hundred years of endotoxin administration to human subjects. *Journal of Endotoxin Research*, 2007, vol. 13, no. 5, pp. 251–279. <https://doi.org/10.1177/0968051907085986>
3. Vismont F. I. Endotoxemia, dysregulation and predisease formation. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2018, vol. 15, no. 1, pp. 7–16 (in Russian).
4. Munford R. S. Endotoxemia – menace, marker, or mistake? *Journal of Leukocyte Biology*, 2016, vol. 100, no. 4, pp. 687–698. <https://doi.org/10.1189/jlb.3ru0316-151r>
5. Lassenius M. I., Pietiläinen K. H., Kaartinen K., Pussinen P. J., Syrjänen J., Forsblom C. [et al.]. Bacterial endotoxin activity in human serum is associated with dyslipidemia, insulin resistance, obesity, and chronic inflammation. *Diabetes Care*, 2011, vol. 34, no. 8, pp. 1809–1815. <https://doi.org/10.2337/dc10-2197>
6. Yakovlev M. Yu. *Systemic endotoxemia*. Moscow, Nauka Publ., 2021. 184 p. (in Russian).
7. Raetz C. R., Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 2002, vol. 71, pp. 635–700. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>
8. Anikhovskaya I. A., Salakhov I. M., Yakovlev M. Yu. Intestinal endotoxin and stress in adaptation and aging. *Vestnik Rossiiskoi akademii estestvennykh nauk* [Bulletin of the Russian Academy of Natural Sciences], 2016, vol. 16, no. 1, pp. 19–24 (in Russian).
9. Yakovlev M. Yu. The role of intestinal microflora and insufficiency of liver barrier function in the development of endotoxemia and inflammation. *Kazanskii meditsinskii zhurnal* [Kazan Medical Journal], 1988, vol. 69, no. 5, pp. 353–358 (in Russian).
10. Vismont F. I., Grishchenko K. N. Participation of Kupffer cells and hepatocytes in the formation of the body’s thermoregulatory reactions to the action of endotoxin. *Zdravookhranenie* [Healthcare], 2001, no. 8, pp. 29–31 (in Russian).
11. Vismont F. I. The role of endotoxemia in the formation of the body’s thyroid status and thermoregulation. *Zdravookhranenie* [Healthcare], 2011, no. 9, pp. 26–29 (in Russian).
12. Vismont F. I., Vismont A. F. Endotoxemia and dysregulation pathology. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk* [Life Sciences News], 2008, no. 1–2, pp. 41–46 (in Russian).
13. Vismont F. I., Vismont A. F. Formation of the “setting” level of body temperature regulation during endotoxin fever. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2020, vol. 17, no. 1, pp. 28–37 (in Russian).
14. Vismont F. I. The role of central adrenoreactive systems in the regulation of lipid metabolism in animals under conditions of overheating and prostaglandin fever. *Zdravookhranenie Belarusi* [Healthcare of Belarus], 1981, no. 9, pp. 61–62.
15. Vismont F. I., Tret'yakovich E. A. On the role of central adrenoreactive systems in the mechanisms of antipyretic action of acupuncture in endotoxin fever in rabbits. *Meditsinskii zhurnal* [Medical journal], 2007, no. 4 (22), pp. 45–47 (in Russian).
16. Lavery R., Taylor K. The fluorometric assay of catecholamines and related compounds. *Analytical Biochemistry*, 1968, vol. 22, no. 2, pp. 269–279. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90316-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90316-3)

Информация об авторе

Висмонт Франтишек Иванович – член-корреспондент, д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр-т Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: patfiz@bsmu.by

Information about the author

Frantyshek I. Vismont – Corresponding Member, D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: patfiz@bsmu.by

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 577.151.42:004.94
<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-1-16-25>

Поступила в редакцию 09.12.2023
Received 09.12.2023

А. С. Доронькина¹, А. А. Рудак¹, И. П. Жаворонок¹, В. Г. Богдан²

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

ВИРТУАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АМИДОВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Аннотация. Проведено 3D-моделирование с целью изучения биодоступности амидов жирных кислот. Методом молекулярного докинга построены их комплексы с рецептором PPAR α . Показано, что амиды жирных кислот, исходя из «правила пяти» Липинского, в связи с низкой растворимостью в воде, высокой липофильностью и конформационной гибкостью обладают слабой биодоступностью, что ограничивает их усвояемость при пероральном приеме. В результате докинга амидов жирных кислот с рецептором PPAR α выявлено образование стабильных комплексов, которые характеризуются наличием водородных связей и сетью ван-дер-ваальсовых контактов.

Ключевые слова: пальмитоилэтаноламид, стеароилэтаноламид, пальмитамид глицина, молекулярный докинг, PPARs-рецепторы

Для цитирования: Виртуальный скрининг биологической активности амидов жирных кислот / А. С. Доронькина [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2024. – Т. 21, № 1. – С. 16–25. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-1-16-25>

Anastasya S. Doronkina¹, Anhelina A. Rudak¹, Irina P. Zhavoronok¹, Vasilii G. Bogdan²

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

VIRTUAL SCREENING OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF FATTY ACID AMIDES

Abstract. 3D modeling of fatty acid amides was carried out in order to study their bioavailability indicators. Fatty acid amide complexes with the PPAR α receptor were constructed by molecular docking. It was shown that fatty acid amides, based on Lipinsky's rule of five, due to their low solubility in water, high lipophilicity and flexibility, have weak bioavailability, which limits their digestibility when taken orally. As a result of docking fatty acid amides with the PPAR α receptor, stable complexes are formed. They are characterized by the presence of hydrogen bonds and a network of Van der Waals contacts.

Keywords: palmitoylethanolamide, stearoylethanolamide, palmitoylglycine, nociceptive sensitivity, molecular docking, PPARs receptors

For citation: Doronkina A. S., Rudak A. A., Zhavoronok I. P., Bogdan V. G. Virtual screening of the biological activity of fatty acid amides. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2024, vol. 21, no. 1, pp. 16–25 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-1-16-25>

Введение. Нейропатия включает большое количество заболеваний, такие как сахарный диабет, онкология, инфекция, травмы и т. д., которые возникают вследствие повреждения нервов и сопровождаются сенсорными дисфункциями, спонтанной болью (стреляющей, жгучей или ощущением покалывания), а также усилением болевой реакции на механические и термические раздражители [1, 2].

Несмотря на высокую распространенность нейропатии, современные препараты, используемые для лечения данной патологии, эффективны лишь частично, а их долгосрочные эффекты являются недостаточными [3]. В настоящее время рекомендуемые лекарственные средства первой линии (трициклические антидепрессанты, ингибиторы обратного захвата серотонина/норадреналина и габапентоиды) дают ограниченный эффект у небольшой группы пациентов, а также обладают рядом побочных эффектов (нарушение концентрации внимания, координации, ухудшение памяти, тремор, тахикардия и др.) [4, 5]. В исследовании Finnegru с соавт. сообщается, что из четырех человек, которые прошли курс лечения нейропатии по стандартной схеме, только один чувствует облегчение на 50 % относительно плацебо [6, 7].

Таким образом, существует острая необходимость в разработке лекарственных средств и новых методов лечения, которые бы не вызвали зависимости и обладали меньшим количеством побочных эффектов.

За последние десятилетия липиды как сигнальные молекулы активно изучались как у здоровых лиц, так и у пациентов с патологией. Среди биогенных сигнальных липидов стоит выделить амиды жирных кислот (FAAs), которые вовлечены в регуляцию процессов воспаления, нейротрансмиссии, метаболизма, фертильности и стресса. В их составе содержатся насыщенные моно- или полиненасыщенные жирные кислоты, которые и определяют сигнальные функции этих амидов [8]. Наиболее изученными из FAAs являются пальмитоилэтаноламид (PEA), стеароилэтаноламид (SEA) и пальмитамид глицина (PGlyA).

FAAs проявляют свою биологическую активность посредством активации различных типов рецепторов: связанных с G-белком мембранных (GPCR), ванилоидных (TRPV1), ядерных (PPAR α и PPAR γ) и каннабиноидных (CB1 и CB2).

Рецепторы, активирующие пролиферацию пероксисом (PPARs), представляют собой транскрипционные факторы, которые принадлежат к суперсемейству ядерных рецепторов и включают три изоформы (PPAR α , PPAR β (ранее δ) и PPAR γ). PPARs играют важнейшую физиологическую роль в качестве регулятора липидного обмена [9]. С другой стороны, лиганды PPARs оказывают противовоспалительное действие, предотвращая активацию медиаторов воспаления при нейродегенеративных и аутоиммунных заболеваниях.

В последние годы все возрастающую роль в процессе создания новых лекарственных препаратов играют методы компьютерного молекулярного моделирования, которые позволяют значительно сократить сроки разработки лекарств и существенно уменьшить финансовые расходы.

Цель исследования – провести квантово-химическое моделирование амидов жирных кислот и проанализировать их комплексы с рецептором PPAR α .

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- 1) выявить особенности показателей биодоступности PEA, SEA и PGlyA по «правилу пяти» Липинского;
- 2) определить селективность антагониста GW6471 посредством построения и анализа комплексов с PPAR α , PPAR β , PPAR γ ;
- 3) осуществить молекулярный докинг рецептора PPAR α с PEA, SEA и PGlyA, проанализировать свойства полученных комплексов.

Материалы и методы исследования. В настоящем исследовании было использовано швейцарское программное обеспечение ADME online (<http://www.swissadme.ch>) для прогнозирования фармакокинетических параметров, которые связаны как с «абсорбцией, распределением, метаболизмом и выведением» (ADME), в частности с химическим составом соединений и биобезопасностью молекул, так и с их физико-химическими свойствами [10]. ADME дает возможность оценивать параметры выбранных соединений и предоставляет информацию, позволяющую на ранней стадии выявить возможные сложности в процессе разработки фармакологического препарата. С помощью веб-инструмента SwissADME были получены радары биодоступности лигандов, которые отражают 6 параметров: растворимость, размер, полярность, липофильность, гибкость и насыщенность [11].

Примечательно, что при пероральном приеме исследуемой субстанции ADME предоставляет платформу для оценки биодоступности с помощью «правила пяти» Липинского, которое было использовано для исследования FAAs (PEA, SEA, PGlyA). Согласно данному правилу, лекарственное средство для перорального приема должно иметь молекулярную массу <500 г/моль, липофильность $\log P < 5$, долю атомов углерода в sp^3 -гибридизации $\geq 0,25$, количество доноров водородных связей <5, количество акцепторов водородных связей <10 и молярную рефракционную способность 40–130 [12].

Липофильность была выражена $\log P$. Этот коэффициент, показывающий отношение *n*-октанола к воде, указывает на гидрофобность молекул лекарственного средства и влияет на абсорбцию, биодоступность, метаболизм. В литературных источниках отмечается, что при $\log P > 5,0$ снижается абсорбция данного соединения в организме [13].

Согласно имеющимся в литературе данным, молекулярный вес является важным фактором при усвояемости молекулы, при этом у 80 % всех существующих лекарственных средств молекулярная масса составляет <450 г/моль. В свою очередь свойство растворимости соединения прогнозируется на основе значения $\log S$, что дает возможность исключить из эксперимента соединения с низким или очень высоким уровнем данного показателя. Предпочтительны значения >-5 и <6 . Площадь молекулярной полярной поверхности (TPSA), которая характеризует транспортные свойства лекарственного средства, должна составлять $<160 \text{ \AA}^2$ [11, 14].

Молекулярный докинг. При обработке данных использовали персональный компьютер Honor MagicBook 15 BMN-WFQ9HN (центральный процессор на 4,2 ГГц) с операционной системой Windows 11. Построение 2D-структуры амидов жирных кислот осуществляли в Chem Draw, после чего копировали формулу в Chem 3D и оптимизировали с помощью методов молекулярной механики [15].

Кристаллическая структура целевых белков-рецепторов (PDB ID: PPAR α -3GWX, PPAR β -3GZ9, PPAR γ -2HFP) была загружена из Банка данных белков (<http://www.resb.org/pdb>) в формате PDB и подготовлена средствами AutoDock tools. Первоначальная оптимизация геометрии соединений выполнена с помощью HyperChem (версия 8.0 Hypercube, Inc., Альберта, Канада). Для визуализации закрепленного положения использовали UCSF CHIMERA 1.16, Molegro Molecular Viewer 2.5 и Discovery Studio 2016 [16].

Молекулы, не принадлежащие белку, были исключены из эксперимента путем удаления строк, начинающихся с HETATM и CONNECT. Структура файла была сохранена и готова для анализа стыковки.

В CHIMERA на первом этапе загружали для совместного докинга антагонист к PPAR α GW6471 с одним из рецепторов (PPAR α , PPAR β , PPAR γ), а на втором этапе – для докинга между PPAR α и одним из амидов жирных кислот (PEA, SEA и PGlyA). После добавления двух соединений в программу рисовали прямоугольник размером $92,54 \times 72,71 \times 86,47 \text{ \AA}$ для точного определения размера и местоположения веществ в пространстве и запускали докинг молекул. Для исследования молекулярного докинга использовали инструмент AutoDock/Vina (алгоритм Бройден–Голдфарба–Шанно) [13].

Результаты и их обсуждение. В данном исследовании нами установлены показатели биодоступности выбранных амидов жирных кислот посредством компьютерного анализа *in silico*, а также выполнено моделирование комплекса белок–лиганд с использованием методов молекулярного докинга.

Биодоступность амидов жирных кислот оценивали по «правилу пяти» Липинского, которое охватывает следующие физико-химические параметры: молекулярная масса, липофильность ($\log P$), количество доноров Н-связей, акцепторы Н-связей, площадь полярной поверхности (TPSA) и растворимость ($\log S$).

Значения $\log P$ амидов жирных кислот составляли больше 5, а именно: для PEA – 6,86, для SEA – 7,27, а для PGlyA – 6,46, что, в свою очередь, больше 5 и показывает невысокую проходимость через клеточную мембрану. Количество акцепторов водородных связей (в частности, атомов O и N) и количество доноров водородных связей во всех структурах соответствовали правилу Липинского (меньше 10 и 5 соответственно).

Обнаружено, что у всех соединений TPSA ниже 160 \AA^2 (от 32,26 до 66,40 \AA^2) молекулярная масса составляет <450 г/моль (от 285,51 до 327,55 г/моль). Согласно критериям биодоступности, количество вращающихся связей между атомами должно быть ≤ 10 . Имеющееся у всех исследованных соединений количество вращающихся связей (17 для PEA и PGlyA, до 19 для SEA) указывает на высокую конформационную гибкость этих соединений. Результаты расчетов представлены в табл. 1 и на рис. 1.

Исследование данных амидов жирных кислот на соответствие правилу Липинского предполагает низкую биодоступность из-за их низкой растворимости в воде, высокой липофильности и конформационной гибкости, что ограничивает всасывание при пероральном приеме.

L. Sobellis с соавт. в 2011 г. предложили две новые рецептуры, описанные для PEA: микронизированный и ультрамикронизированный PEA (PEA-m и PEA-um) [17].

Таблица 1. Показатели биодоступности амидов жирных кислот

Table 1. Bioavailability indicators of fatty acid amides

Показатель	FAAs	PEA	SEA	PGlyA
Липофильность (logP)		6,86	7,27	6,46
Площадь молекулярной полярной поверхности (TPSA, Å ²)		32,26	49,33	66,40
Количество атомов в молекуле		59	64	57
Молекулярная масса, г/моль		285,51	327,55	313,48
Количество акцепторов водородных связей в молекуле		2	2	3
Количество доноров водородных связей		2	2	2
Растворимость (logS)		-4,51	-4,98	4,13
Биодоступность, %		0,55	0,55	0,85
Количество вращающихся связей		17	19	17
Доля атомов углерода в sp ³ -гибридизации		1,00	0,95	0,89

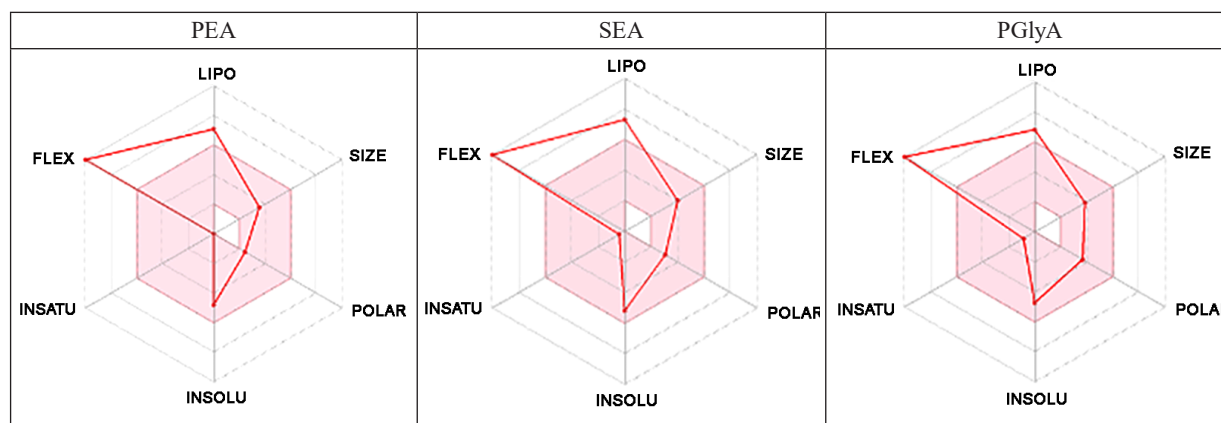


Рис. 1. Радиолокационная диаграмма биодоступности исследуемых амидов жирных кислот.

POLAR – полярность, LIPO – липофильность, SIZE – размер, INSOLU – растворимость, FLEX – гибкость, INSATU – насыщенность (доля атомов углерода в sp³-гибридизации). Розовая область представляет оптимальный диапазон для каждого свойства (липофильность: logP от -0,7 до 5, размер: MW от 150 до 500 г/моль, площадь молекулярной полярной поверхности: TPSA от 20 до 130 Å², растворимость: logS от -5 до 6, насыщенность: доля атомов углерода в sp³-гибридизации не менее 0,25, гибкость: не более 10 вращающихся связей)

Fig. 1. Bioavailability radar chart of the studied fatty acid amides. POLAR – polarity, LIPO – lipophilicity, SIZE – size, INSOLU – solubility, FLEX – flexibility, INSATU – saturation (carbon atom content in sp³ hybridization).

The pink area represents the optimal range for each property (lipophilicity: logP from -0.7 to 5, size: MW from 150 to 500 g/mol, molecular polar surface area: TPSA from 20 to 130 Å², solubility: logS from -5 to 6, saturation: carbon atom content in sp³ hybridization is not less than 0.25, flexibility: no more than 10 rotatable bonds)

Пероральный прием как микронизированного PEA (размер частиц от 100 до 700 мкм), так и ультрамикронизированного (размер частиц от 10 до 0,8 мкм) показал высокие фармакологические результаты при воспалительной боли, вызванной каррагинданом, в сравнении с немикронизированным соединением [4].

Анализ молекулярного докинга. В настоящее время установлено, что рецепторы PPARs не только активируют пролиферацию пероксисом, но и контролируют обмен углеводов, жиров и белков клетке, процессы клеточной дифференцировки и апоптоза, а также влияют на развитие системного воспаления, состояние эндотелия сосудов, уровень резистентности к инсулину [9]. Для определения селективности стыковки антагониста GW6471 с одним из рецепторов PPAR α , PPAR β , PPAR γ были применены AutoDock/Vina, CHIMERA, Molegro Molecular Viewer 2.5.

Молекула антагониста была пристыкована к активному домену рецепторного белка (PPAR α , PPAR β или PPAR γ) (рис. 2, 3). Стыковка и оценка полученного комплекса представлены в табл. 2.

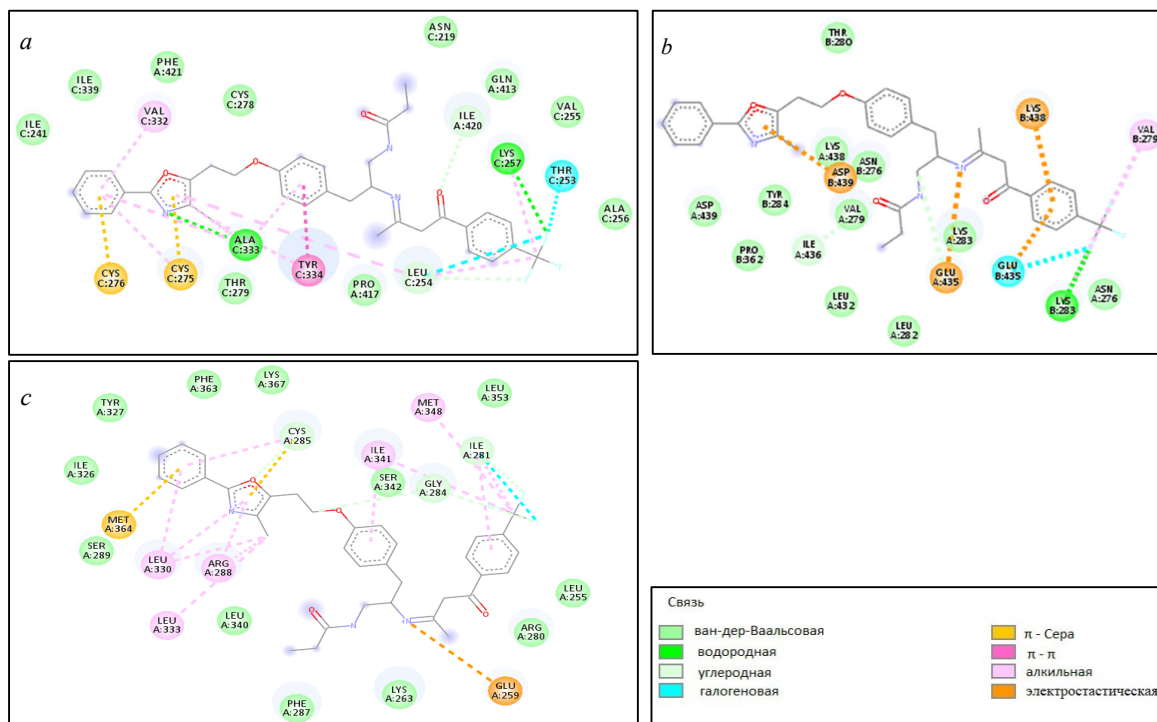


Рис. 2. Элементы структуры PPARs (PPAR α (a), PPAR β (b), PPAR γ (c)) в комплексе с GW6471
 Fig. 2. Structure elements of PPARs (PPAR α (a), PPAR β (b), PPAR γ (c)) in complex with GW6471

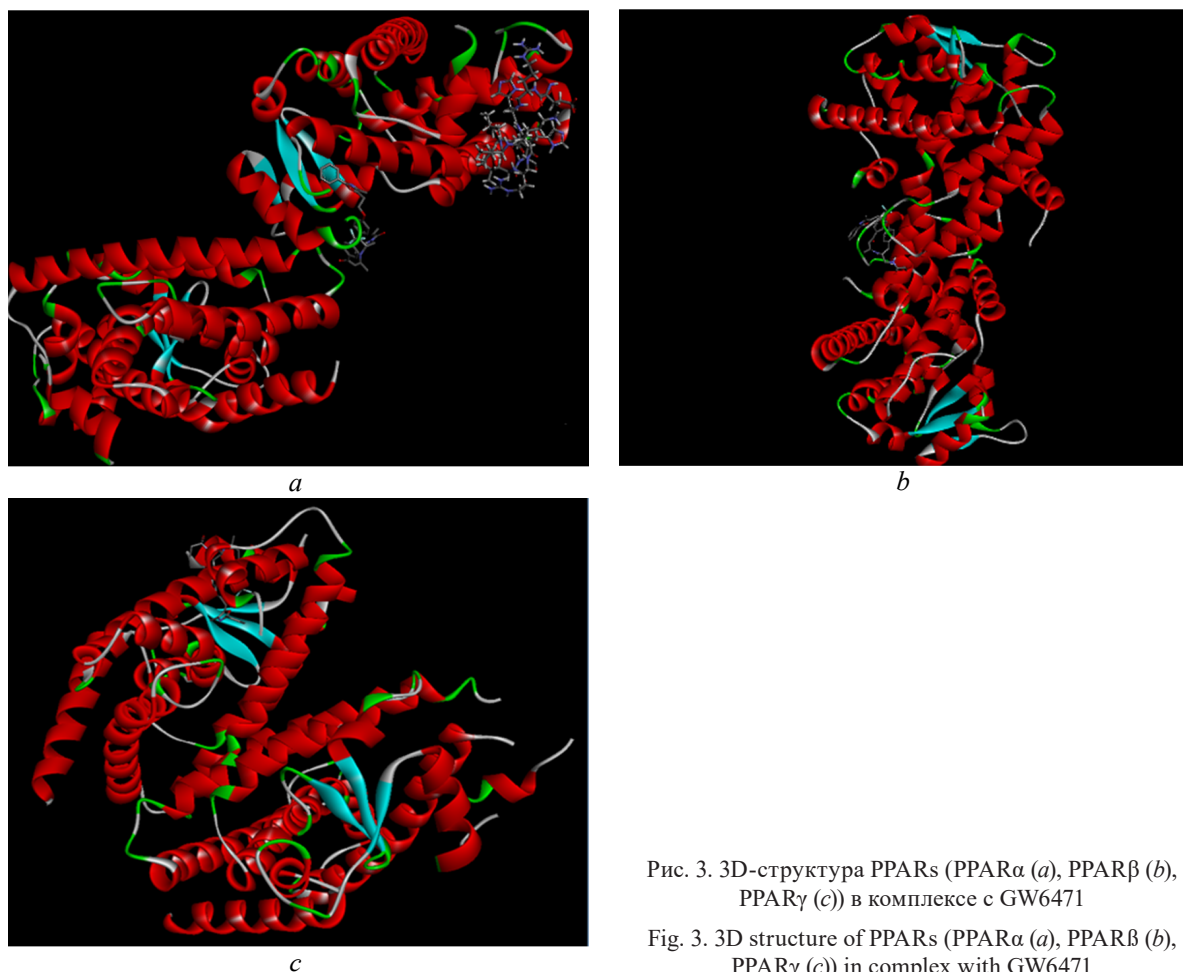


Рис. 3. 3D-структура PPARs (PPAR α (a), PPAR β (b), PPAR γ (c)) в комплексе с GW6471
 Fig. 3. 3D structure of PPARs (PPAR α (a), PPAR β (b), PPAR γ (c)) in complex with GW6471

Таблица 2. Анализ молекулярного докинга PPARs (PPAR α , PPAR β , PPAR γ) с GW6471Table 2. Analysis of molecular docking of PPARs (PPAR α , PPAR β , PPAR γ) with GW6471

Комплекс	PPAR α + GW6471	PPAR β/δ + GW6171	PPAR γ + GW6471
Скорость химической реакции (<i>V</i>), моль/л·с	8,8	7,6	8,6
Аминокислотные остатки рецептора, участвующие в образовании водородных связей	LYS C:257 ALA C:333	LYS B:283	Нет
Энергия водородной связи, ккал/моль	-2,500	-0,883	Нет
Аминокислотные остатки рецептора, участвующие в образовании ван-дер-ваальсовых связей	ILE C:241 ILE C:339 PHE A:421 CYS C:278 ASN C:219 GLN A:413 VAL C:255 ALA C:256 THR C:279 PRO A:417	THR B:280 LYS A:438 ASN B:276 VAL A:279 TYR B:284 PRO B:362 ASP A:439 LEU A:432 LEU A:282 LYS A:283 ASN A:276	TYR A:327 PHE A:363 LYS A:367 SER A:347 LEU A:353 SER A:289 ILE A:326 LEU A:340 RHE A:287 LUS A:263 ARG A:280 LEU A:255
Аминокислотные остатки рецептора, участвующие в образовании π - π связей	TYR C:334	Нет	Нет

Из табл. 2 видно, что скорость химической реакции образования комплекса рецептор–антагонист составляет примерно от 7,60 до 8,80 моль/л·с. Исследование структурных комплексов рецепторов PPARs с GW6471 показывает, что антагонист с PPAR α образует две водородные связи с остатками LYS C:257 с атомом фтора и ALA C:333 с атомом азота, GW6471 с PPAR β – одну водородную связь с остатком LYS B:283 с атомом фтора. В то же время в комплексе антагонист с PPAR γ водородные связи не выявлены. Энергия полученной водородной связи в первом комплексе равна 2,50 ккал/моль, а во втором – 0,88 ккал/моль (табл. 2). Обнаружено специфическое π - π взаимодействие аминокислотного остатка PPAR α (TYR C:334) с пиррольным кольцом лиганда GW6471 (см. рис. 2).

Анализ методами молекулярного моделирования комплексов показал, что все PPARs с лигандом образуют сеть ван-дер-ваальсовых контактов, суммарное число которых варьируется от 10 (PPAR α + GW6471) до 12 (PPAR γ + GW6471) (табл. 2).

Таким образом, данные молекулярного докинга свидетельствуют о том, что в комплексе PPAR α + GW6471 имеются два водородных контакта с энергией связи 2,50 ккал/моль, π -стэкинг между π -сопряженными системами пиррольного кольца лиганда и аминокислотного остатка рецептора (TYR C:334), а также 10 ван-дер-ваальсовых связей, которые играют роль стабилизации структурных комплексов. Этого достаточно для формирования устойчивого соединения рецептор–лиганд. Между PPAR β и GW6471 образована одна водородная связь с энергией 0,88 ккал/моль, что, в свою очередь, указывает на низкий уровень контакта в комплексе между веществами, несмотря на наличие 11 ван-дер-ваальсовых связей. В то же время между PPAR γ и GW6471 получены 12 ван-дер-ваальсовых контактов, однако при отсутствии водородных связей комплекс не является устойчивым. Исходя из полученных данных, GW6471 полноценно можно считать антагонистом к PPAR α -рецепторам (см. рис. 2, табл. 2).

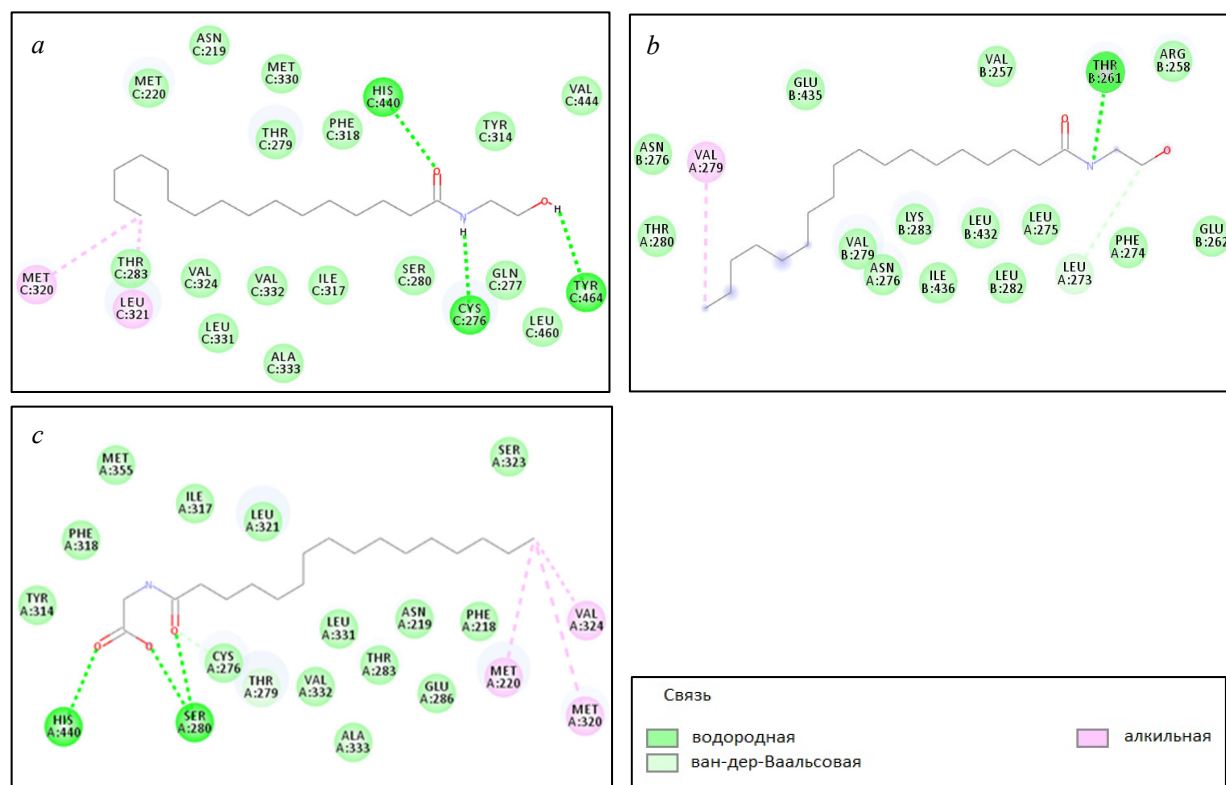
На следующем этапе исследования были проанализированы результаты молекулярного докинга выбранных амидов жирных кислот с рецептором PPAR α . Скорость химической реакции образования комплекса PPAR α –амид жирной кислоты (PEA, SEA, PGlyA) составляет примерно от 5,70 до 6,50 моль/л·с.

Как видно из табл. 3, PEA при взаимодействии с PPAR α образует три водородные связи (остатки HIS C:440 и TYR C:464 с атомами кислорода, CYS C:276 с атомом азота), в комплексе SEA с PPAR α выявлена одна водородная связь THR B:261 с атомом азота, а при взаимодействии PGlyA с PPAR α обнаружено также три водородные связи аминокислотных остатков HIS A:440 и SER A:280 с атомами кислорода. При этом энергия полученных водородных связей в первом комплексе равна 2,838 ккал/моль, во втором – 2,500, а в третьем – 3,086 ккал/моль. Все исследуемые амиды жирных кислот в комплексе с PPAR α формируют ван-дер-ваальсовые связи, суммарное число которых варьируется от 13 (SEA) до 16 (PEA) (рис. 4, 5).

Т а б л и ц а 3. Анализ молекулярного докинга PPAR α с амидами жирных кислот (PEA, SEA, PGlyA)Table 3. Analysis of molecular docking of PPAR α with FAAs (PEA, SEA, PGlyA)

Комплекс	PPAR α + PEA	PPAR α + SEA	PPAR α + PGlyA
Скорость химической реакции (<i>V</i>), моль/л·с	6,4	5,7	6,5
Количество водородных связей	3	1	3
Аминокислотные остатки рецептора, участвующие в образовании водородных связей	HIS C:440 CYS C:276 TYR C:464	THR B:261	HIS A:440 SER A:280
Энергия водородной связи, ккал/моль	-2,838	-2,500	-3,086
Аминокислотные остатки рецептора, участвующие в образовании ван-дер-ваальсовых связей	MET C:220 MET C:330 ASN C:219 THR C:279 THR C:283 PHE C:318 TYR C:314 VAL C:444 VAL C:324 VAL C:332 LEU C:331 LEU C:460 ALA C:333 ILE C:317 SER C:280 GLN C:277	ASN B:276 ASN A:276 THR A:280 GLU B:435 GLU B:262 PHE A:274 VAL B:257 VAL B:279 ARG B:258 LYS B:283 LEU B:432 LEU B:282 ILE B:436	MET A:355 ASN A:219 THR A:283 PHE A:318 PHE A:218 TYR A:314 VAL A:332 LEU A:321 LEU A:331 ILE A:317 SER A:323 CYS A:276 GLU A:286 ALA A:333

Следовательно, данные молекулярного докинга свидетельствуют о том, что в комплексе PPAR α + PEA и PPAR α + PGlyA имеются три водородных контакта с энергией связи 2,838 и 3,086 ккал/моль, а также 16 и 14 ван-дер-ваальсовых связей соответственно. Этого достаточно для формирования полноценного устойчивого комплекса рецептор–лиганд. В свою очередь, между PPAR α и SEA обнаружена одна водородная связь с энергией 2,500 ккал/моль, что может указывать на более низкий уровень контакта, чем в предыдущих комплексах, однако наличие 13 ван-дер-ваальсовых контактов сохраняет полноценную устойчивость данного комплекса. Таким образом, FAAs (PEA, SEA и PGlyA) способны образовывать стабильный комплекс с PPAR α -рецепторами.

Рис. 4. Элементы структуры PPAR α в комплексе с FAAs (PEA (a), SEA (b), PGlyA (c))Fig. 4. Structure elements of PPAR α in complex with FAAs (PEA (a), SEA (b), PGlyA (c))

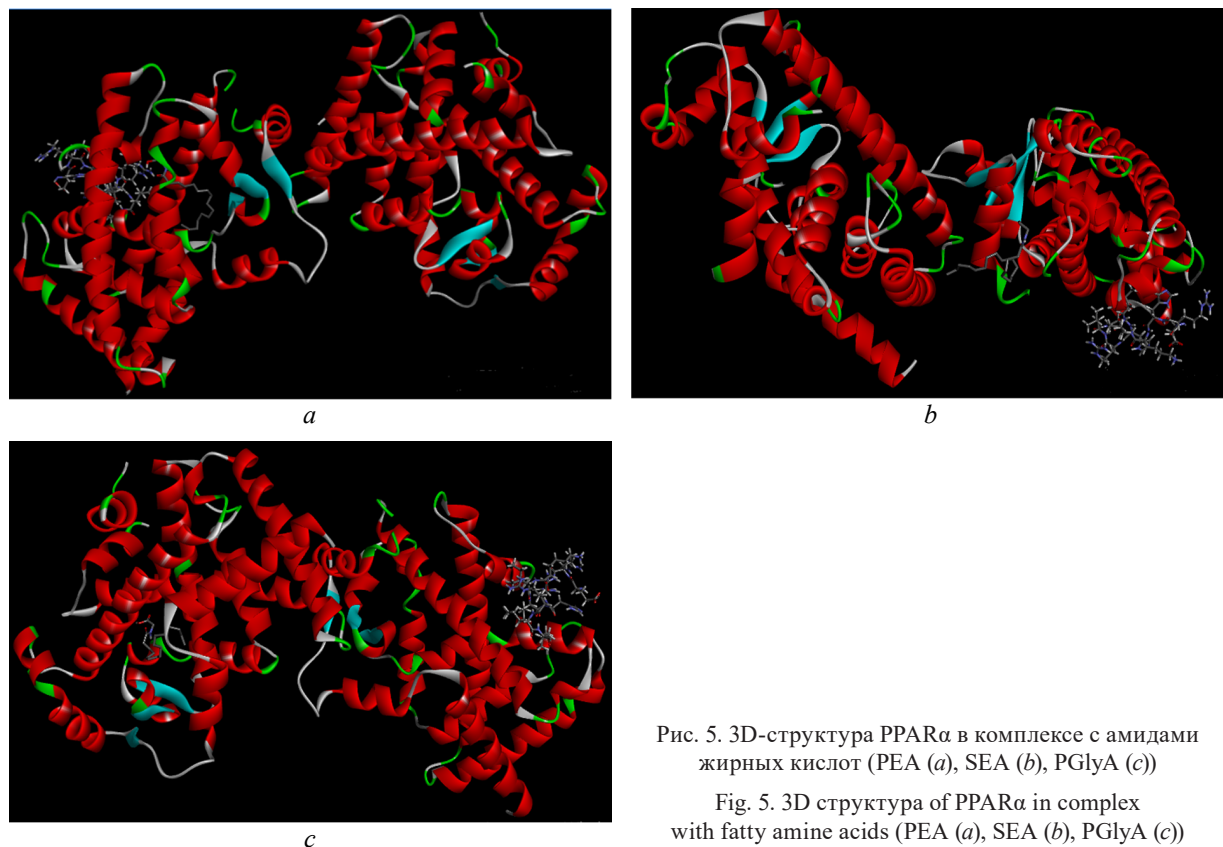


Рис. 5. 3D-структура PPAR α в комплексе с амидами жирных кислот (PEA (a), SEA (b), PGlyA (c))

Fig. 5. 3D structure of PPAR α in complex with fatty amine acids (PEA (a), SEA (b), PGlyA (c))

Заключение. Исследование амидов жирных кислот по «правилу пяти» Липинского предполагает слабую биодоступность данных молекул из-за их низкой растворимости в воде, высокой липофильности и конформационной гибкости, что ограничивает усвояемость при пероральном приеме. Для повышения биодоступности FAAs рекомендуется вводить их парентеральными способами.

Анализ комплексов, построенных методами молекулярного моделирования, свидетельствует о том, что GW6471 является антагонистом PPAR α , а для формирования стабильного комплекса наибольший вклад в энергию связывания лиганда с рецептором вносят водородные связи, ван-дер-ваальсовы контакты и специфические π - π взаимодействия. В то же время, согласно полученным данным, взаимодействие GW6471 с PPAR β или PPAR γ не приводило к образованию устойчивых комплексов.

