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

ВЕСЦІ
НАЦЫЯНАЛЬНАЙ АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ МЕДЫЦЫНСКІХ НАВУК. 2024. Т. 21, № 2

ИЗВЕСТИЯ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК. 2024. Т. 21, № 2

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. Строцкий – 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. Клюшник – Научный центр психического здоровья, Москва, Российская Федерация
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, № 2
Выходит на русском, белорусском и английском языках

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

Подписано в печать 16.05.2024. Выход в свет 28.05.2024. Формат 60×84 $^{1}/_{8}$. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 10,23. Уч.-изд. л. 11,3. Тираж 40 экз. Заказ 96.
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

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

PROCEEDINGS
OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

MEDICAL SERIES, 2024, vol. 21, no. 2

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

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

Eduardas Aleknavicius – National Cancer Institute, Vilnius, Republic of Lithuania
Igor A. Cheshik – Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus
Mark-Antoine Custaud – University of Angers, Angers, French Republic
Dragan Djuric – Richard Buryan Medical Physiology Institute of the University of Belgrade, Belgrade, Republic of Serbia
Mark M. Van Hulle – University of Leuven, Leuven, Kingdom of Belgium
Tatiana P. Klyushnik – Mental Health Research Center, Moscow, Russian Federation
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. 2.

Printed in Russian, Belarusian and English languages

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

It is sent of the press 16.05.2024. Appearance 28.05.2024. Format 60×84 $^{1}/_{8}$. Offset paper. The press digital.
Printed pages 10.23. Publisher's signatures 11.3. Circulation 40 copies. Order 96.
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

Богдан В. Г., Полешко А. Г., Мисюкевич А. Ю., Смирнов А. А., Суховеева С. В., Янцевич А. В. Биологический потенциал генно-инженерной конструкции, кодирующей ген фактора роста эндотелия сосудов человека 95

Рубникович С. П., Побойнев В. В., Хрусталёв В. В. Новый подход к разработке вакцины от кариеса зубов 104

Адзерихо И. Э., Агабеков В. Е., Владимирская Т. Э., Дубатовка Е. И., Жилкевич А. В. Эффективность новой системы адресной доставки тенектеплазы при остром инфаркте миокарда в эксперименте *in vivo* 116

Дашкевич Э. В., Климкович Н. Н., Красько О. В., Пасюков В. В., Пешняк Ж. В., Расюк Е. Д. Трансфузионно-гемостазиологический кластер в электронном здравоохранении Республики Беларусь 125

Пронько Т. П., Снежицкий В. А., Степуро Т. Л., Горчакова О. В. Особенности распространения полиморфных вариантов генов *CYP2C19*, *P2RY12*, *ITGB3*, *ITGA2* и *eNOS3* среди пациентов с инфарктом миокарда ... 138

Доронькина А. С., Рудак А. А., Жаворонок И. П., Богдан В. Г. Молекулярный докинг орфанных рецепторов с амидами жирных кислот 149

Поклонская Н. В., Амвросьева Т. В., Колтунова Ю. Б., Шилова Ю. А., Бельская И. В. Спектр возбудителей острых вирусных гастроэнтеритов в условиях спорадической и групповой заболеваемости в Беларуси 156

Шклярова А. Н., Челнокова И. А., Надыров Э. А., Крылов Ю. А., Стародубцева М. Н. Механические свойства клеток рака молочной железы разных молекулярно-биологических подтипов в реакции с антителами против CD109 антигена 168

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

CONTENTS

CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE

Bogdan V. G., Poleshko A. G., Misiukevich A. Yu., Smirnov A. A., Sukhaveyeva S. V., Yantsevich A. V. Biological potential of a genetic engineering construction encoding the gene for the human vascular endothelium growth factor 95

Rubnikovich S. P., Poboinev V. V., Khrustalev V. V. A new approach in the development of a dental caries vaccine 104

Adzerikho I. E., Agabekov V. E., Vladimirskaya T. E., Dubatouka K. I., Zhilkevich A. V. Efficacy of a new system of targeted delivery of tenecteplase in acute myocardial infarction in an *in vivo* experiment 116

Dashkevich E. V., Klimkovich N. N., Krasko O. V., Pasyukov V. V., Peshnyak J. V., Rasyuk E. D. Transfusion-hemostasiological cluster in electronic healthcare of the Republic of Belarus..... 125

Pronko T. P., Snezhitskiy V. A., Stsiapura T. L., Gorchakova O. V. Frequency of *CYP2C19*, *P2RY12*, *ITGB3*, *ITGA2*, and *eNOS3* gene polymorphism in patients with myocardial infarction..... 138

Doronkina A. S., Rudak A. A., Zhavoronok I. P., Bogdan V. G. Molecular docking of orphan receptors with fatty acid amides..... 149

Paklonskaya N. V., Amvrosyeva T. V., Kaltunova Yu. B., Shilava Yu. A., Belskaya I. V. Sporadic and group incidence of acute viral gastroenteritis in Belarus: spectrum of the pathogens and etiology features..... 156

Shkliarava N. M., Chelnokova I. A., Nadyrov E. A., Krylov A. Yu., Starodubtseva M. N. Mechanical properties of breast cancer cells of different molecular biological subtypes in reaction with antibodies against CD109 antigen..... 168

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

КЛІНІЧНАЯ И ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА
CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE

УДК 576.5; 577.21
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-95-103

Поступила в редакцию 01.03.2024
Received 01.03.2024

В. Г. Богдан[1], А. Г. Полешко[2], А. Ю. Мисюкевич[2], А. А. Смирнов[2], С. В. Суховеева[2], А. В. Янцевич[3]

[1]Отделение медицинских наук НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь
[2]Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь
[3]Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ, КОДИРУЮЩЕЙ ГЕН ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ ЧЕЛОВЕКА

Аннотация. Установлен высокий биологический потенциал разработанной генно-инженерной плазмидной конструкции pcDNA™3.1(–) VEGF165. Доказана ее способность индуцировать значимое повышение экспрессии гена *VEGF165* в мезенхимальных мультипотентных стромальных клетках и эндотелиоцитах человека и увеличивать наработку клетками белка VEGF165. Выявленная временная функциональная активность генно-инженерной конструкции в клетках и отсутствие генотоксического действия минимизирует вероятность онкотрансформации.

Созданная генно-инженерная векторная конструкция pcDNA™3.1(–) VEGF165 может быть использована для разработки модели генотерапевтического лекарственного средства, способствующего ангиогенезу *in vivo* в ишемизированных тканях.

Ключевые слова: генно-инженерная плазмидная конструкция, ишемия, фактор роста эндотелия сосудов, VEGF165, трансфекция, экспрессия гена

Для цитирования: Биологический потенциал генно-инженерной конструкции, кодирующей ген фактора роста эндотелия сосудов человека / В. Г. Богдан [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2024. – Т. 21, № 2. – С. 95–103. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-95-103

Vasiliy G. Bogdan[1], Anna G. Poleshko[2], Ala Yu. Misiukevich[2], Andrei A. Smirnov[2], Sviatlana V. Sukhaveyeva[2], Aleksey V. Yantsevich[3]

[1]Department of Medical Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
[2]Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
[3]Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

BIOLOGICAL POTENTIAL OF A GENETIC ENGINEERING CONSTRUCTION ENCODING THE GENE FOR THE HUMAN VASCULAR ENDOTHELIUM GROWTH FACTOR

Abstract. The high biological potential of the developed genetically engineered plasmid construct pcDNATM3.1(–) VEGF165 has been established. It has been proven to induce a significant increase in the expression of the gene VEGF165 in mesenchymal multipotent stromal cells and human endothelial cells and to increase the production of the VEGF165 protein by cells. The identified temporary functional activity of the genetically engineered construct in cells and the absence of genotoxic effects minimize the likelihood of oncotransformation.

The created genetically engineered vector construct pcDNATM3.1(–) VEGF165 can be used to develop a gene therapy drug model that promotes angiogenesis *in vivo* in ischemic tissues.

Keywords: genetically engineered plasmid construction, ischemia, vascular endothelial growth factor, VEGF165, transfection, gene expression

For citation: Bogdan V. G., Poleshko A. G., Misiukevich A. Yu., Smirnov A. A., Sukhaveyeva S. V., Yantsevich A. V. Biological potential of a genetic engineering construction encoding the gene for the human vascular endothelium growth factor. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2024, vol. 21, no. 2, pp. 95–103 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-95-103

Введение. В настоящее время наиболее перспективным методом лечения ишемии нижних конечностей атеросклеротического или диабетического генеза является терапевтический ангиогенез, основанный на введении в ткани с нарушенным кровоснабжением рекомбинантных генетических конструкций, кодирующих гены факторов роста, и/или стволовых/прогениторных клеток с их сверхэкспрессией [1–4].

Образование, стабилизация и созревание кровеносных сосудов *in vivo* обусловлены действием проангиогенных факторов – белков-медиаторов ангиогенеза (факторы роста эндотелия сосудов человека (VEGF), ангиопоэтинов (ANGPT-1,2), основного фактора роста фибробластов (FGF-2), плацентарных факторов роста (PlGF-1,2), интерлейкина-8 (IL-8), тромбоцитарных факторов роста (PDGF), трансформирующего фактора роста-бета (TGF-ß)), а также привлечением с их помощью периваскулярных и гладкомышечных клеток [5–8].

К одним из основных инструментов терапевтического ангиогенеза для формирования сосудистой сети в ишемизированной ткани можно отнести применение функционально активных в клетках человека векторных конструкций, в том числе на основе плазмидных ДНК, кодирующих один или несколько ростовых факторов. Биологические системы на основе плазмид, представляющих собой кольцевые ДНК, в качестве векторных платформ для доставки являются более привлекательной альтернативой моделям на основе рекомбинантных вирусных структур и белков/пептидов [1, 3, 9]. При использовании генотерапевтических плазмидных ДНК-препаратов в организм вводится нуклеиновая кислота, несущая в своей последовательности ген, кодирующий целевой белок, после чего трансляционный аппарат клеток с плазмидной ДНК начинает вырабатывать тот целевой белок, который и вызывает необходимый терапевтический эффект [1]. Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) играет ключевую роль в регуляции ангиогенеза [5–7]. Являясь основным митогенным и хемотаксическим стимулом для эндотелиоцитов, он увеличивает проницаемость сосудов, усиливает активность плазминогена, коллагеназ, способствует прорастанию сосудов в пораженную ишемизированную область. У человека VEGF представлен шестью изоформами. При этом короткие секретируемые формы типа VEGF165 свободно диффундируют во внеклеточную среду и биологически более активны [10].

На сегодняшний день во всем мире генотерапевтические лекарственные средства для лечения ишемии нижних конечностей представлены единичными инновационными изделиями [2, 11, 12]. Многими научными коллективами активно ведутся разработки в направлении повышения эффективности существующих генотерапевтических ДНК-препаратов, в том числе за счет комбинации генов нескольких ростовых факторов в составе одной плазмидной конструкции, которые, как ожидается, будут обеспечивать аддитивный терапевтический эффект *in vivo* [11].

В связи с этим особую актуальность приобретает создание отечественных генно-инженерных конструкций, кодирующих гены факторов роста сосудов человека, как прототипа нового генотерапевтического лекарственного препарата для лечения ишемии.

Цель данной работы – определение на клеточном уровне *in vitro* особенностей биологического потенциала разработанного оригинального модулятора ангиогенеза генно-инженерной плазмидной векторной конструкции pcDNA™3.1(–)VEGF165.

Материалы и методы исследования. *Культуры клеток.* Исследования проводили *in vitro*, используя культивированные в двух-трех пассажах мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки (МСК) и эндотелиоциты (ЭЦ) человека, так как известно, что эти клетки являются также непосредственными участниками ангиогенеза *in vivo* [5, 13, 14]. Первичные культуры клеток получены из биопсийного материала (жировая ткань для МСК, пупочная вена для ЭЦ) доноров-добровольцев по общепринятым методикам путем ферментативной обработки коллагеназой второго типа и трипсином по общепринятым методикам [15–17]. Биомассу клеток получали путем их культивирования в пассажах (при 37 ºС, атмосфере 100%-ной влажности, постоянном давлении CO_2 5 % в ростовых средах α-МЕМ с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) – для МСК; MCDB 131 с добавлением 20 % ЭТС и факторов роста bFGF 2 (2 нг/мл), VEGF (10 нг/мл), эпидермального фактора роста (EGF) (10 нг/мл) – для ЭЦ) в присутствии антибиотиков пенициллина и стрептомицина. Для культивирования ЭЦ использовали покрытые 0,1%-ным желатином культуральные флаконы. Смену ростовой среды проводили каждые 3 сут.

При достижении 70–80 % конфлюентности монослоя МСК и ЭЦ пересевали с плотностью 3 000 и 10 000 кл/см^2 соответственно и культивировали в полной питательной среде указанного выше состава.

Количество и жизнеспособность МСК и ЭЦ определяли с помощью автоматического счетчика клеток (BioRad, США), учитывая способность раствора трипанового синего проникать через цитоплазматическую мембрану погибших клеток. Среднее время удвоения популяции клеток (Y) рассчитывали по формуле

$$Y = (\log_2 2)t/(\log_2(N_t/N_0)),$$

где t – время прироста популяции клеток; N_t – количество клеток, полученное за время культивирования t; N_0 – исходное количество клеток, помещенных в культуральный флакон.

Все клетки обладали высокой жизнеспособностью, были пролиферативно активны, микробиологически стерильны. При этом МСК и ЭЦ имели характерный для них профиль экспрессии поверхностных маркерных молекул: CD73$^+$/CD90$^+$/CD105$^+$/CD34$^-$/CD45$^-$ – для МСК, CD31$^+$/CD117$^+$/CD144$^+$/CD146$^+$/CD45$^-$ – для ЭЦ.

Плазмидные ДНК. Очищенные pcDNA^{TM}3.1(–) VEGF165 с экспрессионной кассетой человеческого фактора роста эндотелия сосудов 165 (размер – 5,994 kb) под контролем CMV-промотора были сконструированы и синтезированы в ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», получены в препаративном количестве, очищены и переданы в ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси».

Трансфекция. Трансфекцию в клетки плазмидных рекомбинантных конструкций pcDNA^{TM}3.1(–)VEGF165 проводили путем липофекции и электропорации. Липофекцию выполняли с использованием коммерческого набора Lipofectamine 3000 (Invitrogene, США), согласно инструкции производителя, электропорацию клеток – с помощью системы для трансфекции Neon^{TM} (Invitrogene, США), согласно рекомендациям производителя. Используемые режимы электропорации: 1700 V/20 мс/1 имп, 1300 V/20 мс/2 имп, 1400 V/20 мс/2 имп – для МСК; 1500 V/20 мс/1 имп, 1000 V/40 мс/1 имп, 1100 V/40 мс/1 имп – для ЭЦ. Эффективность режимов трансфекции оценивали через 48 ч после липофекции/электропорации по количеству клеток, экспрессирующих репортерный белок GFP, и доли жизнеспособных клеток после воздействия методом проточной цитометрии.

Определение экспрессии гена белка VEGF165 в клетках. Экспрессию гена белка VEGF165 в МСК и ЭЦ определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени на амплификаторе CFX Opus 96 (Bio-Rad, США) с помощью набора реагентов TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems Inc., США). Использовали праймеры к исследуемому гену со следующей нуклеотидной последовательностью: VEGF(F): GGAGATCCTTCGAGGAGCACTT; VEGF(R): GGCGATTTAGCAGCAGATATAAGAA. РНК из клеток выделяли с помощью набора RNAqueous®-4PCR Kit (Applied Biosystems Inc., США), согласно протоколу производителя. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрическим методом по оптической плотности ее раствора (λ = 260 нм). Для исследований использовали 300 нг очищенной РНК. Синтез ДНК из РНК осуществляли с помощью набора High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems Inc., США), согласно руководству производителя. Уровень мРНК анализируемого гена выравнивали по отношению к мРНК референс-гена глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы TaqMan® GAPDH Control (Applied Biosystems Inc., США).

Определение содержания белка VEGF165 в кондиционированной клеточной среде. Экспрессионную активность МСК и ЭЦ человека в отношении фактора роста эндотелия сосудов VEGF165 оценивали по способности клеток в условиях культуры продуцировать данный белок в ростовую среду. Концентрацию белка в кондиционированной среде определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческого набора ELISA Kit VEGF-165 (BT LAB, Китай), согласно рекомендациям производителя, и пересчитывали на 10^3 клеток.

Сортинг и клонирование клеток. Для оценки стабильности экспрессии рекомбинантной плазмидной конструкции pcDNA^{TM}3.1(–)VEGF165 в пассажах через 48 ч после котрансфекции МСК и ЭЦ плазмидной конструкцией pcDNA^{TM}3.1(–)VEGF165 и плазмидой с геном зеленого

флуоресцентного белка (GFP) клетки с экспрессией репортерного белка выделяли из исследуемой общей их популяции в стерильных условиях с использованием сортера клеток S3e (Bio-Rad, США). Отсортированные клетки помещали на 6-луночные планшеты и культивировали в стандартных для них условиях до достижения плотности монослоя в 70–80 %, после чего пересаживали на новые культуральные флаконы. Концентрацию белка VEGF165 в кондиционированной среде клеток определяли в течение двух пассажей после стерильного сортинга клеток.

Микроядерный тест. Для оценки влияния pcDNA^{TM}3.1(–)VEGF165 на генетическую стабильность культивированных клеток использовали окрашивание их красителем DAPI, позволяющее визуализировать повышенное количество микроядер в цитоплазме интерфазных клеток, что может свидетельствовать о потенциальной генотоксичности плазмидного препарата. Для этого клетки пассировали с плотностью 20 тыс/см^2, инкубировали в стандартных условиях (5 % CO_2, 37 °C) 72 ч, после чего фиксировали клеточный монослой 70%-ным этанолом и окрашивали DAPI (2,5 мкгр/мл, 5 мин). Далее клетки анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа, используя соответствующий канал измерения (детекция сигнала при λ = 425–475 нм). Подсчитывали в 10 полях зрения общее количество клеток и количество клеток с микроядрами. Относительное количество микроядер высчитывали по формуле: (клетки с микроядрами/общее количество клеток) · 100 %.

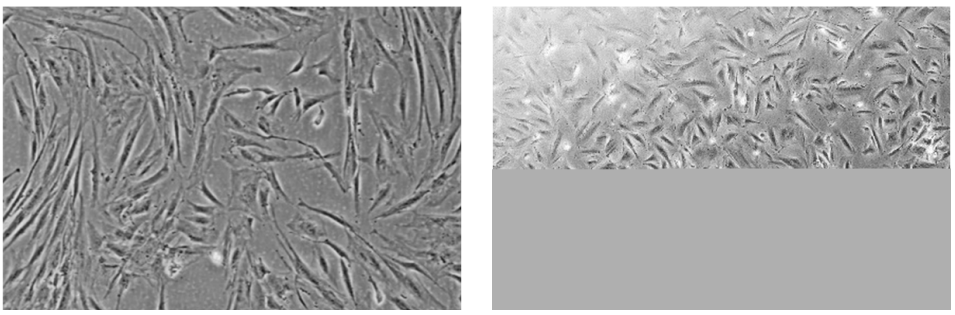
Криоконсервация МСК и ЭЦ. Криоконсервацию полученной в культуре биомассы МСК и ЭЦ осуществляли, используя в качестве криопротектора диметилсульфоксид (ДМСО). Для этого к 0,65 мл клеток (1–2)·10^6)) в ростовой среде α-МЕМ добавляли смесь, содержащую 0,3 мл охлажденной (4–8 °C) ЭТС и 0,05 мл ДМСО, суспензию осторожно перемешивали, герметично закрывали и выдерживали 1 ч при 4 °C, потом 2 ч при –20 °C и помещали в ультраморозильную камеру (–86 °C) для кратковременного криохранения.

Статистическая обработка полученных данных. Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением пакета прикладных программ Statistica (версия 10.0, StatSoft Inc., США). Данные представляли в виде средних величин ± ошибка среднего. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0{,}05$.

Результаты и их обсуждение. Полученные в культуре клетки, используемые для трансфекции, имели типичную для них морфологию: МСК – фибробластоподобную, ЭЦ – фибробластоподобную (укороченная или овальная форма типа «булыжной мостовой») (рис. 1).

Клеточные культуры обладали характерным фенотипом (CD73$^+$/CD90$^+$/CD105$^+$/CD34$^-$/CD45$^-$ – для МСК; CD31$^+$/CD117$^+$/CD144$^+$/CD146$^+$/CD45$^-$ – для ЭЦ) и высокой жизнеспособность (95 ± 1,5 %). Клетки были пролиферативно активны, среднее время удвоения их популяции – 45,3 ± 2 ч для МСК и 39,5 ± 1,5 ч для ЭЦ.

После оптимизации условий трансфекции для полученных в культуре клеток в МСК и ЭЦ вводили рекомбинантные плазмидные конструкции с геном *VEGF165*. Далее трансфецированные клетки культивировали 72 ч в стандартных для них условиях, после чего изучали влияние



a *b*

Рис. 1. Микрофотографии МСК (*a*) и ЭЦ (*b*) в условиях культуры, третий пассаж. Фазово-контрастная микроскопия. ×40

Fig. 1. Microphotographs of MSC (*a*) and EC (*b*) cell culture conditions, passage 3 cells. Magnification, phase contrast microscop. ×40

Т а б л и ц а 2. **Экспрессия CD-маркеров культивированными МСК и ЭЦ, %**

T a b l e 2. **Expression of CD markers by cultured MSC and EC, %**

CD-маркер	CD73	CD90	CD105	CD31	CD117	CD144	CD146
Маркер контрольных МСК в популяции	98,8 ± 0,2	99 ± 0,1	98,4 ± 0,2	–	–	–	–
Маркер МСК в популяции после трансфекции векторной конструкцией pcDNA™3.1(–)VEGF165 и прокультивированных два пассажа	98,5 ± 0,2	99 ± 0,1	98,0 ± 0,2	–	–	–	–
Маркер контрольных ЭЦ в популяции	–	–	–	93 ± 1	89 ± 5	98 ± 1	99 ± 1
Маркер ЭЦ в популяции после трансфекции векторной конструкцией pcDNA™3.1(–)VEGF165 и прокультивированных два пассажа	–	–	–	95 ± 1	89 ± 5	98 ± 1	99 ± 1

Визуализация и подсчет микроядер в клетках после их окраски DAPI показали отсутствие статистически достоверного влияния функциональной активности плазмидной генно-инженерной конструкции pcDNA™3.1(–)VEGF165 на количество микроядер в МСК и ЭЦ. Доказано, что в клеточной культуре допустимая доля клеток с микроядрами, при которой клетки еще считаются биобезопасными, составляет 27 %. Процент клеток в полученных нами препаратах МСК и ЭЦ не изменялся как для контрольных, так и для трансфецированных клеток (5 и 6 % соответственно), что свидетельствовало о хорошем состоянии репаративного аппарата клеточных культур и об отсутствии рисков, связанных с их онкотрансформацией.

Время удвоения популяции снижалось в среднем в 1,2 и 1,4 раза ($p \leq 0,05$) для МСК и ЭЦ соответственно, а в среде культивирования на протяжении первого после трансфекции пассажа можно было наблюдать откреплённые погибшие клетки. Причем этот эффект уже полностью нивелировался во втором раунде пассирования. Временный эффект негативного воздействия на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток в культуре можно объяснить очевидным токсическим воздействием липофекционного агента/электрического тока на цитоплазматическую мембрану клеток при трансфекции.

Выводы

1. В результате исследований *in vitro* впервые установлен высокий биологический потенциал разработанной генно-инженерной плазмидной конструкции pcDNA™3.1(–)VEGF165, который проявляется в ее способности индуцировать значимое повышение экспрессии гена *VEGF165* в мезенхимальных мультипотентных стромальных клетках и эндотелиоцитах человека и увеличивать наработку этими клетками белка VEGF165.

2. Выявленная временная функциональная активность pcDNA™3.1(–)VEGF165 в клетках исключает продленную гиперэкспрессию фактора роста, характерную для опухолевых линий, что в сочетании с отсутствием генотоксического действия плазмидной конструкции минимизирует вероятность переключения биохимических процессов в трансфецированных клеточных культурах и их онкотрансформацию.

3. Созданная генно-инженерная векторная конструкция pcDNA™3.1(–)VEGF165 может быть использована для разработки модели генотерапевтического лекарственного средства, способствующего ангиогенезу *in vivo* в ишемизированных тканях.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Работа выполнена в рамках отдельного проекта фундаментальных и прикладных исследований НАН Беларуси (№ ГР 20230113).

Acknowledgements. The work was carried out within the framework of a separate project for fundamental and applied research of the National Academy of Sciences of Belarus (No. GR 20230113).

Список использованных источников

1. Liu, Y. Gene therapy with plasmid DNA / Y. Liu, S. Musetti, L. Huang // Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery / ed. D. J. Abraham. – John Wiley & Sons, Inc., 2021. – P. 1–35. https://doi.org/10.1002/0471266949.bmc073.pub3

2. Богдан, В. Г. Стимуляция ангиогенеза в комплексном лечении пациентов с хронической артериальной недостаточностью нижних конечностей / В. Г. Богдан, С. Г. Лепешко // Воен. медицина. – 2017. – № 2. – С. 117–119.

3. Червяков, Ю. В. Эффективность генной терапии и стандартного консервативного лечения хронической ишемии нижних конечностей атеросклеротического генеза / Ю. В. Червяков, О. Н. Власенко // Вестн. хирургии им. И. И. Грекова. – 2018. – Т. 177, № 2. – С. 64–69.

4. Механизм стимуляции ангиогенеза в ишемизированном миокарде с помощью стромальных клеток жировой ткани / К. А. Рубина [и др.] // Кардиология. – 2010. – Т. 50, № 2. – С. 51–61.

5. Semenza, G. L. Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling / G. L. Semenza // J. Cell Biochem. – 2007. – Vol. 102, N 4. – P. 840–847. https://doi.org/10.1002/jcb.21523

6. Molecular profiling of angiogenesis markers / S.-C. Shih [et al.] // Am. J. Pathol. – 2002. – Vol. 161, N 1. – P. 35–41. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64154-5

7. Секреция ангиопоэтинов тканью плаценты при физиологическом развитии беременности и при гестозе / О. И. Степанова [и др.] // Журн. акушерства и женских болезней. – 2010. – № 6. – С. 69–74.

8. Васина, Л. В. Функциональная гетерогенность эндотелия / Л. В. Васина, Т. Д. Власов, Н. Н. Петрищев // Артериальная гипертензия. – 2017. – Т. 23, № 2. – С. 88–102.

9. Kishwar, H. K. Gene expression in mammalian cells and its applications / H. K. Kishwar // Adv. Pharmaceut. Bull. – 2013. – Vol. 3, N 2. – P. 257–263. https://doi.org/10.5681/apb.2013.042

10. Дифференциальная экспрессия изоформ сосудисто-эндотелиального фактора роста человека и новые подходы к терапевтическому ангиогенезу / К. Г. Скрябин [и др.] // Докл. Акад. наук. – 2004. – Т. 397, № 6. – С. 838–841.

11. Генная терапия в регенеративной медицине: последние достижения и актуальные направления развития / Е. А. Слободкина [и др.] // Гены и Клетки. – 2020. – Т. 15, № 1. – С. 6–16.

12. Макаревич, П. И. Три десятилетия развития генной терапии: вехи и перспективы / П. И. Макаревич // Регенерация органов и тканей. – 2023. – Т. 1, № 1. – С. 16–24.

13. Engineering vascularized tissue / R. K. Jain [et al.] // Nat. Biotechnol. – 2005. – Vol. 23, N 7. – P. 821–823. https://doi.org/10.1038/nbt0705-821

14. Hirschi, K. K. Pericytes in the microvasculature / K. K. Hirschi, P. A. D'Amore // Cardiovasc. Res. – 1996. – Vol. 32, N 4. – P. 687–698.

15. Ravishankar, P. Isolation of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood / P. Ravishankar, M. A. Zeballos, K. Balachandran // J. Vis. Exp. – 2017. – Vol. 127. – Art. 56021. https://doi.org/10.3791/56021

16. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells / B. Baudin [et al.] // Nat. Protocols. – 2007. – Vol. 2, N 3. – P. 481–485. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.54

17. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells / P. A. Zuk [et al.] // Mol. Biol. Cell. – 2002. – Vol. 13, N 12. – P. 4279–4295. https://doi.org/10.1091/mbc.e02-02-0105

References

1. Liu Y., Musetti S., Huang L. Gene therapy with plasmid DNA. *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, 2021, pp. 1–35. https://doi.org/10.1002/0471266949.bmc073.pub3

2. Bogdan V. G., Lepeshko S. G. Stimulation of angiogenesis in treatment of patients with chronic arterial insufficiency of the lower limbs. *Voennaya meditsina* [Military medicine], 2017, no. 2, pp. 117–119 (in Russian).

3. Chervyakov Yu. V., Vlasenko O. N. Comparison of the effectiveness of gene therapy and standard conservative therapy for patients with chronic lower limb ischemia due to atherosclerosis. *Vestnik khirurgii imeni I. I. Grekova* [Grekov's Bulletin of Surgery], 2018, vol. 177, no. 2, pp. 64–69 (in Russian).

4. Rubina K. A., Kalinina N. I., Efimenko A. Yu., Lopatina T. V., Melikhova V. S., Tsokolaeva Z. I., Sysoeva V. Yu., Tkachuk V. A., Parfenova E. V. The mechanism of stimulation of angiogenesis in ischemic myocardium with the help of stromal cells of adipose tissue. *Kardiologiya* [Cardiology], 2010, vol. 50, no. 2, pp. 51–61 (in Russian).

5. Semenza G. L. Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2007, vol. 102, no. 4, pp. 840–847. https://doi.org/10.1002/jcb.21523

6. Shih S.-C., Robinson G. S., Perruzzi C. A., Calvo A., Desai K., Green J. E., Ali I. U., Smith L. E. H., Senger D. R. Molecular profiling of angiogenesis markers. *American Journal of Pathology*, 2002, vol. 161, no. 1, pp. 35–41. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64154-5

7. Stepanova O. I., Lesnichiya M. V., L'vova T. Yu., Sokolov D. I., Sel'kov S. A. Angiopoietins placental secretion in normal pregnancies and those complicated by preeclampsia. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh boleznei* [Journal of obstetrics and women's diseases], 2010, no. 6, pp. 69–74 (in Russian).

8. Vasina L. V., Vlasov T. D., Petrishchev N. N. Functional heterogeneity of the endothelium. *Arterial'naya gipertenziya* [Arterial hypertension], 2017, vol. 23, no. 2, pp. 88–102 (in Russian).

9. Kishwar H. K. Gene expression in mammalian cells and its applications. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2013, vol. 3, no. 2, pp. 257–263. https://doi.org/10.5681/apb.2013.042

10. Skryabin K. G., El'darov M. A., Kamardinov D. K., Zinov'eva M. V., Ivanov D. S., Prasolov V. S. [et al.]. Differential expression of human vascular endothelial growth factor isoforms and new approaches to therapeutic angiogenesis. *Doklady Akademii nauk* [Reports of the Academy of Sciences], 2004, vol. 397, no. 6, pp. 838–841 (in Russian).

11. Slobodkina E., Karagyaur M. N., Balaban'yan V. Yu., Makarevich P. I. Gene therapy in regenerative medicine: recent achievements and actual directions of development. *Geny i Kletki* [Genes and Cells], 2020, vol. 15, no. 1, pp. 6–16 (in Russian).

12. Makarevich P. I. Three decades of gene therapy development: milestones and prospects. *Regeneratsiya organov i tkanei* [Regeneration of organs and tissues], 2023, vol. 1, no. 1, pp. 16–24 (in Russian).

13. Jain R. K., Au P., Tam J., Duda D. G., Fukumura D. Engineering vascularized tissue. *Nature Biotechnology*, 2005, vol. 23, no. 7, pp. 821–823. https://doi.org/10.1038/nbt0705-821

14. Hirschi K. K., D'Amore P. A. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovascular Research*, 1996, vol. 32, no. 4, pp. 687–698.

15. Ravishankar P., Zeballos M. A., Balachandran K. Isolation of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood. *Journal of Visualized Experiments*, 2017, vol. 127, art. 56021. https://doi.org/10.3791/56021

16. Baudin B., Bruneel A., Bosselut N., Vaubourdolle M. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nature Protocols*, 2007, vol. 2, no. 3, pp. 481–485. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.54

17. Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P., de Ugarte D. A., Huang J. I., Mizuno H., Alfonso Z. C., Fraser J. K., Benhaim P., Hedrick M. H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 2002, vol. 13, no. 12, pp. 4279–4295. https://doi.org/10.1091/mbc.e02-02-0105

Информация об авторах

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

Полешко Анна Григорьевна – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: renovacio888@yandex.ru

Мисюкевич Алла Юрьевна – науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: alla.misyukevich.91@mail.ru

Смирнов Андрей Александрович – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: aasm96@bk.ru

Суховеева Светлана Владимировна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: suhoveevalmbc@mail.ru

Янцевич Алексей Викторович – канд. хим. наук, доцент, директор. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5-2, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: yantsevich@iboch.by

Information about the authors

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

Anna G. Poleshko – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: renovacio888@yandex.ru

Ala Yu. Misiukevich – Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alla.misyukevich.91@mail.ru

Andrei A. Smirnov – Junior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: aasm96@bk.ru

Sviatlana V. Sukhaveyeva – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: suhoveevalmbc@mail.ru

Aleksey V. Yantsevich – Ph. D. (Chem.), Associate Professor, Director. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5-2, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yantsevich@iboch.by

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 616-022.7+616-097+577.112
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-104-115

Поступила в редакцию 27.12.2023
Received 27.12.2023

С. П. Рубникович, В. В. Побойнев, В. В. Хрусталёв

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

НОВЫЙ ПОДХОД К РАЗРАБОТКЕ ВАКЦИНЫ ОТ КАРИЕСА ЗУБОВ

Аннотация. Геномы бактерий *Streptococcus mutans* и *Streptococcus sobrinus*, вызывающих кариес зубов, в настоящее время полностью секвенированы. В то же время пространственные структуры полноразмерных поверхностных белков данных микроорганизмов, с помощью которых они прикрепляются к поверхности зубов, покрытых слюной, до сих пор инструментально не определены. Имеется ряд экспериментальных работ по использованию этих белков в процессе разработки вакцины от кариеса, однако коммерчески доступной вакцины от кариеса на данный момент нет. Для разработки эффективной и безопасной вакцины от кариеса необходимо провести целый ряд экспериментов *in silico*, предшествующих экспериментам *in vitro*, а тем более *in vivo*. Сегодня такой подход не только является общепризнанным, но и позволяет существенно снизить стоимость экспериментов и продолжительность времени на доклиническом и клиническом этапах.

Цель исследования – отбор антигена для последующего молекулярного моделирования уникального пептида для разработки вакцины от кариеса зубов.

По нашей гипотезе, в качестве антигена для разработки вакцины от кариеса необходимо использовать короткий фрагмент поверхностного белка (пептид) *Streptococcus mutans* и/или *Streptococcus sobrinus*, гомологичность которых по аминокислотной последовательности составляет 84,8 %. При этом пространственная структура этого пептида должна соответствовать пространственной структуре соответствующего фрагмента в полноразмерном белке. Кроме того, отобранный фрагмент белка, который войдет в состав вакцинного пептида, должен быть доступен антителам, т. е. располагаться на поверхности белка и определяться как В-клеточный линейный и пространственный эпитоп. Вакцинный пептид может состоять из наиболее стабильных фрагментов богатых аланином и пролином областей поверхностного белка *Streptococcus mutans* и/или *Streptococcus sobrinus* для взаимной стабилизации пространственной структуры.

Ключевые слова: кариес зубов, адгезин AgI/II, антиген, вакцинный пептид, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*

Для цитирования: Рубникович, С. П. Новый подход к разработке вакцины от кариеса зубов / С. П. Рубникович, В. В. Побойнев, В. В. Хрусталёв // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2024. – Т. 21, № 2. – С. 104–115. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-104-115

Sergey P. Rubnikovich, Victor V. Poboinev, Vladislav V. Khrustalev

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

A NEW APPROACH IN THE DEVELOPMENT OF A DENTAL CARIES VACCINE

Abstract. The genomes of the bacteria *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*, which cause dental caries, currently have been fully sequenced. However, the secondary and tertiary structures of the full-size surface proteins of these microorganisms, by which they attach to the surface of teeth covered with saliva, have not been instrumentally determined at the moment. There are a number of experimental studies on the use of these proteins in the process of developing a dental caries vaccine. However, there is currently no commercially available dental caries vaccine.