В результате проведения докинга между амидами жирных кислот и рецептором PPAR α установлено, что образуются стабильные комплексы, которые характеризуются наличием водородных связей и сетью ван-дер-ваальсовых контактов. Таким образом, амиды жирных кислот PEA, SEA и PGlyA способны образовывать устойчивые соединения с PPAR α -рецепторами.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP classification of chronic pain for the international classification of diseases (ICD-11) / R.-D. Treede [et al.] // Pain. – 2019. – Vol. 160, N 1. – P. 19–27. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001384>
2. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain / J. Scholz [et al.] // Pain. – 2019. – Vol. 160, N 1. – P. 53–59. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001365>
3. Stratification of neuropathic pain patients: the road to mechanism-based therapy? / J. Forstenpointner [et al.] // Curr. Opin. Anaesthesiol. – 2018. – Vol. 31, N 5. – P. 562–568. <https://doi.org/10.1097/ACO.0000000000000642>
4. Ultramicronized palmitoylethanolamide in spinal cord injury neuropathic pain: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial / S. R. Andresen [et al.] // Pain. – 2016. – Vol. 157, N 9. – P. 2097–2103. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000623>
5. Rates of opioid misuse, abuse, and addiction in chronic pain: a systematic review and data synthesis / K. E. Vowles [et al.] // Pain. – 2015. – Vol. 156, N 4. – P. 569–576. <https://doi.org/10.1097/01.j.pain.0000460357.01998.f1>

6. Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice / N. B. Finnerup [et al.] // *Pain*. – 2016. – Vol. 157, N 8. – P. 1599–1606. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000492>
7. Rice, A. S. C. Pain and the global burden of disease / A. S. C. Rice, B. H. Smith, F. M. Blyth // *Pain*. – 2016. – Vol. 57, N 4. – P. 791–796. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000454>
8. Ezzili, C. Fatty acid amide signaling molecules / C. Ezzili, K. Otrubova, D. L. Boger // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2010. – Vol. 20, N 20. – P. 5959–5968. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.08.048>
9. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat / O. Braissant [et al.] // *Endocrinology*. – 1996. – Vol. 137, N 1. – P. 354–366. <https://doi.org/10.1210/endo.137.1.8536636>
10. Daina, A. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules / A. Daina, O. Michielin, V. Zoete // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7. – Art. 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
11. Hastings, J. ChEBI in 2016: Improved services and an expanding collection of metabolites / J. Hastings, G. Owen, A. Dekker // *Nucl. Acids Res.* – 2016. – Vol. 44, N D1. – P. D1214–D1219. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1031>
12. Spectroscopic studies (geometry optimization, E → Z isomerization, UV/Vis, excited states, FT-IR, HOMO-LUMO, FMO, MEP, NBO, polarization) and anisotropy of thermal and electrical conductivity of new azomethine dyes in stretched polymer matrix / S. Shahab [et al.] // *Silicon*. – 2018. – Vol. 10. – P. 2361–2385. <https://doi.org/10.1007/s12633-018-9773-8>
13. Shahab, S. Antioxidant properties of the phorbol: A DFT approach / S. Shahab, M. Sheikhi // *Russ. J. Chem. B.* – 2020. – Vol. 14. – P. 15–18. <https://doi.org/10.1134/S1990793120010145>
14. Molecular investigations of the newly synthesized azomethines as antioxidants: theoretical and experimental studies / S. Shahab [et al.] // *Curr. Mol. Med.* – 2019. – Vol. 19, N 6. – P. 419–433. <https://doi.org/10.2174/1566524019666190509102620>
15. Investigation of adsorption tyrophostin AG528 anticancer drug upon the CNT (6, 6-6) nanotube: a DFT study / M. Sheikhi [et al.] // *Curr. Mol. Med.* – 2019. – Vol. 19, N 2. – P. 91–104. <https://doi.org/10.2174/1566524019666190226111823>
16. Investigation of the adsorption Rubraca anticancer drug on the CNT (4, 4-8) nanotube as a factor of drug delivery: a theoretical study based on DFT method / M. Sheikhi [et al.] // *Curr. Mol. Med.* – 2019. – Vol. 19, N 7. – P. 473–486. <https://doi.org/10.2174/1566524019666190506143152>
17. Effectiveness of the association micronized N-palmitoylethanolamine (PEA)-transpolydatin in the treatment of chronic pelvic pain related to endometriosis after laparoscopic assessment: a pilot study / L. Cobellis [et al.] // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 2011. – Vol. 158, N 1. – P. 82–86. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2011.04.011>

References

1. Treede R.-D., Rief W., Barke A., Qasim A., Bennet M. I., Benoliel R. [et al.] Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP classification of chronic pain for the international classification of diseases (ICD-11). *Pain*, 2019, vol. 160, no. 1, pp. 19–27 <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001384>
2. Scholz J., Finnerup N. B., Attal N. J., Aziz Q., Baron R., Bennett M. I. [et al.]. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain. *Pain*, 2019, vol. 160, no. 1, pp. 53–59. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001365>
3. Forstenpointner J., Rehm S., Gierthmühlen J., Baron R. Stratification of neuropathic pain patients: the road to mechanism-based therapy? *Current Opinion in Anesthesiology*, 2018, vol. 31, no. 5, pp. 562–568. <https://doi.org/10.1097/ACO.0000000000000642>
4. Andresen S. R., Bing J., Hansen R. M., Biering-Sørensen F., Johannesen I. L., Hagen E. M., Rice A. S. C., Nielsen J. F., Bach F. W., Finnerup N. B. Ultramicrosized palmitoylethanolamide in spinal cord injury neuropathic pain: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pain*, 2016, vol. 157, no. 9, pp. 2097–2103. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000623>
5. Vowles K. E., McEntee M. L., Julnes P. S., Frohe T., Ney J. P., van der Goes D. N. Rates of opioid misuse, abuse, and addiction in chronic pain: a systematic review and data synthesis. *Pain*, 2015, vol. 156, no. 4, pp. 569–576. <https://doi.org/10.1097/01.j.pain.0000460357.01998.fl>
6. Finnerup N. B., Haroutounian S., Kamerman P., Baron R., Bennett D. L. H., Bouhassira D. [et al.]. Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice. *Pain*, 2016, vol. 157, no. 8, pp. 1599–1606. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000492>
7. Rice A. S. C., Smith B. H., Blyth F. M. Pain and the global burden of disease. *Pain*, 2016, vol. 57, no. 4, pp. 791–796. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000454>
8. Ezzili, C. Fatty acid amide signaling molecules. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2010, vol. 20, no. 20, pp. 5959–5968. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.08.048>
9. Braissant O., Fougère F., Scotto C., Dauça M., Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*, 1996, vol. 137, no. 1, pp. 354–366. <https://doi.org/10.1210/endo.137.1.8536636>
10. Daina A., Michielin O., Zoete V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 2017, vol. 7, art. 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
11. Hastings J., Owen G., Dekker A. ChEBI in 2016: Improved services and an expanding collection of metabolites. *Nucleic Acids Research*, 2016, vol. 44, no. D1, pp. D1214–D1219. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1031>
12. Shahab S., Sheikhi M., Filippovich L., Khaleghian M., Dikuser E., Yahyaei H., Borzehandani M. Y. Spectroscopic studies (geometry optimization, E → Z isomerization, UV/Vis, excited states, FT-IR, HOMO-LUMO, FMO, MEP, NBO,

polarization) and anisotropy of thermal and electrical conductivity of new azomethine dyes in stretched polymer matrix. *Silicon*, 2018, vol. 10, pp. 2361–2385. <https://doi.org/10.1007/s12633-018-9773-8>

13. Shahab S., Sheikhi M. Antioxidant properties of the phorbol: A DFT approach. *Russian Journal of Chemistry B*, 2020, vol. 14, pp. 15–18. <https://doi.org/10.1134/S1990793120010145>

14. Shahab S., Sheikhi M., Filippovich L., Dikusar E., Pazniak A., Rouhani M., Kumar R. Molecular investigations of the newly synthesized azomethines as antioxidants: theoretical and experimental studies. *Current Molecular Medicine*, 2019, vol. 19, no. 6, pp. 419–433. <https://doi.org/10.2174/1566524019666190509102620>

15. Sheikhi M., Shahab S., Alnajjar R., Ahmadianarog M., Kaviani S. Investigation of adsorption tyrophostin AG528 anticancer drug upon the CNT (6, 6-6) nanotube: a DFT study. *Current Molecular Medicine*, 2019, vol. 19, no. 2, pp. 91–104. <https://doi.org/10.2174/1566524019666190226111823>

16. Sheikhi M., Shahab S., Khaleghian M., Ahmadianarog M., Azarakhshi F., Kumar R. Investigation of the adsorption Rubraca anticancer drug on the CNT (4, 4-8) nanotube as a factor of drug delivery: a theoretical study based on DFT method. *Current Molecular Medicine*, 2019, vol. 19, no. 7, pp. 473–486. <https://doi.org/10.2174/1566524019666190506143152>

17. Cobellis L., Castaldi M. A., Giordano V., Trabucco E., de Francis P., Torella M., Colacurci N. Effectiveness of the association micronized N-palmitoylethanolamine (PEA)-transpolydatin in the treatment of chronic pelvic pain related to endometriosis after laparoscopic assessment: a pilot study. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 2011, vol. 158, no. 1, pp. 82–86. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2011.04.011>

Информация об авторах

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

Рудак Ангелина Александровна – мл. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: freya56672@gmail.com

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 – 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

Anhelina A. Rudak – 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, Academic-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)

UDC 616.314.14-009.6:616.31

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-1-26-32>

Received 14.12.2023

Sergey P. Rubnikovich, Liudmila N. Dedova, Yuliya L. Denisova, Alexander S. Solomevich

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

PREDICTING THE RISK OF DENTIN SENSITIVITY DEVELOPMENT IN DENTAL PATIENTS

Abstract. The main predisposing factors for DS occurrence and development in dental patients have been identified, and the DS prognosis program and the DS prognosis index have been developed.

The program and the prognosis index were tested in 95 dental patients. The control group consisted of 30 patients. Clinical parameters were assessed before treatment, after 1 week, and 1, 6, 12 months. The treatment effectiveness was assessed using the number of good, satisfactory, and unsatisfactory treatment results in each group.

The results of clinical observation of patients showed that the use of the DS prognosis program and the DS prognosis index makes it possible not only to clearly inform patients about the level of risk of developing DS, but also to constantly monitor prognostic signs, which increases the treatment effectiveness by 47 %.

Good treatment results in 97 % of cases in a long-term period determine the feasibility of including the program we developed and the prognosis index in the complex treatment of DS in dental patients.

Keywords: prognosis, dentin sensitivity, dental patients, risk factors

For citation: Rubnikovich S. P., Dedova L. N., Denisova Yu. L., Solomevich A. S. Predicting the risk of dentin sensitivity development in dental patients. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2024, vol. 21, no. 1, pp. 26–32 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-1-26-32>

С. П. Рубникович, Л. Н. Дедова, Ю. Л. Денисова, А. С. Соломевич

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

ПРОГНОЗ РИСКА РАЗВИТИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ДЕНТИНА У СТОМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПАЦИЕНТОВ

Аннотация. Выявлены основные предрасполагающие факторы возникновения и развития чувствительности дентина (ЧД) у стоматологических пациентов, разработана программа «Прогноз ЧД» и рассчитан индекс прогноза ЧД.

Программа и индекс прогноза апробированы у 95 стоматологических пациентов. Контрольную группу составили 30 пациентов. Клинические параметры оценивали до лечения, через 1 неделю и через 1, 6, 12 мес. Эффективность лечения оценивалась по количеству хороших, удовлетворительных и неудовлетворительных результатов лечения в каждой группе.

Результаты клинического наблюдения за пациентами показали, что использование программы и индекса прогноза ЧД позволяет не только информировать пациентов об уровне риска развития ЧД, но и постоянно контролировать прогностические признаки, что повышает эффективность лечения на 47 %.

Хорошие результаты лечения в 97 % случаев в отдаленном периоде наблюдения определяют целесообразность включения разработанной нами программы и показателя прогноза в комплексное лечение ЧД у стоматологических пациентов.

Ключевые слова: прогноз, чувствительность дентина, стоматологические пациенты, факторы риска

Для цитирования: Прогноз риска развития чувствительности дентина у стоматологических пациентов / С. П. Рубникович [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2024. – Т. 21, № 1. – С. 26–32. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-1-26-32>

Introduction. Dentine sensitive (DS) – is an independent nosological disease, which is manifested by an increased differentiated reaction of the tooth to irritants with a transient response to targeted dental treatment [1]. Among patients with periodontal diseases, DS is diagnosed in 61–98 % of cases [2, 3]. The difficulties in diagnosing and treating dentin sensitivity in this category of patients lie in the variety of its clinical manifestations. The difficulties of understanding the mechanism of its development are also associated with the dynamic change in unfavorable factors affecting the quality of life. In the Republic of Belarus, DS is classified according to its form, topography, prevalence, course and severity.

It should be noted that the dynamic balance of the biological periodontal system in dental patients with DS is due to the interrelation of anatomical and reflex mechanisms that influence the morphological and clinical manifestations of the pathological process. The mechanism of development of respiratory depression in dental patients requires constant review and clarification. At the same time, timely diagnosis of DS in dental patients makes it possible to predict and adequately plan treatment measures [4, 5].

DS is accompanied by exposure of the root surface and opening of the dentinal tubules, which accompanies gingival recession. At the same time, errors in brushing teeth, bad habits, anomalies in the position of teeth in the dental arch, incorrect orthodontic treatment, inflammatory-destructive and involutive processes in periodontal tissues contribute to the development of DS [6–10]. In addition, experimental studies have established that certain foods (red and white wine, citrus fruit juices, apple juice, yogurt) lead to the removal of the smear layer of dentin and the opening of the entrance to the dentinal tubules [11–14]. It should be noted that DS in some individuals with psychosomatic disorders, dysfunctions of the endocrine glands and mineral metabolism in the body, properties of oral fluid, atherosclerotic stenosis of the carotid arteries [15–17].

Considering the variety of predisposing factors and clinical manifestations of DS, there is a need to predict the development of DS in dental patients [18–28].

The aim of the study – to develop a prediction of the development of dentin sensitivity (DS) in dental patients using a computer program in combination with a clinical prognosis index.

Materials and research methods. The study was conducted on volunteer patients in accordance with clinical protocols approved by the Ministry of Health of the Republic of Belarus. The study included 30 practically healthy individuals, 95 patients with verified true and symptomatic DS who applied to the Department of Periodontology of the Belarusian State Medical University. All patients signed informed consent.

Clinical researches. Clinical parameters were assessed before treatment, after 1 week, and 1, 6, 12 months. Data from clinical examinations were entered into the dental outpatient card and the developed examination card for the patient with DS. Based on the data obtained, the condition of hard tissues and pulp of teeth, periodontium, and oral fluid was assessed. The effectiveness of treatment was assessed based on the number of good, satisfactory and unsatisfactory treatment results in each group.

In order to select targeted therapeutic and diagnostic measures and determine the frequency of individual follow-up, prognostic criteria were used. To assess the likelihood of developing DS, the computer program “Prognosis of DS Development” was used, which included the characteristics of prognostic criteria that were determined before treatment of patients and during control visits throughout the study period.

Statistical analysis. Data processing was carried out using the Statistica 10.0 software package for Windows (USA). The results were expressed as the arithmetic mean (M) \pm standard error (m). Indicators were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Characteristics of groups. Among the 95 dental patients with DS, there were 56 women and 39 men, their ages ranged from 25 to 54 years (mean age 37.4 ± 8.4 years). All patients were equally distributed in two groups depending on diagnosis, gender and age. 41 patients of the first group were diagnosed and treated for DS according to clinical protocols. In the second group of 54 patients, treatment and diagnostic measures were carried out according to clinical protocols, including prediction. 30 practically healthy patients formed the control group.

Results and its discussion. At the Department of Periodontology of the Belarusian State Medical University, the prediction of DS in dental patients has been developed using the program “Prognosis of DS Development” in combination with the DS Prognosis Index (DSPI) [21].

Determination of the DS status was carried out by analyzing prognostic signs of dentin sensitivity in dental patients. The 8 prognostic criteria for the likelihood of developing DS in this program include: frequency of detection of complaints of tooth sensitivity (teeth); general unfavorable factors (stress, carotid artery stenosis, endocrine dyscorrelations, etc.); signs of parafunctions; eating foods with low pH; indicators of the complex differentiated dental sensitivity index (CDDSI) (L. N. Dedova, 2004); number of teeth with DS (prevalence of DS in the patient); increasing the excitability of the dental pulp to electric current by % of the “norm”; indicators of the gingival recession index IR [22]. The above prognostic criteria were entered into a computer program (see Table).

Prognostic criteria probability of development DS

Prognostic criteria (predictor)	Probability					
	low	medium			high	
	1 point	2 points	3 points	4 points	5 points	6 points
Complaints of sensitivity of the teeth (frequency)	Once every 2 months	1 time per month	Once every 3 weeks	1 time every 2 weeks	1 time per week	Daily
General unfavorable factors (no, risk, yes)	No	No, low risk	No, high risk	Yes, compensated course	Yes, subcompensated course	Yes, decompensated course
Signs of parafunctions (no, yes, complaints)	No	No, complaints	Yes, complaints	Yes, nighttime with complaints	Yes, daytime with complaints	Yes, daytime and nighttime with complaints
Eating foods with low pH	1 time per month	1 time every 2 weeks	1 time per week	2 times per week	1 per day	2 times a day
Complex differentiated dental sensitivity index (CDDSI)	0.1–2.0	No more 3.0	No more 4.0	No more 5.0	No more 6.0	Before 10.0
Number of teeth with DS	1–2	1–4	1–6	1–8	1–10	11–32
Increasing the excitability of the dental pulp to electric current, % of the norm	30–40	No more 50	No more 65	No more 75	No more 90	Before 100
The gingival recession index IR	1–25	No more 35	No more 45	No more 55	No more 75	Before 100

Each parameter of the programmed chart has a measurement scale. All prognostic criteria were interpreted depending on the level of probability of development and progression of DS (low, medium, high). The low-risk area was located at the center of the polygon, while the high-risk area was located at its periphery. In their center there is a zone of medium risk for the development and progression of DS.

A comprehensive assessment of prognostic criteria determined the individual level of risk for possible disease progression and the follow-up interval. The program “Prognosis for the development of DS” calculates the area of filling the polygon of the functional prognosis diagram as a percentage.

Thus, the filling of the polygon was highlighted in three colors depending on the risk level: low level corresponded to green, medium to yellow, and high to red (Fig. 1–3).

The diagram shows a program-graphic characteristic of DS, which demonstrates the level of risk of its progression. At the same time, prognostic criteria for DS were used to calculate the dentin sensitivity prognosis index (DSPI), which shows the level of development of DS in dental patients in a digital characteristic. The combination of a developmental prognosis program in combination with IPD makes it possible to plan targeted individual treatment and preventive measures (see Table) [22].

It should be noted that DSPI is scored based on the presence of one or more manifestations of each of the 8 prognostic criteria:

$$DSPI = \frac{\text{prognostic criteria for the likelihood of developing DS (in points)}}{6 \text{ (in points)}} \cdot 100.$$

Based on the index indicators, the following assessment can be made DSPI: 16.7 % – good, compensated condition; 33.3–66.7 – satisfactory condition; 83.3–100 % – state of decompensation.

Using the index indicators, in 76.01 ± 1.63 % of cases it was enough to carry out a short-term re-course of treatment for DS or limit oneself to partial treatment and preventive measures; in 21.56 ± 1.1 % of cases, patients were recommended only rational care for the oral cavity even before relapse of DS.

The results of clinical observation of patients showed that the use of prognostic criteria of the program and the prognosis index made it possible to obtain good results of treatment of DS in dental patients in the main group in 97 % of cases in long-term follow-up periods compared with 50 % of cases in the group where no prediction was made.

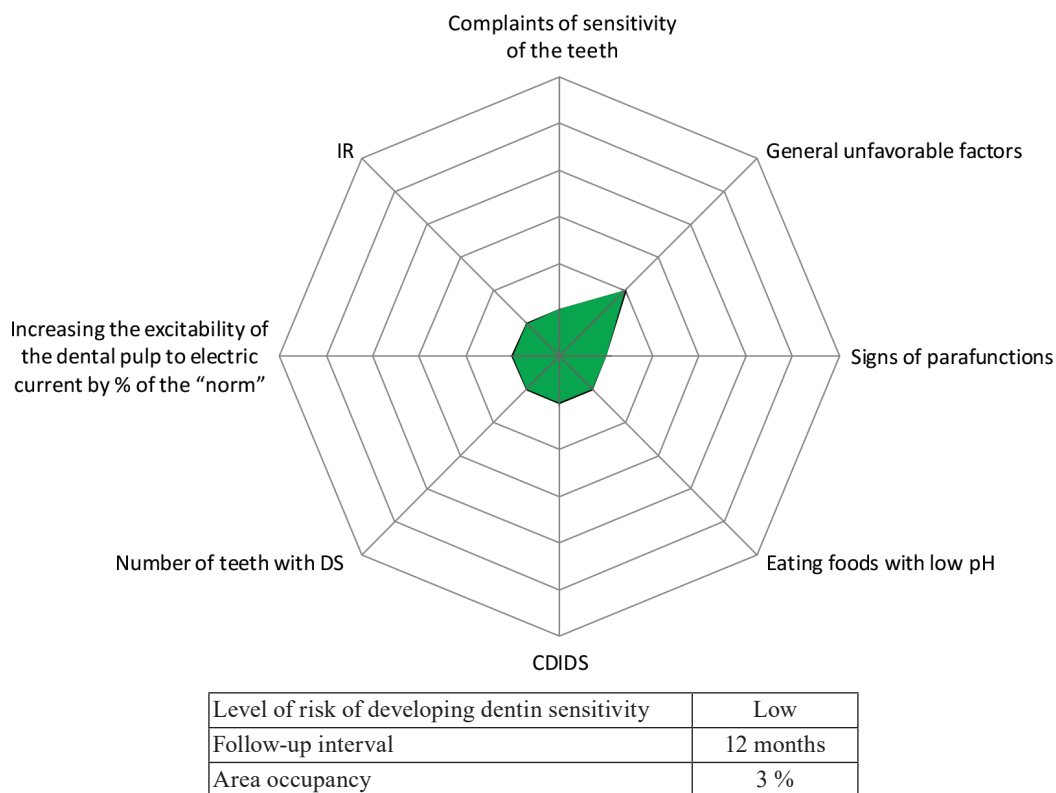


Fig. 1. Patient Z., 42 years old. Low risk of developing DS: low risk of common diseases; 1 time per month eat foods with low pH; indicators CDDSI – 1.0; 2 teeth with DS; increasing the excitability of the dental pulp to electric current by 30 % of the norm; follow-up interval – 3 months; DSPI – compensated condition (16.7 %)

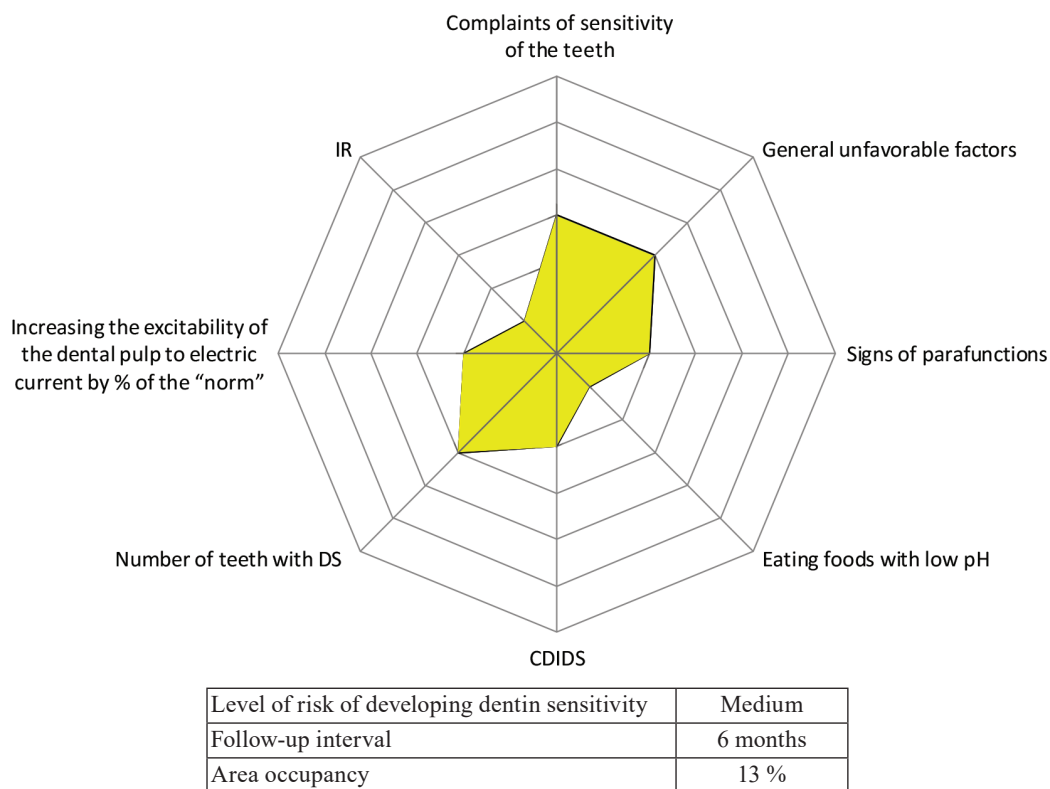


Fig. 2. Patient K., 43 years old. Medium risk of developing DS: high risk of development of common diseases; eating foods with low pH 1 time per month; indicators CDDSI – 2.5; 5 teeth with DS; increasing the excitability of the dental pulp to electric current by 45 % of the norm; follow-up interval – 6 months; DSPI – satisfactory condition (33.3 %)

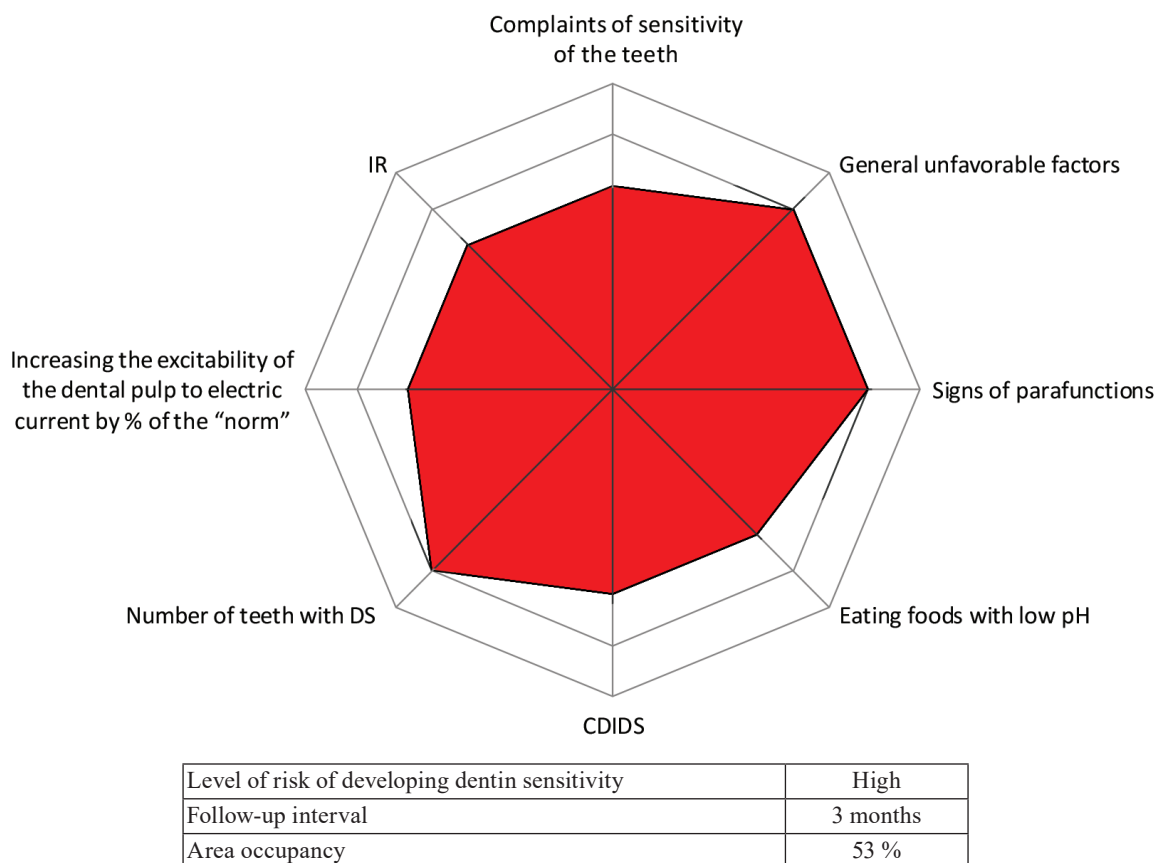


Fig. 3. Patient I., 39 years old. High risk of developing DS: subcompensated course of atherosclerotic stenosis of the right carotid artery; daily consumption of foods with low pH; signs of “daytime” bruxism with complaints; indicators CDDSI – 5.0; 10 teeth with DS; increasing the excitability of the dental pulp to electric current by 70 % of the norm; follow-up interval – 3 month; DSPI – state of decompensation (83.3 %)

Conclusion

1. A new valid method has been developed for predicting the likelihood of developing DS in dental patients based on regression analysis of prognostic criteria ($\mu = 72\text{--}93\%$), which made it possible to select targeted therapeutic and diagnostic measures and the frequency of individual follow-up with constant monitoring of prognostic criteria. This made it possible not only to clearly inform the patient about the level of risk of developing DS, but also to constantly monitor prognostic signs, which increases the effectiveness of treatment by 47 %.

2. Good treatment results in 97 % of cases in long-term follow-up determined the feasibility of including in the complex treatment of DS a developed program for predicting the development of DS with a clinical index for predicting dentin sensitivity in dental patients.

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

References

1. Modern approach to diagnosis and treatment of dental patients with dentin sensitivity. *Stomatolog. Minsk* [Dentist. Minsk], 2022, vol. 3, no. 46, pp. 8–13 (in Russian).
2. Dedova L. N., Solomevich A. S. Dentin sensitivity. Diagnosis (Part I). *Stomatologicheskii zhurnal* [Dental journal], 2006, vol. 7, no. 3, pp. 158–166 (in Russian).
3. Dedova L. N. Prevalence of dental diseases in the Republic of Belarus. *Stomatologiya. Estetika. Innovatsii* [Dentistry. Aesthetics. Innovation], 2017, vol. 1, no. 2, pp. 193–202 (in Russian).
4. Rubnikovich S. P., Denisova Yu. L., Vladimirskaia T. E., Andreeva V. A., Kvacheva Z. B., Panasenkov G. Yu., Volotovskiy I. D. Regenerative cell technologies for the treatment of gum recession. *Sovremennyye tekhnologii v meditsine* [Modern technologies in medicine], 2018, vol. 10, no. 4, pp. 94–104 (in Russian). <https://doi.org/10.17691/stm2018.10.4.11>

5. Rubnikovich S. P. Morphological changes in bone tissue around dental implants after low-intensity ultrasound applications. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2020, vol. 17, no. 1, pp. 20–27 (in Russian).
6. Robinson P. G. *Dentin hypersensitivity*. Elsevier, 2015. 335 p.
7. Solomevich A. S., Denisova Yu. L., Denisov L. A. Treatment of dentin sensitivity in patients with periodontal disease. *Stomatolog. Minsk* [Dentist. Minsk], 2010, no. 1, pp. 113–114 (in Russian).
8. Al-Qahtani S. M. Evaluation and comparison of efficacy of gluma and D/Sense desensitizer in the treatment of root sensitivity induced by non-surgical periodontal therapy. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 2019, vol. 7, no. 10, pp. 1685–1690.
9. Athuluru D., Reddy Ch., Sudhir K. M., Kumar K., Gomasani S., Nagarakanti S. Evaluation and comparison of efficacy of three desensitizing dentifrices on dentinal hypersensitivity and salivary biochemical characteristics: A randomized controlled trial. *Dental Research Journal (Isfahan)*, 2017, vol. 14, no. 2, pp. 150–157. <https://doi.org/10.4103/1735-3327.205785>
10. Bandekar S., Patil S., Dudulwar D., Moogi P., Ghosh S., Kshirsagar S. Remineralization potential of fluoride, amorphous calcium phosphate-casein phosphopeptide, and combination of hydroxylapatite and fluoride on enamel lesions: An *in vitro* comparative evaluation. *Journal of Conservative Dentistry*, 2019, vol. 22, no. 3, pp. 305–309. https://doi.org/10.4103/jcd.jcd_13_19
11. Rubnikovich S. P., Maizet A., Denisova Yu., Bykova N., Arutyunov A., Kopylova I., Avanesyan R. The effect of magnetophototherapy on morphological changes of tissues of pathologically changed periodontium. *Meditsinskii vestnik Severnogo Kavkaza* [Medical news of the North Caucasus], 2017, vol. 12, no. 3, pp. 303–307. <https://doi.org/10.14300/mnnc.2017.12095>
12. Rubnikovich S. P. Digital laser speckle technologies in measuring blood flow in biotissues and the stressed-strained state of the maxillo-dental system. *Journal of Engineering Thermophysics*, 2017, vol. 90, no. 6, pp. 1513–1523. <https://doi.org/10.1007/s10891-017-1713-8>
13. Chowdhary Z., Gupta P., Kaur J., Garg Y., Swarup N. Multifaceted assessment of dentine hypersensitivity, evaluation of demographic prevalence along with associated factors: A cross-sectional study. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 2019, vol. 23, no. 1, pp. 64–68. https://doi.org/10.4103/jisp.jisp_425_18
14. Dam V. V., Nguyen T. H., Trinh H. A., Dung D. T., Hai, T. D. Advances in the Management of Dentin Hypersensitivity: An Updated Review. *Open Dentistry Journal*, 2022, vol. 16, no. 1, p. e187421062201130. <https://doi.org/10.2174/18742106-v16-e2201130>
15. Favaro Zeola L., Soares P. V., Cunha-Cruz J. Prevalence of dentin hypersensitivity: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Dentistry*, 2019, no. 81, pp. 1–6.
16. Liu X.-X., Tenenbaum H. C., Wilder R. S., Quock R., Hewlett E. R., Ren Y.-F. Pathogenesis, diagnosis and management of dentin hypersensitivity: An evidence-based overview for dental practitioners. *BMC Oral Health*, 2020, vol. 20, no. 1, art. 220. <https://doi.org/10.1186/s12903-020-01199-z>
17. Longridge N. N., Youngson C. C. Dental pain: Dentine sensitivity, hypersensitivity and cracked tooth syndrome. *Primary Dental Journal*, 2019, vol. 8, no. 1, pp. 44–51. <https://doi.org/10.1177/205016841900800101>
18. Reddy G. V., Surakanti J. R., Vemisetty H., Doranala S., Hanumanpally J. R., Malgikar S. Comparative assessment of effectiveness of Biomin, NovaMin, herbal, and potassium nitrate desensitizing agents in the treatment of hypersensitive teeth: A clinical study. *Journal of Dr. NTR University of Health Sciences*, 2019, vol. 8, no. 1, pp. 24–28. https://doi.org/10.4103/JDRNTRUHS.JDRNTRUHS_110_18
19. Dedova L. N. *Therapeutic dentistry. Periodontal diseases*. Minsk, Ekoperspektiva Publ., 2016. 268 p. (in Russian).
20. de Silva C. C., de M. Alencar C., de Paula B. L. F., de A. Jassé F. F., Araújo J. L. N., Silva C. M. Photobiomodulation vs. placebo on post-bleaching sensitivity and color change: A split-mouth clinical study. *Open Dentistry Journal*, 2020, vol. 14, pp. 267–274. <https://doi.org/10.2174/1874210602014010267>
21. Laser speckle technology in stomatology. Diagnostics of stresses and strains of hard biotissues and orthodontic and orthopedic structures. *Journal of Engineering Physics and Thermophysics*, 2013, vol. 86, no. 4, pp. 940–951. <https://doi.org/10.1007/s10891-013-0915-y>
22. Bazylev N. B. Investigation of the stressed-strained state of cermet dentures using digital laser speckle-photographic analysis. *Journal of Engineering Physics and Thermophysics*, 2009, vol. 82, no. 4, pp. 789–793. <https://doi.org/10.1007/s10891-009-0247-0>
23. Singh P., Suri I., Shakir Q., Shetty A., Bapat R., Thakur R. A comparative evaluation to assess the efficacy of 5 % sodium fluoride varnish and diode laser and their combined application in the treatment of dentin hypersensitivity. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 2016, vol. 20, no. 3, pp. 307–314. <https://doi.org/10.4103/0972-124x.181243>
24. Rubnikovich S. P. Diagnostic measures for bruxism in combination with dysfunction of the temporomandibular joints and tooth abrasion. *Stomatolog. Minsk* [Dentist. Minsk], 2018, vol. 2, no. 29, pp. 52–61 (in Russian).
25. Denisova Yu. L., Dedova L. N. Endoperiodontal lesions: new information on predicting endoperiodontitis. *Stomatolog. Minsk* [Dentist. Minsk], 2021, vol. 2, no. 41, pp. 8–12 (in Russian).
26. West N., Seong J., Davies M. Dentine hypersensitivity. *Monographs in Oral Science*, 2014, no. 25, pp. 108–122.
27. Dedova L. N. Index of prognosis of dentin sensitivity in dental patients. *Stomatolog. Minsk* [Dentist. Minsk], 2023, vol. 4, no. 51, pp. 8–13 (in Russian).
28. Dedova L. N. *Diagnosis of periodontal diseases: educational and methodological manual*. Minsk, Belarusian State Medical University, 2004. 70 p. (in Russian).

Information about the authors

Sergey P. Rubnikovich – D. Sc. (Med.), Professor, Rector. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0002-7450-3757>. E-mail: rubnikovichs@mail.ru

Liudmila N. Dedova – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0009-0005-6676-0883>. E-mail: dedova.bsmu@mail.ru

Yuliya L. Denisova – D. Sc. (Med.), Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0003-0917-7972>. E-mail: denisova-yul@mail.ru

Alexander S. Solomevich – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sahasaha@mail.ru

Информация об авторах

Рубникович Сергей Петрович – д-р мед. наук, профессор, ректор. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-7450-3757>. E-mail: rubnikovichs@mail.ru

Дедова Людмила Николаевна – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0009-0005-6676-0883>. E-mail: dedova.bsmu@mail.ru

Денисова Юлия Леонидовна – д-р мед. наук, профессор. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0003-0917-7972>. E-mail: denisova-yul@mail.ru

Соломевич Александр Сергеевич – канд. мед. наук, доцент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: sahasaha@mail.ru

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 575.22:612.461.25:[616.12-008.331.1+616.12-008.313.2]

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-1-33-42>

Поступила в редакцию 25.06.2022

Received 25.06.2022

Т. Л. Борисенко, В. А. Снежицкий, М. Н. Курбат, О. В. Горчакова, А. В. Копыцкий*Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Республика Беларусь***РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОТИПОВ ГЕНА *SLC2A9* И ЕГО ВЗАИМОСВЯЗЬ С УРОВНЕМ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ У ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ И ФИБРИЛЛЯЦИЕЙ ПРЕДСЕРДИЙ**

Аннотация. Бессимптомная гиперурикемия (ГУ) широко распространена в популяции и является одним из основных факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний. Данные многочисленных исследований подтверждают взаимосвязь между повышением уровня мочевой кислоты (МК) и риском развития артериальной гипертензии (АГ) и/или фибрилляции предсердий (ФП). Одной из причин повышения уровня МК и значимым фактором риска возникновения ГУ является наличие полиморфизма гена *SLC2A9* – высокоспецифического транспортера уратов в клетках проксимальных почечных канальцев, кодирующего белок GLUT9.

Цель исследования – изучить частоту встречаемости генотипов и аллелей полиморфного варианта rs734553 гена *SLC2A9* и его взаимосвязь с уровнем МК у пациентов с АГ и ФП, а также у здоровых лиц.

Обследован 141 пациент, из них 50 – здоровые пациенты (1-я группа), 68 – с АГ и ФП (2-я группа), 23 – с АГ (3-я группа).

В общей выборке пациентов частоты генотипов полиморфизма rs734553 гена *SLC2A9* были следующие: АА – 46,1 % ($n = 65$), АС – 36,2 % ($n = 51$), СС – 17,7 % ($n = 25$). Согласно результатам генотипирования пациентов, в 1-й группе генотип АА составил 64 % ($n = 32$), АС – 22 % ($n = 11$), СС – 14 % ($n = 7$); во 2-й группе – 32,4 % ($n = 22$), 48,5 % ($n = 33$) и 19,1 % ($n = 13$); в 3-й группе – 47,8 % ($n = 11$), 30,4 % ($n = 7$) и 21,7 % ($n = 5$) соответственно. У пациентов с генотипом СС (420 [413; 424] мкмоль/л) и генотипом АС (330 [284; 412] мкмоль/л) величина урикемии была выше, чем у лиц с генотипом АА (310 [281; 341] мкмоль/л) ($p = 0,003$). ГУ с генотипом АА во 2-й группе была диагностирована у 2 (2,9 %) пациентов, с генотипом АС – у 12 (17,6 %), с генотипом СС – у 10 (14,7 %); в 3-й группе – у 1 (4,3 %), 1 (4,3 %) и 3 (13 %) соответственно. Один пациент (2 %) с ГУ из 1-й группы имел генотип СС.

Установлено распределение частот генотипов и аллелей полиморфного варианта rs734553 гена *SLC2A9* и его взаимосвязь с уровнем МК у пациентов с АГ и ФП, а также у здоровых лиц. У пациентов с АГ и ФП генотип АС встречался в 3 раза чаще, а генотип СС в 2 раза чаще, чем у здоровых пациентов. ГУ встречался достоверно чаще ($p = 0,003$) в группе пациентов с АГ и ФП и генотипом СС, а также у пациентов с генотипом СС.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, фибрилляция предсердий, мочевая кислота, гиперурикемия, полиморфизм гена *SLC2A9*

Для цитирования: Распределение генотипов гена *SLC2A9* и его взаимосвязь с уровнем мочевой кислоты у пациентов с артериальной гипертензией и фибрилляцией предсердий / Т. Л. Борисенко [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2024. – Т. 21, № 1. – С. 33–42. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-1-33-42>

Tatyana L. Barysenka, Viktor A. Snezhitskiy, Mikhail N. Kurbat, Olga V. Gorchakova, Andrey V. Kopytsky*Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus***DISTRIBUTION OF THE *SLC2A9* GENOTYPE AND ITS ASSOCIATION WITH THE URIC ACID LEVEL IN PATIENTS WITH ARTERIAL HYPERTENSION AND ATRIAL FIBRILLATION**

Abstract. Asymptomatic hyperuricemia (HU) is widespread in the population and is one of the main risk factors for cardiovascular diseases. Evidence of numerous studies supports the association between increased uric acid (UA) levels and the risk of arterial hypertension (HTN) and/or atrial fibrillation (AF). One of the causes for an increase in UA levels and a significant risk factor for HU is the polymorphism of the *SLC2A9* gene, a highly specific urate transporter in proximal renal tubule cells, encoding the GLUT9 protein.

The aim of the study is to investigate the frequency of genotypes and alleles of the *SLC2A9* gene rs734553 polymorphic variant and its association with the UA level in patients with HTN and AF, as well as in healthy individuals.

141 patients, including 50 healthy patients (group 1), 68 – with HTN and AF (group 2), 23 – with HTN (group 3) were examined.

In the overall group of patients, the frequencies of the *SLC2A9* gene rs734553 polymorphism were as follows: АА – 46.1 % ($n = 65$), АС – 36.2 % ($n = 51$), СС – 17.7 % ($n = 25$). According to the genotyping results of patients, in group 1 the АА genotype was 64 % ($n = 32$), АС – 22 % ($n = 11$), СС – 14 % ($n = 7$); in group 2 – 32.4 % ($n = 22$), 48.5 % ($n = 33$) and 19.1 % ($n = 13$); in group 3 47.8 % ($n = 11$), 30.4 % ($n = 7$) and 21.7 % ($n = 5$), respectively. The СС genotype patients

(420 [413; 424] $\mu\text{mol/l}$) and the AC genotype patients (330 [284; 412] $\mu\text{mol/l}$) had higher uricemia values than those with the AA genotype (310 [281; 341] $\mu\text{mol/l}$) ($p = 0.003$). HU with the AA genotype in group 2 was diagnosed in 2 (2.9 %) patients, with the AC genotype in 12 (17.6 %), and with the CC genotype in 10 (14.7 %) patients; in group 3 – 1 (4.3 %), 1 (4.3 %) and 3 (13 %), respectively. One patient (2 %) with HU in group 1 had the CC genotype.