The aim of the study was to choose an antigen for subsequent molecular modeling of a unique peptide for the development of a dental caries vaccine.

To develop an effective and safe dental caries vaccine, it is necessary to perform a number of experiments *in silico*, preceding experiments *in vitro* and *in vivo*. Today, this approach is not only generally recognized, but also allows to significantly reduce the cost of experiments and time at the preclinical and clinical studies. According to our hypothesis, as an antigen for the development of a dental caries vaccine, it is necessary to use a short fragment of the surface protein (a peptide) of *Streptococcus mutans* and/or *Streptococcus sobrinus*, whose homology in amino acid sequence is 84.8 %, the spatial structure of which should correspond to the spatial structure of the corresponding fragment in a full-sized protein. In addition, the selected protein fragment, which will be part of the vaccine peptide, must be available to antibodies, i. e. located on the surface of the protein and defined as a B-cell linear and spatial epitope. Also, according to our hypothesis, the vaccine peptide may consist of the most stable fragments of alanine and proline rich regions of the surface protein of *Streptococcus mutans* and/or *Streptococcus sobrinus* for mutual stabilization of the spatial structure.

Keywords: dental caries, adhesin AgI/II, antigen, vaccine peptide, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*

© Рубникович С. П., Побойнев В. В., Хрусталёв В. В., 2024

For citation: Rubnikovich S. P., Poboinev V. V., Khrustalev V. V. A new approach in the development of a dental caries vaccine. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2024, vol. 21, no. 2, pp. 104–115 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-104-115

Введение. Согласно клиническому протоколу «Диагностика и лечение пациентов (взрослое население) с кариесом постоянных зубов», утвержденному постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 11.01.2023 № 4, под термином «кариес постоянных зубов» понимают инфекционное заболевание с прогрессирующей деструкцией твердых тканей зуба, начинающееся деминерализацией на наружной поверхности эмали или оголением цемента [1]. В международной статистической классификации болезней и проблем, связанных со здоровьем, 10-го пересмотра кариес зубов имеет шифр К02. Кариес зубов является наиболее распространенным заболеванием полости рта во всем мире. В 2015 г. нелеченым кариесом страдали около 2,4 млрд человек [2]. Распространенность же кариеса в целом во всем мире приближается к 100 %. Кариес зубов при несвоевременном и/или неправильном лечении может стать причиной развития воспалительных заболеваний пульпы и периодонта, потери зубов, развития гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области, а также представляет собой потенциальные очаги интоксикации и инфекционной сенсибилизации организма.

Согласно расширенной базе данных микробиома полости рта человека (eHOMD), во рту и в аеродигестивном тракте, включая глотку, носовые ходы, придаточные пазухи носа и пищевод, обитает 774 вида бактерий, причем только 58 % из них имеют официальные названия (https://www.homd.org/). Кроме бактерий во рту человека «живут» грибы, вирусы, археи и простейшие [3]. Эти микроорганизмы образуют сложное экологическое сообщество, которое влияет на здоровье полости рта и всего организма в целом. На сегодняшний день известно, что кариес зубов вызывают главным образом бактерии *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) и *Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*) [4]. Обе бактерии одинаково вирулентны, однако *S. mutans* чаще выделяется из полости рта [5]. *S. mutans* относится к группе из семи близкородственных видов, которые в совокупности были названы стрептококками *mutans* [6]. Несмотря на применение различных стратегий, заболеваемость кариесом остается стабильно высокой на протяжении последних десятилетий [7].

При развитии кариеса зубов можно выделить ряд ключевых этапов. С помощью адгезина (белок AgI/II) *S. mutans* прикрепляется к поверхности зубов, покрытых слюной. Глюкозилтрансферазы (GTFs) ответственны за выработку внеклеточных глюканов, которые, как полагают, играют ключевую роль в образовании зубного налета из-за их способности прилипать к гладким поверхностям и опосредовать агрегацию бактериальных клеток и остатков пищи. Глюкансвязывающие белки (GBPs) способствуют взаимодействию синтезированных глюканов с бактериями и формированию биопленки на поверхности зубов.

Коммерчески доступной вакцины от кариеса на сегодняшний день не существует, однако исследования по ее разработке ведутся уже более 40 лет [5]. В первые годы исследований вакцины создавались с использованием целых клеток *S. mutans* или *S. sobrinus*, однако исследования *in vivo* и *in vitro* выявили минимальную пользу таких вакцин и наличие побочных эффектов [8, 9]. Кроме того, были попытки создания субъединичных вакцин, ДНК-вакцин, проведения пассивной иммунизации [5]. В настоящее время одним из основных направлений является разработка синтетических вакцин.

Развитие кариеса начинается с прикрепления стрептококков к поверхности зубов. Для этого у них имеются поверхностные белки: AgI/II (PAc или P1) у *S. mutans* и SpaA (PAg) у *S. sobrinus*. Кроме указанных (наиболее распространенных) названий данных белков, можно встретить и другие обозначения, такие как антиген B [10], SR [11], IF [12] и MSL-1 [13]. Штаммы бактерий, нокаутные по гену pac, кодирующему данный белок, демонстрировали меньшую кариесогенную активность у крыс [14]. Исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что антитела, вырабатываемые против этих адгезинов, предотвращают прилипание стрептококков к покрытым слюной зубам. Иммунизация интактным AgI/II может защитить грызунов, приматов и людей от кариеса зубов, вызванного *S. mutans* [15]. Аналогичным образом иммунизация с использованием SpaA защищала

крыс от кариеса, вызванного *S. sobrinus* [16]. Показано, что подкожная иммунизация синтетическим пептидом, полученным из богатой аланином области адгезина AgI/II *S. mutans*, индуцировала выработку высокого уровня IgG [17]. Однако исследования последних лет показали, что главный поверхностный адгезин *S. mutans* проявляет относительно слабую иммуногенность, вызывая низкий уровень иммунного ответа [2].

На сегодняшний день установлено, что главный поверхностный антиген *S. mutans* состоит из 1565 аминокислотных остатков. Аминокислотные остатки 1–38 входят в состав сигнального пептида, N-концевой фрагмент белка (аминокислотные остатки 60–550) содержит три полных и один неполный повтор последовательности в богатой аланином области, С-концевая область белка (аминокислотные остатки 800–1540) включает богатые пролином повторы (три полных и один неполный), придающие гидрофильность поверхностному белку AgI/II. Аминокислотные остатки 1537–1556 формируют трансмембранный домен. Между богатыми аланином и пролином областями находится промежуточный сегмент (область V), где находится большинство вариаций аминокислотных остатков, по которым различают различные штаммы бактерии [18]. Богатая аланином область и область V содержат эпитопы адгезии, которые непосредственно взаимодействуют со слюнными агглютининами [19]. Главный поверхностный антиген *S. sobrinus* имеет схожее строение с аналогичным белком *S. mutans*. SpaA состоит из 1528 аминокислотных остатков, а также из богатой аланином области на N-конце белка и богатой пролином области на С-конце, однако SpaA включает только два повтора аминокислотных последовательностей в богатой пролином области [20].

Помимо экспериментов на лабораторных животных, были проведены и мелкомасштабные испытания на людях, которые показали, что повышение уровня секреторного IgA в слюне в некоторых случаях препятствовало колонизации полости рта *S. mutans* [21]. Хотя эти эффекты были относительно кратковременными, изменение состава, дозы, способа и частоты введения антигена может значительно увеличить интенсивность и продолжительность иммунного ответа. Это говорит о необходимости дальнейших клинических испытаний, так как в сочетании с устоявшимися методами профилактики кариеса вакцины могут внести весьма ценный вклад в борьбу с данным заболеванием. Кроме низкой иммуногенности предложенных вакцин, имеются сведения о перекрестной реактивности вырабатываемых антител с тканями сердца и скелетных мышц человека [21, 22]. Есть данные, что при клапанном эндокардите, вызванном оральными стрептококками, в 7 % случаев причиной были бактерии *S. mutans*, выделенные из крови пациентов с инфекционным эндокардитом [23]. Причиной низкой иммуногенности исследуемых вакцин могло быть то, что в качестве антигена использовались не отдельные наиболее стабильные фрагменты главного поверхностного адгезина *S. mutans*, а большие фрагменты, соответствующие богатым аланином и/или пролином областям [6, 24]. Для создания эффективной вакцины необходимо использовать только те иммуногенные фрагменты ключевых белков *S. mutans* и *S. sobrinus*, структура которых является устойчивой. Трудности в разработке эффективной высокоиммуногенной вакцины от кариеса обусловлены тем, что на сегодняшний день еще не определено точное строение главного поверхностного адгезина *S. mutans* и *S. sobrinus*. Повысить же иммуногенность имеющихся вакцин исследователи пытаются при помощи адъювантов. В 2023 г. установлено, что введение поверхностного антигена *S. mutans* с наночастицами ZIF-8 повышает иммунный ответ по сравнению с введением исключительно поверхностного антигена *S. mutans*.

Несмотря на то что попытки разработки вакцины от кариеса зубов ведутся уже не одно десятилетие, готового продукта до сих пор нет. Данное обстоятельство говорит о том, что необходимо применить принципиально новый подход для разработки вакцины. Можно использовать гибридные антигены, состоящие из нескольких структурно устойчивых фрагментов одного или нескольких белков. При этом антитела, выработанные на них, не должны перекрестно реагировать с другими тканями организма человека.

Цель данной статьи – отбор антигена с целью последующего молекулярного моделирования уникального пептида для разработки вакцины от кариеса зубов.

Материалы и методы исследования. Для прогнозирования вторичной структуры белка AgI/II *S. mutans* и определения ее стабильности использовалась аминокислотная последовательность

данного белка, полученная из базы Uniprot (ID: P11657) [25]. Вторичная и третичная структура полноразмерного белка AgI/II *S. mutans* инструментальными методами на данный момент не определена, однако в базе Uniprot депонирована структура, определенная программой AlphaFold [26]. Стабильность структуры адгезина AgI/II *S. mutans* оценивали и при помощи оригинальных алгоритмов – PentUnFOLD [27] и PentaFOLD [28]. Для определения степени гомологичности адгезинов *S. mutans* и *S. sobrinus* использовали аминокислотную последовательность *S. sobrinus* с Uniprot ID P21979. Гомологичность определяли при помощи программы SSEARCH, выполняющей выравнивание белков по методу Smith–Waterman [29]. Для оценки качества имеющихся 3D-моделей адгезина AgI/II *S. mutans* были использованы веб-серверы VERIFY 3D и PROCHECK. Сервер VERIFY 3D проверяет соответствие 3D-структуры белка его аминокислотной последовательности (1D-структура) путем присвоения белку структурного класса на основании наличия различных типов элементов вторичной структуры и их расположения в пространстве и сравнения с показателями «правильных» белковых структур [30]. Сервер PROCHECK проверяет стереохимическое качество структуры белка (пептида) путем анализа геометрии каждого аминокислотного остатка и общей геометрии молекулы белка (пептида) [31].

Результаты и их обсуждение. По нашей гипотезе, для усиления иммунного ответа необходимо использовать уникальную третичную структуру главного поверхностного адгезина вызывающих кариес зубов стрептококков, на которой богатая аланином область пространственно сближена с богатой пролином областью и формирует с ней многочисленные взаимодействия (рис. 1) [32].

Трудность заключается в том, что в составе синтетического пептида должна воспроизводиться именно такая же вторичная и третичная структура, как и в полноразмерном белке, – альфа-спираль, формирующая связи с полипролиновой спиралью. Однако в подобных пептидах вторичная структура воспроизводится именно благодаря взаимодействиям, формируемым между остатками тирозина из альфа-спирального фрагмента и пролина из полипролинового фрагмента пептида. Более того, установлено, что вместо остатков тирозина можно включать остатки триптофана [33].

В настоящее время известна аминокислотная последовательность адгезина AgI/II *S. mutans*, однако отсутствуют инструментально полученные сведения о вторичной и третичной структуре полноразмерного белка. В Protein Data Bank имеется информация о структуре лишь фрагментов

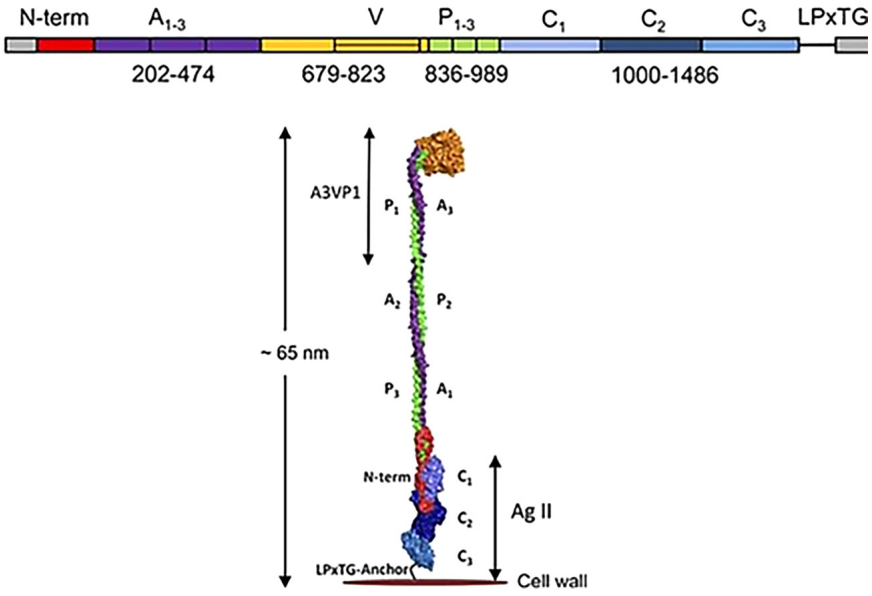


Рис. 1. Схема строения поверхностного адгезина AgI/II *S. mutans*.
$A_{1–3}$ – область, богатая аланином, $P_{1–3}$ – область, богатая пролином

Fig. 1. Scheme of the adhesin AgI/II of *S. mutans*.
$A_{1–3}$ – alanine-enriched area, $P_{1–3}$ – proline-enriched area

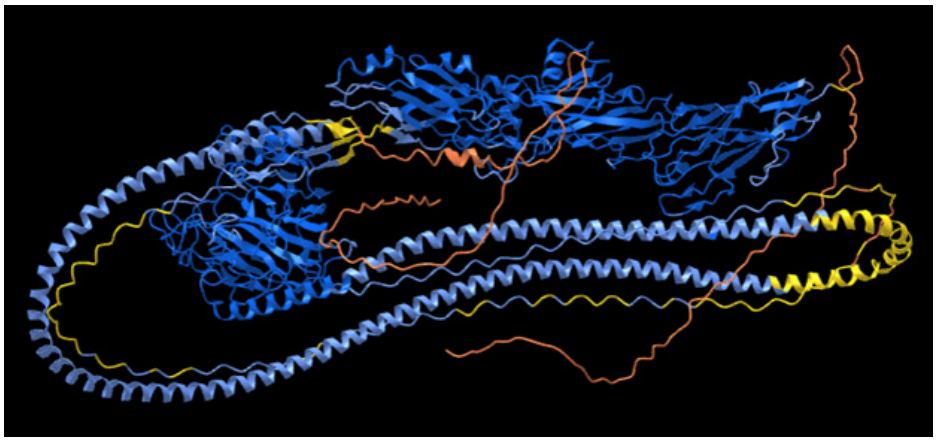


Рис. 2. Пространственная структура адгезина AgI/II *S. mutans.* Оранжевым цветом обозначены фрагменты белка с крайне низкой степенью достоверности структуры, желтым – с низкой степенью достоверности, голубым – с высокой, синим – с очень высокой степенью достоверности

Fig. 2. 3D structure of adhesin AgI/II *S. mutans.* The fragments of the protein with extremely low confidence of the structure are indicated in orange, those with a low confidence – in yellow, those with high confidence – in light blue, those with very high confidence – in blue

адгезина AgI/II *S. mutans*, полученных с помощью рентгеноструктурного анализа: 1JMM (аминокислотная последовательность полноразмерного белка – 463–839), 3OPU (1154–1492), 3QE5 (991–1485), 6TZL (446–848), 6UBV (446–848), 3IPK (386–874), 3IOX (386–874). В этой базе данных также имеется модель, полученная при помощи программы AlphaFold, которая на сегодняшний день является «золотым стандартом» в определении пространственной структуры белка по его аминокислотной последовательности. *In silico* эксперимент CASP14 показал, что по точности моделирования результаты программы AlphaFold сопоставимы с результатами, полученными инструментальными методами, и в большинстве случаев эта программа превосходит другие [26]. Большая часть адгезина AgI/II *S. Mutans*, согласно программе AlphaFold, имеет высокую степень достоверности пространственной структуры (рис. 2).

Фрагменты с низкой степенью достоверности пространственной структуры можно отнести к категории внутренне неупорядоченных фрагментов (IDPRs), которые находятся на N- и C-концах белка. В адгезине AgI/II фрагментами с очень низкой степенью достоверности строения являются Met1-Val86, Glu879-Thr890, Pro1496-Asp1565. Выделяют и несколько фрагментов с низкой степенью достоверности: His87-Glu90, Gly119-Ala127, Ala337-Ala385, Arg873-Ala878, Glu891-Pro1001, Glu1494-Asp1495. Несмотря на то что AlphaFold является на сегодняшний день «золотым стандартом» в определении пространственной структуры белков, ориентироваться на структуру адгезина AgI/II, определенную данной программой, следует с осторожностью, так как 1,7 % аминокислотных остатков на карте Рамачандрана, согласно программе PROCHECK, находятся вне зоны допустимых значений двугранных углов (рис. 3). Согласно программе VERIFY 3D, лишь 71,34 % 3D-структуры белка сопоставимо с его аминокислотной последовательностью (рис. 3).