The distribution of genotype and allele frequencies of the *SLC2A9* gene rs734553 polymorphic variant and its association with the UA level in patients with HTN and AF, as well as in healthy individuals were established. In patients with HTN and AF, the AC genotype occurred 3 times more often and the CC genotype occurred 2 times more often than in healthy patients. HU occurred significantly more often ($p = 0.003$) in the group of patients with HTN and AF and the CC genotype, as well as in patients with the CC genotype.

Keywords: arterial hypertension, atrial fibrillation, uric acid, hyperuricemia, *SLC2A9* gene polymorphism

For citation: Barysenka T. L., Snezhitskiy V. A., Kurbat M. N., Gorchakova O. V., Kopytsky A. V. Distribution of the *SLC2A9* genotype and its association with the uric acid level in patients with arterial hypertension and atrial fibrillation. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2024, vol. 21, no. 1, pp. 33–42 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-1-33-42>

Введение. Основной причиной смерти взрослого населения во многих странах мира являются сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), в частности осложнения вследствие артериальной гипертензии (АГ) и фибрилляции предсердий (ФП) [1].

ФП, наряду с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) и сахарным диабетом (СД), отнесена мировым медицинским сообществом к числу трех сердечно-сосудистых «эпидемий XXI века». В последние годы распространенность ФП неуклонно растет, при этом истинная причина этого роста частоты ФП не может быть объяснена лишь увеличением продолжительности жизни пациентов, более частым поражением клапанов сердца или ростом распространенности инфаркта миокарда [2].

Несмотря на то что ФП встречается у лиц с различными проявлениями ишемической болезни сердца (ИБС), все чаще она диагностируется у больных АГ, не страдающих ИБС. ФП как причина серьезных сердечно-сосудистых осложнений требует глубокого понимания патогенетических аспектов и всестороннего изучения проблемы с учетом сопутствующей коморбидной патологии для выявления предикторов развития и прогрессирования [1].

Долгое время мочевая кислота (МК) рассматривалась как инертный конечный продукт катаболизма пуриновых оснований, однако в последние десятилетия накоплены неоспоримые доказательства того, что хроническая бессимптомная гиперурикемия (ГУ) не только ассоциирована с отложением кристаллов моноурата натрия в тканях и подагрой, но и является независимым фактором риска развития АГ, сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), метаболического синдрома, хронической болезни почек (ХБП). При этом механизмы, объясняющие связь ССЗ с ГУ, до конца не изучены [3].

При уровне МК в сыворотке крови >360 мкмоль/л у женщин и >400 мкмоль/л у мужчин и отсутствии признаков подагрического артрита ГУ считается бессимптомной [4].

В последние десятилетия во многих странах мира наблюдается тенденция к увеличению частоты встречаемости ГУ, что обусловлено снижением физической активности населения, увеличением частоты метаболических нарушений (избыточная масса тела и ожирение, патология углеводного и липидного обмена), все большим потреблением продуктов питания, богатых пуринами (мясо и морепродукты), сладких безалкогольных напитков и алкоголя, а также увеличением продолжительности жизни как в общей популяции, так и у пациентов с ХБП и застойной сердечной недостаточностью [4].

О значении бессимптомной ГУ в риске развития ССЗ свидетельствует включение МК в состав факторов риска развития АГ в рекомендациях ESC/ESH (2018 г.) и рекомендациях Российского кардиологического общества (2020 г.) [5, 6].

Наследственные факторы в развитии ГУ могут играть значительную роль, поэтому во всем мире в научных исследованиях по фундаментальной медицине большое внимание уделяется молекулярно-генетическим методам анализа. Поскольку наследуемость концентрации уратов сыворотки составляет 40–70 %, предполагается, что генетические вариации могут влиять на уровень МК через регуляцию ее синтеза, реабсорбции и экскреции [7].

Ген *SLC2A9* кодирует белок, известный как глюкозный транспортер 9 (GLUT9) или эффлюксный транспортер уратов (URAT)v1, который является также высокоспецифическим транспортером

уратов в клетках проксимальных почечных канальцев, непосредственно влияя на реабсорбцию МК [8]. Недавно было установлено, что распространенные генетические варианты *SLC2A9* тесно связаны с уровнем уратов в сыворотке крови и подагрой в когортах представителей европеоидной расы из Италии, Великобритании, Хорватии, США, Германии и Австрии [9]. Генетические варианты *SLC2A9* влияли на уровень МК у взрослых пациентов из Кореи [10].

Научный интерес представляет и обнаружение связи ряда факторов (клинических и генетических) у пациентов с ГУ и сердечно-сосудистой патологией.

Цель исследования – изучить частоту встречаемости генотипов и аллелей полиморфного варианта rs734553 гена *SLC2A9* и уровень мочевой кислоты у пациентов с артериальной гипертензией и фибрилляцией предсердий, а также у здоровых лиц.

Материалы и методы исследования. Основная часть данного исследования выполнена на базе УЗ «Гродненский областной клинический кардиологический центр». Дополнительное обследование здоровых пациентов (1-я группа) осуществлялось на базе УЗ «Медицинская служба Департамента финансов и тыла МВД по Гродненской области» и УЗ «Гродненская областная станция переливания крови».

Включенные в исследование пациенты ($n = 141$) были разделены на следующие группы: 1-я – здоровые пациенты, без анамнеза АГ и ФП ($n = 50$); 2-я – пациенты с АГ и ФП ($n = 68$), 3-я – пациенты с АГ ($n = 23$). В план обследования пациентов входило изучение анамнеза, физикальное обследование, инструментальная и лабораторная диагностика.

Критерии включения в исследование: для 2-й группы – наличие АГ и ФП, развившейся на фоне АГ; для 3-й группы – наличие АГ, а также отсутствие анамнеза ФП и других клинически значимых нарушений ритма.

Критерии исключения из исследования: острая коронарная или цереброваскулярная патология на момент обследования, инфаркт миокарда либо нарушение мозгового кровообращения в анамнезе, клинически значимая клапанная патология ревматической или другой этиологии, недостаточность кровообращения Н2А и выше, кардиохирургическое вмешательство в анамнезе, ФП после употребления алкоголя, мультифокальный атеросклероз, подагра, ХБП, СД, ожирение, нарушение функции щитовидной железы, бронхолегочная патология, обострение заболеваний желудочно-кишечного тракта, нарушение функции печени, активный воспалительный процесс любой локализации.

Помимо стандартных общеклинических показателей, у всех пациентов определяли уровень МК ферментативным колориметрическим методом. Наличие ГУ предполагалось при уровне МК в сыворотке крови >360 мкмоль/л у женщин и >400 мкмоль/л у мужчин и отсутствии признаков подагрического артрита [4].

Уровень ксантиноксидазы в сыворотке крови определяли с помощью набора для иммуноферментного анализа Human XDH (Xanthine dehydrogenase/oxidase) ELISA Kit Cat. No. EH1036, используя метод, основанный на твердофазном «сэндвич»-варианте иммуноферментного анализа, а содержание метаболитов пуринового обмена (аденозина, гипоксантина и ксантина) – с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для определения полиморфного варианта rs734553 гена *SLC2A9* использовали метод полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме реального времени с применением набора реагентов производства «Литех» (РФ). Для выделения геномной ДНК человека использовали набор реагентов «ДНК-Экстрем-1» («Синтол», РФ), для амплификации ДНК – прибор Rotor Gene-Q (Qiagen, Германия).

Во время пребывания в стационаре лечение пациентов с пароксизмальной и персистирующей формами ФП соответствовало стратегии контроля ритма с назначением антиаритмических препаратов III или IC класса. Кроме того, всем пациентам с персистирующей формой ФП проводили электрическую кардиоверсию с целью восстановления синусового ритма. При лечении пациентов с постоянной формой ФП придерживались стратегии контроля частоты сердечных сокращений, что достигалось путем назначения β -адреноблокатора. При лечении пациентов с АГ использовали алгоритмы ведения пациентов с АГ, целью которых является достижение целевого уровня артериального давления (АД) и уменьшение числа сердечно-сосудистых событий. Пациенты с АГ получали или один из ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента –

периндоприл, рамиприл, лизиноприл, или один из блокаторов рецепторов ангиотензина II – лозартан, валсартан, или комбинированную терапию с применением рациональных комбинаций антигипертензивной терапии в соответствии с рекомендациями Европейского общества кардиологов 2018 г. [5]. Всем пациентам с ФП назначали антитромботическую терапию с учетом риска развития инсульта согласно шкале CHA2DS2-VASc: варфарин до достижения целевого международного нормализованного отношения 2,5 (2,0–3,0) или прямой ингибитор фактора Ха – ривароксабан. Всем пациентам проводилась коррекция сопутствующих факторов сердечно-сосудистого риска в виде назначения, при необходимости, антиагрегантной и гиполипидемической терапии.

Для статистического анализа использовали пакет прикладных программ STATISTICA 10.0 для Windows (StatSoft, Inc., США). Описательные статистики были представлены как Me (Q1; Q3), где Me – медиана, Q1, Q3 – 1-й и 3-й квартили соответственно. Для оценки различий количественных признаков между двумя независимыми группами применялся *U*-критерий Манна–Уитни. При сравнении трех независимых групп использовали критерий Краскела–Уоллиса; при необходимости выполняли апостериорные попарные сравнения по критерию Стила–Дваса–Кричлоу–Флинера. Статистическую значимость различий между распределениями качественных признаков оценивали при помощи точного критерия Фишера. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного варианта rs734553 гена *SLC2A9* соответствовало равновесию Харди–Вайнберга.

Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинской декларации. Все обследуемые подписывали информированное согласие на участие в исследовании, протокол которого был одобрен комитетом по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета.

Результаты исследования. В табл. 1 приведена характеристика групп пациентов, включенных в исследование.

Т а б л и ц а 1. Характеристика групп пациентов, включенных в исследование

Table 1. Characteristic of the patient groups included in the study

Показатель	Группа 1 ($n = 50$)	Группа 2 ($n = 68$)	Группа 3 ($n = 23$)	p
Возраст, лет	50 [45; 53]	57 [51; 62]	45 [38; 50]	< 0,001
Пол (мужской)	22 (44 %)	63 (93 %)	20 (87 %)	< 0,001
САД, мм рт. ст.	120 [110; 120]	140 [130; 155]	150 [140; 160]	< 0,001
ДАД, мм рт. ст.	80 [70; 80]	90 [87,5; 100]	90 [90; 100]	< 0,001
Опыт ФП, мес.	–	22 [3; 96]	–	< 0,001
Индекс массы тела, кг/м ²	26,2 [24,8; 27,4]	26,8 [25,7; 28,3]	26,8 [25,6; 27,5]	>0,05
Мочевая кислота, мкмоль/л	197 [161; 229]	335 [284; 413]	330 [281; 390]	< 0,001
Ксантинооксидаза, пг/мл	0,66 [0,26; 1,33]	0,51 [0,17; 0,92]	0,58 [0,25; 0,76]	>0,05
Гипоксантин, мкмоль/л	11,3 [6,5; 32,9]	4,9 [2,4; 8,2]	3,9 [1,8; 8,5]	< 0,001
Ксантин, мкмоль/л	2,1 [1,3; 3]	0,7 [0,5; 1]	0,69 [0,4; 0,9]	< 0,001
Аденозин, мкмоль/л	0,07 [0,04; 0,17]	0,12 [0,08; 0,17]	0,13 [0,09; 0,17]	0,005

Примечание. Здесь и в табл. 2 данные представлены в виде абсолютного числа пациентов (%) или медианы (25 %-ного и 75 %-ного квартилей). САД – систолическое артериальное давление, ДАД – диастолическое артериальное давление.

Уровень МК составил 197 [161; 229] мкмоль/л у здоровых пациентов без анамнеза АГ и ФП (1-я группа), 335 [284; 413] мкмоль/л у пациентов с АГ и ФП (2-я группа), 330 [281; 390] мкмоль/л у пациентов с АГ (3-я группа) ($p < 0,001$) (табл. 1). ГУ обнаружена у 30 (21,3 %) пациентов из всех групп (у 1 (2 %) из 1-й группы, у 24 (35,3 %) из 2-й группы и у 5 (21,7 %) из 3-й группы). Нормальный уровень МК отмечен у 111 (78,7 %) пациентов.

По результатам молекулярно-генетического исследования полиморфного варианта rs734553 гена *SLC2A9* выявлено три вида генотипов: АА – гомозиготный доминантный, АС – гетерозиготный, СС – гомозиготный рецессивный.

В общей выборке пациентов частоты генотипов полиморфизма rs734553 гена *SLC2A9* были следующие: АА – 46,1 % ($n = 65$), АС – 36,2 % ($n = 51$), СС – 17,7 % ($n = 25$). Распределение генотипов соответствовало равновесию Харди–Вайнберга ($p = 0,01$). Частота аллели А составила 64,2 %, аллели С – 35,8 %.

По результатам генотипирования пациентов 1-й группы по полиморфизму rs734553 гена *SLC2A9* получены следующие результаты: АА – 64 % ($n = 32$), АС – 22 % ($n = 11$), СС – 14 % ($n = 7$). Аллель А встречалась в 75 % случаев, аллель С – в 25 % (табл. 2).

У пациентов 2-й группы гомозиготный генотип АА выявлен в 32,4 % случаев ($n = 22$), гетерозиготный генотип АС – в 48,5 % ($n = 33$), гомозиготный генотип СС – в 19,1 % ($n = 13$). Аллель А встречалась у 56,6 % пациентов, аллель С – у 43,4 % (табл. 2).

У пациентов 3-й группы гомозиготный генотип АА выявлен в 47,8 % случаев ($n = 11$), гетерозиготный генотип АС – в 30,4 % ($n = 7$), гомозиготный генотип СС – в 21,7 % ($n = 5$). Аллель А встречалась у 63 % пациентов, аллель С – у 37 % (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Распределение генотипов и аллелей полиморфного варианта rs734553 гена *SLC2A9*, n (%)

Table 2. Distribution of genotype and allele frequencies of *SLC2A9* gene rs734553 polymorphic variant, n (%)

Полиморфизм, генотип	Группа 1 ($n = 50$)	Группа 2 ($n = 68$)	Группа 3 ($n = 23$)	p
АА	32 (64)*	22 (32,4)*	11 (47,8)	0,002
АС	11 (22)*	33 (48,5)*	7 (30,4)	0,01
СС	7 (14)	13 (19,1)	5 (21,8)	0,664
Аллель А	75 (75)*	77 (56,6)*	29 (63)	0,012
Аллель С	25 (25)*	59 (43,4)*	17 (37)	0,012

П р и м е ч а н и е. * – достоверные различия ($p < 0,05$) между 1-й и 2-й группами.

Уровень МК значительно различался у пациентов 2-й группы с разными генотипами полиморфного варианта rs734553 гена *SLC2A9*. У пациентов с генотипом СС (420 [413; 424] мкмоль/л) и с генотипом АС (330 [284; 412] мкмоль/л) величина урикемии была выше, чем у пациентов с генотипом АА (310 [281; 341] мкмоль/л) полиморфного варианта rs734553 гена *SLC2A9* ($p = 0,003$) (табл. 3).

ГУ с генотипом АА у пациентов 2-й группы была диагностирована в 2,9 % ($n = 2$) случаев, с генотипом АС – в 17,6 % ($n = 12$), с генотипом СС – в 14,7 % ($n = 10$), а у пациентов 3-й группы – в 4,3 % ($n = 1$), 4,3 % ($n = 1$) и 13 % ($n = 3$) случаев соответственно. Пациент с ГУ из 1-й группы имел генотип СС (2 %).

Т а б л и ц а 3. Уровень мочевой кислоты в зависимости от генотипа полиморфного варианта rs734553 гена *SLC2A9* у обследуемых пациентов

Table 3. Uric acid level depending on the genotype of the *SLC2A9* gene rs734553 polymorphic variant in the studied patients

Мочевая кислота, мкмоль/л	Генотип			p
	АА	АС	СС	
Группа 1 ($n = 50$)	199 (144; 233)	177 (161; 222)	185 (171; 201)	$H = 0,255$; $p = 0,88$
Группа 2 ($n = 68$)	310 (281; 341)*	330 (284; 412)#	420 (413; 424)*#	$H = 11,954$; $p = 0,003$
Группа 3 ($n = 23$)	330 (267; 360)	340 (317; 380)	420 (300; 421)	$H = 1,497$; $p = 0,473$

П р и м е ч а н и е. Достоверные различия между парами сравнения генотипов ($p < 0,05$): * – АА–СС, # – АС–СС. Сравнение трех подгрупп в каждой группе выполнено при помощи критерия Краскала–Уоллиса; попарные апостериорные сравнения во 2-й группе выполнены при помощи критерия Стила–Дваса–Кричлоу–Флинера.

Обсуждение. За последние десятилетия распространенность ГУ существенно увеличилась во всем мире. Данные свидетельствуют о достоверном увеличении распространенности ГУ в США за последнее десятилетие с 19,1 до 21,4 % [11]. В метаанализе, опубликованном В. Liu с соавт., сообщалось, что общая распространенность ГУ в 59 исследованиях, проведенных в Китае за последние годы и отобранных для метаанализа, составила 21,6 % для мужчин и 8,6 % для женщин. Показано, что риск ГУ увеличивался у мужчин после 30 лет, а у женщин – после 50 [12].

Распространенность патологических состояний, ассоциированных с ГУ, увеличивается, что выводит данную проблему за рамки ревматологических заболеваний и требует широкого подхода с учетом рисков развития ССЗ и заболеваний почек. Следует отметить, что, несмотря на активное изучение проблемы бессимптомной ГУ, важнейшие аспекты до сих пор остаются предметом дискуссий [4].

Данные последних лет указывают на то, что в большинстве случаев ГУ при подагре связана скорее с недостаточной экскрецией, чем с избыточной продукцией МК. Всего за сутки экскретируется 300–600 мг (1,8–3,6 ммоль) МК. Приблизительно 95 % МК выделяется в мочу путем фильтрации в клубочках почек, однако почти вся МК в последующем подвергается обратной реабсорбции под воздействием переносчиков уратов (URAT-1) и органических анионов (OATs) в проксимальных отделах канальца. Потом она вновь секретируется в дистальных канальцах в мочу, а далее 80 % кислоты окончательно реабсорбируется в кровь, а 20 % выводится с мочой. Повышение уровня МК в сыворотке крови оказывает влияние на клетки эндотелия и гладкой мускулатуры сосудов, приводя к развитию микрососудистого повреждения почек. Таким образом, почки могут играть ключевую роль в недостаточной экскреции МК и, как следствие, являться причиной ГУ [13].

Несмотря на то что наличие ГУ является необходимым условием для возникновения подагры, далеко не у всех пациентов с повышением МК дебютирует суставной синдром. Так, по данным наблюдательного исследования, 5-летняя кумулятивная заболеваемость подагрой у мужчин с бессимптомной ГУ составила 18,83 %. В другом наблюдательном исследовании за 7,5 года наблюдения подагра дебютировала у 3,1 % пациентов с бессимптомной ГУ [14]. Несмотря на это, влияние ГУ на развитие и прогрессирование целого ряда патологий терапевтического профиля имеет широкий диапазон.

Эпидемиологические исследования показали, что повышение концентрации МК является предиктором развития АГ. Данные метаанализа 18 исследований демонстрируют увеличение на 13 % частоты впервые возникшей АГ на каждый 1 % повышения уровня МК [15]. Исследование RAMELA подтвердило, что увеличение уровня МК на 1 мг/дл (60 мкмоль/л) связано со значительным повышением риска развития впервые возникшей АГ [16]. ГУ является значимым фактором риска развития ИБС, острого инфаркта миокарда, острой сердечной недостаточности, сердечно-сосудистой и общей смертности [17]. Кроме того, 12-летнее исследование RIUMA, в котором приняли участие 1720 пациентов с АГ, показало, что уровень МК – сильный предиктор смертности [18]. В метаанализе данных 8776 пациентов с острым коронарным синдромом и сопутствующей ГУ выявлено повышение риска неблагоприятных сердечно-сосудистых событий, общей и сердечно-сосудистой смертности после корректировки на другие известные факторы риска [19]. У пациентов с ХСН установлена прямая связь между повышением уровня МК, снижением фракции выброса левого желудочка и уровнем NT-proBNP [20]. В литературе представлены доказательства взаимосвязи ГУ и острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК). Более того, у пациентов, перенесших ОНМК и имеющих ГУ, отмечалось увеличение показателя смертности [21]. Нарушения ритма сердца также ассоциированы с ГУ. В частности, описаны пути патологического влияния МК на формирование ФП [22].

Представленные результаты исследований по взаимосвязи повышенного уровня МК с риском развития ФП показали, что повышенный уровень МК достоверно увеличивает риск развития ФП [22]. Участвуя в процессе ремоделирования предсердий, ГУ является потенциальным механизмом, лежащим в основе повышенного риска развития аритмии [11].

Уровень МК в крови регулируется тремя механизмами: эндогенным синтезом, экскрецией и реабсорбцией в почках и кишечнике. В физиологических условиях производство и выведение

МК находятся в состоянии баланса, а при его нарушении развивается ГУ. Генетически обусловленное нарушение реабсорбции или экскреции МК может приводить к гипо- или гиперурикемии, демонстрируя, соответственно, двунаправленность транспорта уратов в эпителии проксимальных канальцев почек [23].

Большинство генов, ассоциированных в полногеномном ассоциативном исследовании (genome-wide association study) с уровнем МК или подагрой, кодируют протеины, которые вовлечены в систему почечного транспорта уратов, например *SLC2A9* (solute carrier family 2, member 9) и *ABCG2* (ATP-binding cassette, family G) – хорошо известные гены уратных транспортеров, отвечающие за их реабсорбцию и экскрецию [24].

Проводимые в последние годы полногеномные исследования продемонстрировали важную роль генетической предрасположенности к нарушению пуринового обмена. В частности, полиморфизмы генов, кодирующих уратные транспортеры в почках и кишечнике (*SLC2A9*, *SLC22A12*, *ABCG2* и др.), могут быть причиной повышения уровня МК, т. е. значимым фактором риска возникновения подагры и ГУ [8].

Ген *SLC2A9* кодирует белок, известный как глюкозный транспортер 9 (GLUT9) или эффлюксный транспортер уратов (URAT)v1. Располагается на коротком плече 4-й хромосомы, является высокоспецифическим транспортером уратов в клетках проксимальных почечных канальцев, непосредственно влияя на реабсорбцию МК [8]. Экспрессируется на гепатоцитах, хондроцитах, интестинальных клетках, лейкоцитах, эпителиальных клетках почек. Ген *SLC2A9* существует в двух изоформах: *SLC2A9v1* (обычно переносится на базолатеральную мембрану эпителиальных клеток проксимальных канальцев почек, транспортирует ураты из клеток проксимальных канальцев) и *SLC2A9v2* (локализуется на апикальной мембране и обладает высокой способностью к транспорту уратов, может быть ингибирован урикозурическими препаратами (пробенецидом, бензбромароном, лозартаном). Механизм выведения МК посредством регуляции *SLC2A9* осуществляется посредством этих двух вариантов [25].

Результаты обследования 608 пациентов мужского пола, проведенного китайскими учеными Х-Л. Уи и соавт. в 2018 г., продемонстрировали взаимосвязь полиморфного варианта rs734553 гена *SLC2A9* с ГУ у пациентов с СД второго типа. Пациенты с наличием генотипа с неблагоприятным аллелем С имели более высокий риск ГУ и СД второго типа, осложненного ГУ, чем пациенты без аллеля С. Следовательно, наличие мутации в гене *SLC2A9* увеличивает риск развития ГУ и СД второго типа, осложненного ГУ, в китайской популяции [26]. Согласно опубликованной информации, полиморфизм rs734553 гена *SLC2A9* влияет на уровень МК в сыворотке крови, способствуя предрасположенности к подагре, болезни Паркинсона или прогрессированию ХБП [27]. В исследовании, проведенном в сообществе амишей, полиморфизм rs734553 гена *SLC2A9* был тесно связан с артериальным давлением (АД) [28]. Кроме того, в рамках недавнего исследования F. Mallamaci с соавт., включающего 449 пациентов, было установлено, что носительство неблагоприятного аллеля rs734553 в гене *SLC2A9* позволяет предсказать прогрессирование ХБП, а также ассоциированное систолическое АД и толщину комплекса интима-медиа сонных артерий в корте пациентов с ХБП в Южной Италии [29, 30].

Заключение. Установлено распределение частот генотипов и аллелей полиморфного варианта rs734553 гена *SLC2A9* и его взаимосвязь с уровнем МК у пациентов с АГ и ФП, а также у здоровых лиц.

Выявлены достоверные различия между пациентами по гетерозиготному генотипу АС ($p = 0,01$) при выполнении сравнительного анализа частот генотипов и аллелей полиморфизма rs734553 гена *SLC2A9*. У пациентов с АГ и ФП генотип АС встречался в 3 и 4 раза чаще, чем у здоровых пациентов и пациентов только с АГ соответственно. Генотип СС у пациентов с АГ и ФП встречался в 2 и 2,5 раза чаще, чем у здоровых пациентов и пациентов только с АГ соответственно. Уровень МК достоверно выше у пациентов с наличием АГ и ФП, а также у пациентов только с АГ по сравнению с таковым у пациентов контрольной группы. ГУ встречается достоверно чаще ($p = 0,003$) в группе пациентов с АГ и ФП и генотипом СС, а также у пациентов с генотипом СС.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Генетические маркеры фибрилляции предсердий на фоне гипертонической болезни в сочетании с экстракардиальными заболеваниями / Л. Хидирова [и др.] // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2019. – Т. 23, № 1. – С. 83–85.
2. European Heart Rhythm Association (EHRA) consensus document on the management of supraventricular arrhythmias, endorsed by Heart Rhythm Society (HRS), Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHRs), and Sociedad Latinoamericana de Estimulación Cardíaca y Electrofisiología (SOLAECE) / D. G. Katritsis [et al.] // Eur. Heart J. – 2018. – Vol. 39, N 16. – P. 1442–1445. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw455>
3. Serum uric acid and the risk of cardiovascular and renal disease / C. Borghi [et al.] // J. Hypertens. – 2015. – Vol. 33, N 9. – P. 1729–1741. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000000701>
4. Кобалава, Ж. Д. Бессимптомная гиперурикемия и риск развития сердечно-сосудистых и почечных заболеваний / Ж. Д. Кобалава, Е. А. Троицкая // Кардиология. – 2020. – Т. 60, № 10. – С. 113–121.
5. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension / B. Williams [et al.] // Eur. Heart J. – 2018. – Vol. 39, N 33. – P. 3021–3104. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy339>
6. Артериальная гипертензия у взрослых. Клинические рекомендации 2020 / Ж. Д. Кобалава [и др.] // Рос. кардиол. журн. – 2020. – Т. 25, № 3. – С. 149–218.
7. Роль полиморфизма *SLC2A9*, *ABCG2* генов в возникновении гиперурикемии и подагры // А. А. Фадеева [и др.] // Georg. Med. News. – 2016. – Т. 252, № 3. – С. 79–83.
8. The genetics of hyperuricaemia and gout / A. M. Reginato [et al.] // Nat. Rev. Rheumatol. – 2012. – Vol. 8, N 10. – P. 610–621. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.144>
9. Genome-wide association study identifies genes for biomarkers of cardiovascular disease: serum urate and dyslipidemia / C. Wallace [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 2008. – Vol. 82, N 1. – P. 139–149. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.11.001>
10. Effects of *SLC2A9* variants on uric acid levels in a Korean population / J. W. Sull [et al.] // Rheumatol. Int. – 2013. – Vol. 33, N 1. – P. 19–23. <https://doi.org/10.1007/s00296-011-2303-2>
11. Barysenka, T. L. The role of hyperuricemia in the development of atrial fibrillation / T. L. Barysenka, V. A. Snezhitskiy // Cardiac Arrhythmias. – 2021. – Т. 1, № 1. – С. 7–16.
12. The prevalence of hyperuricemia in China: a meta-analysis / B. Liu [et al.] // BMC Public Health. – 2011. – N 11. – Art. 832. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-11-832>
13. Жернакова, Ю. В. Гиперурикемия как фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний – что нового? / Ю. В. Жернакова // Мед. алфавит. – 2020. – № 13. – С. 5–11.
14. Lin, K. C. The interaction between uric acid level and other risk factors on the development of gout among asymptomatic hyperuricemic men in a prospective study / K. C. Lin, H. Y. Lin, P. Chou // J. Rheumatol. – 2000. – Vol. 27, N 6. – P. 1501–1505.
15. Hyperuricemia and incident hypertension: a systematic review and meta-analysis / P. C. Grayson [et al.] // Arthritis Care Res. (Hoboken). – 2011. – Vol. 63, N 1. – P. 102–110. <https://doi.org/10.1002/acr.20344>
16. Prognostic value of serum uric acid: new-onset in and out-of-office hypertension and long-term mortality / M. Bombelli [et al.] // J. Hypertens. – 2014. – Vol. 32, N 6. – P. 1237–1244. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000000161>
17. Asymptomatic hyperuricemia and coronary artery disease in elderly patients without comorbidities / J. Wu [et al.] // Oncotarget. – 2017. – Vol. 8, N 46. – P. 80688–80699. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21079>
18. Relation between serum uric acid and risk of cardiovascular disease in essential hypertension. The PIUMA study / P. Verdecchia [et al.] // Hypertension. – 2000. – Vol. 36, N 6. – P. 1072–1078. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.36.6.1072>
19. Prognostic value of hyperuricemia in patients with acute coronary syndrome: A meta-analysis / C. He [et al.] // Eur. J. Clin. Invest. – 2019. – Vol. 49, N 4. – P. e13074. <https://doi.org/10.1111/eci.13074>
20. The relationship between serum uric acid and ejection fraction of the left ventricle / I. Vlad-Sabin [et al.] // J. Clin. Med. – 2021. – Vol. 10, N 17. – Art. 4026. <https://doi.org/10.3390/jcm10174026>
21. The prognostic value of serum uric acid in hospitalized patients with acute cerebral infarction / B. Liu [et al.] // Dis. Markers. – 2021. – Vol. 2021. – Art. 6103961. <https://doi.org/10.1155/2021/6103961>
22. The key role of uric acid in oxidative stress, inflammation, fibrosis, apoptosis, and immunity in the pathogenesis of atrial fibrillation / Y. Deng [et al.] // Front Cardiovasc. Med. – 2021. – Vol. 8. – Art. 641136. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.641136>
23. Мазуров, В. И. Влияние бессимптомной гиперурикемии на коморбидные заболевания и возможности ее коррекции / В. И. Мазуров // ПМЖ. – 2021. – № 7. – С. 24–30.
24. Genome-wide association study of clinically defined gout identifies multiple risk loci and its association with clinical subtypes / H. Matsuo [et al.] // Ann. Rheum. Dis. – 2016. – Vol. 75, N 4. – P. 652–659. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-206191>
25. *SLC2A9* is a newly identified urate transporter influencing serum urate concentration, urate excretion and gout / V. Vitart [et al.] // Nat. Genet. – 2008. – Vol. 40, N 4. – P. 437–442. <https://doi.org/10.1038/ng.106>
26. An intron variant of *SLC2A9* increases the risk for type 2 diabetes mellitus complicated with hyperuricemia in Chinese male population / X.-L. Yi [et al.] // Iran J. Publ. Health. – 2018. – Vol. 47, N 6. – P. 844–851.
27. Association of a polymorphism in a gene encoding a urate transporter with CKD progression / A. Testa [et al.] // Clin. J. Am. Soc. Nephrol. – 2014. – Vol. 9, N 6. – P. 1059–1065. <https://doi.org/10.2215/CJN.11041013>
28. Genotype-based changes in serum uric acid affect blood pressure / A. Parsa [et al.] // Kidney Int. – 2012. – Vol. 81, N 5. – P. 502–507. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.414>

29. A polymorphism in the major gene regulating serum uric acid associates with clinic SBP and the white-coat effect in a family-based study / F. Mallamaci [et al.] // *J. Hypertens.* – 2014. – Vol. 32, N 8. – P. 1621–1628. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000000224>

30. A genetic marker of uric acid level, carotid atherosclerosis, and arterial stiffness: A family-based study / F. Mallamaci [et al.] // *Am. J. Kidney Dis.* – 2015. – Vol. 65, N 2. – P. 294–302. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2014.07.021>

References

1. Khidirova L., Yakhontov D., Zenin S., Maksimov V. Genetic markers of atrial fibrillation in patients with hypertension in combination with non-cardiac diseases. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya* [Circulation pathology and cardiac surgery], 2019, vol. 23, no. 1, pp. 83–85 (in Russian).

2. Katritsis D. G., Boriani G., Cosio F. G., Hindricks G., Jais P., Josephson M. E. [et al.]. European Heart Rhythm Association (EHRA) consensus document on the management of supraventricular arrhythmias, endorsed by Heart Rhythm Society (HRS), Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHRS), and Sociedad Latinoamericana de Estimulación Cardíaca y Electrofisiología (SOLAECE). *European Heart Journal*, 2018, vol. 39, no. 16, pp. 1442–1445. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw455>

3. Borghi C., Rosei E. A., Bardin T., Dawson J., Dominiczak A., Kielstein J. T., Manolis A. J., Perez-Ruiz F., Mancia G. Serum uric acid and the risk of cardiovascular and renal disease. *Journal of Hypertension*, 2015, vol. 33, no. 9, pp. 1729–1741. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000000701>

4. Kobalava Zh. D., Troitskaya E. A. Asymptomatic hyperuricemia and risk of cardiovascular and renal diseases. *Kardiologiya* [Cardiology], 2020, vol. 60, no. 10, pp. 113–121 (in Russian).

5. Williams B., Mancia G., Spiering W., Agabiti Rosei E., Azizi M., Burnier M. [et al.]. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *European Heart Journal*, 2018, vol. 39, no. 33, pp. 3021–3104. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy339>

6. Kobalava Zh. D., Konradi A. O., Nedogoda S. V., Shlyakhto E. V., Arutyunov G. P., Baranova E. I. [et al.]. Arterial hypertension in adults. Clinical guidelines 2020. *Rossiiskii kardiologicheskii zhurnal* [Russian journal of cardiology], 2020, vol. 25, no. 3, pp. 149–218 (in Russian).

7. Fadeeva A. A., Pristupa L. N., Pogorelova O. S., Kirichenko N. N., Dudchenko I. A. The role of *SLC2A9*, *ABCG2* gene polymorphism in the occurrence of hyperuricemia and gout. *Georgian Medical News*, 2016, vol. 252, no. 3, pp. 79–83 (in Russian).

8. Reginato A. M., Mount D. B., Yang I., Choi H. K. The genetics of hyperuricaemia and gout. *Nature Reviews Rheumatology*, 2012, vol. 8, no. 10, pp. 610–621. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.144>

9. Wallace C., Newhouse S. J., Braund P., Zhang F., Tobin M., Falchi M. [et al.]. Genome-wide association study identifies genes for biomarkers of cardiovascular disease: serum urate and dyslipidemia. *American Journal of Human Genetics*, 2008, vol. 82, no. 1, pp. 139–149. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.11.001>

10. Sull J. W., Park E. J., Lee M., Jee S. H. Effects of *SLC2A9* variants on uric acid levels in a Korean population. *Rheumatology International*, 2013, vol. 33, no. 1, pp. 19–23. <https://doi.org/10.1007/s00296-011-2303-2>

11. Barysenka T. L., Snezhitskiy V. A. The role of hyperuricemia in the development of atrial fibrillation. *Cardiac Arrhythmias*, 2021, vol. 1, no. 1, pp. 7–16.

12. Liu B., Wang T., Zhao H. N., Yue W. W., Yu H. P., Liu C. X., Yin J., Jia R. Y., Nie H. W. The prevalence of hyperuricemia in China: a meta-analysis. *BMC Public Health*, 2011, vol. 11, art. 832. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-11-832>

13. Zhernakova Yu. V. Hyperuricemia as a risk factor for cardiovascular disease – what’s new? *Meditinskii alfavit* [Medical alphabet], 2020, no. 13, pp. 5–11 (in Russian).

14. Lin K. C., Lin H. Y., Chou P. The interaction between uric acid level and other risk factors on the development of gout among asymptomatic hyperuricemic men in a prospective study. *Journal of Rheumatology*, 2000, vol. 27, no. 6, pp. 1501–1505.

15. Grayson P. C., Kim S. Y., LaValley M., Choi H. K. Hyperuricemia and incident hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Care and Research (Hoboken)*, 2011, vol. 63, no. 1, pp. 102–110. <https://doi.org/10.1002/acr.20344>

16. Bombelli M., Ronchi I., Volpe M., Facchetti R., Carugo S., Dell’oro R., Cuspidi C., Grassi G., Mancia G. Prognostic value of serum uric acid: new-onset in and out-of-office hypertension and long-term mortality. *Journal of Hypertension*, 2014, vol. 32, no. 6, pp. 1237–1244. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000000161>

17. Wu J., Lei G., Wang X., Tang Y., Cheng H., Jian G., Wu X., Wang N. Asymptomatic hyperuricemia and coronary artery disease in elderly patients without comorbidities. *Oncotarget*, 2017, vol. 8, no. 46, pp. 80688–80699. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21079>

18. Verdecchia P., Schillaci G., Reboldi G., Santeusano F., Porcellati C., Brunetti P. Relation between serum uric acid and risk of cardiovascular disease in essential hypertension. The PIUMA study. *Journal of Hypertension*, 2000, vol. 36, no. 6, pp. 1072–1078. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.36.6.1072>

19. He C., Lin P., Liu W., Fang K. Prognostic value of hyperuricemia in patients with acute coronary syndrome: a meta-analysis. *European Journal of Clinical Investigation*, 2019, vol. 49, no. 4, p. e13074. <https://doi.org/10.1111/eci.13074>

20. Vlad-Sabin I., Roxana B., Adina-Flavia C. M., Paul C., Melania A., Daniel G., Llie R. C., Romulus T., Daniel L. The relationship between serum uric acid and ejection fraction of the left ventricle. *Journal of Clinical Medicine*, 2021, vol. 10, no. 17, art. 4026. <https://doi.org/10.3390/jcm10174026>

21. Liu B., Pan Y., Cao L., Yang J. The prognostic value of serum uric acid in hospitalized patients with acute cerebral infarction. *Disease Markers*, 2021, vol. 2021, art. 6103961. <https://doi.org/10.1155/2021/6103961>

22. Deng Y., Liu F., Yang X., Xia Y. The key role of uric acid in oxidative stress, inflammation, fibrosis, apoptosis, and immunity in the pathogenesis of atrial fibrillation. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 2021, vol. 8, art. 641136. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.641136>

23. Mazurov V. I., Bashkinov R. A., Gaidukova I. Z., Fonturenko A. Yu. The effect of asymptomatic hyperuricemia on comorbidities and the possibility of its correction. *Russkii meditsinskii zhurnal* [Russian medical journal], 2021, no. 7, pp. 24–30 (in Russian).

24. Matsuo H., Yamamoto K., Nakaoka H., Nakayama A., Sakiyama M., Chiba T. [et al.]. Genome-wide association study of clinically defined gout identifies multiple risk loci and its association with clinical subtypes. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2016, vol. 75, no. 4, pp. 652–659. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-206191>

25. Vitart V., Rudan I., Hayward C., Gray N. K., Floyd J., Palmer C. N. A. [et al.]. SLC2A9 is a newly identified urate transporter influencing serum urate concentration, urate excretion and gout. *Nature Genetics*, 2008, vol. 40, no. 4, pp. 437–442. <https://doi.org/10.1038/ng.106>

26. Yi X.-L., Li J., Meng D.-M., Liu Y.-J., Liu Y.-H., Ma H.-M., Yuan Yi, Xing S.-C. An intron variant of SLC2A9 increases the risk for type 2 diabetes mellitus complicated with hyperuricemia in Chinese male population. *Iranian Journal of Public Health*, 2018, vol. 47, no. 6, pp. 844–851.

27. Testa A., Mallamaci F., Spoto B., Pisano A., Sanguedolce M. C., Tripepi G., Leonardis D., Zoccali C. Association of a polymorphism in a gene encoding a urate transporter with CKD progression. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2014, vol. 9, no. 6, pp. 1059–1065. <https://doi.org/10.2215/CJN.11041013>

28. Parsa A., Brown E., Weir M. R., Fink J. C., Shuldiner A. R., Mitchell B. D., McArdle P. F. Genotype-based changes in serum uric acid affect blood pressure. *Kidney International*, 2012, vol. 81, no. 5, pp. 502–507. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.414>

29. Mallamaci F., Testa A., Leonardis D., Tripepi R., Pisano A., Spoto B., Sanguedolce M. C., Parlongo R. M., Tripepi G., Zoccali C. A polymorphism in the major gene regulating serum uric acid associates with clinic SBP and the white-coat effect in a family-based study. *Journal of Hypertension*, 2014, vol. 32, no. 8, pp. 1621–1628. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000000224>

30. Mallamaci F., Testa A., Leonardis D., Tripepi R., Pisano A., Spoto B., Sanguedolce M. C., Parlongo R. M., Tripepi G., Zoccali C. A. Genetic marker of uric acid level, carotid atherosclerosis, and arterial stiffness: A family-based study. *American Journal of Kidney Diseases*, 2015, vol. 65, no. 2, pp. 294–302. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2014.07.021>

Информация об авторах

Борисенко Татьяна Леоновна – ассистент. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230015, г. Гродно, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0001-7117-2182>. E-mail: t.kepourko@gmail.com

Снежицкий Виктор Александрович – член-корреспондент, д-р мед. наук, профессор. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230015, г. Гродно, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-1706-1243>. E-mail: vsnezh@grsmu.by

Курбат Михаил Николаевич – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230015, г. Гродно, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0001-9939-8749>. E-mail: vwmisha@mail.ru

Горчакова Ольга Владимировна – ст. науч. сотрудник. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230015, г. Гродно, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0001-7732-7587>. E-mail: daniil_go@inbox.ru

Копыцкий Андрей Витальевич – ст. преподаватель. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230015, г. Гродно, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-1862-4300>. E-mail: Andrey_cop@mail.ru

Information about the authors

Tatyana L. Barysenka – Assistant. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0001-7117-2182>. E-mail: t.kepourko@gmail.com

Viktor A. Snezhitskiy – Corresponding Member, D. Sc. (Med.), Professor. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0002-1706-1243>. E-mail: vsnezh@grsmu.by

Mikhail N. Kurbat – Ph. D. (Med.), Associate Professor, Leading Researcher. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0001-9939-8749>. E-mail: vwmisha@mail.ru

Olga V. Gorchakova – Senior Researcher. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0001-7732-7587>. E-mail: daniil_go@inbox.ru

Andrey V. Kopytsky – Senior Lecturer. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0002-1862-4300>. E-mail: Andrey_cop@mail.ru

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 577.112.3: 546.47/611.018.54

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-1-43-52>

Поступила в редакцию 11.11.2022

Received 11.11.2022

В. М. Шейбак, А. Ю. Павлюковец, Е. М. Дорошенко*Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Республика Беларусь*

ТРИПТОФАН И ЦИНК: ВЛИЯНИЕ СОВМЕСТНОГО ВВЕДЕНИЯ НА ГОМЕОСТАЗ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ ПЛАЗМЫ

Аннотация. Одна из основных гидрофобных аминокислот – триптофан и незаменимый микроэлемент цинк выполняют в организме млекопитающих многочисленные и во многом перекрывающиеся функции. Огромное количество цинксодержащих соединений (белки, ферменты, факторы транскрипции и гормоны) взаимодействуют с метаболитами триптофана. Нами предпринята попытка выявить основные эффекты аминокислоты и микроэлемента на показатели метаболизма аминокислот с целью определения общих механизмов и целесообразности их возможного терапевтического использования.