Применение оригинального алгоритма PentUnFOLD в режиме 1D, который так же, как и алгоритм AlphaFold, работает с аминокислотными последовательностями белков, показало, что адгезин AgI/II состоит из 166 аминокислотных остатков (10,61 % белка), входящих в состав структурно неупорядоченных фрагментов: Ala38-Thr41, Thr44-Asp46, Val52-Thr54, Ser71-Ala74, Asn117-Val121, Lys140-Ile145, Thr148-Thr149, Lys153-Asp155, Asn170-Ala172, Tyr177-Asp180, Ala183-Lys185, Ser198-Thr200, Asn260-Ala261, Ala269-Ile273, Asn342-Ala343, Glu351-Thr353, Val380-Lys382, Glu433-Thr435, Glu479-Gln480, Asn495-Asp497, Thr521-Asp523, Lys538-Ser541, Ser563-Asp565, Asn588-Asn589, Thr608-Tyr609, Val626-Thr630, Gln662-Val663, Tyr678-His679, Glu682-Lys683, Ser760-Asp762, Asp805-Lys810, Glu833-Lys834, Thr848-Tyr849, Lys1022-Gln1023, Asp1040-Thr1042, Asp1070-Tyr1073, Val1108-Val1111, Arg1138-Val1139, Glu1165-Asn1166, Ile1170-Lys1173, Asp1195-Asp1200, Asn1232-Ser1238, Pro1249-Ile1252, Lys1298-Gln1300, Asn1310-Gln1311, Thr1396-Gln1398, Thr1432-Ile1436, Gly1468-Thr1469, Gly1480-Asn1486, Arg1509-Thr1510.

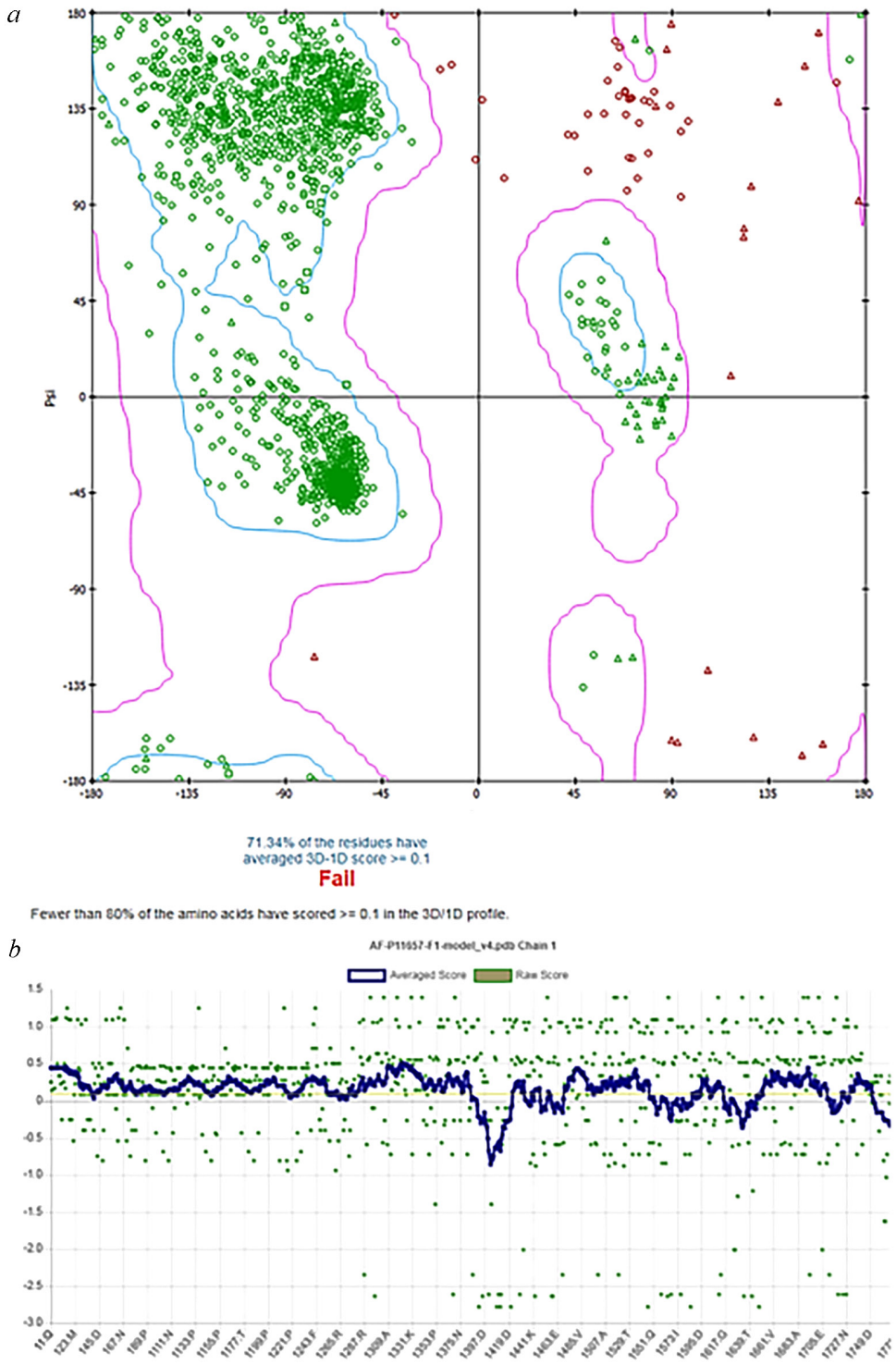


Рис. 3. Карта Рамачандрана (*a*) и сопоставимость 3D-структуры адгезина AgI/II *S. mutans*, полученной с помощью программы AlphaFold, с его аминокислотной последовательностью (*b*)

Fig. 3. Ramachandran plot (*a*) and compatibility of 3D structure of *S. mutans* AgI/II adhesin obtained by AlphaFold program with its amino acid sequence (*b*)

Определение стабильности структуры белка является обязательным условием при отборе фрагмента белка, который может выступать в качестве антигена при разработке любой синтетической вакцины, в том числе и против кариеса зубов. Вторичная структура вакцинного пептида должна соответствовать вторичной структуре данного фрагмента в полноразмерном белке, т. е. в составе вакцинного пептида должны отсутствовать внутренне неупорядоченные фрагменты,

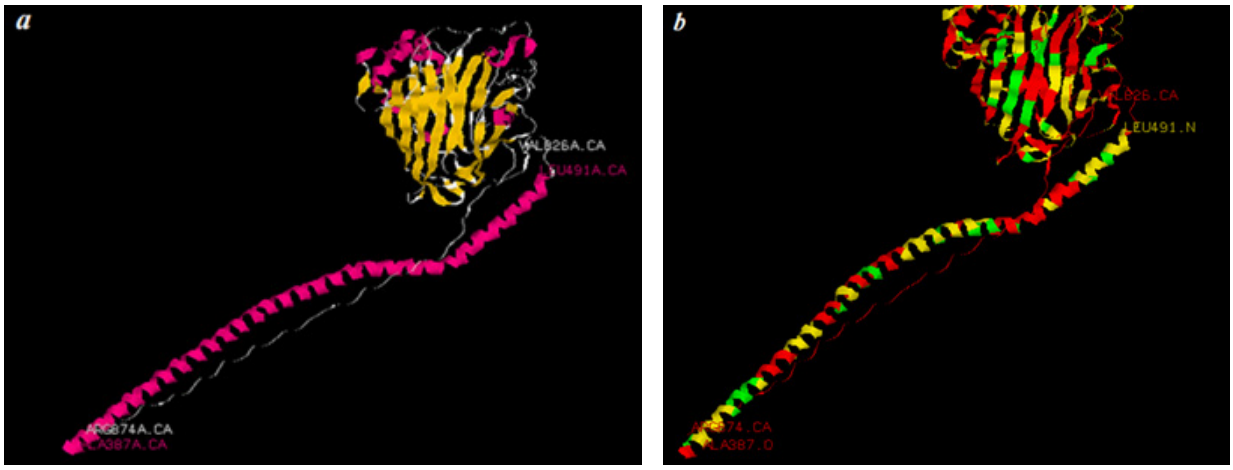


Рис. 4. Структура фрагмента адгезина AgI/II *S. mutans* (PDB ID: 3IOX): *a* – пространственная с аминокислотной последовательностью Ala386–Arg874 (розовым цветом обозначены альфа-спирали, желтым – бета-структура, белым – петли), *b* – стабильная вторичная, определенная программой PentaFOLD (красным цветом обозначены нестабильные элементы вторичной структуры, желтым – метастабильные, зеленым – стабильные)

Fig. 4. Structure of the AgI/II *S. mutans* adhesin fragment (PDB ID: 3IOX): *a* – secondary and tertiary with the amino acid sequence Ala386–Arg874 (alpha helices are indicated in pink, beta structure – in yellow, loops – in white), *b* – stable secondary structure, determined by the PentaFOLD program (unstable elements of the secondary structure are indicated in red, metastable – in yellow, stable – in green)

определенные программами AlphaFold и PentUnFOLD, и нестабильные фрагменты вторичной структуры, определенные программой PentaFOLD. В противном случае антитела, выработанные к вакцинному пептиду, не будут распознавать белок патогенных микроорганизмов. Поэтому для оценки воспроизведения вторичной и третичной структуры в вакцинном пептиде нами будет использоваться структура поверхностного адгезина *S. mutans* с PDB ID: 3IOX, так как она содержит информацию об областях, богатых не только аланином, но и пролином (рис. 4). Что касается данной структуры, как и структуры полноразмерного белка, полученной программой AlphaFold, следует обратить внимание на уникальное пространственное расположение разных фрагментов белка: вдоль альфа-спиралей из области, богатой аланином, следуют петли из области, богатой пролином. На рис. 4 обозначена граница альфа-спирали (согласно программе DSSP) Ala387-Leu491, рядом с которой следует петля Val826-Arg874. Согласно же алгоритму PentaFOLD, область, богатая пролином, определяется как нестабильная. Стабильными же являются лишь аминокислотные остатки Glu389, Ala398-Ala404, Val406, Ala427-Asn428, Asn435-Ile438, Leu453-Ala454, Leu460-Ala461, Tyr463, Ala468, Glu480, Thr482, Ala486-Ala487 из области, богатой аланином (рис. 4).

На наш взгляд, для молекулярного дизайна вакцинного пептида необходимо использовать отличающиеся стабильностью фрагменты данной пространственной структуры адгезина AgI/II *S. mutans*, которые также должны формировать уникальные пространственные B-клеточные эпитопы. При этом качество модели, приведенной на рис. 4, не вызывает сомнений, так как получена она не с помощью предсказательного алгоритма AlphaFold, а в результате рентгеноструктурного анализа кристалла белка. Качество модели подтверждается также алгоритмами VERIFY 3D и PROCHECH (рис. 5).

Действительно, на карте Рамачандрана в запрещенных областях нет аминокислотных остатков, а в дополнительной разрешенной области их всего лишь 0,5 %. Согласно же программе VERIFY 3D, 96,93 % фрагментов этой модели сопоставимо с аминокислотной последовательностью данного фрагмента белка.

Следует подчеркнуть, что на наиболее стабильный фрагмент поверхностного адгезина *S. mutans* будут вырабатываться антитела и против соответствующего белка *S. sobrinus*, поскольку поверхностные белки *S. mutans* и *S. sobrinus* на 67,5 % идентичны по аминокислотной последовательности и на 84,8 % гомологичны согласно программе SSEARCH (рис. 6).

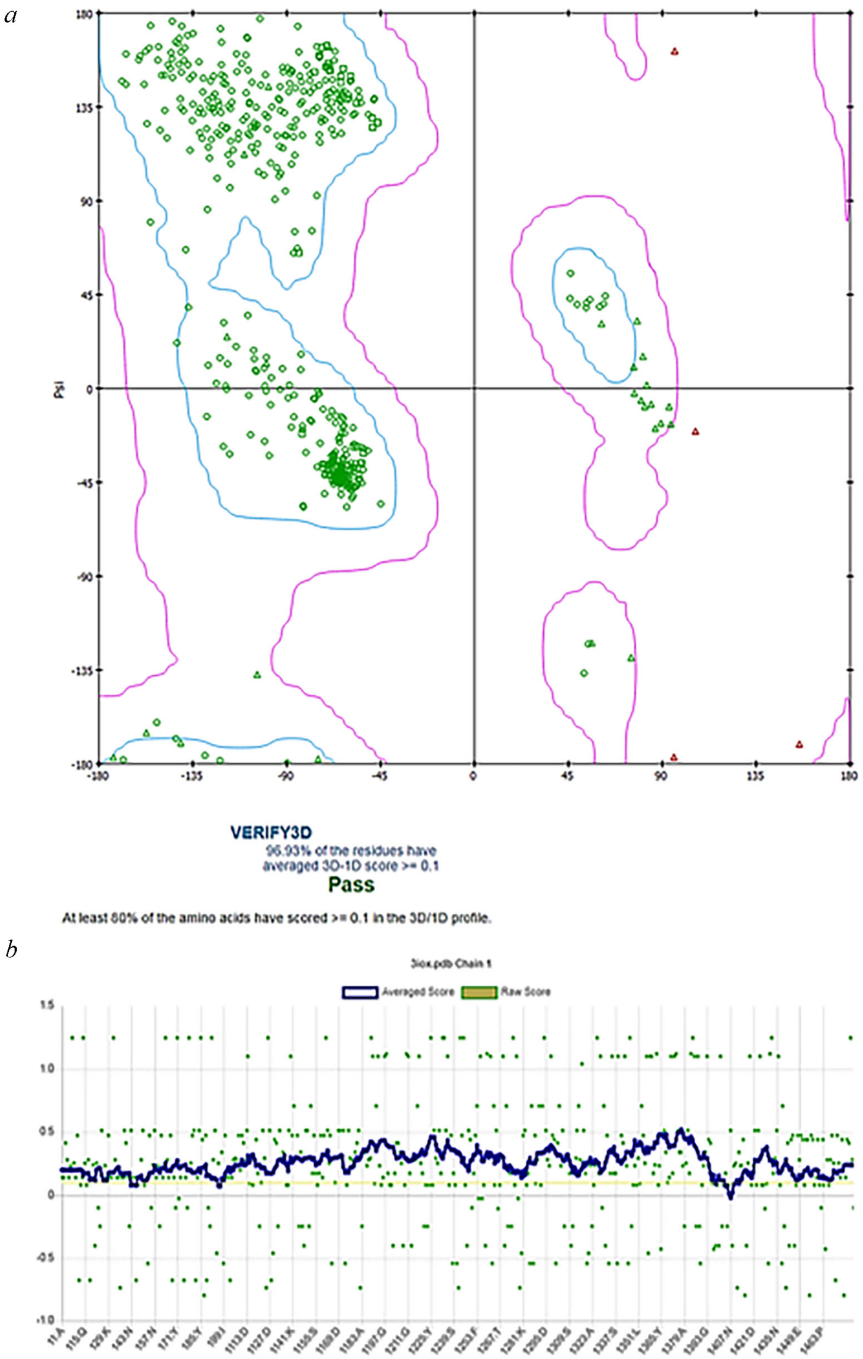


Рис. 5. Карта Рамачандрана (*a*) и сопоставимость 3D-структуры фрагмента адгезина AgI/II *S. mutans* (PDB ID: 3IOX) с его аминокислотной последовательностью (*b*)

Fig. 5. Ramachandran plot (*a*) and comparability of 3D structure of *S. mutans* AgI/II adhesin fragment (PDB ID: 3IOX) with its amino acid sequence (*b*)

Заключение. Для создания эффективной и безопасной вакцины от кариеса зубов мы предлагаем провести классический эксперимент, начинающийся *in silico* и заканчивающийся *in vitro*, который ранее был успешно применен для установления строения подмембранного домена гемагглютинина вируса гриппа A/H1N1 [34, 35]. Опубликованных данных о стабильности вторичной структуры главного поверхностного адгезина *S. mutans* и *S. sobrinus* до сих пор нет. Тем не менее многочисленные эксперименты на лабораторных животных так и не привели к созданию готового продукта. В данном исследовании предлагается применить обширный ряд биоинформатических методик, в том числе оригинальных, и на основании полученных результатов

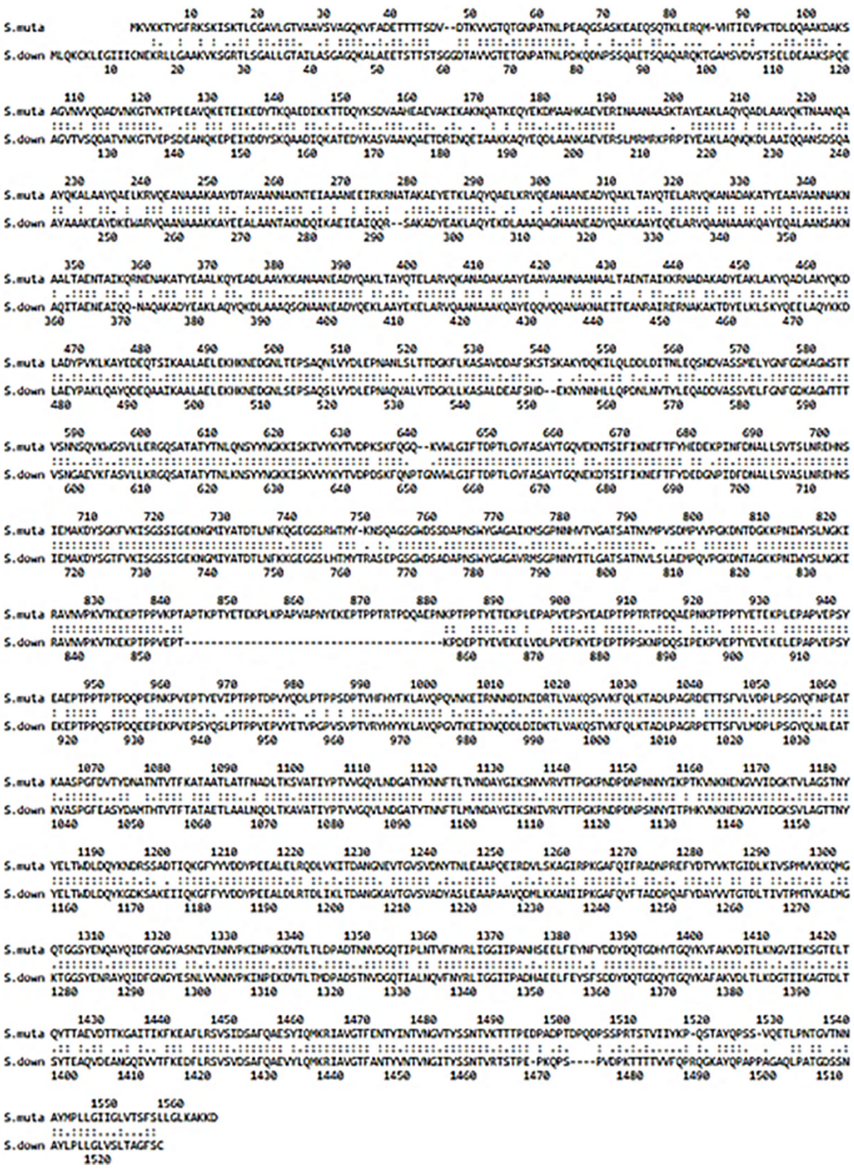


Рис. 6. Гомологичность аминокислотных последовательностей адгезина AgI/II *S. mutans* и SpaA *S. sobrinus* (*S. downei*)

Fig. 6. Homology of amino acid sequences of the AgI/II protein of *S. mutans* and SpaA *S. sobrinus* (*S. downei*)

отобрать наиболее стабильные антигены. Одним из таких алгоритмов является PentUnFOLD, который не только является принципиально новым, но и превосходит имеющиеся аналоги [30]. В качестве антигена планируется использовать короткие (наиболее стабильные и иммуногенные) фрагменты из богатых аланином и пролином областей главного поверхностного адгезина *S. mutans* и/или *S. sobrinus*, которые могут взаимодействовать между собой, формируя при этом уникальный пространственный эпитоп.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Стоматология: сб. клин. протоколов: в 2 ч. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь; под общ. ред. С. П. Рубниковича. – Минск: БГМУ, 2023. – Ч. 1. – 468 с.

2. A nanoparticle-based anticaries vaccine enhances the persistent immune response to inhibit streptococcus *mutans* and prevent caries / Y.-B. Yu [et al.] // Microbiol. Spectr. – 2023. – Vol. 11, N 2. – P. e0432822. https://doi.org/10.1128/spectrum.04328-22

3. Human oral microbiota and its modulation for oral health / Y. Zhang [et al.] // Biomed. Pharmacother. – 2018. – Vol. 99. – P. 883–893. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.146

4. Smith, D. J. Dental caries vaccines: prospects and concerns / D. J. Smith // Crit. Rev. Oral Biol. Med. – 2002. – Vol. 13, N 4. – P. 335–349. https://doi.org/10.1177/154411130201300404

5. Patel, M. Dental caries vaccine: are we there yet? / M. Patel // Lett. Appl. Microbiol. – 2020. – Vol. 70, N 1. – P. 2–12. https://doi.org/10.1111/lam.13218

6. Forssten, S. D. *Streptococcus mutans*, caries and simulation models / S. D. Forssten, M. Björklund, A. C. Ouwehand // Nutrients. – 2010. – Vol. 2, N 3. – P. 290–298. https://doi.org/10.3390/nu2030290

7. Zhang, J. S. Oral microbiome and dental caries development / J. S. Zhang, C. H. Chu, O. Y. Yu // Dent. J. (Basel). – 2022. – Vol. 10, N 10. – Art. 184. https://doi.org/10.3390/dj10100184

8. Talbman, M. A. Effects of local immunization with *Streptococcus mutans* on induction of salivary immunoglobulin A antibody and experimental dental caries in rats / M. A. Talbman, D. J. Smith // Infect. Immun. – 1974. – Vol. 9, N 6. – P. 1079–1091. https://doi.org/10.1128/iai.9.6.1079-1091.1974

9. Effective immunity to dental caries: protection of gnotobiotic rats by local immunization with *Streptococcus mutans* / J. R. McGhee [et al.] // J. Immunol. – 1995. – Vol. 114, N 1, pt. 2. – P. 300–305. https://doi.org/10.4049/jimmunol.114.1_part_2.300

10. Russell, R. R. Wall-associated protein antigens of *Streptococcus mutans* / R. R. Russell // J. Gen. Microbiol. – 1979. – Vol. 114, N 1. – P. 109–115. https://doi.org/10.1099/00221287-114-1-109

11. Purification and characterization of a saliva-interacting cell wall protein from *Streptococcus mutans* serotype f by using monoclonal antibody immunoaffinity chromatography / F. Ackermans [et al.] // Biochem. J. – 1985. – Vol. 228, N 1. – P. 211–217. https://doi.org/10.1042/bj2280211

12. Evidence for an immunological relationship between *Streptococcus mutans* and human cardiac tissue / M. Hughes [et al.] // Infect. Immun. – 1980. – Vol. 27, N 2. – P. 576–588. https://doi.org/10.1128/iai.27.2.576-588.1980

13. Comparison of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* receptors for human salivary agglutinin / D. R. Demuth [et al.] // Microb. Pathog. – 1990. – Vol. 9, N 3. – P. 199–211. https://doi.org/10.1016/0882-4010(90)90022-i

14. Virulence of a spaP mutant of *Streptococcus mutans* in a gnotobiotic rat model / P. J. Crowley [et al.] // Infect. Immun. – 1999. – Vol. 67, N 3. – P. 1201–1206. https://doi.org/10.1128/iai.67.3.1201-1206.1999

15. Immunization with purified protein antigens from *Streptococcus mutans* against dental caries in rhesus monkeys / T. Lehner [et al.] // Infect. Immun. – 1981. – Vol. 34, N 2. – P. 407–415. https://doi.org/10.1128/iai.34.2.407-415.1981

16. Redman, T. K. Oral immunization with recombinant *Salmonella typhimurium* expressing surface protein antigen A (SpaA) of *Streptococcus sobrinus*: effects of the *Salmonella* virulence plasmid on the induction of protective and sustained humoral responses in rats / T. K. Redman, C. C. Harmon, S. M. Michalek // Vaccine. – 1996. – Vol. 14, N 9. – P. 868–878. https://doi.org/10.1016/0264-410x(96)00013-8

17. Immunogenicity and protective effect against oral colonization by *Streptococcus mutans* of synthetic peptides of a streptococcal surface protein antigen / I. Takahashi [et al.] // J. Immunol. – 1991. – Vol. 146, N 1. – P. 332–336. https://doi.org/10.4049/jimmunol.146.1.332

18. The changing faces of *Streptococcus* antigen I/II polypeptide family adhesins / L. J. Brady [et al.] // Mol. Microbiol. – 2010. – Vol. 77, N 2. – P. 276–286. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07212.x

19. Saliva-binding region of *Streptococcus mutans* surface protein antigen / M. Nakai [et al.] // Infect. Immun. – 1993. – Vol. 61, N 10. – P. 4344–4349. https://doi.org/10.1128/iai.61.10.4344-4349.1993

20. Sequence and structural analysis of surface protein antigen I/II (SpaA) of *Streptococcus sobrinus* / R. J. LaPolla [et al.] // Infect. Immun. – 1991. – Vol. 59, N 8. – P. 2677–2685. https://doi.org/10.1128/iai.59.8.2677-2685.1991

21. Dental caries vaccine availability: Challenges for the 21st century / A. S. M. Giasuddin [et al.] // J. Immunol. Immunother. – 2017. – Vol. 1, N 7. – Art. 100002.

22. Immunochemistry of the *Streptococcus mutans* BHT cell membrane: Detection of determinants cross-reactive with human heart tissue / G. Y. Ayakawa [et al.] // Infect. Immun. – 1985. – Vol. 48, N 2. – P. 280–286. https://doi.org/10.1128/iai.48.2.280-286.1985

23. Contribution of cell surface protein antigen PAc of *Streptococcus mutans* to bacteremia / K. Nakano [et al.] // Microb. Infect. – 2006. – Vol. 8, N 1. – P. 114–121. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.06.005

24. LT adjuvant modulates epitope specificity and improves the efficacy of murine antibodies elicited by sublingual vaccination with the N-terminal domain of *Streptococcus mutans* P1 / M. T. Batista [et al.] // Vaccine. – 2017. – Vol. 35, N 52. – P. 7273–7282. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.007

25. UniProt: the Universal Protein knowledgebase / R. Apweiler [et al.] // Nucl. Acids Res. – 2004. – Vol. 32. – P. D115–D119. https://doi.org/10.1093/nar/gkh131

26. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold / J. Jumper [et al.] // Nature. – 2021. – Vol. 596, N 7873. – P. 583–589. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2

27. The PentUnFOLD algorithm as a tool to distinguish the dark and the light sides of the structural instability of proteins / V. V. Poboinev [et al.] // Amino Acids. – 2022. – Vol. 54, N 8. – P. 1155–1171. https://doi.org/10.1007/s00726-022-03153-5

28. Khrustalev, V. V. The PentaFOLD 3.0 algorithm for the selection of stable elements of secondary structure to be included in vaccine peptides / V. V. Khrustalev // Protein Pept. Lett. – 2021. – Vol. 28, N 5. – P. 573–588. https://doi.org/10.2174/0929866527666201110123851

29. Smith, T. F. Identification of common molecular subsequences / T. F. Smith, M. S. Waterman // J. Mol. Biol. – 1981. – Vol. 147, N 1. – P. 195–197. https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90087-5

30. Eisenberg, D. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles / D. Eisenberg, R. Lüthy, J. U. Bowie // Methods Enzymol. – 1997. – Vol. 277. – P. 396–404. https://doi.org/10.1016/s0076-6879(97)77022-8

31. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures / R. A. Laskowski [et al.] // J. App. Cryst. – 1993. – Vol. 26. – P. 283–291. https://doi.org/10.1107/s0021889892009944

32. An intramolecular lock facilitates folding and stabilizes the tertiary structure of *Streptococcus mutans* adhesin P1 / K. P. Heim [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci USA. – 2014. – Vol. 111, N 44. – P. 15746–15751. https://doi.org/10.1073/pnas.1413018111

33. Engineering protein stability with atomic precision in a monomeric miniprotein / E. G. Baker [et al.] // Nat. Chem. Biol. – 2017. – Vol. 13, N 7. – P. 764–770. https://doi.org/10.1038/nchembio.2380

34. The cytoplasmic tail of influenza A/H1N1 virus hemagglutinin is β-structural / V. V. Khrustalev [et al.] // J. Biomol. Struct. Dyn. – 2022. – Vol. 40, N 10. – P. 4642–4661. https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1860827

35. Peptide models of the cytoplasmic tail of influenza A/H1N1 virus hemagglutinin expand understanding its pH-dependent modes of interaction with matrix protein M1 / V. V. Poboinev [et al.] // Protein J. – 2023. – Vol. 42, N 4. – P. 288–304. https://doi.org/10.1007/s10930-023-10101-z

References

1. Rubnikovich S. P. (ed.). *Dentistry: collection of clinical protocols. Pt. 1.* Minsk, Belarusian State Medical University, 2023. 468 p. (in Russian).

2. Yu Y. B., Liu Y., Liang H., Dong X., Yang X. Y., Li S., Guo Z. A nanoparticle-based anticaries vaccine enhances the persistent immune response to inhibit streptococcus *mutans* and prevent caries. *Microbiology Spectrum*, 2023, vol. 11, no. 2, p. e0432822. https://doi.org/10.1128/spectrum.04328-22

3. Zhang Y., Wang X., Li H., Ni C., Du Z., Yan F. Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, vol. 99, pp. 883–893. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.146

4. Smith D. J. Dental caries vaccines: prospects and concerns. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 2002, vol. 13, no. 4, pp. 335–349. https://doi.org/10.1177/154411130201300404

5. Patel M. Dental caries vaccine: are we there yet? *Letters in Applied Microbiology*, 2020, vol. 70, no. 1, pp. 2–12. https://doi.org/10.1111/lam.13218

6. Forssten S. D., Björklund M., Ouwehand A. C. *Streptococcus mutans*, caries and simulation models. *Nutrients*, 2010, vol. 2, no. 3, pp. 290–298. https://doi.org/10.3390/nu2030290

7. Zhang J. S., Chu C. H., Yu O. Y. Oral microbiome and dental caries development. *Dentistry Journal (Basel)*, 2022, vol. 10, no. 10, art. 184. https://doi.org/10.3390/dj10100184

8. Talbman M. A., Smith D. J. Effects of local immunization with *Streptococcus mutans* on induction of salivary immunoglobulin A antibody and experimental dental caries in rats. *Infection and Immunity*, 1974, vol. 9, no. 6, pp. 1079–1091. https://doi.org/10.1128/iai.9.6.1079-1091.1974

9. McGhee J. R., Michalek S. M., Webb J., Navia J. M., Rahman A. F., Legler D. W. Effective immunity to dental caries: protection of gnotobiotic rats by local immunization with *Streptococcus mutans*. *Journal of Immunology*, 1975, vol. 114, no. 1, pt. 2, pp. 300–305. https://doi.org/10.4049/jimmunol.114.1_part_2.300

10. Russell R. R. Wall-associated protein antigens of *Streptococcus mutans*. *Journal of General Microbiology*, 1979, vol. 114, no. 1, pp. 109–115. https://doi.org/10.1099/00221287-114-1-109

11. Ackermans F., Klein J. P., Ogier J., Bazin H., Cormont F., Frank R. M. Purification and characterization of a saliva-interacting cell wall protein from *Streptococcus mutans* serotype f by using monoclonal antibody immunoaffinity chromatography. *Biochemical Journal*, 1985, vol. 228, no. 1, pp. 211–217. https://doi.org/10.1042/bj2280211

12. Hughes M, Machardy S. M., Sheppard A. J., Woods N. C. Evidence for an immunological relationship between *Streptococcus mutans* and human cardiac tissue. *Infection and Immunity*, 1980, vol. 27, no. 2, pp. 576–588. https://doi.org/10.1128/iai.27.2.576-588.1980

13. Demuth D. R., Lammey M. S., Huck M., Lally E. T., Malamud D. Comparison of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* receptors for human salivary agglutinin. *Microbial Pathogenesis*, 1990, vol. 9, no. 3, pp. 199–211. https://doi.org/10.1016/0882-4010(90)90022-i

14. Crowley P. J., Brady L. J., Michalek S. M., Bleweis A. S. Virulence of a spaP mutant of *Streptococcus mutans* in a gnotobiotic rat model. *Infection and Immunity*, 1999, vol. 67, no. 3, pp. 1201–1206. https://doi.org/10.1128/iai.67.3.1201-1206.1999

15. Lehner T., Russell M. W., Caldwell J., Smith R. Immunization with purified protein antigens from *Streptococcus mutans* against dental caries in rhesus monkeys. *Infection and Immunity*, 1981, vol. 34, no. 2, pp. 407–415. https://doi.org/10.1128/iai.34.2.407-415.1981

16. Redman T. K., Harmon C. C., Michalek S. M. Oral immunization with recombinant *Salmonella typhimurium* expressing surface protein antigen A (SpaA) of *Streptococcus sobrinus*: effects of the *Salmonella* virulence plasmid on the induction of protective and sustained humoral responses in rats. *Vaccine*, 1996, vol. 14, no. 9, pp. 868–878. https://doi.org/10.1016/0264-410x(96)00013-8

17. Takahashi I., Okahashi N., Matsushita K., Tokuda M., Kanamoto T., Munekata E., Russell M. W., Koga T. Immunogenicity and protective effect against oral colonization by *Streptococcus mutans* of synthetic peptides of a streptococcal surface protein antigen. *Journal of Immunology*, 1991, vol. 146, no. 1, pp. 332–336. https://doi.org/10.4049/jimmunol.146.1.332

18. Brady L. J., Maddocks S. E., Larson M. R. Forsgren N., Persson K., Deivanayagam C. C., Jenkinson H. F. The changing faces of *Streptococcus* antigen I/II polypeptide family adhesins. *Molecular Microbiology*, 2010, vol. 77, no. 2, pp. 276–286. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07212.x

19. Nakai M., Okahashi N., Ohta H., Koga T. Saliva-binding region of *Streptococcus mutans* surface protein antigen. *Infection and Immunity*, 1993, vol. 61, no. 10, pp. 4344–4349. https://doi.org/10.1128/iai.61.10.4344-4349.1993

20. LaPolla R. J., Haron J. A., Kelly C. G., Taylor W. R., Bohart C., Hendricks M., Pyati J. P., Graff R. T., Ma J. K., Lehner T. Sequence and structural analysis of surface protein antigen I/II (SpaA) of *Streptococcus sobrinus*. *Infection and Immunity*, 1991, vol. 59, no. 8, pp. 2677–2685. https://doi.org/10.1128/iai.59.8.2677-2685.1991

21. Giasuddin A. S. M., Huda S., Jhuma K. A., Haq A. M. Dental caries vaccine availability: Challenges for the 21st century. *Journal of Immunology and Immunotherapy*, 2017, vol. 1, no. 7, art. 100002.