Нами обнаружено, что при курсовом введении триптофана в дозе 40 мг/кг в плазме крови снижается общее количество АРУЦ и повышается концентрация свободного триптофана. У животных, получавших цинка диаспартат или цинка диаспартат совместно с триптофаном, снижалось общее количество аминокислот и их азотсодержащих метаболитов в плазме крови. Анализ индивидуальных концентраций аминокислот и их азотсодержащих метаболитов показал, что совместное введение триптофана и цинка диаспартата сопровождается статистически значимыми изменениями концентраций большинства изучаемых показателей аминокислотного пула (19 из 35 показателей). Следует отметить однонаправленность изменений содержания свободных аминокислот и их азотсодержащих метаболитов в группах животных, получавших цинка диаспартат или цинка диаспартат совместно с триптофаном (совпадение эффектов составляет 90 %).

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что курсовое введение цинка диаспартата в дозе 25 мг/кг массы (в 2 раза превышает среднюю терапевтическую дозу) оказывает выраженный метаболический эффект, характеризующийся изменениями концентраций свободных аминокислот и их азотсодержащих метаболитов в плазме крови. Курсовое введение триптофана в дозе 40 мг/кг массы (1/2 терапевтической дозы) не оказывает существенного влияния на показатели аминокислотного пула плазмы крови. При совместном введении цинка диаспартата и триптофана в указанных дозах выявленные изменения в большей степени можно отнести к эффектам цинка диаспартата.

Ключевые слова: триптофан, цинка диаспартат, свободные аминокислоты и их азотсодержащие производные, плазма крови

Для цитирования: Шейбак, В. М. Триптофан и цинк: влияние совместного введения на гомеостаз свободных аминокислот плазмы / В. М. Шейбак, А. Ю. Павлюковец, Е. М. Дорошенко // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2024. – Т. 21, № 1. – С. 43–52. <https://doi.org/10.29235/1814-6024-2024-21-1-43-52>

Vladimir M. Sheybak, Anastasia Yu. Pavlyukovets, Evgeniy M. Doroshenko*Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus*

TRYPHOPHAN AND ZINC: EFFECT OF CO-ADMINISTRATION ON PLASMA FREE AMINO ACID HOMEOSTASIS

Abstract. One of the main hydrophobic amino acids – tryptophan and essential trace element zinc perform numerous and largely overlapping functions in the mammalian body. A huge number of zinc-containing compounds – proteins, enzymes, transcription factors, and hormones interact with tryptophan metabolites. We have attempted to identify the main effects of amino acids and trace elements on amino acid metabolism in order to determine the general mechanisms and the feasibility of their possible therapeutic use.

We have found that the course administration of tryptophan at a dose of 40 mg/kg in blood plasma reduces the total amount of ARUC and increases the concentration of free tryptophan. In animals treated with zinc diaspertate or zinc diaspertate together with tryptophan, the total amount of amino acids and their nitrogen-containing metabolites in blood plasma decreases. The analysis of individual concentrations of amino acids and their nitrogen-containing metabolites showed that the co-administration of tryptophan and zinc diaspertate is accompanied by statistically significant changes in the concentrations of most of the studied parameters of the amino acid pool (19 out of 35 parameters). It should be noted that the changes in the content of free amino acids and their nitrogen-containing metabolites are unidirectional in the groups of animals treated with zinc diaspertate or zinc diaspertate together with tryptophan (coincidence of effects is 90 %).

Thus, our studies showed that the course administration of zinc diaspартate at a dose of 25 mg/kg (2 times higher than an average therapeutic dose) has a pronounced metabolic effect, characterized by changes in the concentrations of free amino acids and their nitrogen-containing metabolites in blood plasma. The course administration of tryptophan at a dose of 40 mg/kg of body weight (1/2 of a therapeutic dose) has no significant effect on the parameters of the blood plasma aminogram. With the co-administration of zinc diaspартate and tryptophan in the above doses, the revealed changes can be more attributed to the effects of zinc diaspартate.

Keywords: tryptophan, zinc diaspартate, free amino acids and their nitrogen-containing derivatives, blood plasma

For citation: Sheybak V. M., Pavlyukovets A. Yu., Doroshenko E. M. Tryptophan and zinc: effect of co-administration on plasma free amino acid homeostasis. *Vesti Natsyunal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2024, vol. 21, no. 1, pp. 43–52 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-1-43-52>

Введение. Одна из основных гидрофобных аминокислот – триптофан и эссенциальный микроэлемент цинк выполняют в организме млекопитающих многочисленные функции. Огромное количество цинксодержащих соединений (белки, ферменты, факторы транскрипции и гормоны) неизбежно взаимодействуют с метаболитами триптофана. Нами предпринята попытка суммировать основные эффекты аминокислоты и микроэлемента (рис. 1) с целью определения общих механизмов действия и целесообразности их возможного терапевтического использования.

Помимо участия в синтезе белков (в молекулах белка содержится в среднем 1–2 % триптофана), триптофан используется главным образом для синтеза биологически активных производных кинуренина и серотонина (мелатонин, никотинамид и производные индола) [1]. В свою очередь, Zn^{2+} – структурный и функциональный компонент огромного количества белков, в том числе всех шести классов ферментов, сигнальных молекул и факторов транскрипции. Подобно Ca^{2+} , катионы цинка участвуют в межбелковых взаимодействиях. Структурные домены, связывающие нуклеиновые кислоты («цинковые пальцы») – неотъемлемый компонент факторов транскрипции. Известно, что цинк-фингерные белки выполняют различные биологические функции в организме человека, участвуя в процессе дифференцировки, метаболизма, транскрипционной регуляции, а также посттранскрипционной модификации, активации и деградации белков.



Рис. 1. Биологические эффекты триптофана и цинка на организм. «+» – стимулирующий эффект; «+/-» – в различных условиях оказывает стимулирующий или подавляющий эффект, «?» – информация отсутствует

Fig. 1. Biological effects of tryptophan and zinc on the body. “+” – stimulating effect; “+/-” – under various conditions, it has a stimulating or inhibitory effect, “?” – no information

Zn^{2+} может модулировать эффективность передачи клеточных сигналов, метаболизм вторичных мессенджеров, активность протеинкиназ и протеинфосфатаз [2]. Цинк-фингерные белки ZFP36 и ZFP36L1 стабилизируют РНК и играют ключевую роль в регуляции пролиферации, дифференцировки и апоптоза. Ингибирование экспрессии ZFP36 и ZFP36L1 в культивируемых кератиноцитах вызывало апоптоз и остановку клеточного цикла в фазе G2/M [3].

Уникальная структура триптофана позволяет этому соединению выполнять широчайший спектр функций и образовывать самые различные по своим физико-химическим свойствам соединения. В кишечнике триптофан повышает экспрессию белков плотных контактов и, следовательно, способствует усилению барьерной функции слизистой оболочки [4]. Показано, что в культуре ткани коры головного мозга добавление кинуренина, основного метаболита кинуренинового пути деградации триптофана, стимулирует пролиферацию клеток [5]. Экспрессия триптофан-катаболизирующего фермента индоламин-2,3-диоксигеназы в макрофагах под воздействием макрофагального колониестимулирующего фактора приводит к подавлению пролиферации Т-лимфоцитов. Ингибирование клеточной пролиферации, индуцированное катаболитами триптофана, избирательно и распространяется только на активированные клетки, тогда как покоящиеся клетки не затрагиваются и впоследствии могут активироваться иными факторами [6].

Введение триптофана, как и некоторых других аминокислот (например, аргинина), повышает уровни пролактина и соматотропного гормона (СТГ) [7]. В этой связи важно отметить, что в клетках гипофиза содержится больше Zn^{2+} , чем в других отделах мозга, и дефицит Zn^{2+} вызывает нарушение секреции СТГ. Кроме того, СТГ содержит сайт связывания Zn^{2+} и при концентрациях Zn^{2+} выше микромолярных. Это способствует образованию димера СТГ, который менее подвержен деградации. Сродство к рецепторам димеризованного СТГ ниже, что может предотвращать ассоциацию СТГ с клеточными рецепторами в головном мозге и усиливать его взаимодействие с периферическими рецепторами [8].

Внутривенное введение триптофана пациентам снижает уровень глюкозы в сыворотке крови, ингибируя всасывание глюкозы в кишечнике и увеличивая чувствительность клеток к инсулину [9]. Логично, что добавки триптофана замедляют прогрессирование сахарного диабета у крыс. Добавки цинка при преддиабете снижают не только уровень глюкозы в крови, но и резистентность к инсулину и подавляют прогрессирование этой патологии [10].

Кинуренин обладает как прооксидантными, так и антиоксидантными свойствами, что потенциально может способствовать генерации или связыванию активных форм кислорода (АФК). Так, образование метаболитов триптофана – хинонов и 3-гидроксиантракиноновой кислоты – способствует генерации свободных радикалов [11], тогда как его конечный метаболит мелатонин обладает антиоксидантными свойствами и подавляет окислительный стресс [12]. В свою очередь, Zn^{2+} ингибирует выработку АФК, таких как супероксиданион, перекись водорода (H_2O_2) и гидроксильный радикал ($OH\cdot$), а также активных форм азота, включая пероксинитрит [13]. Антиоксидантный эффект Zn^{2+} может быть опосредован его прямым действием или структурной ролью в антиоксидантных белках. Непосредственная антиоксидантная активность Zn^{2+} обусловлена его связыванием с тиоловыми группами, что защищает их от окисления [14]. Одновременно Zn^{2+} является кофактором супероксиддисмутазы, а также косвенно может влиять на активность других антиоксидантных ферментов. Однако при высоких внутриклеточных концентрациях Zn^{2+} могут проявляться его прооксидантные свойства. Наночастицы ZnO дозозависимо усиливают окислительный стресс в адипоцитах 3T3-L1, увеличивая при этом экспрессию антиоксидантных ферментов [15].

Триптофан относится к классу соединений-иммуномодуляторов. Курсовое введение триптофана значительно повышает фагоцитарную активность, а также уменьшает содержание продуктов свободнорадикального окисления в перитонеальных макрофагах [16]. Введение 5-гидрокси-триптофана стимулирует пролиферацию Т-лимфоцитов, поддерживает активацию натуральных киллеров [17]. Более 100 цинксодержащих белков можно отнести к компонентам иммунной системы. Очевидно, что следствием дефицита Zn^{2+} является атрофия тимуса, лимфопения, нарушение функциональной активности фагоцитов (снижение их внутриклеточной киллерной активности)

и продукция цитокинов макрофагами, снижение пролиферативной активности Т- и В-лимфоцитов и секреции антител [18].

Дисбаланс в синтезе метаболитов триптофана приводит к нарушениям ЦНС, которые проявляются неврологическими и психическими расстройствами. В частности, у лиц, страдающих депрессией, отмечали низкий уровень триптофана в плазме крови [19]. Серотонин является основным нейротрансмиттером, участвующим в контроле многочисленных функций ЦНС, включая настроение, агрессию, боль, тревогу, сон, память, пищевое поведение, аддиктивное поведение и терморегуляцию, и его синтез зависит от обеспеченности триптофаном. Zn^{2+} модулирует эффекты серотонина на уровне рецепторов посредством специфических Zn^{2+} -зависимых взаимодействий, сопряженных с G-белками [20].

Показано, что метаболит триптофана кинуренин является вазоактивным метаболитом, активируя ГМФ-зависимую дилатацию гладкомышечных клеток [21]. В свою очередь, Zn^{2+} необходим для димеризации эндотелиальной синтазы оксида азота, ее стимуляции и последующего образования NO, что дополнительно способствует быстрой мобилизации эндотелиальных пулов Zn^{2+} . NO регулирует степень сокращения гладкомышечных клеток сосудов также путем стимуляции растворимой гуанилатциклазы с образованием циклического гуанозинмонофосфата [22].

Поскольку триптофан является незаменимой аминокислотой и должен поступать в организм с пищей, важно отметить, что микробные метаболиты триптофана влияют на моторику кишечника. Например, триптамин уменьшает время транзита и, стимулируя кишечную секрецию, индуцирует высвобождение серотонина кишечными нейронами, индолы действуют как лиганды рецептора ароматических углеводородов (AhR) [23]. Напротив, введение цинка сульфата снижает частоту актов дефекации и моторику кишечника при диарее за счет активации β -адренорецепторов и Ca^{2+} -каналов L-типа [24].

Цель исследования – анализ эффектов совместного введения триптофана и цинка (в форме цинка диаспартата) на основе определения концентраций свободных аминокислот и их азотсодержащих метаболитов (35 показателей) в плазме крови крыс.

Материалы и методы исследования. Эксперимент проведен на крысах линии Вистар массой 120–140 г, имевших свободный доступ к пище и воде. Животным внутрижелудочно в течение 10 дней вводили: 1-я группа (контрольная, $n = 10$) получала физраствор; 2-я группа ($n = 10$) – триптофан в дозе 40 мг/кг массы, применяемая доза триптофана составляет 44 % от рекомендуемой терапевтической дозы (для человека средняя суточная доза составляет 15 мг/кг, для лабораторных крыс – 90 мг/кг (рассчитывается по следующей формуле: суточная доза для человека $\times 6$, где 6 – это стандартизованный коэффициент пересчета для лабораторных крыс, выведенный с учетом разности в скорости метаболических реакций) [25]; 3-я группа ($n = 10$) – цинка диаспартат в дозе 25 мг/кг массы (в пересчете на ионы цинка 4,9 мг/кг), что в 2 раза превышает среднюю терапевтическую дозу (для человека средняя терапевтическая доза цинка диаспартата составляет 2 мг/кг, для лабораторной крысы – 12 мг/кг), побочных эффектов введения животным цинка диаспартата в дозе, превышающей среднюю терапевтическую (в 2 раза), не развивалось; 4-я группа ($n = 10$) – триптофан в дозе 40 мг/кг массы и цинка диаспартат в дозе 25 мг/кг массы. Декапитацию животных осуществляли через 24 ч после последнего введения. Все опыты проведены с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» и согласованы с комитетом по биоэтике УО «ГрГМУ» (протокол № 1 от 23 января 2020 г.).

В образцах плазмы крови определяли уровни свободных аминокислот и их азотсодержащих производных методом обращеннофазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с о-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой, с изократическим элюированием и детектированием по флуоресценции (231/445 нм). Содержание ароматических аминокислот (тирозина и триптофана) оценивали методом ион-парной ВЭЖХ с детектированием по природной флуоресценции (280/320 нм для тирозина и 280/340 нм для триптофана). Все определения проводили на хроматографической системе Agilent 1100, прием и обработку данных – с помощью программы Agilent ChemStation A10.01. Математическую обработку полученных данных проводили с помощью программы Statistica 10.0. Распределение исследуемых показателей проверяли по критерию Шапиро–Уилка. Данные представляли в виде среднего \pm стандартная

ошибка среднего ($M \pm SEM$), а статистическую значимость отличий – на основании t -критерия Стьюдента. Данные считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Анализ полученных нами результатов показал, что курсовое введение как цинка диаспартата, так и цинка диаспартата совместно с триптофаном статистически значимо снижало общее количество свободных аминокислот и их азотсодержащих производных (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Структура аминокислотного пула плазмы крови крыс, получавших внутривентрикулярно триптофан (40 мг/кг массы) и цинка диаспартат (25 мг/кг массы), мкмоль/л ($M \pm m$)

Table 1. Structure of the amino acid pool of the blood plasma of rats treated intragastrically with tryptophan (40 mg/kg) and zinc diaspertate (25 mg/kg), $\mu\text{mol/l}$ ($M \pm m$)

Исследуемый показатель	Контроль	Триптофан	Триптофан + цинк	Цинк
Общее количество аминокислот и их азотсодержащих производных	9370 \pm 312	8876 \pm 178	7890 \pm 157*	7360 \pm 215*
Общее количество протеиногенных аминокислот	8536 \pm 292	8027 \pm 163	7102 \pm 138*	6638 \pm 194*
Общее количество азотсодержащих производных аминокислот	834 \pm 27	849 \pm 22	788 \pm 26	722 \pm 27*
Протеиногенные аминокислоты/азотсодержащие производные аминокислоты	10,3 \pm 0,27	9,5 \pm 0,19*	9,1 \pm 0,22*	9,2 \pm 0,22*
Общее количество заменимых аминокислот	4897 \pm 159	4695 \pm 72	4137 \pm 94*	3778 \pm 89*
Общее количество незаменимых аминокислот	3640 \pm 145	3332 \pm 109	2965 \pm 70*	2860 \pm 134*
Заменимые аминокислоты/незаменимые аминокислоты	1,4 \pm 0,03	1,4 \pm 0,03	1,4 \pm 0,04	1,3 \pm 0,05
Общее количество АРУЦ	878 \pm 28	772 \pm 30*	672 \pm 31*	661 \pm 25*
АРУЦ/ароматические аминокислоты	2,3 \pm 0,08	1,8 \pm 0,06*	1,6 \pm 0,09*	1,7 \pm 0,06*
Общее количество серосодержащих аминокислот	561 \pm 22	587 \pm 16	513 \pm 21	470 \pm 21*
Аргинин/орнитин	4,25 \pm 0,234	4,59 \pm 0,234	3,16 \pm 0,402*	3,59 \pm 0,257
Аргинин/цитруллин	2,31 \pm 0,067	2,25 \pm 0,077	1,91 \pm 0,154*	1,79 \pm 0,057*
Глутамат + глутамин	2046 \pm 70	1927 \pm 40	1713 \pm 35*	1566 \pm 55*
Глутамат/глутамин	0,39 \pm 0,022	0,39 \pm 0,01	0,33 \pm 0,013*	0,33 \pm 0,014*

Пр и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2: * – статистически значимо относительно контрольной группы.

Среди индивидуальных показателей аминокрамы в этих опытных группах введение цинка диаспартата или цинка диаспартата совместно с триптофаном статистически значимо снижало содержание заменимых аминокислот: аспартата – на 34 и 20 %, глутамата – на 33 и 25, аспарагина – на 27 и 18, серина – на 30 и 22, глутамина – на 20 и 13, гистидина – на 20 и 15, глицина – на 21 и 14, аланина – на 21 и 14 % (табл. 2). Заменимые аминокислоты постоянно синтезируются в клетках организма, а их уровни в плазме крови поддерживаются межорганным переносом азота, функционированием цикла трикарбоновых кислот и реакциями гликолиза. Обеднение пула заменимых аминокислот плазмы крови может быть обусловлено повышением их транспорта в клетки и анаплеротической функцией при дефиците углеводов.

Т а б л и ц а 2. Концентрации свободных аминокислот и их азотсодержащих метаболитов в плазме крови крыс, получавших внутривентрикулярно триптофан (40 мг/кг массы) и цинка диаспартат (25 мг/кг массы), мкмоль/л ($M \pm m$)

Table 2. Concentrations of free amino acids and their nitrogen-containing metabolites in the blood plasma of rats treated intragastrically with tryptophan (40 mg/kg) and zinc diaspertate (25 mg/kg), $\mu\text{mol/l}$ ($M \pm m$)

Исследуемый показатель	Контроль	Триптофан	Триптофан + цинк	Цинк
Аспартат	167 \pm 9,3	155 \pm 4,5	133 \pm 10,9*	110 \pm 3,7*
Глутамат	570 \pm 35,4	540 \pm 11,6	427 \pm 20,3*	383 \pm 15,9*
Аспарагин	132 \pm 4,2	126 \pm 4,2	108 \pm 3,6*	97 \pm 2,8*

Исследуемый показатель	Контроль	Триптофан	Триптофан + цинк	Цинк
Серин	539 ± 28,2	481 ± 8,5	421 ± 12,3*	378 ± 11,7*
α-Аминоадипиновая кислота	2,6 ± 0,29	2 ± 0,24	1,7 ± 0,18*	1,4 ± 0,14*
Глутамин	1476 ± 47	1387 ± 34,4	1286 ± 17,2*	1183 ± 46,7*
Гистидин	69 ± 1,6	66 ± 2,6	59 ± 2,4*	55 ± 1,9*
3-Метилгистидин	10 ± 0,4	10 ± 0,4	10 ± 0,5	9 ± 0,4*
Глицин	521 ± 15,2	522 ± 13,5	446 ± 17,4*	411 ± 21,4*
Фосфоэтанолламин	10 ± 2	7 ± 1,4	5 ± 0,6*	5 ± 0,5*
Треонин	600 ± 31	543 ± 31	510 ± 24*	442 ± 27*
1-Метилгистидин	3,2 ± 0,13	2,3 ± 0,15	2,2 ± 0,18*	2,1 ± 0,24*
Аргинин	316 ± 12	326 ± 9	289 ± 21	272 ± 9*
Аланин	1026 ± 49	997 ± 29	885 ± 33*	812 ± 19*
Таурин	472 ± 20,3	497 ± 15,6	426 ± 19,6	388 ± 20,6*
α-Аминомасляная кислота	58 ± 3,6	43 ± 4,8	23 ± 3,9*	27 ± 4,6*
Валин	349 ± 11	312 ± 12*	276 ± 12*	278 ± 11*
Метионин	87 ± 3	88 ± 2,6	85 ± 2,2	79 ± 2,4
Цистатионин	1,4 ± 0,1	1,6 ± 0,12	1,4 ± 0,22	1,6 ± 0,3
Триптофан	176 ± 10	210 ± 10*	230 ± 13*	222 ± 12*
Фенилаланин	134 ± 5	122 ± 4	112 ± 5*	101 ± 2*
Изолейцин	200 ± 6	177 ± 6*	154 ± 7*	148 ± 5*
Лейцин	328 ± 12	283 ± 13	242 ± 14*	235 ± 10*
Орнитин	76 ± 4	73 ± 4	102 ± 10*	79 ± 5
Лизин	1765 ± 97	1598 ± 61	1355 ± 50*	1356 ± 84*

Аминокислоты с разветвленной цепью (АРУЦ, валин, лейцин и изолейцин) – незаменимые аминокислоты, которые являются субстратами для биосинтеза белка, а также регуляторами белкового и энергетического обмена, предшественниками других аминокислот и выполняют важнейшие функции в клетках мозга [26]. Во всех экспериментальных группах, включая животных, получавших триптофан, в плазме крови снижалось общее количество АРУЦ (см. табл. 1), что может указывать на анаболические эффекты вводимых соединений [27].

Введение только цинка диаспартата или цинка диаспартата совместно с триптофаном статистически значимо снижало содержание незаменимых аминокислот: треонина – на 26 и 15 %, валина – на 20 и 21, фенилаланина – на 25 и 16, изолейцина – на 26 и 23, лейцина – на 28 и 26, лизина – на 23 и 23 %. Снижались концентрации азотсодержащих метаболитов аминокислот: α-аминоадипиновой кислоты – на 46 и 34,6 %, фосфоэтанолламина – на 50 и 50, 1-метилгистидина – на 34 и 31, α-аминомасляной кислоты – на 53 и 60 % (табл. 2). Снижение азотсодержащих метаболитов аминокислот может являться следствием подавления катаболизма аминокислот.

Основные различия влияния исследуемых соединений на спектр изучаемых показателей заключались в том, что если введение цинка диаспартата приводило к снижению в плазме крови концентраций аргинина (на 14 %), 3-метилгистидина (на 10 %) и таурина (на 18 %), то совместное введение цинка диаспартата и триптофана повышало концентрацию только орнитина (в 1,3 раза). Следует отметить, что во всех экспериментальных группах в плазме крови крыс повышался уровень триптофана (в 1,3 раза) (табл. 2).

Нами обнаружено, что при курсовом введении триптофана в дозе 40 мг/кг массы в плазме крови снижается общее количество АРУЦ и повышается концентрация этой свободной аминокислоты. В то же время у животных, получавших цинка диаспартат или цинка диаспартат совместно с триптофаном, снижалось общее количество аминокислот и их азотсодержащих метаболитов в плазме крови. Очевидно, что помимо изменения метаболизма отдельных аминокислот имеет место активация анаболических путей, затрагивающих не только стимуляцию биосинтеза

белка, но и липидный и углеводный обмен. Немаловажным фактором, влияющим на метаболические процессы, является поступление в организм существенных количеств цинка диаспартата в комбинации с аминокислотой, лимитирующей белковый синтез и образование большого числа коферментов и медиаторов триптофаном. Анализ индивидуальных концентраций аминокислот и их азотсодержащих метаболитов показал, что совместное введение триптофана и цинка диаспартата сопровождается статистически значимыми изменениями концентраций большинства изучаемых показателей аминокислотного пула (19 из 35 показателей). Следует отметить односторонность изменений содержания свободных аминокислот и их азотсодержащих метаболитов в группах животных, получавших цинка диаспартат или цинка диаспартат совместно с триптофаном (совпадение эффектов составило 90 %).

Диаграмма рассеяния канонических значений показала, что показатели групп «цинка диаспартат» и «цинка диаспартат + триптофан» локализованы примерно в одной области. Так, значение расстояния Махаланобиса между групповыми центроидами контроль–триптофан составляет 26, контроль–цинка диаспартат – 67, контроль–цинка диаспартат + триптофан – 63, цинка диаспартат – цинка диаспартат + триптофан – 36. Диаграмма рассеяния канонических значений визуализирует полученные от вводимых соединений эффекты на пул свободных аминокислот и их азотсодержащих метаболитов плазмы крови (рис. 2).

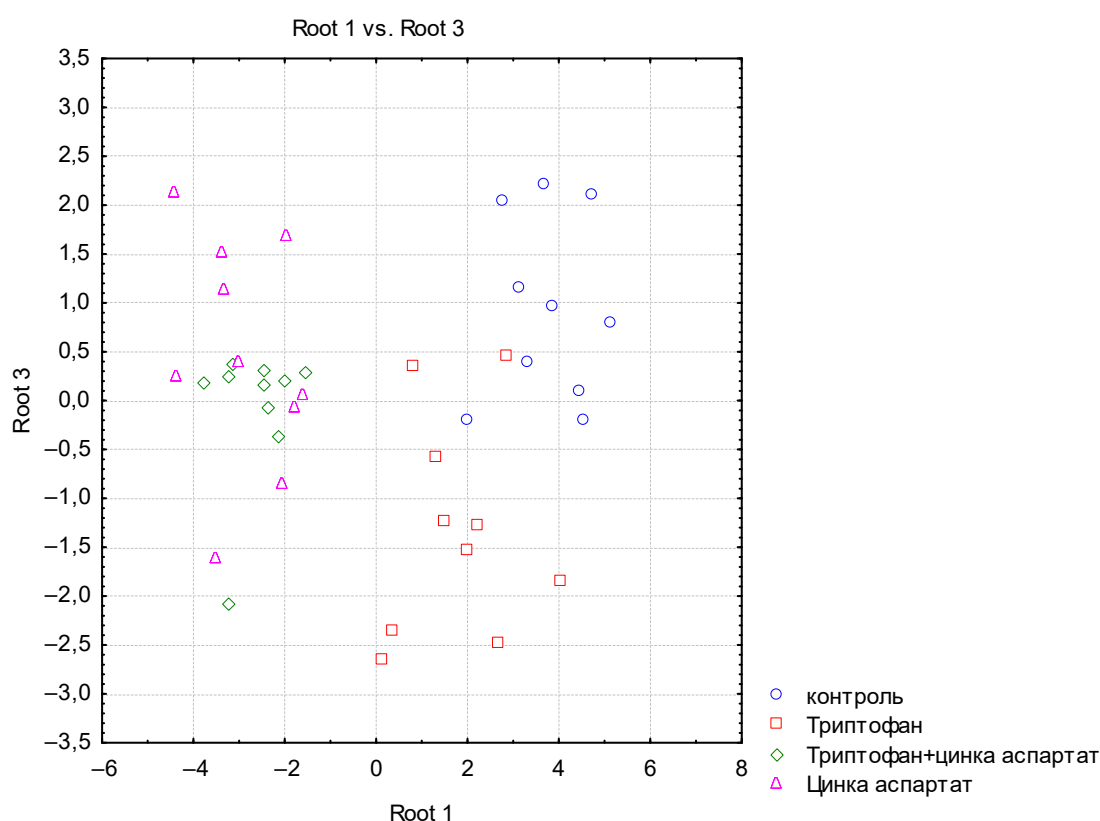


Рис. 2. Диаграмма рассеяния канонических значений для пар значений дискриминантных функций 1 и 3. При интегральной оценке метаболических эффектов курсового внутрижелудочного введения триптофана и цинка диаспартата в ткани печени значение лямбды Вилкса и соответствующий ему критерий Фишера (0,0073914 и 37,21032 соответственно) доказывают высокую степень дискриминации групп, а на основании классификационной матрицы можно сделать вывод о 100 %-ной корректности обучающих выборок для всех групп

Fig. 2. Scatter plot of the canonical values for pairs of values of discriminant functions 1 and 3. In an integral assessment of the metabolic effects of intragastric course administration of tryptophan and zinc diaspertate in the liver tissue, the Wilks lambda value and its corresponding Fisher criterion (0.0073914 and 37.21032, respectively) prove a high discrimination degree of groups. Based on the classification matrix, we can conclude that the training samples are 100 % correct for all groups

Заклучение. Таким образом, проведенные нами исследования показали, что курсовое введение цинка диаспартата в дозе 25 мг/кг массы оказывает выраженный метаболический эффект, проявляющийся существенными изменениями в спектре свободных аминокислот и их азотсодержащих метаболитов в плазме крови. Курсовое введение триптофана в дозе 40 мг/кг массы не оказывает существенного влияния на показатели аминокраммы плазмы крови. При совместном введении животным в вышеуказанных дозах цинка диаспартата и триптофана выявленные эффекты в большей степени можно отнести к воздействию цинка диаспартата.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Tryptophan biochemistry: structural, nutritional, metabolic, and medical aspects in humans / L. Palego [et al.] // *J. Amino Acids*. – 2016. – Vol. 2016. – Art. 8952520. <https://doi.org/10.1155/2016/8952520>
2. Zinc and its importance for human health: An integrative review / N. Roohani [et al.] // *J. Res. Med. Sci.* – 2013. – Vol. 18, N 2. – P. 144–157.
3. Makita, S. Post-transcriptional regulation of immune responses and inflammatory diseases by RNA-binding ZFP36 family proteins / S. Makita, H. Takatori, H. Nakajima // *Front Immunol.* – 2021. – Vol. 12. – Art. 711633. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.711633>
4. Tryptophan supplementation enhances intestinal health by improving gut barrier function, alleviating inflammation, and modulating intestinal microbiome in lipopolysaccharide-challenged piglets / G. Liu [et al.] // *Front Microbiol.* – 2022. – Vol. 13. – Art. 919431. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.919431>
5. Effect of tryptophan and kynurenine on cell proliferation in tissue culture of the cerebral cortex in young and old rats / N. I. Chalisova [et al.] // *Adv. Gerontol.* – 2019. – Vol. 9. – P. 186–189. <https://doi.org/10.1134/S2079057019020073>
6. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase / G. Frumento [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2002. – Vol. 196, N 4. – P. 459–468. <https://doi.org/10.1084/jem.20020121>
7. The effect of IV L-tryptophan on prolactin, growth hormone, and mood in healthy subjects / D. S. Charney [et al.] // *Psychopharmacology (Berl.)*. – 1982. – Vol. 78, N 1. – P. 38–43. <https://doi.org/10.1007/BF00470585>
8. Cunningham, B. C. Dimerization of human growth hormone by zinc / B. C. Cunningham, M. G. Mulkerrin, J. A. Wells // *Science*. – 1991. – Vol. 253, N 5019. – P. 545–548. <https://doi.org/10.1126/science.1907025>
9. Oxenkrug, G. Insulin resistance and dysregulation of tryptophan-kynurenine and kynurenine-nicotinamide adenine dinucleotide metabolic pathways / G. Oxenkrug // *Mol. Neurobiol.* – 2013. – Vol. 48, N 2. – P. 294–301. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8497-4>
10. The effect of zinc supplementation in pre-diabetes: A protocol for systematic review and meta-analysis / X. Du [et al.] // *Medicine (Baltimore)*. – 2019. – Vol. 98, N 27. – P. e16259. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000016259>
11. Tryptophan metabolism, inflammation, and oxidative stress in patients with neurovascular disease / M. Hajsl [et al.] // *Metabolites*. – 2020. – Vol. 10, N 5. – Art. 208. <https://doi.org/10.3390/metabo10050208>
12. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers / R. J. Reiter [et al.] // *J. Pineal Res.* – 2016. – Vol. 61, N 3. – P. 253–278. <https://doi.org/10.1111/jpi.12360>
13. Slepchenko, K. G. Cross talk between increased intracellular zinc (Zn²⁺) and accumulation of reactive oxygen species in chemical ischemia / K. G. Slepchenko, Q. Lu, Y. V. Li // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2017. – Vol. 313, N 4. – P. C448–C459. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00048.2017>
14. Hübner, C. Interactions of zinc- and redox-signaling pathways / C. Hübner, H. Haase // *Redox Biol.* – 2021. – Vol. 41. – Art. 101916. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101916>
15. Muthuraman, P. Analysis of dose-dependent effect of zinc oxide nanoparticles on the oxidative stress and antioxidant enzyme activity in adipocytes / P. Muthuraman, K. Ramkumar, D. H. Kim // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2014. – Vol. 174, N 8. – P. 2851–2863. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1231-5>
16. Tryptophan administration in rats enhances phagocytic function and reduces oxidative metabolism / S. Sanchez [et al.] // *Neuro Endocrinol. Lett.* – 2008. – Vol. 29, N 6. – P. 1026–1032.
17. León-Ponte, M. Serotonin provides an accessory signal to enhance T-cell activation by signaling through the 5-HT7 receptor / M. León-Ponte, G. P. Ahern, P. J. O'Connell // *Blood*. – 2007. – Vol. 109, N 8. – P. 3139–3146. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-052787>
18. Wessels, I. Zinc as a gatekeeper of immune function / I. Wessels, M. Maywald, L. Rink // *Nutrients*. – 2017. – Vol. 9, N 12. – Art. 1286. <https://doi.org/10.3390/nu9121286>
19. Lindseth, G. The effects of dietary tryptophan on affective disorders / G. Lindseth, B. Helland, J. Caspers // *Arch. Psychiatr. Nurs.* – 2015. – Vol. 29, N 2. – P. 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.apnu.2014.11.008>
20. Zinc is involved in depression by modulating G protein-coupled receptor heterodimerization / M. Tena-Campos [et al.] // *Mol. Neurobiol.* – 2016. – Vol. 53, N 3. – P. 2003–2015. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9153-y>
21. Kynurenine is an endothelium-derived relaxing factor produced during inflammation / Y. Wang [et al.] // *Nat. Med.* – 2010. – Vol. 16, N 3. – P. 279–285. <https://doi.org/10.1038/nm.2092>
22. Zinc regulates iNOS-derived nitric oxide formation in endothelial cells / M. M. Cortese-Krott [et al.] // *Redox Biol.* – 2014. – Vol. 16, N 2. – P. 945–954. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.06.011>

23. Gut microbiota-produced tryptamine activates an epithelial g-protein-coupled receptor to increase colonic secretion / Y. Bhattarai [et al.] // *Cell Host Microbe*. – 2018. – Vol. 23, N 6. – P. 775–785.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.004>
24. Effect of zinc treatment on intestinal motility in experimentally induced diarrhea in rats / O. S. Adeniyi [et al.] // *Niger J. Physiol. Sci.* – 2014. – Vol. 29, N 1. – P. 11–15.
25. Выбор дозы препарата для доклинического исследования: межвидовой перенос доз / Е. В. Шекунова [и др.] // *Ведомости Науч. центра экспертизы средств мед. применения. Регулятор. исслед. и экспертиза лекарств. средств.* – 2020. – Т. 10, № 1. – С. 19–28.
26. Neinast, M. Branched chain amino acids / M. Neinast, D. Murashige, Z. Arany // *Annu. Rev. Physiol.* – 2019. – Vol. 81. – P. 139–164. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114455>
27. Holeček, M. Branched-chain amino acids in health and disease: metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements / M. Holeček // *Nutr. Metab.* – 2018. – Vol. 15. – Art. 33. <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0271-1>

References

1. Palego L., Betti L., Rossi A., Giannaccini G. Tryptophan biochemistry: structural, nutritional, metabolic, and medical aspects in humans. *Journal of Amino Acids*, 2016, vol. 2016, art. 8952520. <https://doi.org/10.1155/2016/8952520>
2. Roohani N. R., Hurrell R., Kelishadi R., Schulin R. Zinc and its importance for human health: An integrative review. *Journal of Research in Medical Sciences*, 2013, vol. 18, no. 2, pp. 144–157.
3. Makita S., Takatori H., Nakajima H. Post-transcriptional regulation of immune responses and inflammatory diseases by RNA-binding ZFP36 family proteins. *Frontiers in Immunology*, 2021, vol. 12, art. 711633. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.711633>
4. Liu G., Lu J., Sun W., Jia G., Zhao H., Chen X., Kim I. H., Zhang R., Wang J. Tryptophan supplementation enhances intestinal health by improving gut barrier function, alleviating inflammation, and modulating intestinal microbiome in lipopolysaccharide-challenged piglets. *Frontiers in Microbiology*, 2022, vol. 13, art. 919431. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.919431>
5. Chalisova N. I., Ivanova P. N., Zalomaeva E. S., Nikitina E. A., Kozina L. S. Effect of tryptophan and kynurenine on cell proliferation in tissue culture of the cerebral cortex in young and old rats. *Advances in Gerontology*, 2019, vol. 9, pp. 186–189. <https://doi.org/10.1134/S2079057019020073>
6. Frumento G., Rotondo R., Tonetti M., Damonte G., Benatti U., Ferrara G. B. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Journal of Experimental Medicine*, 2002, vol. 196, no. 4, pp. 459–468. <https://doi.org/10.1084/jem.20020121>
7. Charney D. S., Heninger G. R., Reinhard J. F., Sternberg D. E., Hafstead K. M. The effect of IV L-tryptophan on prolactin, growth hormone, and mood in healthy subjects. *Psychopharmacology (Berl)*, 1982, vol. 78, no. 1, pp. 38–43. <https://doi.org/10.1007/BF00470585>
8. Cunningham B. C., Mulkerrin M. G., Wells J. A. Dimerization of human growth hormone by zinc. *Science*, 1991, vol. 253, no. 5019, pp. 545–548. <https://doi.org/10.1126/science.1907025>
9. Oxenkrug G. Insulin resistance and dysregulation of tryptophan-kynurenine and kynurenine-nicotinamide adenine dinucleotide metabolic pathways. *Molecular Neurobiology*, 2013, vol. 48, no. 2, pp. 294–301. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8497-4>
10. Du X., Shi L., Gao H., Fu X., Zhang X., Zhang Yu., Xie Ch. The effect of zinc supplementation in pre-diabetes: A protocol for systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 2019, vol. 98, no. 27, p. e16259. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000016259>
11. Hajsl M., Hlavackova A., Broulikova K., Sramek M., Maly M., Dyr J. E., Suttner J. Tryptophan metabolism, inflammation, and oxidative stress in patients with neurovascular disease. *Metabolites*, 2020, vol. 10, no. 5, art. 208. <https://doi.org/10.3390/metabo10050208>
12. Reiter R. J., Mayo J. C., Tan D.-X., Sainz R. M., Alatorre-Jimenez M., Qin L. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *Journal of Pineal Research*, 2016, vol. 61, no. 3, pp. 253–278. <https://doi.org/10.1111/jpi.12360>
13. Slepchenko K. G., Lu Q., Li Y. V. Cross talk between increased intracellular zinc (Zn²⁺) and accumulation of reactive oxygen species in chemical ischemia. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2017, vol. 313, no. 4, pp. C448–C459. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00048.2017>
14. Hübner C., Haase H. Interactions of zinc- and redox-signaling pathways. *Redox Biology*, 2021, vol. 41, art. 101916. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101916>
15. Muthuraman P., Ramkumar K., Kim D. H. Analysis of dose-dependent effect of zinc oxide nanoparticles on the oxidative stress and antioxidant enzyme activity in adipocytes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, vol. 174, no. 8, pp. 2851–2863. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1231-5>
16. Sanchez S., Paredes S. D., Sanchez C. L., Barriga C., Reiter R. J., Rodriguez A. B. Tryptophan administration in rats enhances phagocytic function and reduces oxidative metabolism. *Neuro Endocrinology Letters*, 2008, vol. 29, no. 6, pp. 1026–1032.
17. León-Ponte M., Ahern G. P., O'Connell P. J. Serotonin provides an accessory signal to enhance T-cell activation by signaling through the 5-HT₇ receptor. *Blood*, 2007, vol. 109, no. 8, pp. 3139–3146. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-052787>
18. Wessels I., Maywald M., Rink L. Zinc as a gatekeeper of immune function. *Nutrients*, 2017, vol. 9, no. 12, art. 1286. <https://doi.org/10.3390/nu9121286>

19. Lindseth G., Helland B., Caspers J. The effects of dietary tryptophan on affective disorders. *Archives of Psychiatric Nursing*, 2015, vol. 29, no. 2, pp. 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.apnu.2014.11.008>
20. Tena-Campos M., Ramon E., Lupala C. S., Pérez J. J., Koch K.-W., Garriga P. Zinc is involved in depression by modulating G protein-coupled receptor heterodimerization. *Molecular Neurobiology*, 2016, vol. 53, no. 3, pp. 2003–2015. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9153-y>
21. Wang Y., Liu H., McKenzie G., Witting P. K., Stasch J.-P., Hahn M. [et al.]. Kynurenine is an endothelium-derived relaxing factor produced during inflammation. *Nature Medicine*, 2010, vol. 16, no. 3, pp. 279–285. <https://doi.org/10.1038/nm.2092>
22. Cortese-Krott M. M., Kulakov L., Opländer Ch., Kolb-Bachofen V., Kröncke K.-D., Suschek Ch. V. Zinc regulates iNOS-derived nitric oxide formation in endothelial cells. *Redox Biology*, 2014, vol. 16, no. 2, pp. 945–954. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.06.011>
23. Bhattarai Y., Williams B. B., Battaglioli E. J., Whitaker W. R., Till L., Grover M. [et al.]. Gut microbiota-produced tryptamine activates an epithelial G-protein-coupled receptor to increase colonic secretion. *Cell Host and Microbe*, 2018, vol. 23, no. 6, pp. 775–785.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.004>
24. Adeniyi O. S., Akomolafe R. O., Ojabo C. O., Eru E. U., Olaleye S. B. Effect of zinc treatment on intestinal motility in experimentally induced diarrhea in rats. *Nigerian Journal of Physiological Sciences*, 2014, vol. 29, no. 1, pp. 11–15.
25. Shekunova E. V., Kovaleva M. A., Makarova M. N., Makarov V. G. Dose selection for preclinical studies: interspecies dose transfer. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya. Regulyatornye issledovaniya i ekspertiza lekarstvennykh sredstv* [Bulletin of the Scientific Center for Expertise of Medical Products. Regulatory research and examination of medicines], 2020, vol. 10, no. 1, pp. 19–28 (in Russian).
26. Neinast M., Murashige D., Arany Z. Branched chain amino acids. *Annual Review of Physiology*, 2019, vol. 81, pp. 139–164. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114455>
27. Holeček M. Branched-chain amino acids in health and disease: metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements. *Nutrition and Metabolism*, 2018, vol. 15, art. 33. <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0271-1>

Информация об авторах

Шейбак Владимир Михайлович – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Виленская, 19, 230023, г. Гродно, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0001-6829-447>. E-mail: vsheibak@gmail.com

Павлюковец Анастасия Юрьевна – канд. биол. наук, доцент. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Виленская, 19, 230023, г. Гродно, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0001-7995-5587>. E-mail: anastasiayk@mail.ru

Дорошенко Евгений Михайлович – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230015, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: dgi03@mail.ru

Information about the authors

Vladimir M. Sheybak – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Grodno State Medical University (19, Vilenskaya Str., 230023, Grodno, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0001-6829-447>. E-mail: vsheibak@gmail.com

Anastasia Yu. Pavlyukovets – Ph. D. (Biol.), Associate Professor. Grodno State Medical University (19, Vilenskaya Str., 230023, Grodno, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0001-7995-5587>. E-mail: anastasiayk@mail.ru

Evgeniy M. Doroshenko – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Leading Researcher. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: dgi03@mail.ru

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 615.371:578.834.1
<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-1-53-61>

Поступила в редакцию 28.12.2022
Received 28.12.2022

А. М. Цыганков¹, О. В. Грибовская², В. П. Мартинович², **В. П. Голубович²**,
Н. В. Хайрулина¹, В. В. Янченко¹

¹*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
Витебск, Республика Беларусь*

²*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

АКТИВАЦИЯ КОРОТКИМИ СИНТЕТИЧЕСКИМИ ПЕПТИДАМИ ЛЕЙКОЦИТОВ *IN VITRO* КАК ЭТАП СОЗДАНИЯ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ ВАКЦИН ПРОТИВ COVID-19

Аннотация. Опыт борьбы с пандемиями убедительно показывает, что вакцинация населения всех категорий должна быть приоритетной задачей государства. При выборе платформы для производства вакцин следует акцентировать внимание на том, чтобы при минимальных затратах получить оптимальный эффект. Для достижения этих целей возможно использование пептидной вакцины или вакцины на платформе белка. Также привлекательной перспективой будет использование пероральных и интраназальных вакцин, что обусловлено простотой их применения для разных групп населения. Кроме того, сформированный ими иммунитет не уступает таковому при применении вакцин для внутримышечного введения.

В данной работе исследованы синтетические пептиды, представляющие собой фрагменты поверхностного белка SARS-CoV-2. Пептиды получены методом классического пептидного синтеза, причем пептид № 1 (Lys-Ile-Ala-Asp-Tyr-Asn-Tyr-Lys-Leu) является иммунодоминантным для HLA-A02:01 фенотипа, отличающегося низкой расчетной концентрацией полумаксимального ингибирования. Пептид № 2 (Val-Arg-Gln-Ala-Pro-Asn-Gly-Gln-Thr) выбран в качестве контроля и не является иммунодоминантным для HLA-A02:01 фенотипа, имеющего высокую расчетную концентрацию полумаксимального ингибирования (IC_{50}).

Проведено анкетирование 80 и обследование 78 добровольцев. Исследование показателей клеточного иммунитета проводили с помощью проточного цитометра Cytomics FC 500, уровня гамма-интерферона (ИФН- γ) – с помощью иммуноферментного анализа. Полученные данные обрабатывали с использованием программы Statistica 10. В результате работы апробирован новый метод, позволяющий оценивать активацию синтетическими пептидами лейкоцитов крови. Вне зависимости от HLA-A фенотипа обследуемых пептиды могли связываться с лейкоцитами, что свидетельствует об универсальности реакций на чужеродные пептиды, особенно клеток врожденного иммунитета. Пептид № 2 с высокой расчетной IC_{50} по сравнению с пептидом № 1 с низкой расчетной IC_{50} продемонстрировал достоверно большую связь с лимфоцитами и моноцитами, активацию базофилов. Использование в этой работе пептидов показало, что последние взаимодействуют с лейкоцитами, активируют их посредством секреции ИФН- γ . Таким образом, нами продемонстрирован подход к созданию пептидной вакцины на этапе исследований *in vitro*, а по увеличению уровня ИФН- γ изучен противовирусный ответ.

Ключевые слова: COVID-19, вакцина, синтетические пептиды, гамма-интерферон, IC_{50} , HLA, проточная цитометрия, ИФА

Для цитирования: Активация короткими синтетическими пептидами лейкоцитов *in vitro* как этап создания лечебно-профилактических вакцин против COVID-19 / А. М. Цыганков [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2024. – Т. 21, № 1. – С. 53–61. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-1-53-61>

Arsenii M. Tsygankov¹, Olga V. Gribovskaya², Vera P. Martinovich², **Vladimir P. Golubovich²**,
Natalia V. Khairulina¹, Uladzimir V. Yanchanka¹

¹*Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus*

²*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

ACTIVATING THE LEUKOCYTES BY SHORT SYNTHETIC PEPTIDES *IN VITRO* AS A STAGE IN THE CREATION OF TREATMENT-PROPHYLACTIC VACCINES AGAINST COVID-19

Abstract. Experience with pandemics strongly suggests that vaccination of the population in all categories should be a national priority. The choice of a vaccine production platform should be made in such a way as to achieve an optimal effect at the lowest possible cost. A peptide vaccine or a protein platform vaccine could serve these purposes. Oral and intranasal vaccines are also attractive due to the ease of administration to different population groups, and the resulting immunity is not inferior to that of intramuscularly administered vaccines.

In this work, synthetic peptides representing the fragments of the surface protein SARS-CoV-2 were investigated. The peptides were prepared by classical peptide synthesis, with peptide No. 1 (Lys-Ile-Ala-Asp-Tyr-Asn-Tyr-Lys-Leu) being

immunodominant for the HLA-A02:01 phenotype with a low calculated concentration of half-maximum inhibition. Peptide No. 2 (Val-Arg-Gln-Ala-Pro-Asn-Gly-Gln-Thr) was chosen as control and is not immunodominant for the HLA-A02:01 phenotype, with a high estimated concentration of half-maximum inhibition (IC₅₀).

80 persons were questioned and 78 volunteers were examined. Cellular immunity parameters were analyzed using a Cytomics FC 500 flow cytometer and gamma interferon (IFN- γ) was determined by ELISA. The results were processed using Statistica 10 software. As a result, a new method was tested to evaluate the activation of blood leukocytes by synthetic peptides. Regardless of the HLA-A phenotype of the study subjects, the peptides were able to bind to leukocytes, indicating a universal response to foreign peptides, especially to innate immune cells. Peptide No. 2 with high calculated IC₅₀, compared to peptide No. 1 with low calculated IC₅₀, showed significantly higher binding to lymphocytes and monocytes and activation of basophils. The peptides used in this work showed that they interact with leukocytes, activating them through the secretion of IFN- γ . Thus, our work demonstrates an approach to creating a peptide vaccine in the *in vitro* research phase, as well as to studying the antiviral response by the IFN- γ growth in response to the peptides.

Keywords: COVID-19, vaccine, peptide, gamma interferon, IC₅₀, HLA, flow cytometry, ELISA

For citation: Tsygankov A. M., Gribovskaya O. V., Martinovich V. P., Golubovich V. P., Khairulina N. V., Yanchanka U. V. Activating the leukocytes by short synthetic peptides *in vitro* as a stage in the creation of treatment-prophylactic vaccines against COVID-19. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2024, vol. 21, no. 1, pp. 53–61 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-1-53-61>

Введение. По состоянию на 1 ноября 2022 г. 371 вакцина-кандидат против SARS-CoV-2 находилась на разных стадиях разработки (из них 199 активно исследуются на животных и 172 проходят клинические испытания на людях). С 2020 г. только против COVID-19 исследовано более 800 вакцин. Всего 11 вакцин включены в список ВОЗ для использования в чрезвычайных ситуациях. На эти вакцины получены лицензии, а разработчикам выдано разрешение на использование их в чрезвычайных ситуациях или предоставлено право использования вне клинических испытаний каким-либо образом регулирующим органом, национальным органом или другой организацией.

По состоянию на ноябрь 2022 г. 49 вакцин получили одобрение ВОЗ и 234 вакцины являются вакцинами-кандидатами. Около трети одобренных (17, или 36,17 %) являются белковыми субъединичными, 35 (38,46 %) из 91 вакцины III фазы испытаний – также белковыми субъединичными. На более ранних фазах разработки находится 131 вакцина, из них – 40 (30,5 %) белковых субъединичных [1, 2]. Отсюда следует перспективность использования вакцин на основе белковых платформ.

Традиционная разработка вакцины может занять до 15 лет, начиная с фазы открытия, во время которой разрабатываются вакцины и проводятся предварительные доклинические исследования. Доклиническая стадия длится от 1,5 до 2,5 года и является наиболее избирательной; менее 20 % исследованных вакцин выдерживают испытания на людях. Некоторые исследования терпят неудачу вследствие неэффективности продукта, другие – из-за отсутствия финансирования. Тестирование на людях является следующим этапом, который включает одобрение FDA (США) и ЕМА (Европа): на десятках (этап I), сотнях (этап II) и тысячах людей (этап III/IV). Поскольку цель состоит в том, чтобы определить эффективную дозу вакцины и, что более важно, ограничить побочные эффекты, всегда предпочтительнее проводить небольшие испытания. Если предварительно определенные конечные точки удовлетворяют результатам испытаний фазы III, подается заявление на получение лицензии на биологические препараты, которое рассматривается регулирующими органами. После получения лицензии запускается серийное производство вакцины и начинается серия постмаркетинговых исследований [3, 4].

Подходы *in silico* могут быть использованы для ускорения разработки вакцин за счет более быстрого скрининга и более точного прогнозирования последовательностей аминокислот с высокой иммуногенностью и аффинностью связывания с молекулами HLA I и II класса. Эти вычислительные подходы могут предсказать аффинность связывания специфических пептидных последовательностей либо с молекулами HLA I и II класса, либо с рецепторами В-клеток. Антигенность, аллергенность, физико-химические параметры, а также вторичная и третичная структуры этих белков хорошо предсказываются *in silico*. В настоящее время разработанные на основе пептидов вакцины используются не только как терапевтическое, но и как профилактическое средство при множестве заболеваний – от рака и вирусных инфекций до аллергии и болезни Альцгеймера. Учитывая, что не только специфические аминокислотные последовательности

полноразмерных белковых антигенов ответственны за эффективные иммунные ответы, для вакцин предлагаются иммуногенные пептиды, имитирующие В- и Т-клеточные эпитопы [5].

Существует четыре основных преимущества вакцины на основе пептидов: 1) крупномасштабный синтез пептидов относительно недорог, а их технология хорошо отработана; 2) пептиды могут складываться в трехмерные эпитопы, способные индуцировать гуморальный ответ на линейные и конформационные структуры; 3) уникальные эпитопы могут быть выбраны с целью избежать аутоиммунных ответов, которые могут быть вызваны цельным белком; 4) новые эпитопы могут быть легко добавлены к смеси пептидов по мере выявления новых вирусных мутаций [6]. После введения белковой субъединичной (пептидной) вакцины антитела могут вообще не появиться. Не следует ожидать, что вакцина из Т-клеточных эпитопов предотвратит инфекцию, как традиционные вакцины, которые стимулируют появление нейтрализующих антител. Индукция Т-клеток против нескольких разных белков обеспечивает защиту от вирусных мутаций. В случае еще неизвестных вариантов SARS-CoV-2 этот тип вакцины также может быть эффективным [7–10]. До пандемии COVID-19 около 500 исследований пептидных вакцин против различных заболеваний не достигли фазы IV испытаний. Большинство пептидных вакцин в клинических испытаниях были направлены против различных видов рака и только потом против вирусных инфекций, аллергии и аутоиммунных заболеваний. Конечной их целью, как заявлялось, была разработка безопасной, воспроизводимой и стабильной вакцины, которая способна обеспечить соответствующий иммунитет. Следует отметить, что на основе пептидов существует 5 вакцин против COVID-19: 1) «ЭпиВакКорона» производства РФ, Федеральное бюджетное научное учреждение «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», одобренное ВОЗ для использования; 2) UB-612 производства United Biomedical Inc., фаза III испытаний; 3) CoVeriT производства OSE Immunotherapeutics, фаза I испытаний; 4) B-pVAC-SARS-CoV-2 и 5) P-pVAC-SARS-CoV-2; обе производства University Hospital Tuebingen, ФРГ. Эксперименты для проверки эффективности пептидов *in vivo* проводились как сразу после биоинформационных исследований, так и на лабораторном этапе *in vitro*. Так, с целью проверки действия на клетки системы иммунитета нами были синтезированы пептиды, которые представляют собой фрагменты поверхностного белка SARS-CoV-2 с последовательностью аминокислот Lys-Ile-Ala-Asp-Tyr-Asn-Tyr-Lys-Leu и Val-Arg-Gln-Ala-Pro-Asn-Gly-Gln-Thr [11].

Для идентификации активированных клеток крови были использованы моноклональные антитела против молекул, которые экспрессируются на лейкоцитах (CD45), отвечают за раннюю активацию лимфоцитов (CD69) и базофилов (CD203c, CD63). CD45, или PTPRC (protein tyrosine phosphatase receptor type C), является ключевым регулятором передачи сигналов антигенных рецепторов в Т- и В-клетках.

CD45 высоко экспрессируется во всех кровяных клоонах на всех стадиях развития. Функционально CD45 подавляет опосредованную интерлейкином-3 клеточную пролиферацию, эритропоэтин-зависимый гематопоз и противовирусные ответы *in vitro* и *in vivo* [12].

CD69 – антиген очень ранней активации, экспрессия которого на поверхности лейкоцитов и тромбоцитов быстро повышается при активации вирусами. CD69, вовлеченный в передачу сигнала на начальных этапах активации, может быть использован для характеристики напряженности иммунитета. CD69 является интегральным мембранным белком II типа с внеклеточным лектиновым доменом С типа. Это самый ранний гликопротеин, экспрессируемый на поверхности клеток при активации Т-, В- и НК-клеток *in vitro*. CD69 конститутивно экспрессируется на субпопуляциях тимоцитов и тромбоцитов, плазмоцитоидных дендритных клеток и клеток-предшественников [13], а его активация запускает каскад внутриклеточных процессов, связанных с представленными ниже молекулами.

CD203c (ENPP3, экто-нуклеотидпирофосфатаза/фосфодиэстераза) экспрессируется на клетках многих органов, в том числе на эпителии (особенно на базофилах и тучных клетках). Функция этого фермента состоит в подавлении АТФ-зависимого воспаления. Базофилы и тучные клетки участвуют в реакции на определенные патогены, а также на острые и хронические воспалительные и аллергические процессы. CD203c можно использовать как для идентификации, так и в качестве активационного маркера. Его экспрессия на базофилах быстро увеличивается при манипуляциях с клетками или во время стимуляции базофилов без дегрануляции [14].

Антиген CD63 обнаруживается на поверхности моноцитов/макрофагов и слабо экспрессируется покоящимися гранулоцитами, Т- и В-лимфоцитами. Антиген CD63 присутствует в азурофильных гранулах нестимулированных нейтрофилов, сильно экспрессируется на поверхности нейтрофилов и базофилов после активации [15].

Для подтверждения активации лимфоцитов синтезированными пептидами было взято за основу определение гамма-интерферона (ИФН- γ), который применяется в различных вариациях [16, 17]. ИФН- γ представляет собой цитокин, участвующий в различных биологических реакциях, включая защиту от инфекций, противоопухолевое действие и регуляцию эффекторных клеток как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Он способствует усилению презентации антигена молекулами главного комплекса гистосовместимости, дифференцировке клеток, стимуляции фагоцитов, координации взаимодействий лейкоцитов и эндотелия, влияет на клеточную пролиферацию и апоптоз, а также на стимуляцию и подавление различных генов. ИФН- γ регулирует дифференцировку, активацию и гомеостаз лимфоцитов, активацию M1 подтипа макрофагов; индуцирует рекрутирование эффекторных клеток при различных видах воспаления. Он рассматривается как ключевое звено между врожденным и адаптивным ответом системы иммунитета и как главный переключатель каскада цитокинов [18].

Цель исследования – изучение свойств синтезированных пептидов и их влияния на активацию клеток системы как врожденного, так и адаптивного иммунитета.

Материалы и методы исследования. Проведен анализ научных публикаций по теме исследования в системах Google Scholar, PubMed. Перед исследованием получено одобрение Этического комитета ВГМУ (протокол № 1 от 25.02.2021 г.).

Проведено анкетирование 80 и обследование 78 добровольцев, образцы венозной крови которых были собраны на протяжении 2 лет – с 2020 по 2022 г. (в основном в 2020–2021 гг.). Участникам было предложено заполнить ретроспективную анкету, а кроме того, ими было дано добровольное информированное согласие. Вопросы в анкетах касались анамнеза (в том числе по COVID-19), возраста, наличия хронических заболеваний и условий, предшествовавших в течение 14 дней до исследования венозной крови. Переболевшими считались лица с подтвержденным наличием SARS-CoV-2 в мазках из носоглотки методом ПЦР, что не исключало у обследуемых бессимптомное носительство SARS-CoV-2.

Исследование противовирусного клеточного иммунитета проводили методом проточной цитометрии и ИФА ИФН- γ по алгоритму:

1) забор 5,0 мл венозной крови из кубитальной вены в стеклянную пробирку № 1 с 100 мкл гепарина (100 ЕД);

2) вносили по 500 мкл (цельной гепаринизированной) крови из пробирки № 1 в пробирки Эппендорф № 2 и № 3 с 2,5 мкл раствора с пептидами № 1 (меченый FITC) и № 2 (оба в концентрации 15 мкг/мл) соответственно;

3) в пробирку Эппендорф № 4 переносили 100 мкл крови из пробирки № 2 для внесения моноклональных антител CD45 PE–TR;

4) в пробирку Эппендорф № 6 вносили 100 мкл крови из пробирки № 2, далее – моноклональные антитела CD45 PE–TR, CD69 FITC;

5) в пробирку Эппендорф № 8 вносили 500 мкл крови из пробирки № 2, далее – моноклональные антитела CD63 FITC, CD203c PE;

6) в пробирки № 4, 6, 8 добавляли 500 мкл лизирующего раствора и помещали в термостат с температурой 37 °C на 10 мин;

7) затем в пробирки № 4, 6, 8 добавляли 500 мкл буферного раствора и исследовали на проточном цитометре 30 000 клеток с лейкоцитами, лимфоцитами, моноцитами, нейтрофилами, эозинофилами (CD45⁺), активированными лимфоцитами (CD45⁺, CD69⁺) и 50 000 клеток с активированными базофилами (CD203c⁺, CD63⁺);

8) помещали пробирки № 2 и № 3 в термостат на 1 сут;

9) центрифугировали пробирки № 2 и № 3 при 3000 об/мин 10 мин (получали для замораживания надосадочную жидкость с ИФН- γ в пробирки № 10 и № 11);

10) повторить п. 3–7 для пробирки № 3 (пробирки № 5, 7, 9 соответственно).

Все полученные данные проточной цитометрии были проанализированы с помощью программного обеспечения Kaluza Analysis 1.3. Лабораторное исследование ИФН- γ в пробирках № 10

и № 11 проводили методом ИФА с использованием диагностических тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск), каталожный номер 8752. Для статистического анализа данных применяли непараметрические критерии Мана–Уитни, использовали программу Statistica 10.

Результаты и их обсуждение. Анализ 80 анкет показал, что за 3–12 мес. до исследования COVID-19 переболели 28 человек. Среди обследуемых оказалось 11 (16,25 %) женщин и 67 (83,75 %) мужчин. Получивших две дозы инактивированной вакцины «Vero Cell» было 3 (3,75 %) человека, привитых вакцинами «Спутник V» и «Спутник лайт» – 4 (5 %). Среди переболевших привитых не было, наблюдалось бессимптомное течение или острое респираторное заболевание легкой степени тяжести.

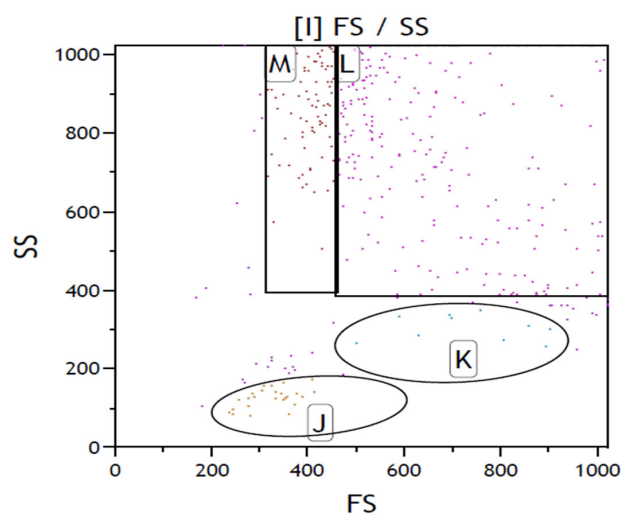
Согласно данным анкет, респонденты чаще отмечали «физические нагрузки, стресс, прием лекарственных средств, трехразовое питание» за 2 недели до забора крови.

Возраст. Возраст участников составил от 18 до 52 лет (средний возраст – $26,9 \pm 9,4$ года).

Хронические заболевания. Всего 15 (18,75 %) человек (95 % ДИ: 10,2–27,3) указали на наличие хронических заболеваний органов пищеварения, органов кровообращения, органов дыхания, обмена веществ; на двухразовое питание указали 23 (28,75 %) человека (95 % ДИ: 18,8–38,7), на трехразовое и более – 57 (71,25 %) человек (95 % ДИ: 61,3–81,2). В течение 14 дней до забора крови стресс испытывали 27 (33,75 %) человек (95 % ДИ: 23,4–44,1), на физические нагрузки сверх обычных указали 26 (32,5 %) (95 % ДИ: 22,2–42,8), на контакт с людьми с инфекционными заболеваниями – 15 (18,75 %) (95 % ДИ: 10,2–27,3), на прием лекарственных средств – 12 (15 %) человек (95 % ДИ: 7,2–22,8).

Влияние синтетических пептидов на лейкоциты крови изучено на 78 образцах венозной крови. У пептида № 1 концентрация полуингибирования (IC_{50}) для HLA-A 02:01 составляла 16 нМ, у пептида № 2 IC_{50} была более 50 нМ (4546,9). Нами не было найдено публикаций, где в качестве пептида сравнения выбран(ы) пептид(ы) с высокой расчетной IC_{50} .

При анализе данных гейтирования можно сделать вывод о вовлеченности в ответ на малые чужеродные пептиды клеток как врожденной, так и приобретенной системы иммунитета (см. рисунок).



Gate Number	%Total	%Gated
All	800	2,67
J	25	0,08
K	10	0,03
L	270	0,90
M	82	0,27

Гейтирование лейкоцитов, связавших синтетический пептид COVID-19.

All – все лейкоциты; J – лимфоциты; K – моноциты; L – нейтрофилы; M – эозинофилы

Gating the leukocytes binding to the COVID-19 synthetic peptide. All – all leukocytes; J – lymphocytes; K – monocytes; L – neutrophils; M – eosinophils

Моноциты и лимфоциты реагировали на пептид № 2 достоверно больше, чем на пептид № 1. Лейкоциты в целом и эозинофилы в частности реагировали на пептид № 1 больше, чем на пептид № 2, но статистически не значимо (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Количество ответивших на пептиды клеток в расчете на 30 000 клеток, Ме [25 %–75 %]

T a b l e 1. Number of the cells responding to peptides per 30,000 cells, Me [25 %–75 %]

Тип клеток и кол-во наблюдений для пептидов № 1/№ 2	Кол-во клеток, ответивших на пептиды № 1 и № 2 соответственно	Достоверность различий при $p < 0,05$
Лейкоциты (CD45 ⁺) ($n = 70/54$)	233 [71–361] 198 [80–380]	Не значимо
Из них:		
лимфоциты ($n = 20/51$)	1 [1–2,5] 12 [6–22]	Значимо
моноциты ($n = 37/50$)	2 [1–4] 6 [3–11,75]	Значимо
нейтрофилы ($n = 70/54$)	32 [21–100] 75 [20–141,5]	Не значимо
эозинофилы ($n = 70/54$)	25 [8–85] 15 [6–29]	Не значимо
Активированные лимфоциты (CD69 ⁺) ($n = 78$)	65 [31,5–117,5] 92 [35,25–145]	Не значимо
Активированные базофилы (CD203c ⁺) ($n = 77$) (на 50 000)	9 [3–25,5] 16 [5–32]	Значимо

При анализе ИФН- γ , который секретируют лимфоциты, при использовании пептида № 1 был выявлен рост концентрации ИФН- γ (в отличие от пептида № 2) (табл. 2). Всего проанализированы результаты 136 исследований (табл. 3).

Т а б л и ц а 2. Концентрация ИФН- γ из пробирок № 10 и № 11, Ме [25 %–75 %] (95 % ДИ)

T a b l e 2. IFN- γ concentration from tubes No. 10 and No. 11 Me [25 %–75 %] (95 % CI)

Показатель	ИФН- γ , пг/мл	Достоверность различий при $p < 0,05$
При использовании пептида № 1	6,3 [2,9–16,51] (95 % ДИ: 3,95–8,67)	Не значима
При использовании пептида № 2	5,45 [1,97–11,96] (95 % ДИ: 2,99–7,92)	
Переболевшие (и/или привитые) COVID-19 ($n = 31$)	6,85 [2,63–17,35] (95 % ДИ: 2,67–11,03)	
Не переболевшие COVID-19 ($n = 37$)	5,16 [1,7–11,91] (95 % ДИ: 2,13–8,19)	

П р и м е ч а н и е. Ме – медиана, 25 % и 75 % – интерквартильный размах в виде 25-й и 75-й процентилей.

Т а б л и ц а 3. Результаты анкетирования и связь с активированными лейкоцитами

T a b l e 3. Questionnaire results and the association with activated leukocytes

Категория	Кол-во респондентов, ответивших утвердительно, %	Активированные лимфоциты и базофилы
Хронические заболевания ($n = 15$)	18,75 % (95 % ДИ: 10,2–27,3)	Значимо ($p < 0,05$) для активированных пептидом № 1 лимфоцитов
В течение 14 дней до забора крови		
Стресс ($n = 27$)	33,75 (95 % ДИ: 23,4–44,1)	Не значимо ($p > 0,05$)
Физические нагрузки выше обычного ($n = 26$)	32,5 (95 % ДИ: 22,2–42,8)	
Прием лекарственных средств ($n = 12$)	15 (95 % ДИ: 7,2–22,8)	
Двухразовое питание ($n = 23$)	28,75 (95 % ДИ: 18,8–38,7)	
Трехразовый и более прием пищи в день ($n = 57$)	71,25 (95 % ДИ: 61,3–81,2)	
Контакт с инфекционными больными ($n = 15$)	18,75 (95 % ДИ: 10,2–27,3)	

Таким образом, показано, что синтезированные пептиды активировали лимфоциты, что приводило к секреции ими ИФН- γ . Интересно, что для категории переболевших COVID-19 (и/или привитых от COVID-19) наблюдалась тенденция к более сильной активации при использовании пептида № 1, чем при использовании пептида № 2.

Полученные результаты указывают на то, что даже пептиды с разной расчетной IC_{50} могут быть использованы для исследования *in vitro* лейкоцитов у носителей различных HLA фенотипов. Пептид № 1 лучше активировал лимфоцит, пептид № 2 достоверно активировал базофилы.

Экономическая целесообразность, безопасность, эффективность и простота относительно быстрой модификации и производства делают синтетические пептиды одними из лучших антигенных детерминант для дизайна и разработки вакцин против вирусных патогенов. Однако потребность в том, чтобы вирусные пептиды были эффективно представлены в комплексе HLA и вызывали последующий ответ В- и Т-клеток, значительно затрудняет их выбор. Субъединичные вакцины имеют тенденцию генерировать низкую иммуногенность по сравнению с традиционными вакцинами из-за относительно небольших размеров эпитопов. Изучено множество подходов к разработке эффективных субъединичных вакцин, включая использование адъювантов и нанотехнологий для создания эффективных систем антигенного дисплея. Разработка пептидных вакцин может предотвратить риск антителизависимого усиления инфекции, а синтетические пептиды могут использоваться в качестве антигенных эпитопов В- и Т-клеток для разработки субъединичных вакцин против SARS-CoV-2. Пептидные вакцины вызывают лучший Т-клеточный ответ по сравнению с полнобелковыми вакцинами. Всесторонние исследования *in vivo* показали, что длинные пептиды способствуют более качественному Т-клеточному ответу. С другой стороны, длинные пептиды подвергаются процессингу и могут быть представлены только антигенпрезентирующими клетками [19–21].

Заключение. Анализ информации о вакцинах-кандидатах и вакцинах, одобренных к применению, показал, что не менее трети из них являются белковыми субъединичными (в том числе 5 пептидных), что указывает на правильность идеи о создании пептидной вакцины. Первым шагом в этом направлении является практическое подтверждение гипотезы об активации лимфоцитов синтезированным коротким пептидом с высокой IC_{50} . Апробированный нами в виде протокола метод позволяет оценивать влияние коротких пептидов на лейкоциты крови. Пептид № 2 с высокой расчетной IC_{50} по сравнению с пептидом № 1 с низкой расчетной IC_{50} продемонстрировал достоверно большую активацию лимфоцитов и моноцитов, а также базофилов.

Таким образом, использование нами пептидов показало, что последние взаимодействуют с лейкоцитами, активируют их посредством секреции ИФН- γ . Вне зависимости от HLA-A фенотипа исследуемых пептиды могли взаимодействовать с лейкоцитами, что говорит об их универсальности. Следует отметить, что отсутствие ответа или слабый ответ на действие пептида может быть обусловлено иным HLA-A фенотипом исследуемых.

С учетом полученных результатов необходимо усовершенствовать протокол исследования. В дальнейшем планируется увеличить количество участников исследования и сравнить влияние пептидов на лейкоциты обследуемых после перенесенного COVID-19 (и/или привитых) и не переболевших; сравнить активацию пептидами за разное время инкубации; использовать моноклональные антитела против биомаркера стволовых клеток CD34; исследовать другие синтезированные пептиды иных возбудителей инфекционных заболеваний, а также проанализировать возможный фенотип HLA будущих участников исследования и сопоставить с имеющейся информацией в общедоступных базах данных.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. COVID-19 vaccine tracker: COVID-19 Landscape of novel coronavirus candidate vaccine development worldwide [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>. – Date of access: 09.10.2022.

2. COVID-19 vaccine tracker [Electronic resource]. – Mode of access: <https://covid19.trackvaccines.org>. – Date of access: 29.11.2022.
3. A global database of COVID-19 vaccinations / E. Mathieu [et al.] // *Nat. Human Behav.* – 2021. – Vol. 5, N 7. – P. 947–953. <https://doi.org/10.1038/s41562-021-01122-8>
4. Pollard, A. J. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments / A. J. Pollard, E. M. Bijker // *Nat. Rev. Immunol.* – 2021. – Vol. 21, N 2. – P. 83–100. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00479-7>
5. Park, J. H. Delivery routes for COVID-19 vaccines / J. H. Park, H. K. Lee // *Vaccines.* – 2021. – Vol. 9, N 5. – P. 524. <https://doi.org/10.3390/vaccines9050524>
6. Developing an effective peptide-based vaccine for COVID-19: Preliminary studies in mice models / H. Yang [et al.] // *Viruses.* – 2022. – Vol. 14, N 3. – P. 449. <https://doi.org/10.3390/v14030449>
7. A comprehensive review of the protein subunit vaccines against COVID-19 / M. Heidary [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2022. – Vol. 13. – Art. 927306. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.927306>
8. Contemporary COVID-19 vaccines: The science and marketing / S. Chiplunkar [et al.] // *J. Young Pharmacists.* – 2022. – Vol. 14, N 2. – P. 133–139.
9. Triccas, J. A. Affordable SARS-CoV-2 protein vaccines for the pandemic endgame / J. A. Triccas, J. Kint, F. M. Wurm // *NPJ Vaccines.* – 2022. – Vol. 7, N 1. – P. 1–2.
10. The many faces of innate immunity in SARS-CoV-2 infection / N. Hanan [et al.] // *Vaccines.* – 2021. – Vol. 9, N 6. – Art. 596. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060596>
11. Effect of COVID-19 peptides on leukocytes / O. V. Gribovskaya [et al.] // VII International conference on “Chemistry, structure and function of biomolecules”, Minsk, November 23–25, 2021 : book of abstracts / ed.: A. V. Lapko, N. B. Khripach, A. B. Sachanka. – Minsk, 2021. – P. 87–88.
12. Hermiston, M. L. CD45+: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells / M. L. Hermiston, Z. Xu, A. Weiss // *Annu. Rev. Immunol.* – 2003. – Vol. 21, N 1. – P. 107–137. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.140946>
13. Sancho, D. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation / D. Sancho, M. Gómez, F. Sánchez–Madrid // *Trends Immunol.* – 2005. – Vol. 26, N 3. – P. 136–140. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.12.006>
14. Structural basis for nucleotide recognition by the ectoenzyme CD 203c / A. Gorelik [et al.] // *FEBS J.* – 2018. – Vol. 285, N 13. – P. 2481–2494. <https://doi.org/10.1111/febs.14489>
15. Pols, M. S. Trafficking and function of the tetraspanin CD63 / M. S. Pols, J. Klumperman // *Exp. Cell Res.* – 2009. – Vol. 315, N 9. – P. 1584–1592. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.09.020>
16. Interferon- γ release assay for accurate detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 T-cell response / K. Murugesan [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* – 2021. – Vol. 73, N 9. – P. 3130–3132. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1537>
17. Accuracy of QuantiFERON SARS-CoV-2 research use only assay and characterization of the CD4+ and CD8+ T cell-SARS-CoV-2 response: comparison with a homemade interferon- γ release assay / A. Aiello [et al.] // *Int. J. Infect. Dis.* – 2022. – Vol. 122. – P. 841–849. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.07.049>
18. Todorović-Raković, N. Between immunomodulation and immunotolerance: The role of IFN γ in SARS-CoV-2 disease / N. Todorović-Raković, J. R. Whitfield // *Cytokine.* – 2021. – Vol. 146. – Art. 155637. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155637>
19. Designing a SARS-COV-2 T-cell-inducing vaccine for high-risk patient groups / H. G. Rammensee [et al.] // *Vaccines.* – 2021. – Vol. 9, N 5. – P. 428. <https://doi.org/10.3390/vaccines9050428>
20. Peptide candidates for the development of therapeutics and vaccines against β -coronavirus infection / R. Chourasia [et al.] // *Bioengineered.* – 2022. – Vol. 13, N 4. – P. 9435–9454. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.206045+3>
21. Cid, R. Platforms for production of protein-based vaccines: from classical to next-generation strategies / R. Cid, J. Bolívar // *Biomolecules.* – 2021. – Vol. 11, N 8. – P. 1072–1105. <https://doi.org/10.3390/biom11081072>

References

1. COVID-19 vaccine tracker: COVID-19 Landscape of novel coronavirus candidate vaccine development worldwide. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines> (accessed 09.10.2022).
2. COVID-19 vaccine tracker. Available at: <https://covid19.trackvaccines.org> (accessed 29.11.2022).
3. Mathieu E., Ritchie H., Ortiz-Ospina E., Roser M., Hasell J., Appel C., Giattino Ch., Rodés-Guirao L. A global database of COVID-19 vaccinations. *Nature Human Behaviour*, 2021, vol. 5, no. 7, pp. 947–953. <https://doi.org/10.1038/s41562-021-01122-8>
4. Pollard A. J., Bijker E. M. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nature Reviews Immunology*, 2021, vol. 21, no. 2, pp. 83–100. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00479-7>
5. Park J. H., Lee H. K. Delivery routes for COVID-19 vaccines. *Vaccines*, 2021, vol. 9, no. 5, pp. 524–539. <https://doi.org/10.3390/vaccines9050524>
6. Yang H., Cao J., Lin X., Yue J., Zieneldien T., Kim J. [et al.]. Developing an effective peptide-based vaccine for COVID-19: Preliminary studies in mice models. *Viruses*, 2022, vol. 14, no. 3, p. 449. <https://doi.org/10.3390/v14030449>
7. Heidary M., Kaviar V. H., Shirani M., Ghanavati R., Motahar M., Sholeh M., Ghahramanpour H., Khoshnood S. A comprehensive review of the protein subunit vaccines against COVID-19. *Frontiers in Microbiology*, 2022, vol. 13, art. 927306. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.927306>
8. Chiplunkar S., Baravkar A., Paricharak S., Masal A., Aher N. Contemporary COVID-19 vaccines: The science and marketing. *Journal of Young Pharmacists*, 2022, vol. 14, no. 2, pp. 133–139.
9. Triccas J. A., Kint J., Wurm F. M. Affordable SARS-CoV-2 protein vaccines for the pandemic endgame. *NPJ Vaccines*, 2022, vol. 7, no. 1, pp. 1–2. <https://doi.org/10.1038/s41541-022-00507-8>

10. Hanan N., Doud Jr. R. L., Park In-W., Jones H. P., Mathew S. O. The many faces of innate immunity in SARS-CoV-2 infection. *Vaccines*, 2021, vol. 9, no. 6, art. 596. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060596>
11. Gribovskaya O. V., Yanchenko V. V., Tsygankov A. M., Martinovich V. P., Golubovich V. P. Effect of COVID-19 peptides on leukocytes. *VII International conference on (Chemistry, structure and function of biomolecules)*, Minsk, November 23–25, 2021: book of abstracts. Minsk, 2021, pp. 87–88.
12. Hermiston M. L., Xu Z., Weiss A. CD45+: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annual Review of Immunology*, 2003, vol. 21, no. 1, pp. 107–137. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.140946>
13. Sancho D., Gómez M., Sánchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends in Immunology*, 2005, vol. 26, no. 3, pp. 136–140. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.12.006>
14. Gorelik A., Randriamihaja A., Illes K., Nagar B. Structural basis for nucleotide recognition by the ectoenzyme CD 203c. *FEBS Journal*, 2018, vol. 285, no. 13, pp. 2481–2494. <https://doi.org/10.1111/febs.14489>
15. Pols M. S., Klumperman J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Experimental Cell Research*, 2009, vol. 315, no. 9, pp. 1584–1592. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.09.020>
16. Murugesan K., Jagannathan P., Pham Th. D., Pandey S., Bonilla H. F., Jacobson K. [et al.]. Interferon- γ release assay for accurate detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 T-cell response. *Clinical Infectious Diseases*, 2021, vol. 73, no. 9, pp. 3130–3132. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1537>
17. Aiello A., Coppola A., Vanini V., Petrone L., Cuzzi G., Salmi A. [et al.]. Accuracy of QuantiFERON SARS-CoV-2 research use only assay and characterization of the CD4+ and CD8+ T cell-SARS-CoV-2 response: comparison with a homemade interferon- γ release assay. *International Journal of Infectious Diseases*, 2022, vol. 122, pp. 841–849. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.07.049>
18. Todorović-Raković N., Whitfield J. R. Between immunomodulation and immunotolerance: The role of IFN γ in SARS-CoV-2 disease. *Cytokine*, 2021, vol. 146, art. 155637. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155637>
19. Rammensee H. G., Gouttefangeas C., Heidu S., Klein R., Preuß B., Walz J. S. [et al.]. Designing a SARS-COV-2 T-cell-inducing vaccine for high-risk patient groups. *Vaccines*, 2021, vol. 9, no. 5, p. 428. <https://doi.org/10.3390/vaccines9050428>
20. Chourasia R., Padhi S., Phukon L. Ch., Abedin M. M., Sirohi R., Singh R. S., Rai A. K. Peptide candidates for the development of therapeutics and vaccines against β -coronavirus infection. *Bioengineered*, 2022, vol. 13, no. 4, pp. 9435–9454. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2060453>
21. Cid R., Bolívar J. Platforms for production of protein-based vaccines: from classical to next-generation strategies. *Biomolecules*, 2021, vol. 11, no. 8, pp. 1072–1105. <https://doi.org/10.3390/biom11081072>

Інфармацыя аб аўтарах

Цыганков Арсеній Міхайлавіч – ст. прафесар. Віцебскі дзяржаўны ўніверсітэт ордэна Дружбы народаў медыцынскі ўніверсітэт (пр-т Фрунзе, 27, 210023, г. Віцебск, Рэспубліка Беларусь). <https://orcid.org/0000-0003-1367-7742>. E-mail: 87senka@gmail.com

Грыбовская Ольга Віктаровна – канд. хім. навук, заступнік дырэктара па навучнай рабоце. Інстытут біаарганічнай хіміі НАН Беларусі (ул. Акадэміка Купрэвіча, 5/2, 220141, г. Мінск, Рэспубліка Беларусь). <https://orcid.org/0000-0001-6640-3388>. E-mail: o.gribovskaya@iboch.by

Марціновіч Вера Павлаўна – канд. хім. навук, вяд. навуц. супрацоўнік. Інстытут біаарганічнай хіміі НАН Беларусі (ул. Акадэміка Купрэвіча, 5/2, 220141, г. Мінск, Рэспубліка Беларусь). <http://orcid.org/0000-0002-145+4-619X>. E-mail: vermar@iboch.by

Голубовіч Вадзімір Пятровіч – д-р біол. навук, прафесар, заведуючы лабараторыяй. Інстытут біаарганічнай хіміі НАН Беларусі (ул. Акадэміка Купрэвіча, 5/2, 220141, г. Мінск, Рэспубліка Беларусь). <https://orcid.org/0000-0001-5324-0495>. E-mail: golubovich@iboch.by

Хайруліна Наталія Васільевна – лабарант. Віцебскі дзяржаўны ўніверсітэт ордэна Дружбы народаў медыцынскі ўніверсітэт (пр-т Фрунзе, 27, 210023, г. Віцебск, Рэспубліка Беларусь). E-mail: highrullina@gmail.com

Янченко Вадзімір Вільяніновіч – канд. мед. навук, доцент. Віцебскі дзяржаўны ўніверсітэт ордэна Дружбы народаў медыцынскі ўніверсітэт (пр-т Фрунзе, 27, 210023, г. Віцебск, Рэспубліка Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-9355-8534>. E-mail: rst_vitebsk@inbox.ru

Information about the authors

Arsenii M. Tsygankov – Senior Lecturer. Vitebsk State Medical University (27, Frunze Ave., 210023, Vitebsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0003-1367-7742>. E-mail: 87senka@gmail.com

Olga V. Gribovskaya – Ph. D. (Chem.), Deputy Director. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Akad. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0001-6640-3388>. E-mail: o.gribovskaya@iboch.by

Vera P. Martinovich – Ph. D. (Chem.), Leading Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Akad. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). <http://orcid.org/0000-0002-145+4-619X>. E-mail: vermar@iboch.by

Vladimir P. Golubovich – D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Akad. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0001-5324-0495>. E-mail: golubovich@iboch.by

Natalia V. Khairulina – Assistant. Vitebsk State Medical University (27, Frunze Ave., 210023, Vitebsk, Republic of Belarus). E-mail: highrullina@gmail.com

Uladzimir V. Yanchanka – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Vitebsk State Medical University (27, Frunze Ave., 210023, Vitebsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0002-9355-8534>. E-mail: rst_vitebsk@inbox.ru

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 577.112.388.3:57.017.73:547.962.9:616-002.5/7

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-1-62-67>

Поступила в редакцию 29.12.2022

Received 29.12.2022

А. Н. Путятина, Л. Б. Ким, Г. С. Русских¹

*Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины,
Новосибирск, Российская Федерация*

ОЦЕНКА МЕТАБОЛИЗМА КОЛЛАГЕНОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ БЦЖ-ИНДУЦИРОВАННОМ ТУБЕРКУЛЕЗНОМ ВОСПАЛЕНИИ

Аннотация. В работе представлены данные, полученные при исследовании органов мышей с БЦЖ-индуцированным гранулематозом. В печени, легких, селезенке мышей опытной и контрольной групп измеряли содержание фракций свободного, пептидно-связанного, белково-связанного гидроксипролина (ГОП) методом щелочного гидролиза в собственной модификации. У мышей с БЦЖ-гранулематозом отмечено повышенное содержание фракций ГОП, отражающих синтез коллагенов, тогда как содержание свободного ГОП, свидетельствующего о деградации коллагенов, не отличалось от аналогичных показателей контрольной группы. Анализ соотношения отдельных фракций ГОП продемонстрировал различную степень выраженности фиброза в органах мышей: усиленный – в легких, умеренный – в печени, слабый – в селезенке, что свидетельствует об органоспецифичности фиброгенеза при туберкулезной инфекции.