22. Ayakawa G. Y., Siegel J. L., Crowley P. J., Bleiweis A. S. Immunochemistry of the *Streptococcus mutans* BHT cell membrane: detection of determinants cross-reactive with human heart tissue. *Infection and Immunity*, 1985, vol. 48, no. 2, pp. 280–286. https://doi.org/10.1128/iai.48.2.280-286.1985

23. Nakano K., Tsuji M., Nishimura K., Nomura R., Ooshima T. Contribution of cell surface protein antigen PAc of *Streptococcus mutans* to bacteremia. *Microbes and Infection*, 2006, vol. 8, no. 1, pp. 114–121. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.06.005

24. Batista M. T., Ferreira E. L., Pereira G. S., Stafford P., Maeda D. L. N. F., Rodrigues J. F., Brady L. J., Johnston S. A., Ferreira L. C. S., Ferreira R. C. C. LT adjuvant modulates epitope specificity and improves the efficacy of murine antibodies elicited by sublingual vaccination with the N-terminal domain of *Streptococcus mutans* P1. *Vaccine*, 2017, vol. 35, no. 52, pp. 7273–7282. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.007

25. Apweiler R., Bairoch A., Wu C. H., Barker W. C., Boeckmann B., Ferro S. [et al.]. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, 2004, vol. 32, pp. D115–D119. https://doi.org/10.1093/nar/gkh131

26. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O. [et al.]. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 2021, vol. 596, no. 7873, pp. 583–589. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2

27. Poboinev V. V., Khrustalev V. V., Khrustaleva T. A., Kasko T. E., Popkov V. D. The PentUnFOLD algorithm as a tool to distinguish the dark and the light sides of the structural instability of proteins. *Amino Acids*, 2022, vol. 54, no. 8, pp. 1155–1171. https://doi.org/10.1007/s00726-022-03153-5

28. Khrustalev V. V. The PentaFOLD 3.0 algorithm for the selection of stable elements of secondary structure to be included in vaccine peptides. *Protein and Peptide Letters*, 2021, vol. 28, no. 5, pp. 573–588. https://doi.org/10.2174/0929866527666201110123851

29. Smith T. F., Waterman M. S. Identification of common molecular subsequences. *Journal of Molecular Biology*, 1981, vol. 147, no. 1, pp. 195–197. https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90087-5

30. Eisenberg D., Lüthy R., Bowie J. U. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Methods in Enzymology*, 1997, vol. 277, pp. 396–404. https://doi.org/10.1016/s0076-6879(97)77022-8

31. Laskowski R. A., MacArthur M. W., Moss D. S., Thornton J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 1993, vol. 26, pp. 283–291. https://doi.org/10.1107/s0021889892009944

32. Heim K. P., Crowley P. J., Long J. R., Kailasan S., McKenna R., Brady L. J. An intramolecular lock facilitates folding and stabilizes the tertiary structure of *Streptococcus mutans* adhesin P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, vol. 111, no. 44, pp. 15746–15751. https://doi.org/10.1073/pnas.1413018111

33. Baker E. G., Williams C., Hudson K. L., Bartlett G. J., Heal J. W., Porter Goff K. L., Sessions R. B., Crump M. P., Woolfson D. N. Engineering protein stability with atomic precision in a monomeric miniprotein. *Nature Chemical Biology*, 2017, vol. 13, no. 7, pp. 764–770. https://doi.org/10.1038/nchembio.2380

34. Khrustalev V. V., Kordyukova L. V., Arutyunyan A. M., Poboinev V. V., Khrustaleva T. A., Stojarov A. N., Baratova L. A., Sapon A. S., Lugin V. G. The cytoplasmic tail of influenza A/H1N1 virus hemagglutinin is β-structural. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2022, vol. 40, no. 10, pp. 4642–4661. https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1860827

35. Poboinev V. V., Khrustalev V. V., Akunevich A. A., Shalygo N. V., Stojarov A. N., Khrustaleva T. A., Kordyukova L. V. Peptide models of the cytoplasmic tail of influenza A/H1N1 virus hemagglutinin expand understanding its pH-dependent modes of interaction with matrix protein M1. *Protein Journal*, 2023, vol. 42, no. 4, pp. 288–304. https://doi.org/10.1007/s10930-023-10101-z

Информация об авторах

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

Побойнев Виктор Витольдович – ст. преподаватель. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: dremozzew@mail.ru

Хрусталёв Владислав Викторович – д-р биол. наук, доцент, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: vvkhrustalev@mail.ru

Information about the authors

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

Victor V. Poboinev – Senior Lecturer. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dremozzew@mail.ru

Vladislav V. Khrustalev – D. Sc. (Biol.), Associate Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vvkhrustalev@mail.ru

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 616.127-005.8-009.7:615.273.55]-092.9-036
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-116-124

Поступила в редакцию 24.01.2024
Received 24.01.2024

И. Э. Адзерихо[1], В. Е. Агабеков[2], Т. Э. Владимирская[1], Е. И. Дубатовка[2], А. В. Жилкевич[1]

[1]Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь
[2]Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ЭФФЕКТИВНОСТЬ НОВОЙ СИСТЕМЫ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ТЕНЕКТЕПЛАЗЫ ПРИ ОСТРОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO*

Аннотация. Разработана новая система адресной доставки тканевого активатора плазминогена тенектеплазы для восстановления коронарного кровотока при остром инфаркте миокарда в эксперименте на животных.

Новая система адресной доставки фибринолитика состоит из нативной («свободной») и инкапсулированной в липосомы («связанной») форм тенектеплазы (60 и 40 % соответственно), которые конъюгированы через карбоксилированный декстран с фибрин-специфичными моноклональными антителами Fnl-3C.

Установлены физико-химические характеристики полученных липосом, конъюгированных с фибрин-специфичными моноклональными антителами (иммунолипосомы) с тенектеплазой: гидродинамический диаметр ~76–77 нм, дзета-потенциал ~(–33) мВ, индекс полидисперсности ~0,55. Модификация липосом фибрин-специфичными моноклональными антителами не приводит к изменению активности тромболитика.

Выживаемость животных с острым инфарктом миокарда при использовании иммунолипосом составляет ~90 %, при применении липосомальной и нативной форм препарата – 80 %.

При использовании иммунолипосомальной системы доставки фибринолитика у животных с острым инфарктом миокарда свободный просвет инфаркт-связанной артерии увеличивается ($p < 0,05$) на 26 % по сравнению с применением липосомальной системы и на 46 % по сравнению с использованием нативной тенектеплазы. При этом масса ишемизированного миокарда на фоне тромболитической терапии с применением иммунолипосом уменьшается ($p < 0,05$) на 16 % по сравнению с таковой при использовании липосомальной системы и на 26 % при применении нативной тенектеплазы.

Новая система адресной доставки тенектеплазы обеспечивает эффективный и безопасный тромболизис в эксперименте на животных.

Ключевые слова: острый инфаркт миокарда, тенектеплаза, липосомы, система адресной доставки, фибрин-специфичные моноклональные антитела

Для цитирования: Эффективность новой системы адресной доставки тенектеплазы при остром инфаркте миокарда в эксперименте *in vivo* / И. Э. Адзерихо [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2024. – Т. 21, № 2. – С. 116–124. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-116-124

Ihar E. Adzerikho[1], Vladimir E. Agabekov[2], Tat'yana E. Vladimirskaya[1], Katsiaryna I. Dubatouka[2], Aliona V. Zhilkevich[1]

[1]Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus
[2]Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

EFFICACY OF A NEW SYSTEM OF TARGETED DELIVERY OF TENECTEPLASE IN ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION IN AN *IN VIVO* EXPERIMENT

Abstract. A new system of targeted delivery of tissue plasminogen activator tenecteplase for restoration of coronary blood flow in acute myocardial infarction in animal experiments was developed.

The new system of targeted delivery of fibrinolytic consists of native ("free") and encapsulated ("bound") tenecteplase in liposomes, in the percentage ratio (60 and 40 %, respectively), which are conjugated through carboxylated dextran with fibrin-specific monoclonal antibodies Fnl-3C.

The physicochemical characteristics of the obtained liposomes conjugated with fibrin-specific monoclonal antibodies (immunoliposomes) with tenecteplase were determined: immunoliposomes have a hydrodynamic diameter of ~76–77 nm, a zeta potential of ~(–33) mV, a polydispersity index of ~0.55. Modification of liposomes with fibrin-specific monoclonal antibodies does not alter thrombolytic activity.

When using immunoliposomes the survival rate of animals with acute myocardial infarction is ~90 %, liposomal and native form of the drug – 80 %.

The use of immunoliposomal delivery system in animals with acute myocardial infarction leads to an increase in the free lumen of the infarct-related artery ($p < 0.05$) by 26 % compared to the liposomal delivery system and by 46 % compared to native tenecteplase. At the same time, the mass of ischemic myocardium on the background of thrombolytic therapy with

immunoliposomes decreases ($p < 0.05$) by 16 % in rats in comparison with the liposomal system and by 26 % in comparison with native tenecteplase.

The new system of targeted delivery of tenecteplase provides effective and safe thrombolysis in animal experiment.

Keywords: acute myocardial infarction, tenecteplase, liposomes, targeted delivery system, fibrin-specific monoclonal antibodies

For citation: Adzerikho I. E., Agabekov V. E., Vladimirskaya T. E., Dubatouka K. I., Zhilkevich A. V. Efficacy of a new system of targeted delivery of tenecteplase in acute myocardial infarction in an *in vivo* experiment. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2024, vol. 21, no. 2, pp. 116–124 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-116-124

Введение. Сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смертности населения во всем мире [1]. При этом острый артериальный тромбоз выступает одним из пусковых механизмов развития инфарктов миокарда и головного мозга, а также ишемии нижних конечностей.

Основным нехирургическим методом восстановления коронарного кровотока при остром инфаркте миокарда (ОИМ) является тромболитическая терапия (ТЛТ). На сегодняшний день использование в ведущих клиниках мира тромболитических препаратов (ТП) позволило снизить смертность от ОИМ до 5–7 % [2]. В то же время незначительная степень реперфузии, а также высокий риск возникновения геморрагических осложнений ТЛТ диктуют необходимость разработки новых подходов к лечению ОИМ.

В настоящее время использование в эксперименте и клинической практике систем локальной доставки (Drug Delivery Systems, DDSs) ТП позволяет значительно повысить эффективность ТЛТ и уменьшить частоту развития ее побочных эффектов [3, 4]. Применение липосом в DDSs для инкапсуляции ТП представляется наиболее перспективным, что обусловлено их биосовместимостью с организмом, защитой лекарственного препарата от контакта с ферментативными системами, а также от преждевременной его инактивации [5, 6]. Одним из способов применения DDS-тромболитиков является модификация поверхности липосом путем фиксации к ней «сайт-распознающих» компонентов, например антифибриновых [6–8] или антиагрегатных моноклональных антител [9].

Ранее нами была разработана липосомальная форма стрептокиназы (СК) для создания адресной доставки препарата[1] [5]. Использование липосом в качестве DDS улучшает фармакологический профиль СК – увеличивается период ее полувыведения за счет двухфазного высвобождения ТП [6, 7]. Это связано с наличием в составе липосомальной системы доставки «связанной» (инкапсулированной в липосомы) и «свободной» (нативной) СК, что приводит сначала к действию «свободной» фракции с быстрым фибринолитическим эффектом и последующему выходу из липосом «связанной» СК, обеспечивающей пролонгированную активацию фибринолиза.

СК, как один из эффективных тромболитиков, уступает высокоселективным ТП по скорости, степени и полноте фибринолиза по ряду причин: отсутствием у СК фибрин-селективности, коротким периодом ее полувыведения, высоким риском системных побочных эффектов [5, 6, 10, 11]. С целью исключения указанных недостатков разработана новая система адресной доставки СК, включающая иммунолипосомальную и нативную формы тромболитика [6, 7, 12]. В экспериментах *in vitro* показано преимущество иммунолипосомальной формы СК в сравнении с нативным препаратом – через 3 ч после ее введения степень тромболизиса увеличивается в среднем на 30 % [6, 10]. При этом действие иммунолипосомальной СК усиливается за счет целевой ее локализации в сайтах фибрина оставшейся тромболитической массы, что и приводит к существенному восстановлению просвета сосуда. Необходим фибринолиз краевой (пристеночной) части тромба, поскольку от полноты восстановления просвета тромбированного сосуда зависит частота развития ретромбоза/реоклюзий и, соответственно, реинфарктов/смертей. В отличие от центральной, пристеночная часть тромба наиболее трудно поддается лизису, что обусловлено низким уровнем проникновения препарата в эту область.

Использование иммунолипосомальной формы СК в адресной системе доставки существенно снижает риск геморрагических осложнений и защищает от воздействия нейтрализирующих циркулирующих антител [13].

---

[1] Способ получения липосом, содержащих стрептокиназу: патент BY21995 / И. Э. Адзерихо, Т. Е. Владимирская, В. Е. Агабеков, Е. И. Чернявский, Г. К. Жавнерко, Г. В. Шерстюк, И. Л. Лутик, Е. И. Дубатовка. – Минск, 2018.

Выдвинуто предположение, что использование иммунолипосомальной формы тканевого активатора плазминогена тенектеплазы (ТНК) при ОИМ позволит улучшить фармакологический профиль и фибрин-специфичные свойства препарата, увеличить степень восстановления просвета окклюзированного сосуда за счет фибринолиза не только центральной, но и периферической части тромба, а также снизить риск развития побочных эффектов.

Цель настоящего исследования – изучить физико-химические свойства и эффективность использования новой адресной системы доставки тенектеплазы в лечении острого инфаркта миокарда в эксперименте на лабораторных животных (крысах).

Материалы и методы исследования. *Методы получения липосомальных форм ТНК.* В качестве активатора плазминогена использовали ТНК – тромболитик третьего поколения высокой фибрин-специфичности («Метализе», Boehringer Ingelheim, Германия). ТНК разводили в изотоническом растворе натрий хлорида и инкапсулировали в обычные и фибрин-специфичные липосомы.

Липосомы получали путем гидратации липидной пленки, формируемой из смеси стабилизированного α-токоферолом холестерина и яичного или соевого фосфатилхолина (ФХ) в хлороформе в соотношении 1 : 1,5 [6, 7, 13].

Липидную пленку гидратировали дистиллированной водой и подвергали ультразвуковому воздействию с частотой 35 кГц в течение 10 мин (ультразвуковая ванна Bandelin Sonorex, Германия), а полученный золь лиофилизировали (лиофильная сушка Labcongol Free Zone 1.0, США). После этого к пустым липосомам добавляли ТНК (33–50,0 мас.%) для получения ее липосомальной формы (ЛТНК) в соотношениях липидов и активатора плазминогена 1 : 1; 1,5 : 1; 2 : 1, перемешивали и проводили 5 циклов замораживания-оттаивания (от –20 до +37 °С) для увеличения доли активного компонента в везикулы, после чего снова лиофилизировали, предварительно добавив D-маннитол в качестве криопротектора для защиты липидной мембраны и предотвращения инактивации ТНК в процессе высушивания.

Липосомальная система доставки ТНК представляла собой суспензию, содержащую «свободную» в растворе и «связанную» с липосомами ТНК (ЛТНК-СД) [6].

Для визуализации липосом с тромболитиком использовали гидрофобные флуоресцентные наночастицы типа «ядро–оболочка» CdSe/ZnS/олеиламин (ФНЧ). Стабилизированные жирным амином ФНЧ, имеющим высокое сродство к остаткам жирных кислот липидов, вводили в липосомы на стадии формирования пленки. При этом ФНЧ находились внутри бислоя в области жирных «хвостов» липидов и удерживались там благодаря гидрофобным взаимодействиям. Сформированные липосомы с ТНК, содержащие ФНЧ, идентифицировали и визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Planar100-МБ (Беларусь) по спектрам испускания ФНЧ при $\lambda = 520$ нм и 400-кратном увеличении.

Для определения концентрации «свободного» и «связанного» тромболитика липосомы ресуспендировали в воде и центрифугировали при 20 000 об/мин (Allegra 64R, Beckman Coulter, США) в течение 1 ч. При этом анализируемый супернатант содержал «свободную» ТНК, а осадок – «связанную». Эффективность включения ТНК и ее содержание в липосомах определяли стандартным биохимическим методом Бредфорда [14–16], основанном на связывании белками анионной формы красителя Kymaccio G-250 [7] с отщеплением *n*-нитроанилина.

Для адресной доставки тромболитика использовали фибрин-специфичные АТ FnI-3C класса IgG2a, которые предварительно ковалентно связывали с карбоксиметилдекстраном (КМД-АТ), применяя карбодимидный метод. Модифицированные антителами липосомы (иммунолипосомы) готовили непосредственно перед использованием: к лиофилизированному порошку ЛТНК добавляли раствор конъюгата КМД-АТ (электростатическое связывание полисахарида с поверхностью липосом и формирование комплекса ЛТНК/КМД-АТ), конечная концентрация липосом составила 1 мг/мл (по липидам), конъюгата – 0,75 мг/мл.

Липосомальная система доставки ТНК с соотношением липидов и ТНК 1 : 1 после лиофилизации содержала 60–75 % «связанного» и ~25–40 % «свободного» тромболитика. Изменение данного соотношения до необходимого (40 и 60 %) осуществляли путем добавления раствора ТНК к готовым липосомам непосредственно перед его введением экспериментальным животным.

Аналогичным образом готовили адресную (иммунолипосомальную) систему доставки тромболитика ИЛТНК-СД в следующем соотношении: «связанный» – 40 %, «свободный» – 60 %.

Размеры и форму различных форм ТНК изучали методами просвечивающей электронной (JEM-100 CX, Япония), атомно-силовой (Nanoscope-3D MultiMode, Veeco, США) микроскопии и спектрофлуориметрически (Solar CM 2203, Беларусь).

Параметры стабильности коллоидных растворов тромболитика и его липосомальных форм определяли по величине дзета-потенциала (электрофоретической подвижности частиц) на анализаторе Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания).

Протеолитическую активность лиофилизированных и ресуспендированных в воде образцов ТНК определяли по накоплению *n*-нитроанилина, образующегося при гидролизе хромогенного субстрата S-2288 (температура 37 °C, постоянное перемешивание в течение 5 мин).

Исследования in vivo. При проведении экспериментальных исследований руководствовались методическими указаниями «Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP)» (Руководящий нормативный документ РД-126-91. М.,1992), ТКП 125-2008 «Надлежащая лабораторная практика».

Работа проведена на 50 белых крысах массой 280–310 г, содержавшихся в стационарных условиях вивария БГМУ на полноценном стандартном пищевом рационе согласно установленным нормам. С целью маркировки различные участки шерстного покрова окрашивали с помощью спиртового раствора пикриновой кислоты.

Для создания модели ОИМ животных предварительно наркотизировали: после премедикации фентанилом (0,0005 мг/кг) и дроперидолом (0,1 мг/кг) им внутримышечно вводили тиопентал натрия (10 мг/кг). Для поддержания анестезии по мере необходимости внутривенно болюсно вводили тиопентал натрия (10 мг/кг) и фентанил (0,0003 мг/кг), после чего животных подключали к аппарату искусственной вентиляции легких. Доступ к сердцу выполняли через вертикальный разрез длиной 3 см в левой половине грудной клетки в проекции среднеключичной линии. После выделения сердца из околосердечной сумки на переднюю его поверхность в области верхней трети левой коронарной артерии помещали фильтровальную бумагу, которую заранее насыщали раствором $FeCl_3$ (12,5 %). Время действия химического агента на сосуд составило 3 мин. Затем фильтровальную бумагу удаляли и место воздействия на миокард несколько раз промывали физиологическим раствором, после чего выполняли послойное ушивание раны.