Ключевые слова: фракции гидроксипролина, коллаген, щелочной гидролиз, фиброз, туберкулез, органы мышей

Для цитирования: Путятина, А. Н. Оценка метаболизма коллагенов при экспериментальном БЦЖ-индуцированном туберкулезном воспалении / А. Н. Путятина, Л. Б. Ким, Г. С. Русских // Вестн. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2024. – Т. 21, № 1. – С. 62–67. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-1-62-67>

Anna N. Putyatina, Lena B. Kim, Galina S. Russkikh

Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

ASSESSING THE COLLAGEN METABOLISM IN EXPERIMENTAL BCG-INDUCED TUBERCULOUS INFLAMMATION

Abstract. The paper presents the study results of the organs of mice without (control group) and with BCG-induced granulomatosis. The contents of hydroxyproline (Hyp) fractions (free, peptide-bound, and protein-bound) were measured in the liver, lungs, and spleen by our alkaline hydrolysis method. In mice with BCG-induced granulomatosis, an increased content of Hyp fractions, reflecting the collagen synthesis, was observed, while the content of free Hyp, characterizing the collagen degradation, did not differ from similar indicators of the control group. The analysis of the ratios of individual Hyp fractions showed a different fibrosis degree in the organs. It was high in the lungs, moderate in the liver and weak in the spleen, thus indicating the organ-specific fibrogenesis in tuberculous infection.

Keywords: hydroxyproline fractions, collagen, alkaline hydrolysis, fibrosis, tuberculosis, organs of mice

For citation: Putyatina A. N., Kim L. B., Russkikh G. S. Assessing the collagen metabolism in experimental BCG-induced tuberculous inflammation. *Vesti Natsyynal'noi akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2024, vol. 21, no. 1, pp. 62–67 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-1-62-67>

Введение. По данным ВОЗ, туберкулез (ТБ), микобактериями которого инфицирована четверть населения мира, остается одной из 10 основных причин смерти (Global tuberculosis report 2020. Geneva: World Health Organization, 2020). В связи с этим остро стоит проблема своевременной диагностики, оценки степени распространенности процесса, развития осложнений и эффективности лечения такого наиболее частого осложнения, развивающегося при всех гранулематозных и негранулематозных воспалениях, как фиброз.

Общеизвестно, что в основе физиологических и патологических процессов лежит ремоделирование внеклеточного матрикса (ВКМ) в органах и тканях человека и животных, при котором наблюдается количественное и качественное изменение одного из его ключевых компонентов, а именно коллагена. Обмен коллагенов изучают по их маркерам синтеза и деградации [1–3]. При необходимости изучения общего содержания коллагенов прибегают к определению аминокис-

лоты – гидроксипролина (ГОП), используя для этого один из методов из огромного спектра методических подходов [1, 4–7]. Оценка интенсивности обмена коллагенов при ТБ по-прежнему остается актуальной [8], поскольку от его характера зависит «полноценность» процесса заживления (рассасывание, фиброз, склерозирование на фоне проводимой химиотерапии), которая и определяет качество жизни пациентов.

Цель работы – изучение обмена коллагенов у мышей с экспериментальным туберкулезным воспалением с помощью усовершенствованного метода определения фракций гидроксипролина.

Материалы и методы исследования. Для исследования обмена коллагенов в органах животных за основу был взят метод щелочного гидролиза N. J. Siddiqi [4], в который внесли определенные изменения. В частности, 10-кратно уменьшили изначальный объем супернатанта (с 500 до 50 мкл) и количество этанола для экстракции (с 2 мл до 200 мкл), сократили время гидролиза (с 3–4 ч до 30 мин). Этапы нейтрализации, окисления до пиррол-2-карбоновой кислоты и окрашивания продуктов окисления ГОП проводили согласно методике К. А. Athanasiou с соавт. [7]. Добавление соляной кислоты для нейтрализации оказалось целесообразным, поскольку повысило конечное содержание ГОП и чувствительность анализа [6, 9]. Эти изменения позволили сократить необходимое время для определения содержания фракций ГОП, уменьшить расход реактивов, повысить чувствительность, что сделало методику более доступной.

Исследование выполнено на 2-месячных мышках-самцах линии BALB/c массой 18–22 г, находившихся в стандартных лабораторных условиях со свободным доступом к питьевой воде и корму. Животные были разделены на две группы, по 5 мышей в каждой: 1-я группа – интактные животные, 2-я – БЦЖ-инфицированные. БЦЖ-индуцированное гранулематозное воспаление воспроизводили путем однократного введения вакцины БЦЖ в ретроорбитальный синус из расчета 0,5 мг микробных тел в 0,2 мл 0,85%-ного раствора NaCl. Исследование выполнено в соответствии с принципами гуманности, изложенными в Хельсинкской декларации и в «Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977).

По истечении 5 мес. мышей выводили из эксперимента путем дислокации шейных позвонков под легким эфирным наркозом. Выделенные органы мышей (печень, легкие, селезенка) промывали в 0,9%-ном растворе NaCl (+4 °C), взвешивали, измельчали при 20 500 об/мин с помощью гомогенизатора Ultra Turrax T 10 Standart (IKA, Германия) и готовили на льду 10%-ный гомогенат на 0,9%-ном растворе NaCl (вес/объем). После фильтрования через капроновую ткань к аликвоте гомогената добавляли 0,1%-ный раствор Тритона X-100 (1:1), центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин, замораживали полученный супернатант и хранили при температуре –70 °C до момента использования.

В пробирки типа Eppendorf с 50 мкл полученного супернатанта трехкратно добавляли по 200 мкл 97%-ного этанола и каждый раз центрифугировали (10 мин при 3000 об/мин). Отдельно в пробирках высушивали супернатант (А) и осадок (Б) при +50 °C, а затем растворяли в 200 мкл дистиллированной воды. Отбирали по 80 мкл из пробирки (А) в 1-ю пробирку (свободный ГОП – свГОП) и во 2-ю пробирку (свГОП + пептидно-связанный ГОП (пепГОП)), из пробирки (Б) – в 3-ю пробирку (белково-связанный ГОП – белГОП) и во все пробирки добавляли по 80 мкл 4 N NaOH. Содержимое 2-й и 3-й пробирок подвергали термической обработке (30 мин при +120 °C), после чего охлаждали до комнатной температуры. Далее в каждую пробирку вносили по 80 мкл 4 N HCl для нейтрализации. В последующем добавляли по 500 мкл приготовленного *ex tempore* 0,062 М раствора хлорамина Т и оставляли пробирки на 20 мин при комнатной температуре. По окончании окисления приливали по 500 мкл приготовленного *ex tempore* 1 М реактива Эрлиха и сразу перемешивали согласно рекомендации [7] во избежание расслоения реактивов. Затем для образования хромофора пробирки нагревали 20 мин на водяной бане WB-4MS (Biosan, Латвия) при +65 °C и охлаждали при комнатной температуре.

Измерение оптической плотности проб проводили на спектрофотометре PD-303S (Arel, Япония) в кювете с длиной оптического пути 1 см при $\lambda = 550$ нм против контроля дистиллированной воды. В качестве стандарта использовали раствор ГОП (0–50 мкг ГОП/мл). Содержание ГОП

рассчитывали с помощью стандартной кривой с пересчетом на массу сухой ткани всего органа. По разности содержания ГОП во 2-й и 1-й пробирках определяли содержание пепГОП.

Для статистической обработки полученных результатов использовали пакет прикладных программ Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Результаты исследования были проверены на нормальность распределения с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Поскольку в большинстве случаев распределение признаков в выборках не подчинялось закону нормального распределения, использовали непараметрический метод, учитывая медиану (Me [25-й; 75-й перцентиль]). Для проверки статистической гипотезы разности значений для двух независимых переменных применяли *U*-критерий Манна–Уитни. Критическим уровнем значимости при проверке статистической гипотезы принимали $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В печени мышей 2-й группы по сравнению с данными животных 1-й группы отмечено повышенное (в 1,3 раза) содержание белГОП (см. таблицу), что и определило высокое содержание общего ГОП (обГОП) во 2-й группе инфицированных мышей. Различий в содержании других фракций ГОП (свГОП и пепГОП) не выявлено.

Содержание гидроксипролина (мкг ГОП/мг сухой ткани) в органах мышей при туберкулезном воспалении
Hydroxyproline content (μg Hyp/mg of dry tissue) in the organs of mice with tuberculous inflammation

Орган	Фракция ГОП	Группа животных		<i>p</i>
		Интактные	БЦЖ	
Печень	свГОП	165,85 [84,77; 182,81]	158,98 [99,04; 182,51]	–
	пепГОП	176,22 [106,85; 272,76]	260,90 [155,50; 448,81]	–
	белГОП	288,57 [236,29; 315,42]	361,55 [332,73; 393,21]	0,010
	обГОП	577,14 [520,99; 704,66]	774,54 [721,64; 893,58]	0,014
Легкие	свГОП	5,99 [3,11; 11,45]	6,76 [5,99; 9,61]	–
	пепГОП	16,83 [12,27; 18,00]	32,43 [27,22; 37,58]	0,0005
	белГОП	14,40 [12,70; 18,47]	39,82 [32,83; 40,70]	0,0005
	обГОП	34,99 [32,47; 44,65]	78,00 [67,25; 87,18]	0,0005
Селезенка	свГОП	6,27 [4,04; 9,24]	9,65 [6,12; 13,92]	–
	пепГОП	12,60 [11,45; 16,10]	22,33 [15,55; 27,48]	0,050
	белГОП	15,00 [11,57; 18,34]	23,07 [14,13; 25,00]	–
	обГОП	34,91 [27,06; 43,15]	57,89 [35,79; 64,97]	–

П р и м е ч а н и е. Результаты исследования представлены в виде Me [25-й; 75-й перцентиль], свГОП – свободный гидроксипролин (ГОП), пепГОП – пептидно-связанный ГОП, белГОП – белково-связанный ГОП, обГОП – общий ГОП.

В легких мышей 2-й группы наблюдали повышенное содержание пепГОП (в 2 раза) и белГОП (в 2,4 раза) относительно данных 1-й группы (см. таблицу), что обеспечило соответствующее повышение обГОП в органе. Как и в печени, содержание свГОП не отличалось от такового у мышей 1-й группы.

В селезенке мышей 2-й группы содержание пепГОП было повышено в 1,6 раза по сравнению с аналогичным показателем у мышей 1-й группы (см. таблицу). Значимых различий в содержании белГОП и обГОП относительно данных 1-й группы не отмечено. Содержание свГОП в селезенке мышей 2-й группы, как и в двух других органах, не отличалось от его уровня у мышей 1-й группы (см. таблицу).

Известно, что содержание свГОП в биологическом материале отражает деградацию коллагенов, пепГОП – скорость биологического оборота коллагенов [3], тогда как белГОП – синтез коллагенов. Таким образом, фракции ГОП позволяют судить о характере изменения обмена коллагенов.

При этом повышенное содержание ГОП в сыворотке крови свидетельствует об увеличении его количества в ВКМ внутренних органов и отражает выраженность фиброза [1]. Показано, что

снижение содержания белГ ОП в плазме крови пациентов с множественной лекарственной устойчивостью детерминирует благоприятное течение ТБ [8].

Недавно были получены результаты исследования ГОП в сыворотке крови мышей линии BALB с БЦЖ-гранулематозом описанным выше методом [10]. Оказалось, что содержание пепГОП ($0,28 \pm 0,04$ мкг/мл) в 3,5 раза выше, чем у интактных животных ($0,08 \pm 0,02$ мкг/мл, $p = 0,002$). Уровень свГОП у инфицированных мышей в сыворотке крови, как и в представленных выше органах, не отличался от такового у интактных животных. Однако, несмотря на отсутствие межгрупповых различий, содержание свГОП в сыворотке крови мышей с БЦЖ-гранулематозом положительно коррелировало с его уровнем в печени ($r = 0,90$, $p = 0,040$) и легких ($r = 0,90$, $p = 0,037$) инфицированных мышей. Полученные корреляции согласуются с предположением о взаимосвязи уровня ГОП в сыворотке крови и содержанием коллагена в органах [1].

При оценке содержания ГОП методом кислотного гидролиза, описанного в предыдущей работе [11], в органах инфицированных мышей с БЦЖ-гранулематозом (2-я группа) нами были получены меньшие значения ГОП: в печени – в 4 раза ниже ($200,61 \pm 87,28$ мкг ГОП/мг сухой ткани, $p = 0,0005$), в легких – в 1,2 раза ниже ($63,46 \pm 25,35$ мкг ГОП/мг сухой ткани), в селезенке – в 1,03 раза ниже ($50,36 \pm 9,46$ мкг ГОП/мг сухой ткани), чем при использовании метода щелочного гидролиза ($800,99 \pm 95,87$; $77,37 \pm 10,54$ и $51,88 \pm 15,89$ мкг ГОП/мг сухой ткани соответственно). В то же время в другом исследовании при определении содержания коллагена в печени свиней не выявлено зависимости от способа гидролиза [6].

Оценка фракций ГОП и их соотношения позволяет не только определить характер обмена коллагенов при физиологических и патологических состояниях, но и использовать их для уточнения выраженности фиброза. Поскольку содержание белГОП отражает синтез, а свГОП – деградацию коллагенов, их отношение могло бы отражать выраженность фиброза. Расчет соотношения белГОП/свГОП у мышей 2-й группы показал, что в легких оно составило 5,0, в печени – 2,5, в селезенке – 2,0, что свидетельствует о разной степени выраженности фиброза и органоспецифичности фиброгенеза при БЦЖ-индуцированном гранулематозе.

Таким образом, обмен коллагенов в органах мышей при туберкулезном воспалении отличается от такового у интактных животных. Об этом свидетельствуют повышенное содержание белГОП, пепГОП и обГОП в легких, белГОП и обГОП в печени, пепГОП в селезенке и отсутствие различий в содержании свГОП во всех трех органах. Такое распределение фракций ГОП отражает преобладание синтеза коллагенов и подавление деградации, что приводит к избыточному депонированию фиброзной ткани. В легких инфицированных мышей фиброз был более выражен, чем в печени и селезенке.

Аналогичные результаты были получены ранее индийскими учеными [12]. Используя метод кислотного гидролиза, авторы продемонстрировали более выраженный фиброз в легких морских свинок с ТБ (штамм H37Rv) относительно интенсивности этого процесса в печени и селезенке.

Одной из причин усиленного фиброгенеза при ТБ рассматривают повышенную экспрессию коллагенов I и III типов в ткани легкого [13]. Определенную роль при ТБ легких отводят фактору некроза опухоли- α (его экспрессия повышается параллельно с содержанием ГОП [11]), а также стимуляции пролиферации фибробластов в зоне поражения, которая подтверждается повышением уровня аутоантител к коллагену I и III типов в сыворотке крови [14]. При фиброгенезе у мышей с БЦЖ-гранулематозом имеет значение индукция эпителиально-мезенхимального перехода и активация профибротических процессов, связанная с усилением экспрессии цепи $\alpha 1$ коллагена III типа и трансформирующего ростового фактора β в ткани легкого [15].

Заключение. Примененный нами метод щелочного гидролиза для изучения обмена коллагенов по содержанию отдельных фракций ГОП прост в использовании, не требует большого объема биологического материала и менее продолжителен по времени по сравнению с методом кислотного гидролиза. Для корректной оценки содержания отдельных фракций ГОП были внесены описанные выше изменения, позволившие устранить технические ограничения. Увеличение выхода измеряемого аналита обеспечил введенный этап нейтрализации.

Использование усовершенствованного метода показало, что развитие фиброза в органах мышей с БЦЖ-индуцированным гранулематозом связано с повышенным синтезом коллагенов (пепГОП и/или белГОП) относительно их деградации (свГОП). Наиболее выраженный фиброз был в легких инфицированных мышей. Данный способ может быть рекомендован для изучения процессов фиброгенеза и фибролиза не только при туберкулезном воспалении, но и при других патологических процессах, в патогенезе которых ВКМ играет ключевую роль.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания № 122032300155-4 с использованием оборудования ЦКП «Современные оптические системы».

Acknowledgements. The work was carried out within the framework of state assignment No. 122032300155-4 using the equipment of the Center for Shared Use “Modern Optical Systems”.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Hydroxyproline as a biomarker in liver disease / S. A. Gabr [et al.] // *Biomarkers in liver disease. Biomarkers in disease: methods, discoveries and applications.* – Dordrecht, 2016. – P. 471–491. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7742-2_26-1
2. The collagen suprafamily: from biosynthesis to advanced biomaterial development / A. Sorushanova [et al.] // *Adv. Mater.* – 2019. – Vol. 31, N 1. – P. e1801651. <https://doi.org/10.1002/adma.201801651>
3. Extracellular matrix markers and methods for their study (review) / E. V. Tush [et al.] // *CTM.* – 2019. – Vol. 11, N 2. – P. 133–147. <https://doi.org/10.17691/stm2019.11.2.20>
4. Siddiqi, N. J. Effect of sodium fluoride and magnesium chloride on different hydroxyproline fractions in rat liver / N. J. Siddiqi // *J. Biochem. Biophys.* – 2012. – Vol. 49, N 2. – P. 130–133.
5. Measurement of hydroxyproline in collagen with three different methods / B. Qiu [et al.] // *Mol. Med. Rep.* – 2014. – Vol. 10, N 2. – P. 1157–1163. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2267>
6. da Silva, C. M. L. Fast and sensitive collagen quantification by alkaline hydrolysis/hydroxyproline assay / C. M. L. da Silva, E. Spinelli, S. V. Rodrigues // *Food Chem.* – 2015. – Vol. 173. – P. 619–623. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.073>
7. Assaying for total collagen content. Articular cartilage / K. A. Athanasiou [et al.]. – 2nd ed. – Boca Raton, 2017. – P. 585–587.
8. Dynamics of aldosterone, connective tissue reorganization and glucose level as markers for tuberculosis treatment effectiveness / O. S. Shevchenko [et al.] // *Archives Balkan Med. Union.* – 2019. – Vol. 54, N 2. – P. 274–280. <https://doi.org/10.31688/ABMU.2019.54.2.08>
9. Способ определения фракций гидроксипролина в биологическом материале : пат. № 2735375 от 30.10.2020 / А. Н. Путятина, Г. С. Русских, Л. Б. Ким // *Изобретения. Полезные модели: офиц. бюл.* – 2020. – № 31.
10. Content of the major extracellular matrix components of the liver and lung in mice with chronic BCG-granulomatosis treated with liposome-encapsulated dextrazide / L. B. Kim [et al.] // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2021. – Vol. 170, N 4. – P. 453–457. <https://doi.org/10.1007/s10517-021-05086-7>
11. Fibrogenesis in granulomas and lung interstitium in tuberculous inflammation in mice / V. A. Shkurupiy [et al.] // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2014. – Vol. 156, N 6. – P. 731–735. <https://doi.org/10.1007/s10517-014-2435-y>
12. Jayasankar, K. Biochemical and histochemical changes relating to fibrosis following infection with *Mycobacterium tuberculosis* in the guinea pig / K. Jayasankar, V. D. Ramanathan // *Indian J. Med. Res.* – 1999. – Vol. 110. – P. 91–97.
13. Lung gene expression signatures suggest pathogenic links and molecular markers for pulmonary tuberculosis, adenocarcinoma and sarcoidosis / Q. Chai [et al.] // *Commun. Biol.* – 2020. – Vol. 3, N 1. – P. 604. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01318-0>
14. Тарасова, Л. Г. Особенности коллагенового обмена в сопоставлении с иммунологическим статусом у больных туберкулезом легких / Л. Г. Тарасова, Е. Н. Стрельцова // *Астрахан. мед. журн.* – 2016. – Т. 11, № 4. – С. 100–105.
15. Экспрессия генов белков, сопряженных с фибротическими процессами, в легких мышей при развитии туберкулезного воспаления / П. М. Кожин [и др.] // *Сибир. науч. мед. журн.* – 2019. – Т. 39, № 4. – С. 22–29.

References

1. Gabr S. A., Alghadir A. H., Sherif Y. E., Ghfar A. A. Hydroxyproline as a biomarker in liver disease. *Biomarkers in liver disease. Biomarkers in disease: methods, discoveries and applications.* Dordrecht, 2016, pp. 471–491. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7742-2_26-1
2. Sorushanova A., Delgado L. M., Wu Z., Shologu N., Kshirsagar A., Raghunath R. [et al.]. The collagen suprafamily: from biosynthesis to advanced biomaterial development. *Advanced Materials*, 2019, vol. 31, no. 1, p. e1801651. <https://doi.org/10.1002/adma.201801651>
3. Tush E. V., Eliseeva T. I., Khaletskaya O. V., Krasilnikova S. V., Ovsyannikov D. Yu., Potemina T. E., Ignatov S. K. Extracellular matrix markers and methods for their study (review). *CTM*, 2019, vol. 11, no. 2, pp. 133–147. <https://doi.org/10.17691/stm2019.11.2.20>

4. Siddiqi N. J. Effect of sodium fluoride and magnesium chloride on different hydroxyproline fractions in rat liver. *Journal of Biochemistry and Biophysics*, 2012, vol. 49, no. 2, pp. 130–133.
5. Qiu B., Wei F., Sun X., Wang X., Duan B., Shi C., Zhang J., Zhang J., Qiu W., Mu W. Measurement of hydroxyproline in collagen with three different methods. *Molecular Medicine Reports*, 2014, vol. 10, no. 2, pp. 1157–1163. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2267>
6. da Silva C. M. L., Spinelli E., Rodrigues S. V. Fast and sensitive collagen quantification by alkaline hydrolysis/hydroxyproline assay. *Food Chemistry*, 2015, vol. 173, pp. 619–623. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.073>
7. Athanasiou K. A., Darling E. M., Hu J. C., Reddi A. H. Assaying for total collagen content. *Articular cartilage*. 2nd ed. Boca Raton, 2017, pp. 585–587.
8. Shevchenko O. S., Todoriko L. D., Ovcharenko I. A., Radzishavska Ye. B., Shvets O. M., Ovcharenko S. S., Semianiv I. O., Vivsyannuk V. V. Dynamics of aldosterone, connective tissue reorganization and glucose level as markers for tuberculosis treatment effectiveness. *Archives of the Balkan Medical Union*, 2019, vol. 54, no. 2, pp. 274–280. <https://doi.org/10.31688/ABMU.2019.54.2.08>
9. Putyatina A. N., Russkikh G. S., Kim L. B. Method of determining fractions of hydroxyproline in biological material. Patent no. 2735375 (30.10.2020). *Izobreteniya. Poleznye modeli: ofitsial'nyi byulleten'* [Inventions. Utility models: official bulletin], 2020, no. 31 (in Russian).
10. Kim L. B., Putyatina A. N., Russkikh G. S., Shkurupy V. A. Content of the major extracellular matrix components of the liver and lung in mice with chronic BCG-granulomatosis treated with liposome-encapsulated dextrazide. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2021, vol. 170, no. 4, pp. 453–457. <https://doi.org/10.1007/s10517-021-05086-7>
11. Shkurupiy V. A., Kim L. B., Potapova O. V., Cherdantseva L. A., Putyatina A. N., Nikonova I. K. Fibrogenesis in granulomas and lung interstitium in tuberculous inflammation in mice. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2014, vol. 156, no. 6, pp. 731–735. <https://doi.org/10.1007/s10517-014-2435-y>
12. Jayasankar K., Ramanathan V. D. Biochemical and histochemical changes relating to fibrosis following infection with *Mycobacterium tuberculosis* in the guinea pig. *Indian Journal of Medical Research*, 1999, vol. 110, pp. 91–97.
13. Chai Q., Lu Z., Liu Z., Zhong Y., Zhang F., Qiu C., Li B., Wang J., Zhang L., Pang Y., Liu C. H. Lung gene expression signatures suggest pathogenic links and molecular markers for pulmonary tuberculosis, adenocarcinoma and sarcoidosis. *Communications Biology*, 2020, vol. 3, no. 1, p. 604. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01318-0>
14. Tarasova L. G., Strel'tsova E. N. Features of collagen exchange as compared to immunological status of patients with pulmonary tuberculosis. *Astrahanskii meditsinskii zhurnal* [Astrakhan medical journal], 2016, vol. 11, no. 4, pp. 100–105 (in Russian).
15. Kozhin P. M., Chechushkov A. V., Zaitseva N. S., Khrapova M. V., Cherdantseva L. A., Men'shchikova E. B., Troitskii A. V., Shkurupiy V. A. Expression of protein genes participating in fibroplastic processes in mice lung during the development of tuberculous inflammation. *Sibirskii nauchnyi meditsinskii zhurnal* [Siberian scientific medical journal], 2019, vol. 39, no. 4, pp. 22–29 (in Russian).

Информация об авторах

Пуятіна Анна Ніколаевна – канд. мед. навук, науч. супрадуінік. Федэральны ісследаватэльский цэнтр фундаментальнай і трансляцыйнай медыцыны (ул. Тімакова, 2, 630117, г. Навосібірск, Расійская Федэрацыя). <https://orcid.org/0000-0001-9599-3049>. E-mail: putyatina@ngs.ru

Кім Лена Борісовна – д-р мед. навук, гл. науч. супрадуінік, рукаводітель групы. Федэральны ісследаватэльский цэнтр фундаментальнай і трансляцыйнай медыцыны (ул. Тімакова, 2, 630117, г. Навосібірск, Расійская Федэрацыя). <http://orcid.org/0000-0002-4051-8854>. E-mail: lbkim@frcftm.ru

Русскіх Галіна Сержеевна – канд. біол. навук, ст. науч. супрадуінік. Федэральны ісследаватэльский цэнтр фундаментальнай і трансляцыйнай медыцыны (ул. Тімакова, 2, 630117, г. Навосібірск, Расійская Федэрацыя). <http://orcid.org/0000-0003-1565-5248>. E-mail: russkikh_g@mail.ru

Information about the authors

Anna N. Putyatina – Ph. D. (Med.), Researcher. Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine (2, Timakov Str., 630117, Novosibirsk, Russian Federation). <https://orcid.org/0000-0001-9599-3049>. E-mail: putyatina@ngs.ru

Lena B. Kim – D. Sc. (Med.), Chief Researcher, Head of the group. Research Center of Fundamental and Translational Medicine (2, Timakov Str., 630117, Novosibirsk, Russian Federation). <http://orcid.org/0000-0002-4051-8854>. E-mail: lbkim@frcftm.ru

Galina S. Russkikh – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. Research Center of Fundamental and Translational Medicine (2, Timakov Str., 630117, Novosibirsk, Russian Federation). <http://orcid.org/0000-0003-1565-5248>. E-mail: russkikh_g@mail.ru

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 616.858-08:602.9]-036.8

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-1-68-78>

Поступила в редакцию 15.08.2023

Received 15.08.2023

В. А. Чижик, М. М. Селицкий, В. В. Пономарев¹

*Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения
УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь*

ЭФФЕКТИВНОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ ПЕРВИЧНОГО И ПОВТОРНОГО КУРСОВ ТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА АУТОЛОГИЧНЫМИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ В ДОЛГОСРОЧНОМ ПЕРИОДЕ

Аннотация. Болезнь Паркинсона (БП) – это хроническое неуклонно прогрессирующее заболевание. Лечение БП в настоящее время носит симптоматический характер. Одним из перспективных направлений в разработке терапии, изменяющей течение БП, является использование аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК). Несмотря на обнадеживающие результаты различных доклинических и клинических испытаний в отношении эффективности клеточной терапии и ее доказанную безопасность, остаются открытыми такие вопросы клеточной терапии, как выбор оптимального пути введения, дозы и частоты курсов лечения.

В настоящем исследовании проведена оценка динамики моторных и немоторных проявлений БП после первого и второго курсов клеточной терапии с использованием ММСК системным и тандемным методами в долгосрочном периоде наблюдения. Выявлен положительный эффект клеточной терапии на динамику моторных и немоторных симптомов у пациентов с БП в течение в среднем 6 мес. после проведения одного курса лечения ММСК. Повторный курс лечения ММСК имеет схожую с первым курсом эффективность и безопасность и может быть применен для замедления прогрессирования БП на более длительный срок.

Ключевые слова: аутологичные мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, болезнь Паркинсона, долгосрочный период клеточной терапии, повторные курсы клеточной терапии, моторные симптомы, немоторные симптомы

Для цитирования: Чижик, В. А. Эффективность и безопасность первичного и повторного курсов терапии болезни Паркинсона аутологичными мезенхимальными стромальными клетками в долгосрочном периоде / В. А. Чижик, М. М. Селицкий, В. В. Пономарев // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2024. – Т. 21, № 1. – С. 68–78. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-1-68-78>

Veranika A. Chyzyk, Mikhail M. Sialitski, Vladimir V. Ponomarev

*Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of Educational Institution
“Belarusian State Medical University”, Minsk, Republic of Belarus*

EFFICACY AND SAFETY OF PRIMARY AND REPEATED THERAPY COURSES OF PARKINSON’S DISEASE WITH AUTOLOGOUS MESENCHYMAL STROMAL CELLS IN THE LONG-TERM PERIOD

Abstract. Parkinson’s disease (PD) is a chronic progressive disease. Currently, PD treatment is symptomatic. One of the promising directions changing the PD therapy course is the use of autologous multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs). Despite the encouraging results in various preclinical and clinical trials and proven safety, the cell therapy questions remain open, such as the choice of an optimal route of administration, dose, and frequency of treatment courses.

In the present study, the dynamics of PD motor and non-motor symptoms was assessed after the first and second cell therapy courses using MMSC injections via systemic and tandem methods during a long-term period. A positive therapy effect on the dynamics of motor and non-motor symptoms in patients with PD was revealed for an average of 6 months after one MMSC treatment course. The repeated MMSC treatment course has similar efficacy and safety to the first course and can be used to slow down the PD progression for a longer period.

Keywords: autologous multipotent mesenchymal stromal cells, Parkinson’s disease, long-term period, repeated cell therapy courses, motor symptoms, non-motor symptoms

For citation: Chyzyk V. A., Sialitski M. M., Ponomarev V. V. Efficacy and safety of primary and repeated therapy courses of Parkinson’s disease with autologous mesenchymal stromal cells in the long-term period. *Vesti Natsyyanal’nai akademii nauk Belarusi. Seryya medytsynskikh nauk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2024, vol. 21, no. 1, pp. 68–78 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-1-68-78>

Введение. Болезнь Паркинсона (БП) – это хроническое неуклонно прогрессирующее заболевание, которое приводит к тяжелым двигательным нарушениям, социальным ограничениям и снижению качества жизни пациента [1]. В основе патогенеза БП лежит формирование замкнутого патологического круга, в котором под воздействием различных этиологических факторов запускаются процессы нейродегенерации и нейровоспаления. Из поврежденных нейронов высвобождаются агрегаты α -синуклеина и нейромеланина, поддерживающие провоспалительную активацию микроглии, которая, в свою очередь, усиливает синтез нейротоксических факторов. Таким образом, этот процесс становится непрерывным, прогрессирующим и выходит за пределы ЦНС [2].

В классическом описании развития клинических проявлений БП главная роль отводится нарастанию двигательного дефицита и появлению характерных моторных симптомов: олигобрадикинезии, мышечной ригидности, тремора покоя, постуральной неустойчивости [3]. Однако для данного заболевания, помимо моторных проявлений, характерно наличие широкого круга немоторных симптомов: психических, вегетативных и сенсорных нарушений, расстройства сна [4].

Согласно современным данным, применяемая при БП заместительная или симптоматическая терапия не оказывает влияния на течение заболевания [5]. Одним из перспективных векторов в разработке терапии, изменяющей течение БП, является использование клеточных технологий. Применение аутологических мезенхимальных мультипотентных стволовых клеток (ММСК) имеет ряд преимуществ перед другими клеточными продуктами, подробно изложенных в специализированных научных источниках, и является многообещающим направлением клеточной терапии БП. Многочисленные исследования на экспериментальных моделях синдрома паркинсонизма продемонстрировали положительный терапевтический эффект ММСК [6, 7]. Несмотря на обнадеживающие результаты в отношении эффективности клеточной терапии в различных доклинических и клинических испытаниях и ее доказанную безопасность, некоторые вопросы остаются открытыми. Путь введения, доза и частота курсов терапии широко варьируются между отдельными исследованиями. Предварительные результаты клинической фазы исследования, начатой в рамках выполнения НИОК(Т)Р по заданию 19.17 «Разработать и внедрить метод терапии болезни Паркинсона с использованием клеточных технологий» подпрограммы «Трансплантация клеток, органов и тканей» ГНТП «Новые методы оказания медицинской помощи» (№ государственной регистрации 20171292) с ноября 2018 г. и продолжающейся по настоящее время на базе учреждения здравоохранения «5-я городская клиническая больница» (УЗ 5ГКБ), продемонстрировали снижение выраженности моторных и немоторных симптомов заболевания в краткосрочном периоде наблюдения и угасание терапевтического эффекта ММСК в долгосрочном периоде наблюдения [8].

В нескольких научных публикациях сообщается о позитивных результатах после многократных курсов ММСК у пациентов с различными заболеваниями нервной системы [9–12]. Пик клинического улучшения после введения клеточной суспензии у пациентов наступает через 1–3 мес. [9–11]. Поэтому повторные дозы, как сообщается в исследовании Vaquero с соавт., рекомендуются для достижения более благоприятного клинического эффекта [13]. Описанные результаты послужили теоретическим базисом для проведения повторного курса терапии ММСК пациентам с БП после угасания эффекта от первого курса. В настоящее время клеточная терапия повторно проведена 10 пациентам с БП.

Цель настоящего исследования – оценка динамики моторных и немоторных проявлений болезни Паркинсона после первого и второго курсов клеточной терапии с использованием аутологических мезенхимальных мультипотентных стволовых клеток в долгосрочном периоде наблюдения.

Материалы и методы исследования. В исследование было включено 36 пациентов с БП, из них 22 мужчины и 14 женщин, медианный возраст составил 53,0 [47,0–63,0] года, продолжительность заболевания – 6,0 [5,0–7,0] года. Тяжесть заболевания пациентов по шкале Hoehn & Yahr – 2,0 [2,0–2,5] стадия. У 25 (69,4 %) пациентов имелась ригидно-дрожательная форма БП, у 10 (27,8 %) – акинетико-ригидная, у 1 (2,8 %) пациента – преимущественно дрожательная форма. Все пациенты добровольно подписали информированное согласие до включения в исследование.

Оценку когнитивных функций и заполнение опросников проводили в первой половине дня после приема противопаркинсонических препаратов. Исследование выполнено на базе учреждения здравоохранения УЗ 5ГКБ г. Минска, было одобрено главным врачом учреждения и независимым этическим комитетом Института повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения УО «Белорусский государственный медицинский университет».

Распределение пациентов по группам осуществлялось методом рандомизации по полу, возрасту и длительности заболевания. В основную группу 1 (ОГ1) вошли 13 пациентов, которым был проведен один курс клеточной терапии. Соотношение по полу (М:Ж) в данной группе составило 7:6, медианный возраст – 53,0 [45,0–57,0] года, длительность заболевания – 6,0 [4,0–7,0] года, тяжесть заболевания по шкале Hoehn & Yahr – 2,0 [2,0–3,0] стадия. В основную группу 2 (ОГ2) было включено 10 пациентов, прошедших терапию ММСК повторно через 9–36 мес. после первого курса лечения. Соотношение М:Ж в этой группе составило 7:3, медианный возраст – 50,0 [45,0–62,0] года, длительность заболевания – 5,0 [5,0–7,5] года, тяжесть заболевания по шкале Hoehn & Yahr – 2,0 [2,0–2,0] стадия.

Группу сравнения (ГС) составили 13 пациентов (М:Ж – 8:5) с диагнозом БП. Медианный возраст – 58,0 [49,0–66,0] года, длительность заболевания – 6,0 [5,0–7,0] года, тяжесть заболевания по шкале Hoehn & Yahr – 2,0 [2,0–2,0] стадия.

Статистически значимых различий по полу, возрасту, длительности и тяжести заболевания между тремя группами не выявлено ($p > 0,05$ согласно U -критерию Mann–Whitney).

Клиническое обследование пациентов на этапе отбора как для первого, так и для второго курса терапии ММСК включало уточнение жалоб, сбор анамнеза, неврологический осмотр, нейровизуализацию (КТ и МРТ 1,5 Тл) и общеклинические исследования. Диагноз БП у всех участников исследования устанавливали в соответствии с всемирно признанными критериями диагностики, разработанными Банком головного мозга Общества болезни Паркинсона Великобритании [14]. Тяжесть заболевания оценивалась по шкале Hoehn & Yahr в модификации Lindvall с соавт. (1989) [15].

Критерии включения: 1) диагноз БП, установленный в соответствии с общепринятыми критериями; 2) тяжесть заболевания по шкале Hoehn & Yahr: 1,5–3,0 стадия; 3) положительный ответ на лечение препаратами леводопы (дофаминовый тест – не менее 30 % разницы по сумме баллов в периоды выключения и включения III раздела шкалы UPDRS); 4) длительность заболевания – не более 10 лет; 5) возраст пациентов – до 69 лет.

Следует отметить, что у всех участников исследования до первого введения клеточной суспензии ММСК установлен быстрый либо умеренный темп прогрессирования заболевания, со сменой стадий не менее чем 1 раз в 5 лет.

Противопоказаниями к проведению клеточной терапии БП являлись: заболевания, протекающие с синдромом паркинсонизма или паркинсонизма-плюс; тяжелые сопутствующие заболевания (застойная сердечная недостаточность, инфаркт миокарда, пневмония, декомпенсированный сахарный диабет, кахексия и др.); аутоиммунные и онкологические заболевания; склонность к кровотечениям и сепсис в анамнезе; обострение хронического воспалительного процесса носовых пазух и полости рта; положительный результат на ВИЧ, гепатит В (HBV), гепатит С (HCV), сифилис (RW); когнитивный дефицит (Монреальская когнитивная оценка (МОСА) < 26); психические расстройства – галлюцинации, расстройства поведения; депрессия выраженной степени (не более 19 баллов по шкале Гамильтона); алкоголизм, наркомания, уголовная ответственность в анамнезе пациента; беременность, период лактации.

Первый курс терапии ММСК проведен пациентам ОГ1 и ОГ2 двумя методами:

а) системный (внутривенный) метод введения: суммарную дозу клеток ($Me = 44,0 [28,9–55,3]$, что составило для обеих групп 0,5–1,0 млн/кг массы тела пациента) вводили в 10,0 мл приготовленного раствора внутривенно медленно в два-три этапа с интервалом 7 дней;

б) метод тандемного введения: суспензию аутологичных ММСК в дозе $Me_{ор1} = 11,3 [9,7–13,0] \cdot 10^6$ клеток, $Me_{ор2} = 10,0 [10,0–10,7] \cdot 10^6$ клеток в 5,0 мл приготовленного раствора вводили трансназально в подслизистый слой зоны обонятельного эпителия с обеих сторон. Через 7 дней производилась инъекция ММСК в дозе $Me_{ор1} = 44,1 [22,2–63,3] \cdot 10^6$ клеток, $Me_{ор2} = 41,0 [35,0–67,9] \cdot 10^6$ клеток

в 10,0 мл приготовленного раствора внутривенно медленно в один-два приема с интервалом в неделю. В ОГ1 у 5 участников исследования применен системный метод, у 8 – тандемный, в ОГ2 у 1 пациента использован системный метод, у 9 – тандемное введение. Выбор между системным и тандемным методом определялся индивидуально с учетом противопоказаний. Пациентам ГС тандемным методом осуществлялось введение 0,9%-ного физиологического раствора (плацебо). Статистически значимых различий по дозе ММСК на 1 кг массы тела между пациентами ОГ1 и ОГ2 не выявлено ($p > 0,05$ согласно U -критерию Mann–Whitney).

Второй курс клеточной терапии проведен пациентам ОГ2 через 9–36 мес. тандемным методом в дозе $Me_{2or2} = 10,0 [10,0–10,0] \cdot 10^6$ для интраназальной инъекции и $Me_{2or2} = 40,9 [35,5–64,9] \cdot 10^6$ клеток для внутривенного введения. Статистически значимые различия по дозам ММСК в сравнении с первым курсом лечения отсутствовали ($p > 0,05$ согласно U -критерию Mann–Whitney).