Все животные были разделены на пять групп, по 10 крыс в каждой: модель ОИМ без лечения и с ТЛТ, ТНК, ЛТНК-СД и ИЛТНК-СД. В контрольной группе физиологический раствор интактным животным вводили внутривенно. Растворы фибринолитика вводили внутривенно болюсно из расчета 0,5 мг/кг тела животного (коэффициент пересчета доз 6,0) через 2 ч после моделирования ОИМ. Для потенцирования действия ТП в процессе тромболизиса и профилактики осложнений использовали антикоагулянт гепарин в дозе 20 тыс. ЕД/кг.

Период наблюдения за животными составил 24 ч. По истечении срока наблюдения животные были выведены из эксперимента с соблюдением принципов биоэтики (в соответствии со стандартами GLP) на фоне внутрибрюшинного тиопенталового наркоза (1 мл 5 %-ного тиопентала натрия на 100 г тела животного).

Изменение содержания в сыворотке крови крыс тропонина Т, Д-димера, креатинкиназы-МВ определяли с помощью наборов Rat Troponin T Elisa Kit (Bioassay Technology Laboratory, Китай), Rat D-Dimer Elisa Kit (Bioassay Technology Laboratory, Китай), КФК-МВ («Анализ Мед», Беларусь). Оптическую плотность измеряли на иммуноферментном анализаторе SIRIO S SEAC (Италия).

Съемку ЭКГ осуществляли по стандартной методике на компьютерном электрокардиографе «Поли-Спектр-8/Л» («Нейрософт», Россия) в стандартных отведениях I, II, III и усиленных отведениях от конечностей aVR, aVL, aVF. ЭКГ проводили исходно (до ОИМ), а также сразу после моделирования ОИМ и через 1, 2, 6, 24 ч.

Морфологические исследования. У животных непосредственно после забора крови извлекали сердце. Иссеченные сегменты фиксировали в 10 %-ном формалине в течение 24 ч. Затем промывали в проточной воде, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации (70-, 80-, 96 %-ный абсолютный спирт). Далее материал проводили через спирт-ксилол, ксилол, ксилол-парафин

и заливали в парафин по стандартной методике [16]. На микротоме Leica RM2265 (Германия, 2008 г.) из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 3 мкм, которые окрашивали гематоксилин-эозином, MSB (для определения «возраста» фибрина) и ГОФП (для исследования ранних ишемических повреждений миокарда).

Для изучения микропрепаратов и изготовления микрофотографий использовали световые микроскопы с программным обеспечением (Leica, Германия; Motic China Group Co., Китай).

Морфометрическую оценку степени свободного просвета сосудов (ССПС) проводили при помощи программ количественной микроскопии для анализа и обработки изображений Leica-Qwin (версия 1.56). Определяли площадь тромба (S_1), площадь просвета сосуда (S_2), ССПС рассчитывали по отношению площади просвета тромба к сумме площади тромба и площади просвета сосуда (ССПС = $S_2/S_1 + S_2$).

Определение относительной массы ишемизированного миокарда. Измерение относительной массы поврежденного миокарда осуществляли методом гистохимического окрашивания поперечных срезов сердца 1%-ным раствором 2,3,5-трифенитетразолия хлорида (MP Biomedicals, США). Срезы инкубировали в указанном растворе в течение 15 мин, при этом жизнеспособный миокард окрашивался в ярко-красный цвет, а участки ишемизированного миокарда оставались неокрашенными. С помощью офтальмологических инструментов иссекали неокрашенные участки во всех сегментах миокарда и взвешивали их. Полученную абсолютную сумму всей зоны кардиальных сегментов инфаркта пересчитывали в процентах к общей массе сердца и получали относительную массу пораженных участков.

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью пакета программ STATISTICA 10.0 (Statsoft, США). Для проверки нормальности распределения данных использовали метод Колмогорова–Смирнова, а также показатели эксцесса и асимметрии. Различия между выборками оценивали с помощью *U*-теста Манна–Уитни и теста Краскелла–Уоллеса для независимых выборок. Результаты представлены в виде медианы (Me) – значение, справа и слева от которого на оси значений признака располагаются равные количества значений признака данной выборки; 25-й и 75-й процентили. Достоверным считалось различие при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Размер липосом с ТНК составил ~96 нм, индекс полидисперсности (PDi) – ~0,7. После модификации ЛТНК карбоксиметилдекстраном или конъюгата КМД с антителами их размер достигал ~76–77 нм, а PDi – ~0,45 и ~0,55 нм соответственно. Данные изменения могут быть связаны с уменьшением агрегации и слипания липосом в водном растворе за счет образования на их поверхности гидрофильной оболочки из полисахарида. Модификация поверхности липосом антителами к фибрину FnI-3C (иммунолипосомы) практически не изменяла их физико-химические свойства.

Добавление КМД или КМД/АТ приводило к уменьшению абсолютного значения дзета-потенциала от ~(–59) мВ для ЛТНК до ~(–51) и ~(–33) мВ у ЛТНК/КМД и ЛТНК/КМД-АТ соответственно. Во всех случаях липосомы оставались стабильными. При хранении готовых золей в течение первых суток их размер и дзета-потенциал изменялись незначительно и составляли ~120 нм, –52 мВ для ЛТНК и ~80 нм и –48 мВ для ЛТНК/КМД.

Включение наночастиц в состав липосом приводило к увеличению их гидродинамического диаметра от ~96 нм для ЛТНК до ~437 нм в случае ЛТНК с ФНЧ и ~571 нм для модифицированных антителами везикул ЛТНК/КМД-АТ с ФНЧ.

Следует отметить, что липосомы из соевого ФХ обладали большей коллоидной устойчивостью значения дзета-потенциала (~57 мВ) и меньшим гидродинамическим диаметром (~140 нм) по сравнению с липосомами из яичного ФХ, что может быть обусловлено более жесткой и менее текучей мембраной соевых липосом, из-за чего они слабее агрегируют.

Ранее на примере СК было показано [6], что для достижения максимального тромболитического эффекта наиболее оптимальным является соотношение «связанной» и «свободной» форм СК 40 и 60 %. Это обусловлено первоначальным быстрым фибринолитическим действием нативной («свободной») формы и последующим выходом из липосом «связанного» тромболитика, обеспечивающей пролонгированный фибринолиз.

При этом для ЛТНК из соевого ФХ доля «связанной» формы ТНК составляла ~76 % в течение 24 ч и при хранении при +4 °С уменьшалась до ~59 %, а через 48 ч – до ~54 %.

Для ЛТНК из яичного ФХ доля «связанной» формы ТНК (~36 %) не изменялась в течение 24 ч (+4 °С), что указывает на незначительное высвобождение ТНК из липосом в данных условиях и на стабильность золя, что дает возможность его использования в течение первых суток практически без потери его активности.

По своим физико-химическим свойствам ЛТНК, полученные как из соевого, так и из яичного ФХ, полностью отвечали требованиям по проведению эффективного и безопасного тромболиза [6, 7].

Протеолитическая активность липосомальной формы ТНК составила 58,0 ±7,0 и 36,0 ±11,0 % от номинального количества нативного препарата для соевого и яичного ФХ.

Инкубация разведенных образцов золей при +4 °С в течение 24 и 48 ч незначительно (на 5–10 %) уменьшала активность ТНК, что указывает на их стабильность и на возможность использовать приготовленные золи без существенной потери их активности.

ЛТНК обладала коллоидной устойчивостью в течение 2 ч после приготовления, значения дзета-потенциала практически не изменялись и составили –45…–55 мВ, а значения гидродинамического диаметра – 100–250 нм. При длительном хранении (более суток) ЛТНК агрегируют и их нельзя использовать.

Детектируемая протеолитическая активность ЛТНК составляла ~83 %, что позволяло рассчитать эффективную дозировку для введения экспериментальным животным и провести сравнительную оценку с тромболитическим действием нативных форм данного препарата.

На планарной поверхности кремния ЛТНК имеют округлую форму. Размер везикул по высоте 10–35 нм, диаметр 20–80 нм; для ЛТНК/КМД и ЛТНК/КМД-АТ размер по высоте 20–40 нм, диаметр 280–360 и 90–250 нм соответственно.

Модификация липосом конъюгатом КМД-АТ не приводила к изменению активности тромболитика.

При использовании иммунолипосом выживаемость животных с ОИМ составляла ~90 %, при применении липосомальной и нативной форм препарата – 80 и ~80 % соответственно.

Исследование ЭКГ крыс до оперативного вмешательства показало, что у всех животных был правильный синусовый ритм, отсутствовали нарушения проводимости и изменения в сегменте QRS-T. При анализе ЭКГ группы с моделью ОИМ у большинства (70 %) животных имели место изменения, характерные для инфаркта миокарда: элевация сегмента ST и появление зубца Q.

Микроскопическое исследование препаратов сердца, выведенных через 24 ч после моделирования ОИМ у животных, показало наличие обтурирующих или субобтурирующих тромбов в инфаркт-связанной артерии (ИСА). В миокарде наблюдали неравномерное его кровенаполнение, диффузно-очаговое венозно-капиллярное полнокровие, стаз и сладж эритроцитов, плазмостаз. Отмечались очаги волнистой деформации миоцитов, контрактуры, избирательное окрашивание миоцитов с преднекротическими и некротическими изменениями, формирование вокруг участков некроза демаркационного лейкоцитарного вала, участки незрелой грануляционной ткани, миомаляция, мелкоочаговая макрофагальная инфильтрация. При окрашивании методом MSB тромбов в ИСА наблюдались фрагменты «зрелого» и «старого» фибрина. Таким образом, у всех выживших животных выявлены морфологические признаки развития ОИМ.

При оценке ЭКГ после проведенного тромболизиса липосомальными формами ТНК наблюдали снижение сегмента ST более чем на 50 % от исходного во II отведении, что свидетельствовало об эффективной реперфузии с восстановлением кровотока.

Исследование динамики кардиоспецифических маркеров показало значительное снижение ($p < 0,05$) содержания КФК-МВ и тропонина Т и увеличение ($p < 0,05$) содержания Д-димеров в сыворотке крови животных после введения липосомальных форм ТНК по сравнению с таковыми после применения нативной формы тенектеплазы (табл. 1).

Результатом тромболитического действия ИЛТНК-СД препарата являлось статистически значимое уменьшение объема ишемического повреждения сердца к моменту завершения эксперимента ($p < 0,05$) по сравнению с нативной ТНК и ЛТНК-СД (табл. 2).

Таблица 1. **Уровни кардиоспецифических маркеров и Д-димеров в сыворотке крови экспериментальных животных при введении различных форм тенектеплазы**

Table 1. **Levels of cardiac-specific markers and D-dimers in the blood serum of experimental animals after administration of different-form tenecteplase**

Маркер	ТНК	ЛТНК-СД	ИЛТНК-СД	ОИМ	Контроль	*p*
	1	2	3	4	5	
КФК-МВ, Ед/л	415,1* (357,2; 477,8)	307,4* (199,4; 394,4)	301,1* (287,2; 347,3)	422,6* (381,3; 573,7)	130,4 (122,4; 136,1)	$p_{1-2} < 0,05$, $p_{1-3} < 0,05$, $p_{1-4} < 0,05$, $p_{2-4} < 0,05$, $p_{3-4} < 0,05$
Тропонин Т, нг/л	4,2* (3,1; 6,9)	3,3* (2,9; 3,6)	3,0* (2,0; 3,4)	5,9* (5,1; 7,0)	2,7* (1,9; 3,5)	$p_{1-3} < 0,05$, $p_{1-4} < 0,05$, $p_{2-4} < 0,05$, $p_{3-4} < 0,05$
Д-димеры, нг/мл	22,2* (21,3; 41,5)	29,3* (21,6; 34,3)	32,3* (2,1; 34,9)	15,7* (12,0; 20,5)	6,7 (3,9; 8,9)	$p_{1-2} < 0,05$, $p_{1-3} < 0,05$, $p_{1-4} < 0,05$, $p_{2-4} < 0,05$, $p_{3-4} < 0,05$, $p_{2-3} < 0,05$

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

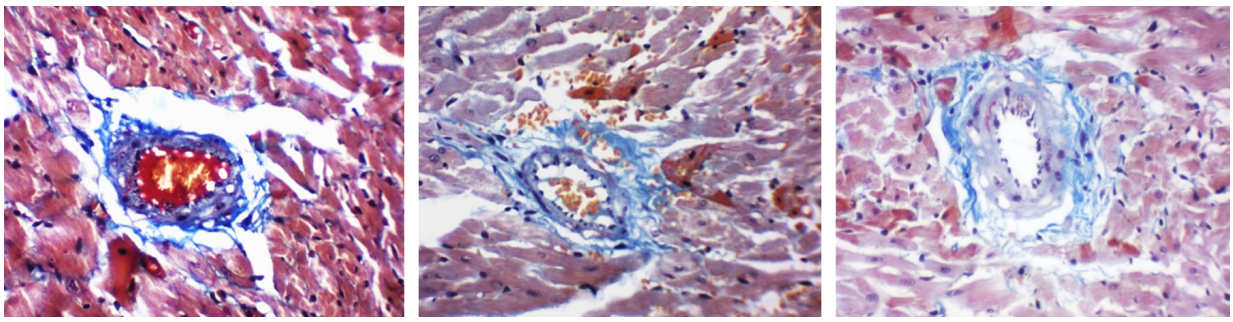
Таблица 2. **Масса ИМ при введении различных форм тенектеплазы, %**

Table 2. **Weight of MI after administration of different-form tenecteplase, %**

Исследуемая зона	ТНК	ЛТНК-СД	ИЛТНК-СД	ОИМ	*p*
	1	2	3	4	
Зона ишемии	41 (29; 45)	31 (24; 40)	15 (9; 23)	51 (31; 54)	$p_{1-2} < 0,05$, $p_{1-3} < 0,05$, $p_{1-4} < 0,05$, $p_{2-3} < 0,05$, $p_{2-4} < 0,05$, $p_{3-4} < 0,05$,
Здоровый миокард	59 (48; 61)	69 (63; 70)	85 (74; 87)	49 (43; 51)	$p_{1-2} < 0,05$, $p_{1-3} < 0,05$, $p_{1-4} < 0,05$, $p_{2-3} < 0,05$, $p_{2-4} < 0,05$, $p_{3-4} < 0,05$

В нашем эксперименте ТЛТ с использованием разных форм тромболитика вызывала полный или частичный лизис тромбов (см. рисунок). При лечении нативной ТНК у всех экспериментальных животных отмечался неполный тромболизис в ИСА с сохранением фибрина, располагающегося пристеночно и в центральной части просвета коронарной артерии (КА) (см. рисунок, *b*). При лечении ЛТНК-СД и ИЛТНК-СД фибрин в тромбах наблюдался в следовых количествах или отсутствовал.

Морфометрический анализ показал, что ССПС значительно ($p < 0,05$) увеличилась при использовании иммунолипосомальной формы доставки ТНК (88,9 [73,2; 99,8]) по сравнению с липосомальной (62,4 [57,9; 69,0]). Наименьшую ССПС в ИСА наблюдали при использовании нативной ТНК (43,3 [32,4; 55,6]).



a *b* *c*

Микроскопические изменения в ИСА крыс с ОИМ. Репрезентативные изображения КА, окрашенных MSB: исходный тромб (*a*), тромболизис ЛТНК-СД (*b*), тромболизис ИЛТНК-СД (*c*)

Microscopic changes in the ISA of rats with AMI. Representative images of MSB-stained CAs: original thrombus (*a*), thrombolysis of LTNK-SD (*b*), thrombolysis of LTNK-SD (*c*)

Уменьшение объема ишемического повреждения миокарда и полное восстановление просвета ИСА при использовании иммунолипосомальной системы доставки ТНК обусловлено ее оптимальной структурой, содержащей 40 % «связанной» и 60 % «свободной» форм тромболитика и наличием на поверхности липосом АТ к фибрину.

Заключение. Разработана новая система адресной доставки ТНК, представляющая собой комбинацию иммунолипосомальной формы препарата с нативной в процентном соотношении 40/60.

Установлены физико-химические характеристики полученных иммунолипосом: иммунолипосомы имеют гидродинамический диаметр ~76–77 нм, дзета-потенциал ~(–33) мВ, индекс полидисперсности ~0,55.

При использовании ИЛТНК-СД у животных с ОИМ свободный просвет ИСА увеличивается на 26 % по сравнению с группой ЛТНК-СД и на 46 % по сравнению с группой нативной ТНК. При этом масса ишемизированного миокарда у крыс на фоне ТЛТ с применением ИЛТНК-СД уменьшается на 16 % по сравнению с группой ЛТНК-СД и на 26 % по сравнению с группой нативной ТНК.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Работа выполнена в рамках проекта «Разработать метод адресной доставки лекарственных средств для тромболитической терапии острого инфаркта миокарда» ГПНИ «Фундаментальные и прикладные науки – медицине» (2019/2021 гг.). Авторы выражают особую благодарность Министру здравоохранения Республики Беларусь Пиневичу Дмитрию Леонидовичу за поддержку и постоянное внимание к выполнению данного проекта.

Acknowledgements. The work was carried out within the framework of the project “Develop a method for targeted delivery of drugs for thrombolytic therapy of acute myocardial infarction” of the State Public Research Institute “Basic and Applied Sciences – Medicine” (2019/2021). The authors are very grateful to the Minister of Heathcare of the Republic of Belarus Pinevich Dmitry Leonidovich for support and constant attention to the implementation of this project.

Список использованных источников

1. Global Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015 / G. A. Roth [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. – 2017. – Vol. 70, N 1. – P. 1–25. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.04.052

2. Sustained benefit 20 years after reperfusion therapy in acute myocardial infarction / R. T. van Domburg [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. – 2005. – Vol. 46, N 1. – P. 15–20. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.03.047

3. Zhang, H. Thin-film hydration followed by extrusion method for liposome preparation / H. Zhang // Methods Mol. Biol. – 2017. – Vol. 1522. – P. 17–22. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6591-5_2

4. Liposomal nanocarriers for plasminogen activators / S. Koudelka [et al.] // J. Controll. Release. – 2016. – Vol. 227. – P. 45–57. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.02.019

5. Получение комплексных препаратов на основе липосомальной формы стрептокиназы и их фармакокинетические характеристики / Е. И. Дубатовка [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 6. – С. 50–57.