Мониторинг клинико-неврологического статуса участников исследования осуществляли до первой инъекции (День 0) и через 1, 3, 6, 9, 12 мес. (М1, М3, М6, М9, М12). Для ОГ2 проводились осмотры перед началом второго курса терапии (День 2-0) и через 1, 3, 6 мес. после ее осуществления (М2-1, М2-3, М2-6). Степень выраженности моторных проявлений БП оценивали по Разделу III Единой рейтинговой шкалы болезни Паркинсона (UPDRS) Международного общества двигательных расстройств (2008). Оценка двигательных функций проводилась в период выключения после 12–24-часового перерыва в приеме противопаркинсонических препаратов (off-период). Затем участников исследования повторно тестировали по данной шкале в периоде включения через 1 ч после приема противопаркинсонических средств (on-период). Выраженность немоторных симптомов устанавливали с помощью шкал HDRS (шкала оценки депрессии Гамильтона) и NMS (шкала немоторных симптомов).

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью непараметрических методов статистики (использовали программы MS Excel и Statistica 8). Полученные результаты представлены в медианах (Me) с интерквартильным интервалом (25–75-й процентиля – Q25–Q75), их статистическая значимость подтверждалась при $p < 0,05$. Для сравнения трех групп и определения статистической значимости различий использовали непараметрические критерии Mann–Whitney и Wilcoxon.

Результаты исследования. При оценке моторных симптомов БП у пациентов ГС, получивших курс плацебо-терапии, через 3 мес. (М3) выявлено статистически значимое нарастание двигательных нарушений ($Me_{ГСМ3} = 33,0 [29,0–40,0]$) и увеличение медианы на 6 баллов (24 %) в off-периоде UPDRS по сравнению с исходными данными ($Me_{ГСМО} = 28,0 [27,0–33,0]$) ($p_{0-3off} = 0,01$). Спустя 6, 9 мес. наблюдалось дальнейшее статистически значимое нарастание двигательного дефицита ($Me_{ГСМ6} = 33,0 [32,0–41,0]$; $Me_{ГСМ9} = 35,0 [32,0–41,0]$) ($p < 0,004$) в периоде выключения, достигшее максимальной выраженности к концу 12-го месяца наблюдения ($Me_{ГСМ12} = 37,0 [33,0–43,0]$). В периоде включения значимое ухудшение моторных функций у участников исследования ГС зафиксировано через 6, 9 и 12 мес. после введения плацебо ($p < 0,05$). Таким образом, в долгосрочном периоде наблюдения у пациентов ГС наблюдается постепенное снижение показателей моторной функции как в периоде выключения, так и в периоде включения, что является закономерным для естественного течения БП. Полученные данные схематично представлены в табл. 1.

У пациентов ОГ1 выявлено статистически значимое уменьшение степени выраженности моторных симптомов через 1, 3 и 6 мес. после введения ММСК по сравнению с исходными данными в День 0 ($p_{0-1off} = 0,005$, $p_{0-3off} = 0,008$, $p_{0-6off} = 0,04$) в периоде выключения и в точках М1 и М3 в периоде включения ($p_{0-1on} = 0,005$, $p_{0-3on} = 0,03$). Однако при оценке двигательных нарушений спустя 9 и 12 мес. после терапии ММСК статистически значимых изменений по сравнению с результатами, полученными в Д0, не обнаружено. Схожие изменения двигательных функций наблюдались и у участников исследования из группы ОГ2 после первого курса клеточной терапии. Таким образом, положительное влияние одного курса клеточной терапии на моторную активность пациента с БП длилось около 6 мес., затем происходило постепенное возвращение на уровень Д0. Однако следует отметить, что по прошествии 12 мес. в ОГ1 и ОГ2 не зафиксировано значимого прогрессирования моторного дефицита, в отличие от ГС. Полученные данные представлены в табл. 1.

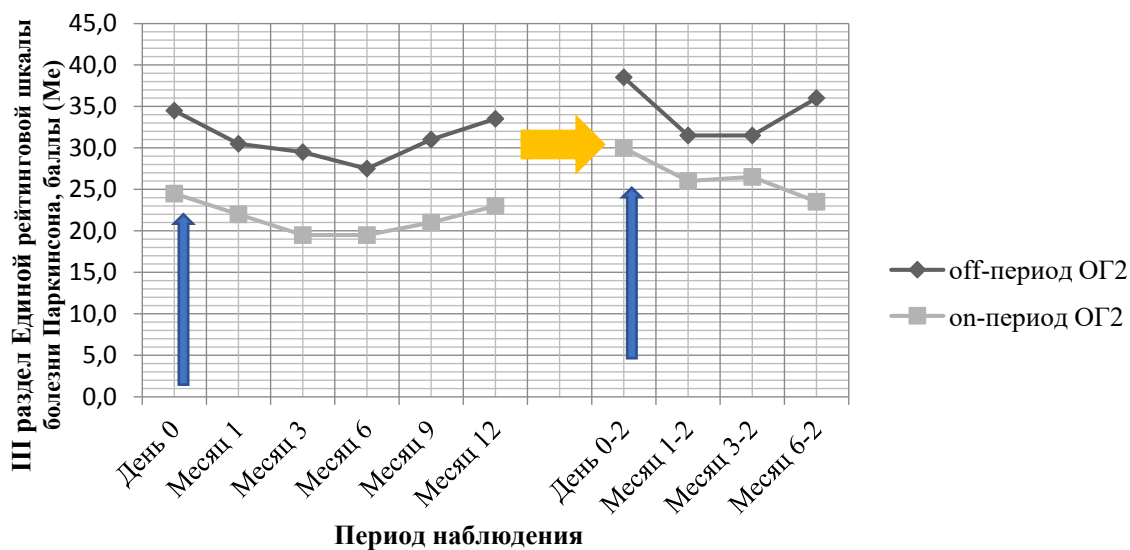
Т а б л и ц а 1. Динамика моторных симптомов у пациентов до и после первого курса клеточной терапии ММСК/плацебо (согласно Разделу III Единой рейтинговой шкалы болезни Паркинсона), Ме (Q25–Q75)

T a b l e 1. Dynamics of the motor symptoms before and after the first course of MMSC/placebo cell therapy (According to Section III of the Parkinson Disease Unified Rating Scale), Me (Q25–Q75)

Группа	Период наблюдения	День 0 (1)	Месяц 1 (2)	Месяц 3 (3)	Месяц 6 (4)	Месяц 9 (5)	Месяц 12 (6)	Статистическая значимость различий (Wilcoxon test)
ОГ1 (n = 13)	Период выключения	38,0 [27,0–57,0]	36,0 [27,0–52,0]	30,0 [27,0–44,0]	32,0 [26,0–42,0]	39,5 [27,0–50,0]	45,5 [37,0–58,0]	$p_{1-2} = 0,005$ $p_{1-3} = 0,009$ $p_{1-4} = 0,049$ $p_{1-5} = 0,675$ $p_{1-6} = 0,076$
	Период включения	24,0 [15,0–34,0]	22,0 [13,0–30,0]	21,0 [14,0–30,0]	21,0 [15,0–29,0]	25,5 [20,0–37,0]	26,5 [20,0–37,0]	$p_{1-2} = 0,005$ $p_{1-3} = 0,03$ $p_{1-4} = 0,18$ $p_{1-5} = 0,68$ $p_{1-6} = 0,44$
ОГ2 (n = 10)	Период выключения	34,5 [26,0–40,0]	30,5 [23,0–31,0]	29,5 [25,0–32,0]	27,5 [25,0–37,0]	31,0 [28,0–37,0]	33,5 [26,0–40,0]	$p_{1-2} = 0,005$ $p_{1-3} = 0,009$ $p_{1-4} = 0,0046$ $p_{1-5} = 0,09$ $p_{1-6} = 0,44$
	Период включения	24,5 [21,0–33,0]	22,0 [12,0–30,0]	19,5 [12,0–30,0]	19,5 [12,0–27,0]	21,0 [13,0–28,0]	23,0 [22,0–29,0]	$p_{1-2} = 0,01$ $p_{1-3} = 0,02$ $p_{1-4} = 0,01$ $p_{1-5} = 0,02$ $p_{1-6} = 0,37$
ГС (n = 13)	Период выключения	28,0 [27,0–33,0]	29,0 [27,0–36,0]	33,0 [29,0–40,0]	33,0 [32,0–41,0]	35,0 [31,5–41,0]	37,0 [33,0–43,0]	$p_{1-2} = 0,11$ $p_{1-3} = 0,01$ $p_{1-4} = 0,003$ $p_{1-5} = 0,003$ $p_{1-6} = 0,003$
	Период включения	25,0 [17,0–29,0]	25,0 [22,0–34,0]	25,0 [24,0–36,0]	31,0 [24,0–36,0]	30,0 [23,5–34,5]	30,0 [24,0–35,0]	$p_{1-2} = 0,08$ $p_{1-3} = 0,08$ $p_{1-4} = 0,02$ $p_{1-5} = 0,01$ $p_{1-6} = 0,003$

После второго курса терапии ММСК в ОГ2 зафиксировано статистически значимое снижение суммы баллов (согласно Разделу III UPDRS) в точках М1, М3, М6 по сравнению с Д0 в off- и on-периодах (см. рисунок). Таким образом, терапевтический эффект повторного применения ММСК на моторные проявления БП по выраженности и длительности не уступал таковому после первого курса ММСК. Следует особо отметить, что, несмотря на длительный временной промежуток между курсами терапии, достигавший в некоторых случаях 24–36 мес., не выявлено статистически значимых различий при сравнении выраженности моторных симптомов на Д0 перед первым и вторым курсами лечения ($p = 0,32$). Этот факт может указывать на замедление прогрессирования заболевания за пределами рассматриваемого нами временного промежутка наблюдения длиной в 12 мес.

При анализе влияния первого курса терапии ММСК на эмоциональное состояние пациентов ОГ1 и ОГ2 выявлено статистически значимое уменьшение депрессивного фона уже через 1 мес. после лечения. Через 3 мес. в группе ОГ1 и через 6 мес. в группе ОГ2 уменьшение общего балла по шкале депрессии также достигало значимых величин, однако спустя 9 и 12 мес. после первого введения ММСК улучшение настроения носило индивидуальный характер у некоторых пациентов и не достигало значимых величин в ОГ1 и ОГ2. У пациентов ГС по шкале депрессии Гамильтона выявлена отрицательная динамика через 6 мес. после введения плацебо, в остальных точках наблюдения статистически значимых изменений не зарегистрировано (табл. 2).



(синей стрелкой указано проведение терапии ММСК)

Динамика моторных симптомов у пациентов ОГ2 до и после клеточной терапии ММСК/плацебо (согласно Разделу III Единой рейтинговой шкалы болезни Паркинсона)

Dynamics of the motor symptoms in MG2 before and after MMSC/placebo cell therapy (According to Section III of the Parkinson Disease Unified Rating Scale)

Т а б л и ц а 2. Оценка эмоциональных нарушений по шкале депрессии Гамильтона у пациентов до и после первого курса клеточной терапии ММСК/плацебо, Me (Q25–Q75)

Table 2. Assessing emotional disturbances according to the Hamilton Depression Scale before and after the first course of MMSC/placebo cell therapy, Me (Q25–Q75)

Группа	День 0 (1)	Месяц 1 (2)	Месяц 3 (3)	Месяц 6 (4)	Месяц 9 (5)	Месяц 12 (6)	Статистическая значимость различий (Wilcoxon test)
ОГ1 (n = 13)	13,0 [9,0–16,0]	8,0 [6,0–11,0]	8,0 [6,0–11,0]	11,0 [8,0–13,0]	10,5 [7,0–13,0]	12,0 [9,0–16,0]	$p_{1-2} = 0,03$ $p_{1-3} = 0,01$ $p_{1-4} = 0,07$ $p_{1-5} = 0,20$ $p_{1-6} = 0,63$
ОГ2 (n = 10)	7,5 [4,0–11,0]	4,0 [1,0–7,0]	5,5 [3,0–7,0]	4,0 [2,0–9,0]	4,5 [3,0–9,0]	6,0 [5,0–10,0]	$p_{1-2} = 0,02$ $p_{1-3} = 0,19$ $p_{1-4} = 0,035$ $p_{1-5} = 0,17$ $p_{1-6} = 0,72$
ГС (n = 13)	8,0 [4,0–12,0]	8,0 [4,0–13,0]	11,0 [5,0–12,0]	11,0 [6,0–15,0]	8,0 [4,0–15,0]	11,0 [6,0–15,0]	$p_{1-2} = 0,93$ $p_{1-3} = 0,07$ $p_{1-4} = 0,04$ $p_{1-5} = 0,11$ $p_{1-6} = 0,14$

Результаты оценки воздействия терапии ММСК на немоторные симптомы БП у пациентов ОГ1 и ОГ2 выявили статистически значимое уменьшение общего балла по шкале NMS через 1 и 3 мес. после курса лечения. Однако через 6, 9, 12 мес. выраженность немоторных симптомов вновь увеличилась, к 12 мес. после первой инъекции медиана достигала значения, полученного в Д0. У пациентов ГС через 9 мес. после проведения клеточной терапии установлено статистически значимое нарастание немоторных проявлений БП, в остальных точках наблюдения за указанный период статистически значимых изменений не выявлено (табл. 3).

После второго курса терапии ММСК в ОГ2 значимое снижение депрессии наблюдалось через 3 мес. ($p_{0,3} = 0,01$), статистически значимое уменьшение немоторных проявлений – через 6 мес. ($p_{0,3} = 0,04$) от момента начала лечения (табл. 4).

Т а б л и ц а 3. Оценка немоторных проявлений болезни Паркинсона у пациентов с болезнью Паркинсона до и после первого курса клеточной терапии ММСК/плацебо, Ме (Q25–Q75)

Table 3. Assessment of non-motor manifestations of Parkinson's disease in patients with Parkinson's disease before and after the first course of cell therapy MMSC/placebo, Me (Q25–Q75)

Группа	День 0 (1)	Месяц 1 (2)	Месяц 3 (3)	Месяц 6 (4)	Месяц 9 (5)	Месяц 12 (6)	Статистическая значимость различий (Wilcoxon test)
ОГ1 (n = 13)	12,0 [10,0–14,0]	10,0 [7,0–14,0]	9,0 [6,0–13,0]	11,0 [7,0–13,0]	12,0 [10,0–14,0]	12,0 [10,0–14,0]	$p_{1-2} = 0,025$ $p_{1-3} = 0,04$ $p_{1-4} = 0,09$ $p_{1-5} = 0,81$ $p_{1-6} = 1,0$
ОГ2 (n = 10)	7,0 [4,0–13,0]	5,0 [3,0–8,0]	5,0 [3,0–6,0]	6,0 [4,0–7,0]	6,0 [4,0–9,0]	7,0 [5,0–9,0]	$p_{1-2} = 0,02$ $p_{1-3} = 0,01$ $p_{1-4} = 0,20$ $p_{1-5} = 0,10$ $p_{1-6} = 0,10$
Группа сравнения (n = 13)	7,0 [6,0–12,0]	8,0 [6,0–9,0]	9,0 [6,0–14,0]	9,0 [8,0–14,0]	9,0 [7,0–14,0]	10,0 [5,0–15,0]	$p_{1-2} = 0,7$ $p_{1-3} = 0,2$ $p_{1-4} = 0,1$ $p_{1-5} = 0,02$ $p_{1-6} = 0,3$

Т а б л и ц а 4. Оценка эмоциональных нарушений по шкале депрессии Гамильтона и шкале немоторных проявлений болезни Паркинсона у пациентов ОГ2 (n = 10) в динамике до и после второго курса клеточной терапии ММСК, Ме (Q25–Q75)

Table 4. Assessing emotional disturbances using Hamilton's Depression Scale and the scale of non-motor manifestations of Parkinson's disease in patients OG2 (n = 10) in dynamics before and after the second course of MMSC cell therapy, Me (Q25–Q75)

Исследуемая шкала	День 0-2 (1)	Месяц 1-2 (2)	Месяц 3-2 (3)	Месяц 6-2 (4)	Статистическая значимость различий (Wilcoxon test)
Шкала депрессии Гамильтона	7,5 [5,0–11,0]	5,0 [4,0–8,0]	4,0 [3,0–6,0]	6,5 [3,0–10,0]	$p_{1-2} = 0,11$ $p_{1-3} = 0,01$ $p_{1-4} = 0,16$
Шкала немоторных симптомов	6,0 [1,0–12,0]	5,0 [4,0–11,0]	5,5 [2,0–10,0]	5,5 [2,0–10,0]	$p_{1-2} = 0,029$ $p_{1-3} = 0,18$ $p_{1-4} = 0,04$

Обсуждение. В нашем исследовании зафиксирован положительный эффект клеточной терапии на динамику моторных и немоторных симптомов у пациентов с БП в течение в среднем 6 мес. после проведения одного курса лечения ММСК. В это время у пациентов ОГ1 и ОГ2 зарегистрированы статистически значимые позитивные изменения в динамике по всем исследуемым шкалам, а медиана суммы баллов (согласно Разделу III UPDRS) в точках М3 и М6 опускалась на 4 балла и более по сравнению с Д0, что, по данным различных исследований, считается достоверным клиническим улучшением [16]. Такая длительность клинического эффекта обусловлена механизмом действия ММСК и, вероятно, молекулярными особенностями патогенеза БП.

В настоящее время результаты большого числа научных работ свидетельствуют о том, что основным свойством ММСК, обуславливающим их терапевтический потенциал, является паракринная активность, а именно выделение различных растворимых факторов для оказания иммуномодулирующего, ангиогенного, антиапоптотического и антиоксидантного эффектов [17]. Накопленные данные свидетельствуют о том, что иммуномодулирующая функция играет значимую роль в развитии терапевтического эффекта ММСК. Она реализуется посредством регуляции пролиферации и активности лимфоцитов и макрофагов [18]. Иммуномодулирующие свойства ММСК способны к саморегуляции в соответствии с выраженностью воспаления в микроокружении. Антиапоптотический эффект ММСК заключается в выделении различных факторов

роста и ингибиторов апоптоза [19]. Антиоксидантное действие ММСК заключается в модуляции окислительно-восстановительных процессов и снижении выработки активных форм кислорода [20, 21]. Важным свойством ММСК является донорство митохондрий для поврежденных клеток [22]. Функции митохондрий как производителей энергии заключаются в их способности сохранять поляризацию внутренней мембраны. «Датчик» окислительного стресса в клетках находится внутри митохондрий; следовательно, участие этой органеллы имеет решающее значение в патогенезе БП. Важным свойством ММСК является экспрессия множества рецепторов и молекул клеточной адгезии, участвующих в хоуминге и миграции к участкам поражения при различных путях введения [23].

Однако на сегодняшний день установлено, что ММСК в организме человека уже спустя сутки после введения начинают подвергаться апоптозу и фагоцитозу [24]. Также доказанным является тот факт, что фагоцитоз ММСК способствует превращению классических моноцитов в подтип с противовоспалительными свойствами и повышенной экспрессией ИЛ-10 [25]. Таким образом, формируется альтернативный путь иммуномодуляции, не зависящий от жизнеспособности ММСК. Этот путь еще недостаточно изучен, однако предполагается, что для оказания наиболее эффективного терапевтического эффекта важны не только характеристики ММСК, но и молекулярная, и клеточная среда целевого заболевания, а возможно, и молекулярные различия на разных стадиях заболевания и с учетом индивидуальных особенностей пациентов [24].

Повторный курс терапии ММСК имеет схожий с первым курсом лечения клинический эффект по выраженности и длительности. У пациентов ГС, напротив, наблюдается прогрессирование заболевания через 6 мес. и более от начала наблюдения.

В долгосрочном периоде наблюдения после первого курса клеточной терапии у пациентов ОГ1 и ОГ2 не зарегистрировано серьезных нежелательных явлений, связанных с ММСК. Второй курс лечения также имел высокую безопасность, в краткосрочном периоде наблюдения зарегистрировано два нежелательных явления (до точки М1), не связанных непосредственно с введением клеточной суспензии: 1) боль в месте забора костного мозга в течение 14 дней у 1 пациента; 2) острая респираторная инфекция, развившаяся в течение 7 дней после выписки из стационара у 2 пациентов. Высокая безопасность повторных курсов терапии ММСК при различных заболеваниях нервной системы подтверждена и в зарубежных исследованиях [12].

В ГС спустя 12–16 мес. наблюдения после введения плацебо выявлены серьезные нежелательные явления: 1) смерть пациента с частыми акинетическими кризами в анамнезе во время пандемии COVID-19 (официальная причина смерти – болезнь Паркинсона); 2) два случая онкологического заболевания, выявленные на ранней стадии: рак простаты и злокачественный невус. Случаи онкопатологии у пациентов ГС могут быть расценены как случайное явление либо же косвенно указывать на онкопротективные свойства терапии ММСК у пациентов с БП, связанные с их иммуномодулирующим и антиоксидантным действием этих клеток, что требует дальнейших исследований.

Важно отметить, что исследование проводилось на фоне пандемии COVID-19. Поэтому некоторым пациентам в каждой из групп не удалось избежать заражения. Все заразившиеся пациенты перенесли заболевание в легкой форме или бессимптомно. Однако в связи с наличием у SARS-CoV-2 нейротропных свойств увеличение степени выраженности моторных и немоторных симптомов после перенесенной коронавирусной инфекции, наблюдавшееся у 4 пациентов (подтверждено с помощью соответствующих шкал), как предполагается, связано с вирусной активацией нейровоспаления. У 3 пациентов, перенесших коронавирусную инфекцию до получения клеточной терапии, динамика симптомов после ее проведения соответствовала общей тенденции к временному уменьшению двигательных и немоторных нарушений либо их стабилизации.

Заключение. Лечение БП с использованием терапии аутологичных ММСК показало клиническую эффективность в долгосрочном периоде наблюдения и постепенное угасание положительного эффекта спустя 6–12 мес. Повторный курс лечения ММСК, также показавший эффективность и высокую безопасность, может быть применен на более длительный срок для замедления прогрессирования БП. Результаты исследования подтверждают влияние ММСК на различные

звенья патогенеза БП, на возможность контроля над двигательными и немоторными симптомами заболевания. В дальнейшем предстоит выяснить наличие особенностей терапевтического эффекта лечения ММСК на разных стадиях БП и с учетом индивидуальных особенностей пациентов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

- Schrag, A. How does Parkinson's disease affect quality of life? A comparison with quality of life in the general population / A. Schrag, M. Jahanshahi, N. Quinn // *Mov. Disord.* – 2000. – Vol. 15, N 6. – P. 1112–1118. [https://doi.org/10.1002/1531-8257\(200011\)15:6<1112::aid-mds1008>3.0.co;2-a](https://doi.org/10.1002/1531-8257(200011)15:6<1112::aid-mds1008>3.0.co;2-a)
- Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease / W. Zhang [et al.] // *FASEB J.* – 2005. – Vol. 19, N 6. – P. 533–542. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2751com>
- Левин, О. С. Болезнь Паркинсона / О. С. Левин, Н. В. Федорова. – 5-е изд. – М.: МЕДпресс-информ, 2015. – 352 с.
- Chaudhuri, K. R. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management / K. R. Chaudhuri, D. G. Healy, A. H. Schapira // *Lancet Neurol.* – 2006. – Vol. 5, N 3. – P. 235–245. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70373-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70373-8)
- The acute brain response to levodopa heralds dyskinesias in Parkinson disease / D. M. Herz [et al.] // *Ann. Neurol.* – 2014. – Vol. 75, N 6. – P. 829–836. <https://doi.org/10.1002/ana.24138>
- Effect of intranasal stem cell administration on the nigrostriatal system in a mouse model of Parkinson's disease / M. Salama [et al.] // *Exp. Therapeut. Med.* – 2017. – Vol. 13, N 3. – P. 976–982. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4073>
- Therapeutic effects of intranigral transplantation of mesenchymal stem cells in rat models of Parkinson's disease / D. Chen [et al.] // *J. Neurosci. Res.* – 2017. – Vol. 95, N 3. – P. 907–917. <https://doi.org/10.1002/jnr.23879>
- Chyzhyk, V. Assessment of non-motor symptoms of Parkinson's disease in the long-term follow-up after the cell therapy [Electronic resource] / V. Chyzhyk, A. Boika, V. Ponomarev. – Mode of access: <https://www.mdsabstracts.org/abstract/assessment-of-non-motor-symptoms-of-parkinsons-disease-in-the-long-term-follow-up-after-the-cell-therapy>. – Date of access: 06.07.2023.
- Transplantation of spinal cord-derived neural stem cells for ALS: Analysis of phase 1 and 2 trials / J. D. Glass [et al.] // *Neurology.* – 2016. – Vol. 87, N 4. – P. 392–400. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002889>
- Safety and clinical effects of mesenchymal stem cells secreting neurotrophic factor transplantation in patients with amyotrophic lateral sclerosis: results of phase 1/2 and 2a clinical trials / P. Petrou [et al.] // *JAMA Neurol.* – 2016. – Vol. 73, N 3. – P. 337–344. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.4321>
- NurOwn, phase 2, randomized, clinical trial in patients with ALS / J. D. Berry [et al.] // *Neurology.* – 2019. – Vol. 93, N 24. – P. e2294–e2305. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000008620>
- Long-term clinical and immunological effects of repeated mesenchymal stem cell injections in patients with progressive forms of multiple sclerosis / P. Petrou [et al.] // *Front. Neurol.* – 2021. – Vol. 12. – Art. 639315. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.639315>
- Intrathecal administration of autologous mesenchymal stromal cells for spinal cord injury: Safety and efficacy of the 100/3 guideline / J. Vaquero [et al.] // *Cytotherapy.* – 2018. – Vol. 20, N 6. – P. 806–819. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2018.03.032>
- Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases / A. J. Hughes [et al.] // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* – 1992. – Vol. 55, N 3. – P. 181–184. <https://doi.org/10.1136/jnnp.55.3.181>
- Hoehn, M. M. Parkinsonism: onset, progression, and mortality / M. M. Hoehn, M. Yahr // *Neurology.* – 1967. – Vol. 17, N 5. – P. 427–442. <https://doi.org/10.1212/wnl.17.5.427>
- Thuy, C. Vu. Progression of motor and nonmotor features of Parkinson's disease and their response to treatment / C. Vu Thuy, J. G. Nutt, N. H. G. Holford // *Br. J. Clin. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 74, N 2. – P. 267–283. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04192.x>
- Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives / X. Liang [et al.] // *Cell Transplant.* – 2014. – Vol. 23, N 9. – P. 1045–1059. <https://doi.org/10.3727/096368913X667709>
- Induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells activate quiescent T cells and elevate regulatory T cell response via NF- κ B in allergic rhinitis patients / X.-L. Fan [et al.] // *Stem Cell Res. Ther.* – 2018. – Vol. 9, N 1. – Art. 170. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0896-z>
- Green, D. R. Mitochondria and apoptosis / D. R. Green, J. C. Reed // *Science.* – 1998. – Vol. 281, N 5381. – P. 1309–1312. <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1309>
- Human bone marrow mesenchymal stem cells protect catecholaminergic and serotonergic neuronal perikarya and transporter function from oxidative stress by the secretion of glial-derived neurotrophic factor / A. L. Whone [et al.] // *Brain Res.* – 2012. – Vol. 1431. – P. 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.10.038>
- Meting Mesenchymal stromal cells protect cancer cells from ROS-induced apoptosis and enhance the Warburg effect by secreting STC1 / S. Ohkouchi [et al.] // *Mol. Ther.* – 2012. – Vol. 20, N 2. – P. 417–423. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.259>
- Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury / M. N. Islam [et al.] // *J. Nat. Med.* – 2012. – Vol. 18, N 5. – P. 759–765. <https://doi.org/10.1038/nm.2736>
- de Becker, A. Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? / A. de Becker, I. V. Riet // *World J. Stem Cells.* – 2016. – Vol. 8, N 3. – P. 73–87. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v8.i3.73>

24. The critical role of apoptosis in mesenchymal stromal cell therapeutics and implications in homeostasis and normal tissue repair / Ch. Giacomini [et al.] // *Cell Mol. Immunol.* – 2023. – Vol. 20, N 6. – P. 570–582. <https://doi.org/10.1038/s41423-023-01018-9>

25. Immunomodulation by therapeutic mesenchymal stromal cells (MSC) is triggered through phagocytosis of MSC by monocytic cells / S. F. H. de Witte [et al.] // *Stem Cells.* – 2018. – Vol. 36, N 4. – P. 602–615. <https://doi.org/10.1002/stem.2779>

References

1. Schrag A., Jahanshahi M., Quinn N. How does Parkinson's disease affect quality of life? A comparison with quality of life in the general population. *Movement Disorders*, 2000, vol. 15, pp. 1112–1118. [https://doi.org/10.1002/1531-8257\(200011\)15:6<1112::aid-mds1008>3.0.co;2-a](https://doi.org/10.1002/1531-8257(200011)15:6<1112::aid-mds1008>3.0.co;2-a)

2. Zhang W., Wang T., Pei Zh., D. Miller S., Wu X., Block M. [et al.]. Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB Journal*, 2005, vol. 19, no. 6, pp. 533–542. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2751com>

3. Levin O. S., Fedorova N. V. *Parkinson's disease. 5th ed.* Moscow, MEDpress-inform Publ., 2012. 352 p. (in Russian).

4. Chaudhuri K. R., Healy D. G., Schapira A. H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurology*, 2006, vol. 5, no. 3, pp. 235–245. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70373-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70373-8)

5. Herz D. M., Haagensen B. N., Christensen M. S., Madsen K. H., Rowe J. B., Løkkegaard A., Siebner H. R. The acute brain response to levodopa heralds dyskinesias in Parkinson disease. *Annals of Neurology*, 2014, vol. 75, no. 6, pp. 829–836. <https://doi.org/10.1002/ana.24138>

6. Salama M., Sobh M., Emam M., Abdalla A., Sabry D., El-Gamal M. [et al.]. Effect of intranasal stem cell administration on the nigrostriatal system in a mouse model of Parkinson's disease. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2017, vol. 13, no. 3, pp. 976–982. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4073>

7. Chen D., Fu W., Zhuang W., Lv C., Li F., Wang X. J. Therapeutic effects of intranigral transplantation of mesenchymal stem cells in rat models of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience Research*, 2017, vol. 95, no. 3, pp. 907–917. <https://doi.org/10.1002/jnr.23879>

8. Chyzyk V., Boika A., Ponomarev V. *Assessment of non-motor symptoms of Parkinson's disease in the long-term follow-up after the cell therapy.* Available at: <https://www.mdsabstracts.org/abstract/assessment-of-non-motor-symptoms-of-parkinsons-disease-in-the-long-term-follow-up-after-the-cell-therapy> (accessed 06.07.2023).

9. Glass J. D., Hertzberg V. S., Boulis N. M., Riley J., Federici T., Polak M. [et al.]. Transplantation of spinal cord-derived neural stem cells for ALS: Analysis of phase 1 and 2 trials. *Neurology*, 2016, vol. 87, no. 4, pp. 392–400. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002889>

10. Petrou P., Gothelf Y., Argov Z., Gotkine M., Levy Y. S., Kassis I. [et al.]. Safety and clinical effects of mesenchymal stem cells secreting neurotrophic factor transplantation in patients with amyotrophic lateral sclerosis: results of phase 1/2 and 2a clinical trials. *JAMA Neurology*, 2016, vol. 73, no. 3, pp. 337–344. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.4321>

11. Berry J. D., Cudkovic M. E., Windebank A. J., Staff N. P., Owegi M., Nicholson K. [et al.]. NurOwn, phase 2, randomized, clinical trial in patients with ALS. *Neurology*, 2019, vol. 93, no. 24, pp. e2294–e2305. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000008620>

12. Petrou P., Kassis I., Ginzberg A., Halimi M., Yaghmour N., Abramsky O., Karussis D. Long-term clinical and immunological effects of repeated mesenchymal stem cell injections in patients with progressive forms of multiple sclerosis. *Frontiers of Neurology*, 2021, vol. 12, art. 639315. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.639315>

13. Vaquero J., Zurita M., Rico M. A., Aguayo C., Bonilla C., Marin E. [et al.]. Intrathecal administration of autologous mesenchymal stromal cells for spinal cord injury: Safety and efficacy of the 100/3 guideline. *Cytotherapy*, 2018, vol. 20, no. 6, pp. 806–819. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2018.03.032>

14. Hughes A. J., Daniel S. E., Kilford L., Lees A. J. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 1992, vol. 55, no. 3, pp. 181–184. <https://doi.org/10.1136/jnnp.55.3.181>

15. Hoehn M. M. Parkinsonism: onset, progression, and mortality. *Neurology*, 1967, vol. 17, no. 5, pp. 427–442. <https://doi.org/10.1212/wnl.17.5.427>

16. Thuy C. Vu, Nutt J. G., Holford N. H. G. Progression of motor and nonmotor features of Parkinson's disease and their response to treatment. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2012, vol. 74, no. 2, pp. 267–283. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04192.x>

17. Liang X., Ding Y., Zhang Y., Tse H. F., Lian Q. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. *Cell Transplantation*, 2014, vol. 23, no. 9, pp. 1045–1059. <https://doi.org/10.3727/096368913X667709>

18. Fan X.-L., Zeng Q.-X., Li X., Li C.-L., Xu Z.-B., Deng X.-Q., Shi J., Chen D., Zheng S. G., Fu Q.-L. Induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells activate quiescent T cells and elevate regulatory T cell response via NF- κ B in allergic rhinitis patients. *Stem Cell Research & Therapy*, 2018, vol. 9, no. 1, art. 170. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0896-z>

19. Green D. R., Reed J. C. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 1998, vol. 281, no. 5381, pp. 1309–1312. <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1309>

20. Whone A. L., Kemp K., Sun M., Wilkins A., Scolding N. J. Human bone marrow mesenchymal stem cells protect catecholaminergic and serotonergic neuronal perikarya and transporter function from oxidative stress by the secretion of glial-derived neurotrophic factor. *Brain Research*, 2012, vol. 1431, pp. 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.10.038>

21. Ohkouchi S., Block G. J., Katsha A. M., Kanehira M., Ebina M., Kikuchi T., Saijo Y., Nukiwa T., Prockop D. J. Mesenchymal stromal cells protect cancer cells from ROS-induced apoptosis and enhance the Warburg effect by secreting STC. *Molecular Therapy*, 2012, vol. 20, no. 2, pp. 417–423. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.259>

22. Islam M. N., Das S. R., Emin M. T., Wei M., Sun L., Westphalen K., Rowlands D. J., Quadri S. K., Bhattacharya S., Bhattacharya J. Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Journal of Natural Medicines*, 2012, vol. 18, no. 5, pp. 759–765. <https://doi.org/10.1038/nm.2736>

23. De Becker A., Riet I. V. Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? *World Journal of Stem Cells*, 2016, vol. 8, no. 3, pp. 73–87. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v8.i3.73>

24. Giacomini Ch., Granéli C., Hicks R., Dazzi F. The critical role of apoptosis in mesenchymal stromal cell therapeutics and implications in homeostasis and normal tissue repair. *Cellular and Molecular Immunology*, 2023, vol. 20, no. 6, pp. 570–582. <https://doi.org/10.1038/s41423-023-01018-9>

25. de Witte S. F. H., Luk F., Sierra Parraga J. M., Gargasha M., Merino A., Korevaar S. S. [et al.]. Immunomodulation by therapeutic mesenchymal stromal cells (MSC) is triggered through phagocytosis of MSC by monocytic cells. *Stem Cells*, 2018, vol. 36, no. 4, pp. 602–615. <https://doi.org/10.1002/stem.2779>

Информация об авторах

Чижик Вероника Александровна – ассистент. Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения УО «Белорусский государственный медицинский университет» (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: chyzhykva@gmail.com

Селицкий Михаил Михайлович – канд. мед. наук, доцент. Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения УО «Белорусский государственный медицинский университет» (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: m_sialitski@tut.by

Пономарев Владимир Владимирович – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения УО «Белорусский государственный медицинский университет» (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: professor.ponomarev@gmail.com

Information about the authors

Veranika A. Chyzhyk – Assistant. Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of Educational Institution “Belarusian State Medical University” (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: chyzhykva@gmail.com

Mikhail M. Sialitski – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of Educational Institution “Belarusian State Medical University” (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: m_sialitski@tut.by

Vladimir V. Ponomarev – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of Educational Institution “Belarusian State Medical University” (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: professor.ponomarev@gmail.com

ISSN 1814-6023 (Print)
 ISSN 2524-2350 (Online)
 УДК 616.433
<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-1-79-88>

Поступила в редакцию 21.12.2023
 Received 21.12.2023

Н. В. Карлович¹, О. Н. Шишко², М. А. Малышко³, Е. В. Юреня², Т. В. Мохорт¹

¹Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь
²Минский городской консультативный эндокринологический центр, Минск, Республика Беларусь
³16-я городская клиническая поликлиника, Минск, Республика Беларусь

КАНЮЛИРОВАННЫЙ ТЕСТ НА ПРОЛАКТИН В ДИАГНОСТИКЕ СИНДРОМА ГИПЕРПРОЛАКТИНЕМИИ

Аннотация. Синдром гиперпролактинемии (ГП) – это стойкое патологическое повышение сывороточной концентрации пролактина (>20 нг/мл у мужчин и >25 нг/мл у женщин), приводящее к развитию патологического симптомокомплекса ГП, в первую очередь со стороны репродуктивной системы. Для подтверждения стойкого характера ГП и исключения физиологического кратковременного повышения гормона в ряде рекомендаций, включая российские и белорусские, предлагается проводить несколько измерений пролактина.

В данное исследование были включены 120 пациентов с ГП (96 (78,0 %) лиц женского пола и 27 (22,0 %) – мужского) в возрасте 18–50 лет, которые обращались за медицинской помощью в учреждение здравоохранения «Минский городской клинический эндокринологический центр» в период с декабря 2022 г. по сентябрь 2023 г. После катетеризации вены устанавливали венозный катетер (канюлю), забор крови выполняли непосредственно после канюлирования (Т0), а затем через 60 мин (Т1) и 120 мин (Т2). Результаты канюлированного теста расценивали как положительный тест при сохранении ГП во всех трех пробах (Т0, Т1, Т2), как сомнительный, если ГП сохранялась в Т0 и Т1, и как отрицательный, если ГП была только в точке Т0. Оценка результатов канюлированного теста показала, что истинная ГП составляет 36,7 %. При этом у пациентов с положительным канюлированным тестом на пролактин был более высокий показатель пролактина в точке Т0 – 888,5 мМЕ/л ($U = 97,0$; $z = 7,92$; $p < 0,001$). Пациенты со стресс-индуцированной ГП (отрицательный тест) и истинной ГП (положительный тест) не имели статистически значимых различий по возрасту и частоте встречаемости специфических и неспецифических для ГП жалоб и симптомов.

Ключевые слова: синдром гиперпролактинемии, канюлированный тест, пролактин, стресс-индуцированная гиперпролактинемия

Для цитирования: Канюлированный тест на пролактин в диагностике синдрома гиперпролактинемии / Н. В. Карлович [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2024. – Т. 21, № 1. – С. 79–88. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-1-79-88>

Natalia V. Karlovich¹, Olga N. Shishko², Maria A. Malyshko³, Elena V. Yurenya², Tatiana V. Mokhort¹

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus
²Minsk City Clinical Endocrinological Center, Minsk, Republic of Belarus
³16th City Clinical Clinic, Minsk, Republic of Belarus

CANNULATED PROLACTIN TEST IN THE DIAGNOSIS OF THE HYPERPROLACTINEMIA SYNDROME

Abstract. Hyperprolactinemia (HP) is a persistent pathological increase in a prolactin serum concentration amounting to more than 20 ng/ml in males and 25 ng/ml in females and leads to developing the pathological symptom complex of HP primarily from the reproductive system. To confirm the persistent etiology of HP and to eliminate physiological short-term hormone enhancement, a number of recommendations, including Russian and Belarusian, were proposed to make several prolactin measurements.

This study included 120 patients with HP (96 females, 78.0 %) and (27 males, 22.0 %) aged 18–50 years who sought medical help at the Health Institution “Minsk City Clinical Endocrinology Center” in the period from December 2022 to September 2023. After catheterizing the vein, a venous cannula was inserted and blood was taken immediately after cannulating (T0), and then in 60 minutes (T1) and 120 minutes (T2). The cannulated prolactin test results were considered positive – with HP remaining in all three samples (T0, T1, T2), questionable – if HP was kept at T0 and T1, and negative if HP was only at T0. When evaluating the cannulated test results, true HP is 36.7 %. Patients with a positive cannulated test had a higher prolactin at T0, which was 888.5 mME/L ($U = 97,0$; $z = 7,92$; $p < 0,001$). Patients with stress-induced HP (negative test) and patients with true HP (positive test) had no statistically significant differences in age and occurrence frequency of specific and non-specific complaints and symptoms for HP.

Keywords: hyperprolactinemia syndrome, cannulation test, prolactin, stress-induced hyperprolactinemia

For citation: Karlovich N. V., Shishko O. N., Malyshko M. A., Yurenya E. V., Mokhort T. V. Cannulated prolactin test in the diagnosis of the hyperprolactinemia syndrome. *Vestsi Natsyonal'noi akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2024, vol. 21, no. 1, pp. 79–88 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-1-79-88>

Введение. Синдром гиперпролактинемии (ГП) – распространенное патологическое состояние, регистрирующееся у 0,26 % всего населения и у 0,5 % женщин репродуктивного возраста. При развитии вторичной аменореи или олигоменореи ГП выявляется у 15–20 % женщин, а сексуальная дисфункция у мужчин сопровождается ГП в 10 % случаев. ГП – это стойкое патологическое повышение сывороточной концентрации пролактина (>20 нг/мл у мужчин и >25 нг/мл у женщин), приводящее к развитию патологического симптомокомплекса ГП, в первую очередь со стороны репродуктивной системы [1, 2]. В рекомендациях Европейского эндокринологического сообщества по ГП (2011 г.) указывается, что основным лабораторный признак – однократное повышение уровня пролактина >20 нг/мл (424 мМЕ/л) у мужчин и >25 нг/мл (530 мМЕ/л) у женщин (S. Melmed, F. F. Casanueva) [3].

Вследствие того, что ряд физиологических стимулов, таких как половой акт, стресс, включая венепункцию для забора биологического материала из кубитальной вены, сон, раздражение сосков и др. может приводить к нестойкому умеренному физиологическому повышению пролактина крови, однократное определение данного гормона зачастую приводит к гипердиагностике синдрома ГП. В связи с этим для подтверждения стойкого характера ГП и исключения физиологического кратковременного повышения гормона в ряде рекомендаций, включая российские и белорусские, предлагается проводить несколько измерений пролактина [1, 2, 4–6]. Особенно важное значение это имеет в случае умеренной ГП и отсутствия уверенности в том, что все условия забора крови были соблюдены [1, 7]. Критерием установления диагноза ГП в проекте российских клинических рекомендаций (2023) является двукратно подтвержденное повышение уровня пролактина в сыворотке крови выше референтных значений при условии исключения феномена макропролактинемии [1].

Секреция пролактина носит пульсирующий характер, пиковый уровень пролактина обычно приходится на период с 4 до 7 ч утра [8]. Одной из разновидностей стресса как стимула повышения пролактина является венепункция. По данным L. Vilar, C. F. Vilar, стрессовая ситуация, обусловленная венепункцией, может вызвать повышение уровня пролактина до 60 нг/мл (1270 мкМЕ/л) [9]. Стресс-индуцированная ГП связана с возможностью пролактина повышать уровень надпочечниковых андрогенов – дегидроэпиандростерона и дегидроэпиандростерона сульфата, кортизола и альдостерона.

Рядом авторов было показано, что введение внутривенного катетера за 15–20 мин до забора крови для определения пролактина, а также серийное определение концентрации пролактина через 0, 30, 60, 90 и 120 мин после катетеризации вены является простым и практичным инструментом верификации умеренной ГП и исключения ГП, связанной со стрессом, позволяющим избежать диагностических ошибок и ненужного лечения [7, 10, 11]. Вместе с тем канюлированный тест на пролактин в настоящее время не входит в клинические рекомендации по диагностике синдрома ГП.

Цель исследования – оценка результатов канюлированного теста на пролактин у пациентов репродуктивного возраста с синдромом гиперпролактинемии.

Материалы и методы исследования. В исследование были включены 120 пациентов с ГП, которые обращались за медицинской помощью в учреждение здравоохранения «Минский городской клинический эндокринологический центр» в период с декабря 2022 г. по сентябрь 2023 г.

Отбор пациентов для участия в исследовании осуществляли по следующим критериям: наличие лабораторно выявленной ГП; возраст на момент обследования 18–50 лет. Среди обследованных было 93 (77,5 %) лиц женского пола и 27 (22,5 %) – мужского, средний возраст пациентов составил $31,4 \pm 9,0$ года.

У всех пациентов была определена сывороточная концентрация пролактина электрохемилюминесцентным методом с использованием коммерческих наборов фирмы Roche Diagnostics GmbH на автоматическом анализаторе Modular. Референтные значения пролактина при использовании данных наборов 102–496 мЕд/л у женщин, 86–324 мМЕ/л у мужчин. При данном методе исследования реализуется двухсайтовый иммунометрический принцип (или сэндвич-принцип), при котором пролактин может реагировать как с захватывающим антителом, которое часто иммобилизуется на твердой фазе, так и с меченым антителом, которое используется для обнаружения. После захвата сэндвича аналит–антитело и удаления непрореагировавших реагентов на этапе промывания генерируемый сигнал напрямую зависит от количества присутствующего пролактина [12].

ГП диагностировали в соответствии с рекомендациями международного эндокринологического сообщества: >20 нг/мл (424 мЕд/л) у мужчин и >25 нг/мл (530 мЕд/л) у женщин [3].

Пациентам утром натощак был выполнен канюлированный тест на пролактин. После установки венозного катетера (канюли) забор крови выполняли непосредственно после канюлирования (Т0), затем через 60 мин (Т1) и 120 мин (Т2). После каждого забора крови в течение 15 мин внутривенно капельно вводили 0,9%-ный раствор хлорида натрия.

У пациентов оценивали наличие специфических для синдрома ГП жалоб, таких как галакторея, нарушение менструального цикла (НМЦ), снижение либидо, эректильная дисфункция, а также неспецифических жалоб: боль в молочных железах, боль в мошонке, прибавка массы тела, головная боль, головокружение, утомляемость, аспе.

Также всем пациентам выполняли антропометрию с расчетом индекса массы тела и уточняли анамнез применения препаратов, влияющих на уровень пролактина крови.

Для статистической обработки результатов использовали компьютерные программы Excel и STATISTICA 12.0 (Stat Soft, 2001). Проверку показателей на нормальность проводили с помощью теста Шапиро–Уилка. Распределение сывороточной концентрации пролактина значительно отличалось от нормального, поэтому применялись методы непараметрической статистики (данные представлены в виде медианы, 25 %-го и 75 %-го квартилей – Me (LQ–UQ)). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования. Клиническая характеристика участников исследования представлена в табл. 1. Исходно сывороточная концентрация пролактина в целом по группе составила 867,0 (545,3–1051,5) мМЕ/л и была достоверно выше у женщин (977,7 (668,7–1100,0) мМЕ/л), чем у мужчин (485,5 (417,6–529,4) мМЕ/л) ($U = 152,0$; $z = 6,93$; $p < 0,00001$). Концентрация пролактина ≥ 1000 мМЕ/л установлена у 33 (26,9 %) пациентов женского пола и у 1 (3,7 %) пациента мужского пола, концентрация пролактина >2000 мМЕ/л – у 2 (3,2 %) пациентов женского пола. Значения пролактина >2000 мМЕ/л у мужчин, включенных в исследование, не встречались. Избыточная масса тела и ожирение имели место у 38 (31,8 %) пациентов – 26 (27,7 %) женщин и 12 (53,4 %) мужчин.

В целом по группе у 99 (82,5 %) пациентов (81 (87,1 %) женщины и 18 (66,7 %) мужчин) имелись жалобы, среди которых у 67 (67,7 %) пациентов (64 (68,8 %) женщин и 3 (11,1 %) мужчин) – специфические для синдрома ГП (галакторея, НМЦ, снижение либидо, ненаступление беременности), у 52 (52,5 %) пациентов (37 (39,7 %) женщин и 16 (59,3 %) мужчин) – неспецифические (боль в молочных железах, боль в мошонке, прибавка массы тела, аспе, головная боль, головокружение, утомляемость). Неспецифические жалобы встречались в 1,5 раза чаще у мужчин, чем у женщин (рис. 1).

Результаты канюлированного теста на пролактин в общей группе обследованных, а также среди пациентов мужского и женского пола представлены в табл. 2 и на рис. 2.

Таблица 1. Клиническая характеристика группы обследованных пациентов

Table 1. Clinical characteristics of the group of examined patients

Показатель	Все пациенты	Женщины	Мужчины	Достоверность различий (м/ж)
Кол-во пациентов, n (%)	120 (100)	93 (77,5)	27 (22,5)	$\chi^2 = 72,6$; $p < 0,001$
Возраст, лет	$31,4 \pm 9,0$	$32,6 \pm 8,7$	$27,0 \pm 8,5$	$t = 2,93$; $p = 0,004$
Пролактин, мМЕ/л	867,0 (545,3–1051,5)	977,7 (668,7–1100,0)	485,5 (417,6–529,4)	$z = 6,93$; $U = 152,0$; $p < 0,00001$
ИМТ, кг/м ²	$24,2 \pm 6,1$	$23,5 \pm 5,4$	$26,6 \pm 7,5$	$t = -2,35$; $p = 0,021$
Число пациентов, n (%): с избыточной массой тела и ожирением	38 (31,6)	26 (27,7)	12 (53,4)	$\chi^2 = 2,67$; $p = 0,105$
В том числе:				
с избыточной массой тела (ИМТ 25–29,9 кг/м ²)	21 (17,5)	16 (17,2)	5 (18,5)	$\chi^2 = 0,03$; $p = 0,874$
с ожирением (ИМТ ≥ 30 кг/м ²)	17 (14,1)	10 (10,5)	7 (34,9)	$\chi^2 = 3,96$; $p = 0,047$
со специфическими для ГП жалобами	67 (67,7)	64 (68,8)	3 (11,1)	$\chi^2 = 66,4$; $p < 0,001$
с неспецифическими жалобами	52 (52,5)	37 (39,7)	16 (59,3)	$\chi^2 = 21,6$; $p < 0,001$
Общее кол-во пациентов с наличием жалоб, n (%)	99 (82,5)	81 (87,1)	18 (66,7)	$\chi^2 = 6,05$; $p = 0,014$

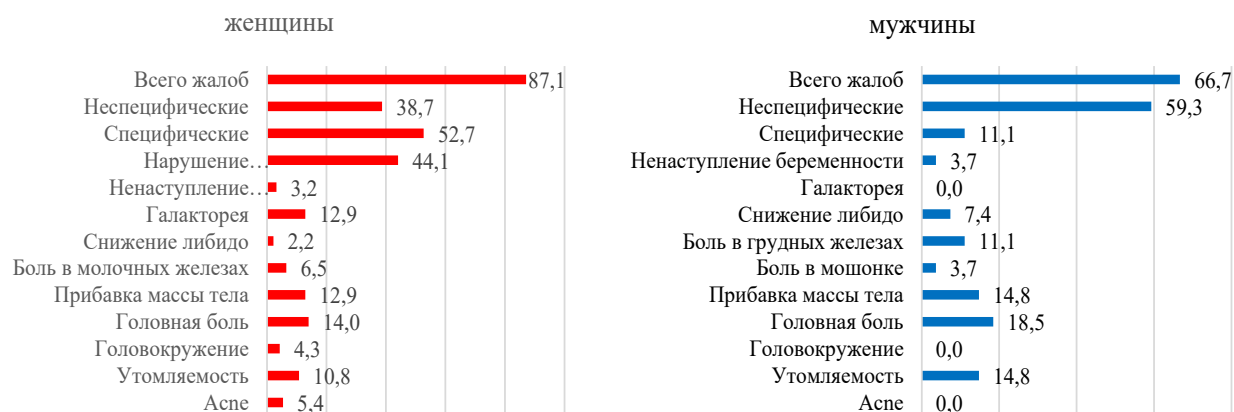


Рис. 1. Частота встречаемости у пациентов жалоб и клинических симптомов, %

Fig. 1. Occurrence frequency of complaints and clinical symptoms in patients, %

Как следует из представленных в табл. 2 и на рис. 2 данных, в точке 0 канюлированного теста медиана пролактина составила 633,8 мМЕ/л и достоверно снизилась до 526,9 мМЕ/л в точке 1 ($z = 8,37$; $p < 0,001$) и до 412,7 мМЕ/л в точке 2 ($z = 8,81$; $p < 0,001$).

Таблица 2. Результаты канюлированного теста на пролактин

Table 2. Results of cannulated prolactin test

Показатель		Все пациенты	Женщины	Мужчины	Достоверность различий (м/ж)
T0	Пролактин, мМЕ/л	633,8 (445,9–885,5)	741,0 (534,2–1036,0)	416,8 (287,5–455,9)	$U = 341,0$; $z = 5,74$; $p < 0,001$
	Число пациентов, n (%):				
	с ГП	80 (66,7)	70 (75,3)	10 (37,0)	$\chi^2 = 46,4$; $p < 0,001$
	с ГП ≥ 1000	23 (21,7)	22 (26,9)	1 (3,7)	$\chi^2 = 6,62$; $p = 0,010$
с ГП ≥ 2000	3 (2,5)	3 (3,2)	0 (0)	$\chi^2 = 0,89$; $p = 0,345$	
T1	Пролактин, мМЕ/л	526,9 (366,5–729,1)	598,6 (423,9–783,7)	337,7 (256,2–415,3)	$U = 344,5$; $z = 5,72$; $p < 0,001$
	Число пациентов, n (%):				
	с ГП	62 (51,7)	56 (66,2)	6 (22,2)	$\chi^2 = 12,8$; $p < 0,001$
	с ГП ≥ 1000	12 (10)	12 (12,9)	0 (0)	$\chi^2 = 3,87$; $p = 0,049$
с ГП ≥ 2000	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NS	
T2	Пролактин, мМЕ/л	412,7 (284,9–605,9)	491,5 (348,3–634,7)	267,9 (187,5–321,3)	$U = 354,5$; $z = 5,66$; $p < 0,001$
	Число пациентов, n (%):				
	с ГП	37 (36,7)	35 (45,1)	2 (7,4)	$\chi^2 = 12,8$; $p < 0,001$
	с ГП ≥ 1000	7 (5,8)	7 (7,5)	0 (0)	$\chi^2 = 2,16$; $p = 0,142$
с ГП ≥ 2000	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NS	

В точке T0 канюлированного теста у 80 (66,7 %) пациентов установлена ГП – у 70 (75,3 %) женщин и 10 (37,0 %) мужчин. При этом у 23 (21,7 %) пациентов концентрация пролактина составила >1000 мМЕ/л, у 3 (2,5 %) – >2000 мМЕ/л. В точке T1 канюлированного теста ГП была установлена у 62 (51,7 %) пациентов – 56 (66,2 %) женщин и 10 (37,0 %) мужчин. У 12 (10 %) пациентов показатель пролактина был в диапазоне от 1000 до 2000 мМЕ/л, преимущественно у женщин (100 %). В точке T2 канюлированного теста ГП отмечена у 37 (36,7 %) пациентов – 35 (45,1 %) женщин и 2 (7,4 %) мужчин. Сывороточная концентрация пролактина >1000 мМЕ/л установлена у 7 (5,8 %) пациентов, при этом все пациенты данной группы были женщинами. Значения концентрации пролактина >2000 мМЕ/л как в точке 1, так и в точке 2 не установлены.

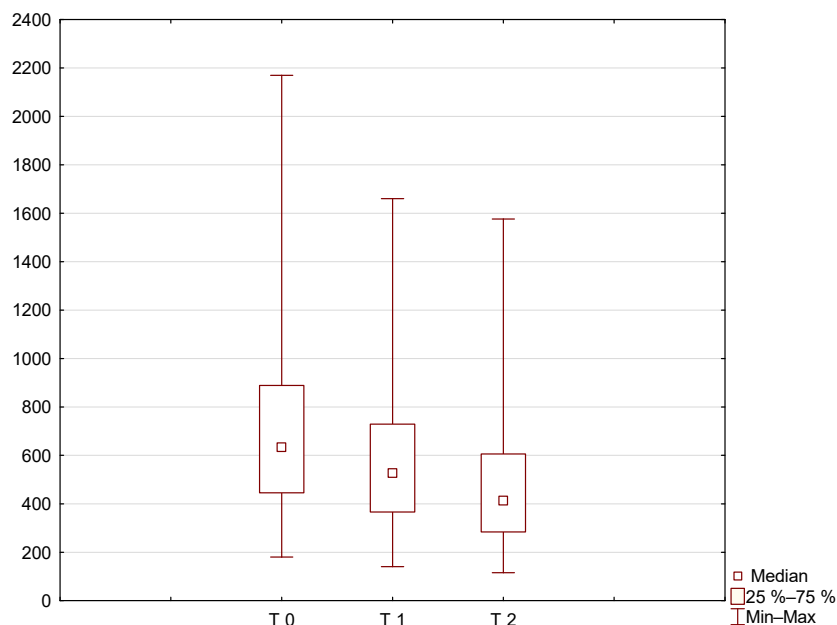


Рис. 2. Показатели пролактина в точках канюлированного теста, Me (Q25–Q75), мМЕ/л
 Fig. 2. Prolactin points of the cannulated test, Me (Q25–Q75), mIU/l

Результаты канюлированного теста расценивали как положительный тест при сохранении ГП во всех трех пробах (T0, T1, T2), как сомнительный, если ГП сохранялась в T0 и T1, и как отрицательный, если ГП была только в точке T0. Результаты оценки теста представлены в табл. 3.

Таблица 3. Результаты оценки канюлированного теста на пролактин
 Table 3. Cannulated prolactin test results

Результат теста	Все пациенты	Женщины	Мужчины	Достоверность различий (м/ж)
Положительный	44 (36,7 %)	42 (45,1 %)	2 (7,4 %)	$\chi^2 = 12,8; p < 0,001$
Сомнительный	19 (15,8 %)	15 (16,1 %)	4 (14,8 %)	$\chi^2 = 0,03; p = 0,869$
Отрицательный	57 (47,5 %)	36 (38,7 %)	21 (77,7 %)	$\chi^2 = 12,8; p < 0,001$

В целом по группе положительный канюлированный тест на пролактин установлен в 36,7 % случаев, в том числе у 45,1 % женщин и 7,4 % мужчин ($p < 0,001$). Отрицательный тест, т. е. снижение сывороточной концентрации пролактина до нормальных значений, зарегистрирован у 47,5 % пациентов, 38,7 % женщин и 77,7 % мужчин ($p < 0,001$).

Снижение сывороточной концентрации пролактина в ходе теста (T2 в сравнении с T0) установлено у 113 (94,2 %) пациентов, медиана снижения составила 164,1 (88,6–341,7) мМЕ/л. По сравнению с точкой T0 в точке T1 снижение произошло у 104 (86,7 %) пациентов, медиана снижения составила 104,7 (52,5–219,3) мМЕ/л. В точке T2 по сравнению с точкой T1 снижение произошло у 108 (90 %) пациентов, медиана снижения составила 92,4 (47,8–162,1) мМЕ/л.

Распределение пациентов в зависимости от нормо- и гиперпролактинемии разной степени выраженности в точках канюлированного теста представлено на рис. 3. Показатель пролактина превысил 2000 мМЕ/л у 2,5 % пациентов в точке T0, но не был установлен у пациентов в точках T1 и T2. Умеренное повышение сывороточной концентрации пролактина (от 1000 до 2000 мМЕ/л) было выявлено у 19,2 % пациентов в точке T0, у 10,0 % в точке T1 и не встречалось в точке T2. Через 2 ч после канюляции у всех пациентов с ГП показатель пролактина не превысил 1000 мМЕ/л.

Далее было проведено сравнение показателей у пациентов с положительным, отрицательным и сомнительным результатами канюлированного теста на пролактин (табл. 4).

При положительном канюлированном тесте жалобы и клинические симптомы отмечены у 36 (86,3 %) пациентов, при сомнительном – у 18 (94,7 %), при отрицательном – у 43 (75,4 %) пациентов. Неспецифические жалобы зарегистрированы у 18 (40,9 %) пациентов при положительном

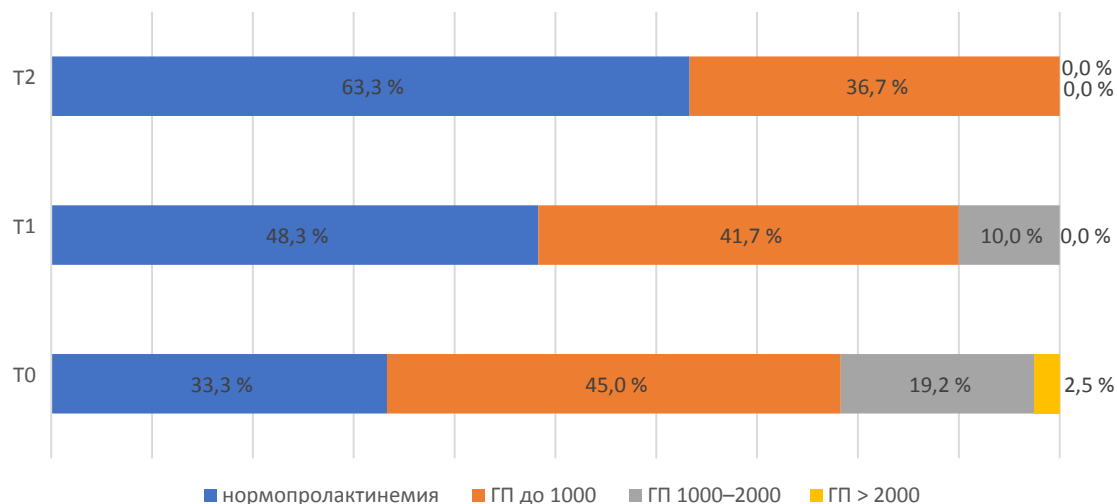


Рис. 3. Доля пациентов с нормопролактинемией и ГП разной степени выраженности в разных точках канюлированного теста на пролактин

Fig. 3. Proportion of patients with normoprolactinemia and HP of varying severity at different points of the cannulated prolactin test

тесте, у 8 (42,1 %) – при сомнительном, у 26 (45,6 %) – при отрицательном тесте. Специфические жалобы были диагностированы у 28 (63,6 %) пациентов при положительном тесте, у 13 (68,4 %) – при сомнительном, у 26 (45,6 %) – при отрицательном тесте.

Таблица 4. Сравнительный анализ подгрупп пациентов в зависимости от результата оценки канюлированного теста на пролактин

Table 4. Comparative analysis of subgroups of patients depending on the cannulated prolactin test result

Показатель	Результат теста		
	положительный (n = 44)	сомнительный (n = 19)	отрицательный (n = 57)
Возраст, лет	32,3 ± 8,6	28,9 ± 7,2	31,5 ± 9,7
Пролактин в точке T0, мМЕ/л	888,5 (727,5–1253,5)	859,6 (671,4–1093,0)	441,3 (356,8–527,2)
ИМТ, кг/м ²	22,8 ± 4,7	26,2 ± 6,4	24,7 ± 6,7
Число пациентов, n (%):			
с избыточной массой тела и ожирением	10 (22,7)	10 (52,6)	10 (31,6)
с ожирением	5 (11,3)	4 (13,9)	8 (21,0)
с жалобами	38 (86,3)	18 (94,7)	43 (75,4)
со специфическими жалобами и симптомами	28 (63,6)	13 (68,4)	26 (45,6)
с неспецифическими жалобами и симптомами	18 (40,9)	8 (42,1)	26 (45,6)

Пациенты со стресс-индуцированной ГП (отрицательный тест) и с истинной ГП (положительный тест) не имели статистически значимых различий по возрасту и частоте встречаемости специфических и неспецифических для ГП жалоб и симптомов. При этом пациенты с положительным канюлированным тестом на пролактин имели более высокий показатель пролактина в точке T0, что составило 888,5 мМЕ/л ($U = 97,0; z = 7,92; p < 0,001$). Среди пациентов с отрицательным тестом, т. е. со стресс-индуцированной ГП, удельный вес лиц с избыточной массой тела и ожирением составил 31,6 % vs 22,7 % среди пациентов с истинной ГП ($\chi^2 = 5,8; p < 0,05$), а распространенность ожирения – 21,0 % vs 11,3 % ($\chi^2 = 5,6; p < 0,05$).

Обсуждение. ГП является актуальной проблемой современной эндокринологии. Ее классические проявления являются важным аспектом репродуктивного здоровья и демографической ситуации, а неклассические относятся к недостаточно изученным и активно обсуждаются в настоящее время. Расширение доступности исследования сывороточной концентрации пролактина и все новые сведения о его влиянии на различные аспекты жизнедеятельности организма увеличили выявляемость умеренной ГП, патологическое значение которой является предметом дискуссии, равно как и оптимальный подход к диагностике, лечению и наблюдению.

Согласно современным рекомендациям, ГП устанавливается при повышении пролактина >25 нг/мл у женщин и >20 нг/мл у мужчин. При этом ГП в пределах 25–50 нг/мл, что соответствует 500–1000 мМЕ/л, принято относить к незначительной ГП, 50–100 нг/мл (1000–2000 мМЕ/л) – к умеренной, >100 нг/мл (2000 мМЕ/л) – к выраженной. Данная градация является условной, однако ее уточнение представляется важным, поскольку считается, что повышение пролактина в интервале 25–50 нг/мл (500–1000 мМЕ/л) наиболее часто является физиологическим (чаще всего – стрессовым). Если показатель пролактина в 2–4 раза выше верхней границы референтного интервала (50–100 нг/мл, или 1000–2000 мМЕ/л), это обычно соответствует так называемой «неопухоловой» ГП. Ассоциированная с пролактиномой гипофиза ГП чаще всего сопровождается повышением пролактина >200 нг/мл (4000 мМЕ/л). Эти данные не являются аксиомой, однако получают все больше доказательств в настоящее время.

Следует отметить, что впервые данные о применении метода канюлирования для оценки секреции пролактина были опубликованы О. Muneууіrcі в 1989 г. [11]. Однако данная методика не получила распространения в клинической практике, что, возможно, обусловлено недостаточной актуальностью дифференциальной диагностики стресс-индуцированной ГП. В последние годы интерес к применению данной методики возрос. Так, опубликовано несколько исследований, в которых приведена оценка результатов применения метода канюлирования для исключения физиологической, в том числе стрессовой, ГП [10, 11, 13, 14]. Определение пролактина в ходе канюлированного теста является инновационным методом дифференциальной диагностики синдрома ГП, который на данный момент еще не получил широкого применения в мировой клинической практике, поскольку требует уточнения особенностей выполнения и интерпретации результатов теста.

В работе А. Tsur с соавт. [13] проанализировали результаты проведения канюлированного теста на пролактин 757 пациентам с ГП. Тест включал три определения сывороточной концентрации пролактина: T0 – базовый уровень, измеренный в состоянии покоя; T60 и T90 – два измерения с помощью канюли через 60 и 90 мин без повторной венопункции.

Из 621 пациента с исходной ГП показатель пролактина нормализовался в T0 у 324 (52,2 %). Вероятность нормопролактинемии в T0 составляла 50 %, если исходный показатель пролактина в 2 раза превышал верхнюю границу нормы (ВГН), и только 5 %, если исходный показатель пролактина превышал ВГН в 5 раз. Из 359 пациентов с ГП в T0 пролактин нормализовался в T60 и/или T90 у 99 (27,6 %) пациентов. Вероятность нормопролактинемии была низкой (<5 %) у пациентов с сывороточной концентрацией пролактина в T0 более чем в 2,4 раза выше ВГН. По результатам исследования только у 260 (34,3 %) пациентов наблюдалась стойкая ГП во всех пробах. Показано, что при исходном уровне пролактина, в 5 раз превышающем ВГН, или показателе пролактина в точке T0, в 2,4 раза превышающем ВГН, вероятность получить нормальные значения пролактина в ходе канюлированного теста составляет менее 5 %. В таком случае проведение теста (T60 и T90) не показано, следует рассмотреть вопрос визуализации гипофиза.

В исследовании Н. Gad с соавт. [14] канюлированный тест на пролактин проведен у 55 пациентов репродуктивного возраста с показателями сывороточного пролактина от 511 до 3022 мМЕ/л, медиана составила 979 мМЕ/л. У 40 % пациенток были НМЦ, у 32 % – галакторея. Канюлированный тест был отрицательным в 58 % случаев. Пациенты с истинной ГП чаще сообщали о галакторее (48 % против 21 %, $p < 0,05$), а пациенты со стресс-индуцированной ГП, как правило, не имели симптомов (47 % против 26 %, $p < 0,05$).

L. Searle с соавт. [15] определили значимость серии канюлированных тестов на пролактин у женщин с бесплодием, у которых при первичной консультации по вопросам репродуктивного здоровья выявлена ГП. Из 1660 женщин только у 44 (2,7 %) после двух проб наблюдалось стойкое повышение сывороточной концентрации пролактина, и они были направлены на канюлированный тест. У 61 % (95 % ДИ – 47–74) женщин показатель пролактина был в норме в ходе канюлированного теста, положительный тест был у 39 % женщин. В подгруппе пациентов с показателем пролактина >1000 мМЕ/л в 45 % случаев через 2 ч после канюлирования показатель пролактина не превысил верхний предел референтного интервала.

В настоящем исследовании канюлированный тест на пролактин выполнен 120 пациентам с ГП в возрасте 18–50 лет. Результат канюлированного теста был положительным у 44 (36,7 %) пациентов. Среди женщин положительный результат канюлированного теста был установлен

у 42 (45,1 %) пациенток, что в 6 раз чаще, чем у мужчин, у которых положительный тест отмечен только в 7,4 % случаев (2 человека), $p < 0,001$.

Сомнительный результат теста, если ГП сохранялась в T0 и T1, был выявлен у 19 (15,8 %) пациентов – 4 (14,8 %) мужчин и 15 (16,8 %) женщин.

Отрицательным тест был у 57 (47,5 %) пациентов. У мужчин канюлированный тест был отрицательным у 21 (77,7 %) пациента, что в процентном выражении было в 2 раза чаще, чем у группы женщин, у которых тест был отрицательным (36 (38,7 %) пациентов), $p < 0,05$.

Таким образом, полученные нами данные соответствуют результатам, полученным в упомянутых выше исследованиях по частоте выявления истинной ГП в ходе канюлированного теста. Достоверные различия результатов теста у мужчин и женщин, вероятно, связаны с особенностями отбора пациентов: у мужчин исходно было незначительное повышение сывороточной концентрации пролактина и реже встречались специфические жалобы. Польза использования данной методики нашла подтверждение и в последнем консенсусном заявлении Гипофизарного общества (Pituitary Society), где тест с канюлированием предложен для выделения стрессовой ГП с целью дифференциальной диагностики пролактином [7].

Показатель пролактина в точке T0 у пациентов с положительным тестом был в 2 раза выше, чем при отрицательном, при этом при сомнительном тесте достоверных различий с пациентами с положительным тестом не выявлено. Наши данные подтверждают, что при умеренном повышении показателя пролактина (до 2 ВГН) проведение канюлированного теста позволяет исключить истинную ГП более чем в 70 % случаев. Чем выше показатель пролактина, тем больше вероятность истинной ГП (табл. 4).

Известно, что избыток пролактина способствует увеличению веса, ожирению. Уровень пролактина в диапазоне от 25 до 100 нг/мл (от 525 до 2100 мМЕ/л), при отсутствии других диагностируемых патологических причин, были предложены как физиологический ответ на запрос на увеличение метаболической активности, и в настоящее время так называемый HomeoFITPRL классифицируют как стимулятор метаболического гомеостаза [16]. В настоящем исследовании проведена оценка частоты избыточной массы тела и ожирения у пациентов с ГП и влияния на результат теста избыточной массы тела и ожирения. Избыточная масса тела и ожирение у пациентов, включенных в исследование, составила 31,7 %, в том числе у 12 (53,4 %) мужчин, что было в 2 раза выше, чем у женщин. Среди женщин избыточная масса тела и ожирение выявлены у 26 (27,7 %) пациентов. При этом избыточная масса тела и ожирение в подгруппе пациентов с отрицательным канюлированным тестом были установлены в 1,3 раза чаще, чем у пациентов с положительным тестом, а в подгруппе с сомнительным тестом – в 2,3 раза чаще, чем у пациентов с положительным тестом. Приведенные факты позволяют выдвинуть гипотезу, что избыточная масса тела и ожирение сопровождаются незначительным (до 50 нг/мл, или 1000 мМЕ/л) повышением пролактина, и это повышение носит не стойкий характер.

Согласно данным Y. Ну с соавт., наиболее частыми жалобами при истинной ГП были НМЦ, галакторея, нарушения зрения, головная боль, их частота достоверно превышала аналогичные цифры при макропролактинемии ($p < 0,05$) [17].

В настоящем исследовании у 99 (82,5 %) пациентов с ГП было установлено наличие различных жалоб и симптомов, дающих основание заподозрить у них ГП. Специфические жалобы (галакторея, НМЦ, снижение либидо, ненаступление беременности) выявлены у 67 пациентов (68,8 % женщин и 11,1 % мужчин), что может быть расценено как случайная находка. У женщин специфические жалобы были установлены в 6,2 раза чаще, чем у мужчин. Неспецифические жалобы (боль в молочных железах, боль в мошонке, набор веса, аспе, головная боль, головокружение, утомляемость) выявлены у 52 (52,5 %) пациентов. Данная группа жалоб встречалась в 1,4 раза чаще у мужчин, чем у женщин. Взаимосвязи жалоб и симптомов с результатами канюлированного теста продемонстрировано не было. Следует отметить, что медиана пролактина у пациентов с наличием жалоб и симптомов составила 633,8 (445,9–885,5) мМЕ/л. Поэтому вряд ли подобная незначительная ГП, не подтвержденная в ходе канюлированного теста, могла быть причиной описанных жалоб и клинических симптомов.

Заключение. Результаты анализа канюлированного теста на пролактин у 120 пациентов с умеренным исходным повышением пролактина показали, что истинная ГП составляет 36,7 %.

Отрицательный тест, указывающий на отсутствие истинной ГП, чаще регистрируется у мужчин, а также у лиц с избыточной массой тела и ожирением. Наличие жалоб и симптомов, особенно неспецифических, не оказывает значимого влияния на результат теста.

В соответствии с полученными данными проведение канюлированного теста на пролактин является перспективным методом исключения физиологической (стресс-индуцированной) ГП у молодых лиц репродуктивного возраста с синдромом ГП.

Необходимо проведение дальнейших исследований для обоснования включения этого метода в алгоритм дифференциальной диагностики синдрома ГП, уточнения показаний для визуализации гипофиза и выбора лечебной тактики.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Клинические рекомендации «Гиперпролактинемия» (проект) / И. И. Дедов [и др.] // Ожирение и метаболизм. – 2023. – Т. 20, № 2. – С. 170–188.
2. Клинические рекомендации по гиперпролактинемии: клиника, диагностика, дифференциальная диагностика и методы лечения [Электронный ресурс] / Рос. ассоц. эндокринологов. – М., 2014. – 19 с. – Режим доступа: https://www.endocrincentr.ru/sites/default/files/specialists/science/clinic-recomendations/rek_giperprolact_14.pdf. – Дата доступа: 21.11.2023.
3. Diagnosis and treatment of hyperprolactinemia: an Endocrine Society clinical practice guideline / S. Melmed [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2011. – Vol. 96, N 2. – P. 273–288. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-1692>
4. Об утверждении клинических протоколов: постановление Министерства здравоохранения Респ. Беларусь, 21 июня 2021 г., № 85 [Электронный ресурс] // Нац. правовой Интернет-портал Респ. Беларусь. – Режим доступа: <https://pravo.by/document/?guid=12551&p0=W22238190p&p1=1&p5=0>. – Дата доступа: 11.12.2023.
5. Федеральные клинические рекомендации по клинике, диагностике, дифференциальной диагностике и методам лечения гиперпролактинемии / Г. Мельниченко [и др.] // Проблемы эндокринологии. – 2013. – Т. 59, № 6. – С. 19–26.
6. Современная концепция диагностики синдрома гиперпролактинемии / Н. В. Карлович [и др.] // Здравоохранение. – 2023. – № 10. – С. 39–50.
7. Diagnosis and management of prolactin-secreting pituitary adenomas: a pituitary society international consensus statement / S. Petersenn [et al.] // Nat. Rev. Endocrinol. – 2023. – Vol. 19. – P. 722–740. <https://doi.org/10.1038/s41574-023-00886-5>
8. Lennartsson, A. Prolactin in response to acute psychosocial stress in healthy men and women / A.-K. Lennartsson, I. H. Jonsdottir // Psychoneuroendocrinology. – 2011. – Vol. 36, N 10. – P. 1530–1539. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.04.007>
9. Pitfalls in the diagnostic evaluation of hyperprolactinemia / L. Vilar [et al.] // Neuroendocrinology. – 2019. – Vol. 109, N 1. – P. 7–19. <https://doi.org/10.1159/000499694>
10. Italian guidelines for the management of prolactinomas / R. Cozzi [et al.] // Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets. – 2023. – Vol. 23, N 12. – P. 1459–1479. <https://doi.org/10.2174/1871530323666230511104045>
11. Muneyyirci-Delale, O. Diagnosis of stress-related hyperprolactinemia. Evaluation of the hyperprolactinemia rest test / O. Muneyyirci-Delale, D. Goldstein, F. I. Reyes // N. Y. State J. Med. – 1989. – Vol. 89, N 4. – P. 205–208.
12. Saleem, M. Prolactin biology and laboratory measurement: An update on physiology and current analytical issues / M. Saleem, H. Martin, P. Coates // Clin. Biochem. Rev. – 2018. – Vol. 39, N 1. – P. 3–16.
13. Cahn role of cannulated prolactin test in evaluation of hyperprolactinemia – a retrospective study / A. Tsur [et al.] // Endocrine Practice. – 2020. – Vol. 26. – P. 1304–1311.
14. Gad, H. The role of cannulated prolactin test in females of reproductive age presenting with isolated mild persistent hyperprolactinaemia on random sampling / H. Gad, Y. Mamoojee, A. James // Endocrine Abstracts. – 2021. – Vol. 73. – Art. AEP491. <https://doi.org/10.1530/endoabs.73.AEP491>
15. A cannulated prolactin series reduces the need for further investigations in women with infertility and lowers the number of false positive screening prolactin measurements / L. Searle [et al.] // Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol. – 2021. – Vol. 61, N 6. – P. 949–954. <https://doi.org/10.1111/ajo.13416>
16. Metabolic effects of prolactin / R. Pirchio [et al.] // Front Endocrinol. (Lausanne). – 2022. – Vol. 13. – Art. 1015520. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022/1015520>
17. Establishment of reference intervals of monomeric prolactin to identify macroprolactinemia in Chinese patients with increased total prolactin / Y. Hu [et al.] // BMC Endocr. Disord. – 2021. – Vol. 21, N 1. – Art. 197. <https://doi.org/10.1186/s12902-021-00861-z>

References

1. Dedov I. I., Mel'nichenko G. A., Dzeranova L. K., Andreeva E. N., Grineva E. N., Marova E. I. [et al.]. Clinical guidelines “Hyperprolactinemia” (draft). *Ozhirenie i metabolizm* [Obesity and metabolism], 2023, vol. 20, no. 2, pp. 170–188 (in Russian).
2. *Clinical recommendations for hyperprolactinemia: clinic, diagnostics, differential diagnostics and treatment methods*. Moscow, 2014. 19 p. Available at: https://www.endocrincentr.ru/sites/default/files/specialists/science/clinic-recomendations/rek_giperprolact_14.pdf (accessed 21.11.2023) (in Russian).

3. Melmed S., Casanueva F. F., Hoffman A. R., Kleinberg D. L., Montori V. M., Schlechte J. A., Wass J. A. H. Diagnosis and treatment of hyperprolactinemia: an Endocrine Society clinical practice guideline. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2011, vol. 96, no. 2, pp. 273–288. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-1692>

4. On approval of clinical protocols: Decree of the Ministry of Health of the Republic of Belarus, June 21, 2021, no. 85. *National legal Internet portal of the Republic of Belarus*. Available at: <https://pravo.by/document/?guid=12551&p0=W22238190p&p1=1&p5=0> (accessed 11.12.2023.)

5. Mel'nichenko G. A., Dzeranova L. K., Pigarova E. A., Vorotnikova S. Yu., Rozhinskaya L. Ya., Dedov I. I. Federal clinical guidelines on the clinic, diagnosis, differential diagnosis and methods of treatment of hyperprolactinemia. *Problemy endokrinologii* [Problems of endocrinology], 2013, vol. 59, no. 6, pp. 19–26 (in Russian).

6. Karlovich N. V., Malyshko M. A., Danilkovich L. S., Mokhort T. V. Modern concept of diagnosing hyperprolactinemia syndrome. *Zdravookhranenie* [Healthcare], 2023, no. 10, pp. 39–50 (in Russian).

7. Petersenn S., Fleseriu M., Casanueva F. F., Giustina A., Biermasz N., Biller B. M. K. [et al.]. Diagnosis and management of prolactin-secreting pituitary adenomas: a pituitary society international consensus. *Nature Reviews Endocrinology*, 2023, vol. 19, pp. 722–740. <https://doi.org/10.1038/s41574-023-00886-5>

8. Lennartsson A.-K., Jonsdottir I. H. Prolactin in response to acute psychosocial stress in healthy men and women. *Psychoneuroendocrinology*, 2011, vol. 36, no. 10, pp. 1530–1539. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.04.007>

9. Vilar L., Vilar C. F., Lyra R., da Conceição Freitas M. Pitfalls in the diagnostic evaluation of hyperprolactinemia. *Neuroendocrinology*, 2019, vol. 109, no. 1, pp. 7–19. <https://doi.org/10.1159/000499694>

10. Cozzi R., Auriemma R. S., De Menis E., Esposito F., Ferrante E., Iati G. [et al.]. Italian guidelines for the management of prolactinomas. *Endocrine, Metabolic and Immune Disorders-Drug Targets*, 2023, vol. 23, no. 12, pp. 1459–1479. <https://doi.org/10.2174/1871530323666230511104045>

11. Muneyyirci-Delale O., Goldstein D., Reyes F. I. Diagnosis of stress-related hyperprolactinemia. Evaluation of the hyperprolactinemia rest test. *New York State Journal of Medicine*, 1989, vol. 89, no. 4, pp. 205–208.

12. Saleem M., Martin H., Coates P. Prolactin biology and laboratory measurement: An update on physiology and current analytical issues. *Clinical Biochemist Reviews*, 2018, vol. 39, no. 1, pp. 3–16.

13. Tsur A., Dreyfuss E., Abramof R. N., Pollack R., Cahn A. Role of cannulated prolactin test in evaluation of hyperprolactinemia – a retrospective study. *Endocrine Practice*, 2020, vol. 26, pp. 1304–1311. <https://doi.org/10.4158/EP-2020-0260>

14. Gad H., Mamoojee Y., James A. The role of cannulated prolactin test in females of reproductive age presenting with isolated mild persistent hyperprolactinaemia on random sampling. *Endocrine Abstracts*, 2021, vol. 73, art. AEP491. <https://doi.org/10.1530/endoabs.73.AEP491>

15. Searle L., McDowell S., Willink R., Krebs J. A cannulated prolactin series reduces the need for further investigations in women with infertility and lowers the number of false positive screening prolactin measurements. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 2021, vol. 61, no. 6, pp. 949–954. <https://doi.org/10.1111/ajo.13416>

16. Pirchio R., Graziadio C., Colao A., Pivonello R., Auriemma R. S. Metabolic effects of prolactin. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 2022, vol. 13, art. 1015520. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022/1015520>

17. Hu Y., Ni J., Zhang B., Cheng W., Zhang H., Ye H., Ji L., Lu B., Guan M. Establishment of reference intervals of monomeric prolactin to identify macroprolactinemia in Chinese patients with increased total prolactin. *BMC Endocrine Disorders*, 2021, vol. 21, no. 1, art. 197. <https://doi.org/10.1186/s12902-021-00861-z>

Информация об авторах

Карлович Наталья Викторовна – д-р мед. наук, профессор. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: natkarlovich@gmail.com

Шишко Ольга Николаевна – канд. мед. наук, заместитель главного врача. Минский городской консультативный эндокринологический центр (ул. Киселева, 7, 220029, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: shyshko.volha@tut.by

Мальшко Мария Андреевна – врач-эндокринолог. 16-я городская клиническая поликлиника (ул. Щедрина, 83, 220051, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: doc-malyshko@yandex.ru

Юрения Елена Васильевна – главный врач. Минский городской клинический эндокринологический центр (ул. Киселева, 7, 220029, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: yureniaelena@gmail.com

Мохорт Татьяна Вячеславовна – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: tatsianamokhort@gmail.com

Information about the authors

Natalia V. Karlovich – D. Sc. (Med.), Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: natkarlovich@gmail.com

Olga N. Shyshko – Ph. D. (Med.), Deputy Chief for medical care. Minsk City Clinical Endocrinology Center (7, Kiselev Str., 220029, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: shyshko.volha@tut.by

Maria A. Malyshko – endocrinologist. 16th City Clinical Clinic (83, Shchedrin Str., 220051, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: doc-malyshko@yandex.ru

Elena V. Yurenia – Chief Physician. Minsk City Clinical Endocrinology Center (7, Kiselev Str., 220029, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yureniaelena@gmail.com

Tatiana V. Mokhort – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tatsianamokhort@gmail.com