6. Fibrinspecific liposomes as a potential method of delivery of the thrombolytic preparation streptokinase / I. E. Adzerikho [et al.] // J. Thrombosis Thrombolysis. – 2022. – Vol. 53, N 2. – P. 313–320. https://doi.org/10.1007/s11239-021-02614-0

7. Efficiency of targeted delivery of streptokinase based on fibrin-specific liposomes in the vivo experiment / I. Adzerikho [et al.] // Drug Deliv. Transl. Res. – 2023. – Vol. 13, N 3. – P. 811–821. https://doi.org/10/1007/S13346-022-01242-2

8. Targeted Delivery of Plasminogen Activators for Thrombolytic Therapy: An Integrative Evaluation / Y.-H. Ma [et al.] // Molecules. – 2019. – Vol. 24, N 18. – Art. 3407. https://doi.org/10.3390/molecules24183407

9. Platelet microparticle-inspired clot-responsive nanomedicine for targeted fibrinolysis / C. L. Pawlowski [et al.] // Biomaterials. – 2017. – Vol. 128. – P. 94–108. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.03.012

10. Nanocarriers in cancer clinical practice: a pharmacokinetic issue / L. Giodini [et al.] // Nanomedicine. – 2017. – Vol. 13, N 2. – P. 583–599. https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.07.012

11. Li, W. Ferric chloride-induced murine carotid arterial injury: A model of redox pathology / W. Li, T. M. McIntyre, R. L. Silverstein // Redox Biol. – 2013. – Vol. 1, N 1. – P. 50–55. https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.11.001

12. The efficacy and the safety of the action of the complex drug of fibrin-specific streptokinase in arterial thrombosis *in vivo* / I. E. Adzeriho [et al.] // Eur. Heart J. – 2019. – Vol. 40, suppl. 1. – Art. P743. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz747.0346

13. Экспериментальное изучение физико-химических, фармакокинетических свойств и степени безопасности комплексного препарата стрептокиназы на основе фибрин-специфичных липосом / И. Л. Лутик [и др.] // Кардиология в Беларуси. – 2019. – Т. 11, № 5. – С. 729–743.

14. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the estimation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254. https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999

15. Compton, S. J. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay / S. J. Compton, G. G. Jones // Anal. Biochem. – 1985. – Vol. 151, N 2. – P. 369–374. https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90190-3

16. Сапожников, А. Г. Гистологическая и микроскопическая техника: руководство / А. Г. Сапожников, А. Е. Доросевич. – Смоленск: Смолен. ассоц. ученых, 2000. – 475 с.

References

1. Roth G. A., Johnson C., Abajobir A., Abd-Allah F., Abera S. F., Abyu G. [et al.]. Global Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *Journal of the American College of Cardiology,* 2017, vol. 70, no. 1, pp. 1–25. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.04.052

2. van Domburg R. T., Sonnenschein K., Nieuwlaat R., Kamp O., Storm C. J., Bax J. J., Simoons M. L. Sustained benefit 20 years after reperfusion therapy in acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 2005, vol. 46, no. 1, pp. 15–20. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.03.047

3. Zhang H. Thin-film hydration followed by extrusion method for liposome preparation. *Methods in Molecular Biology*, 2017, vol. 1522, pp. 17–22. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6591-5_2

4. Koudelka S., Mikulik R., Mašek J., Raška M., Turánek Knotigová P., Miller A. D., Turánek J. Liposomal nanocarriers for plasminogen activators. *Journal of Controlled Release*, 2016, vol. 227, pp. 45–57. https://doi.org/10.1016/j.jconrel. 2016.02.019

5. Dubatovka E. I., Lutik I. L., Chernyavskii E. A., Bondarenko E. S., Adzerikho I. E., Agabekov V. E. Preparation of complex formulations based on liposomal streptokinase and their pharmacokinetic characteristics. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2017, vol. 61, no. 6, pp. 50–57 (in Russian).

6. Adzerikho I. E., Vladimirskaya T. E., Lutsik I. L., Dubatouka K. I., Agabekov V. E., Branovitskaya E. S., Chernyavsky E. A., Lugovska N. Fibrinspecific liposomes as a potential method of delivery of the thrombolytic preparation streptokinase. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 2022, vol. 53, no. 2, pp. 313–320. https://doi.org/10.1007/s11239-021-02614-0

7. Adzerikho I., Vladimirskaya T., Lutsik I., Dubatovka K., Agabekov V. Efficiency of targeted delivery of streptokinase based on fibrin-specific liposomes in the vivo experiment. *Drug Delivery and Translational Research*, 2023, vol. 13, no. 3, pp. 811–821. https://doi.org/10/1007/S13346-022-01242-2

8. Ma Y.-H., Liu Ch.-H., Liang Y., Chen J.-P., Wu T. Targeted Delivery of Plasminogen Activators for Thrombolytic Therapy: An Integrative Evaluation. *Molecules*, 2019, vol. 24, no. 18, art. 3407. https://doi.org/10.3390/molecules24183407

9. Pawlowski C. L., Li W., Sun M., Ravichandran K., Hickman D., Kos C., Kaur G., Sen Gupta A., Dreussi E., Toffoli G. Platelet microparticle-inspired clot-responsive nanomedicine for targeted fibrinolysis. *Biomaterials*, 2017, vol. 128, pp. 94–108. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.03.012

10. Giodini L., Re F. L., Campagnol D., Marangon E., Posocco B. Nanocarriers in cancer clinical practice: a pharmacokinetic issue. *Nanomedicine*, 2017, vol. 13, no. 2, pp. 583–599. https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.07.012

11. Li W., McIntyre T. M., Silverstein R. L. Ferric chloride-induced murine carotid arterial injury: A model of redox pathology. *Redox Biology*, 2013, vol. 1, no. 1, pp. 50–55. https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.11.001

12. Adzeriho I. E., Lutsik I. L., Vladimirskaya T. E., Cherniavsky E. A. The efficacy and the safety of the action of the complex drug of fibrin-specific streptokinase in arterial thrombosis *in vivo*. *European Heart Journal*, 2019, vol. 40, suppl. 1, art. P743. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz747.0346

13. Lutik I. L., Vladimirskaya T. E., Chernyavskii E. A., Dubatovka E. I., Adzerikho I. E. Experimental study of physico-chemical, pharmacokinetic properties, and the degree of safety of complex preparation of streptokinase on the base of fibrin-specific liposomes. *Kardiologiya v Belarusi = Cardiology in Belarus*, 2019, vol. 11, no. 5, pp. 729–743 (in Russian).

14. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the estimation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, vol. 72, pp. 248–254. https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999

15. Compton S. J., Jones G. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry*, 1985, vol. 151, no. 2, pp. 369–374. https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90190-3

16. Sapozhnikov A. G., Dorosevich A. E. *Histological and microscopic techniques*. Smolensk, Smolensk Association of Scientists, 2000. 475 p. (in Russian).

Информация об авторах

Адзерихо Игорь Эдуардович – д-р мед. наук, профессор. Белорусский государственный медицинский университет (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0001-6572-8842. E-mail: adzerikhoigor@mail.ru

Агабеков Владимир Енокович – академик, д-р хим. наук, профессор, заведующий отделом. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0002-7218-3649. E-mail: agabekov@ichnm.basnet.by

Владимирская Татьяна Эрнстовна – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Белорусский государственный медицинский университет (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0002-0777-192X. E-mail: tan_2304@inbox.ru

Дубатовка Екатерина Ивановна – мл. науч. сотрудник. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: d_katerina@tut.by

Жилкевич Алена Вячеславовна – мл. науч. сотрудник. Белорусский государственный медицинский университет (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: alenazhilkevich@mail.ru

Information about the authors

Ihar E. Adzerikho – D. Sc. (Med.), Professor. Belarusian State Medical University (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0001-6572-8842. E-mail: adzerikhoigor@mail.ru

Vladimir E. Agabekov – Academician, D. Sc. (Chem.), Professor, Head of the Department. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skoryna Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0002-7218-3649. E-mail: agabekov@ichnm.basnet.by

Tat'yana E. Vladimirskaya – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Leading Researcher. Belarusian State Medical University (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0002-0777-192X. E-mail: tan_2304@inbox.ru

Katsiaryna I. Dubatouka – Junior Researcher. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skoryna Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: d_katerina@tut.by

Aliona V. Zhilkevich – Junior Researcher. Belarusian State Medical University (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alenazhilkevich@mail.ru

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 616.15:[614.2:004]
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-125-137

Поступила в редакцию 15.02.2023
Received 15.02.2023

Э. В. Дашкевич[1], Н. Н. Климкович[2], О. В. Красько[3], В. В. Пасюков[1], Ж. В. Пешняк[1], Е. Д. Расюк[1]

[1]Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Минск, Республика Беларусь
[2]Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь
[3]Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ТРАНСФУЗИОННО-ГЕМОСТАЗИОЛОГИЧЕСКИЙ КЛАСТЕР В ЭЛЕКТРОННОМ ЗДРАВООХРАНЕНИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Аннотация. Информатизация в трансфузиологии и гемостазиологии является актуальным направлением, позволяющим осуществлять организационно-методическое сопровождение, планирование лечебных мероприятий, распределение компонентов и препаратов крови с учетом уровня и объема медицинской помощи в стране, регионе, учреждении здравоохранения, а также с учетом обеспечения оказания медицинской помощи при чрезвычайных ситуациях.

К реальным результатам информатизации в трансфузиологии и гемостазиологии отечественного здравоохранения можно отнести разработанные с использованием элементов аналитики специализированные информационно-аналитические системы (ИАС), эпидемиологические регистры пациентов с различными нозологиями, созданные исходя из правовых, административных, методических и клинико-лабораторных критериев с целью учета, анализа, планирования медицинских мероприятий, подготовки отчетов, а также для принятия производственных решений. Для обеспечения взаимодействия с внешними системами ИАС и регистры разрабатываются согласно международным стандартам обмена медицинскими данными HL7 FHIR, на основе сервис-ориентированной архитектуры, а клиентская часть реализуется как Windows/Web-приложение.

В настоящее время в Республике Беларусь в сфере трансфузиологии и гемостазиологии разработано и используется несколько специализированных ИАС. Наряду с функционирующей много лет системой учета доноров крови (АИС Донор) ИАС формируют основу трансфузионно-гемостазиологического кластера, который способствует обеспечению высокого качества медицинской помощи и реализуется путем межрегионального и межструктурного взаимодействия составляющих его компонентов, направленного на обеспечение своевременности, безопасности и эффективности оказания помощи пациенту.

Ключевые слова: информационно-аналитические системы, регистры, компоненты крови, трансфузионная безопасность, трансфузионно-гемостазиологический кластер

Для цитирования: Трансфузионно-гемостазиологический кластер в электронном здравоохранении Республики Беларусь / Э. В. Дашкевич [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2024. – Т. 21, № 2. – С. 125–137. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-125-137

Eleonora V. Dashkevich[1], Natalya N. Klimkovich[2], Olga V. Krasko[3], Vadim V. Pasyukov[1], Janna V. Peshnyak[1], Elena D. Rasyuk[1]

[1]Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies, Minsk, Republic of Belarus
[2]Institute for Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Educational Institution "Belarusian State Medical University", Minsk, Republic of Belarus
[3]United Institute of Informatics Problems of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

TRANSFUSION-HEMOSTASIOLOGICAL CLUSTER IN ELECTRONIC HEALTHCARE OF THE REPUBLIC OF BELARUS

Abstract. Informatization in transfusiology and hemostasiology is a relevant and modern direction that allows for organizational and methodological support, planning of therapeutic measures, distribution of components and blood products, taking into account the level and volume of medical care in the country, region, healthcare institution and also the provision of medical care in emergency situations.

Information and analytical systems (IAS) are developed taking into account legal, administrative, methodological and clinical and laboratory criteria in order to record, analyze, generate reports and plan medical events, as well as make production decisions using the international standard for the exchange of medical data HL7 FHIR, Web-applications and assume privacy, real-time operation.

At present, several IASs have been developed and implemented in the Republic of Belarus. Along with the blood donor registration system (AIS Donor), which has been functioning for many years, they form the basis of the transfusion-hemosta-

siology cluster, which contributes to ensuring the high quality of medical care and is implemented through interregional and interstructural cooperation aimed at ensuring the timeliness, safety and efficiency of patient care.

Keywords: information and analytical systems, registers, blood components, transfusion safety, transfusion and hemostasiology cluster

For citation: Dashkevich E. V., Klimkovich N. N., Krasko O. V., Pasyukov V. V., Peshnyak J. V., Rasyuk E. D. Transfusion-hemostasiological cluster in electronic healthcare of the Republic of Belarus. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2024, vol. 21, no. 2, pp. 125–137 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-125-137

Введение. Система электронного здравоохранения открывает широкие перспективы в плане совершенствования всеобщего доступа к медико-санитарным услугам и информации о состоянии здоровья [1]. В настоящее время в Республике Беларусь, как и во всем мире, информационные технологии востребованы в различных областях здравоохранения [2]. Они позволяют обеспечить сбор, представление и комплексный анализ данных о динамике расхода компонентов крови с учетом тенденций о состоянии здоровья населения и характере медико-демографических процессов, эпидемиологической ситуации, повысить эффективность принимаемых организационно-методических решений.

Национально-административные особенности нашей республики, такие как территориальная компактность, покрытие интернет-сетями, наличие семи административных регионов, разработанная и постоянно совершенствующаяся нормативная база, имеющийся научно-кадровый потенциал, позволяют считать, что задача создания информационно-аналитических систем для сферы здравоохранения вполне осуществима [3].

В развитии информационных технологий в системе здравоохранения Республики Беларусь можно выделить несколько этапов [4]:

1) создание регистров пациентов с различными заболеваниями (синдромами, осложнениями) на базе сервис-ориентированной архитектуры и применение стандарта обмена медицинскими данными HL7 FHIR;

2) разработка специализированных информационно-аналитических систем различного назначения;

3) создание организационно-методических кластеров;

4) взаимодействие специализированных ИАС на единой платформе электронного здравоохранения.

В настоящее время разработаны и внедрены в организации здравоохранения Республики Беларусь следующие ИАС, включающие в том числе и регистры как составную часть:

регистр пациентов с гемофилией с возможностью расчетов потребности в лекарственных препаратах (ИАС РГ) [5], который аккумулировал информацию от областных специалистов-гематологов по заболеваемости, структуре, инвалидности, смертности по 15 нозологическим формам, протекающим с геморрагическими проявлениями [6];

регистр HLA-типированных доноров;

системы учета и анализа посттрансфузионных осложнений (ИАС ПТО) с формированием протокола лечения;

онлайн-заявка на трансфузионные среды и иммуногематологические реагенты, позволяющая проводить анализ потребности и планировать заготовку компонентов крови с учетом специализации коечного фонда;

система поддержки принятия решений (СППР) при оказании трансфузиологической помощи с учетом клинико-лабораторных трансфузионных синдромов [7].

Цель работы – создание трансфузионно-гемостазиологического кластера в электронном здравоохранении Республики Беларусь.

Материалы и методы исследования. Изучены заявки на трансфузионные компоненты крови от организаций здравоохранения Республики Беларусь, карты учета пациентов с гемофилией, данные о посттрансфузионных осложнениях, карты доноров, нормативно-правовые акты Республики Беларусь, Российской Федерации, ВОЗ.

Использованы аналитический, стастистический методы исследования, а также структурный подход к программированию.

Результаты и их обсуждение. *Трансфузионно-гемостазиологический кластер.* Совокупность программных продуктов (специализированные ИАС, регистры, СППР и др.) трансфузионно-гемостазиологического кластера обеспечивает организационно-методическое и информационное взаимодействие между медицинскими регистрами, заготовкой и производством компонентов и препаратов крови для планирования лечебных (в трансфузиологии это в основном заместительная терапия), производственных (объемы заготовки, структура заготавливаемых компонентов и иммуногематологических реагентов, безопасность применяемых консервантов и расходных материалов), методических (целесообразность подготовки клинических протоколов и инструкций) и организационных (потребности в зависимости от профиля коек, уровня оказания помощи, обеспечение препаратами на амбулаторном этапе, формирование запасов на чрезвычайные и экстренные ситуации) мероприятий для пациентов (рис. 1).

Этапы создания ИАС. На первом этапе разработки каждой ИАС предполагается формирование справочников в соответствии с действующими нормативно-правовыми актами, обзор научной литературы, разработка необходимых и достаточных критериев включения и выбытия данных: в ИАС РГ- и HLA-типированных доноров – демографических, территориальных и клинико-лабораторных данных пациентов, в ИАС ПТО – случаев посттрансфузионного осложнения с территориальной и клинико-лабораторной привязкой, в онлайн-заявке на трансфузионную среду наряду с территориальной составляющей включение кода по МКБ-10 заболевания пациента, выбор компонентов крови для коррекции трансфузионно значимого синдрома с учетом СППР.

Второй этап разработки включает формирование отчетов с целью представления данных (по территориальному, возрастному, нозологическому и другим запросам) и проведения расчетов.

Следующим этапом является непосредственно формирование завершающей формы документов с рекомендациями для проведения лечебных мероприятий по заданным параметрам (протокол лечения, расчет потребности в компонентах крови для лечения, список HLA-типированных доноров для трансплантации и т. д.) с возможностью сохранения данных и выявления трендов для изучения тенденций.

Онлайн-заявка. С целью обеспечения системного унифицированного подхода и централизации данных в Республике Беларусь создана система онлайн-заявки на продукты крови, которая предполагает, что содержащиеся в ней заданные параметры соответствуют классификациям и протоколам, которые отвечают требованиям действующих нормативно-правовых актов. Обеспечение больничных организаций здравоохранения продуктами крови производится на основании поданной в учреждение службы крови персонифицированной заявки, в которой указаны



Рис. 1. Схема трансфузионно-гемостазиологического кластера в электронном здравоохранении Республики Беларусь

Fig. 1. Scheme of the transfusion-hemostasiology cluster as part of the e-health of the Republic of Belarus

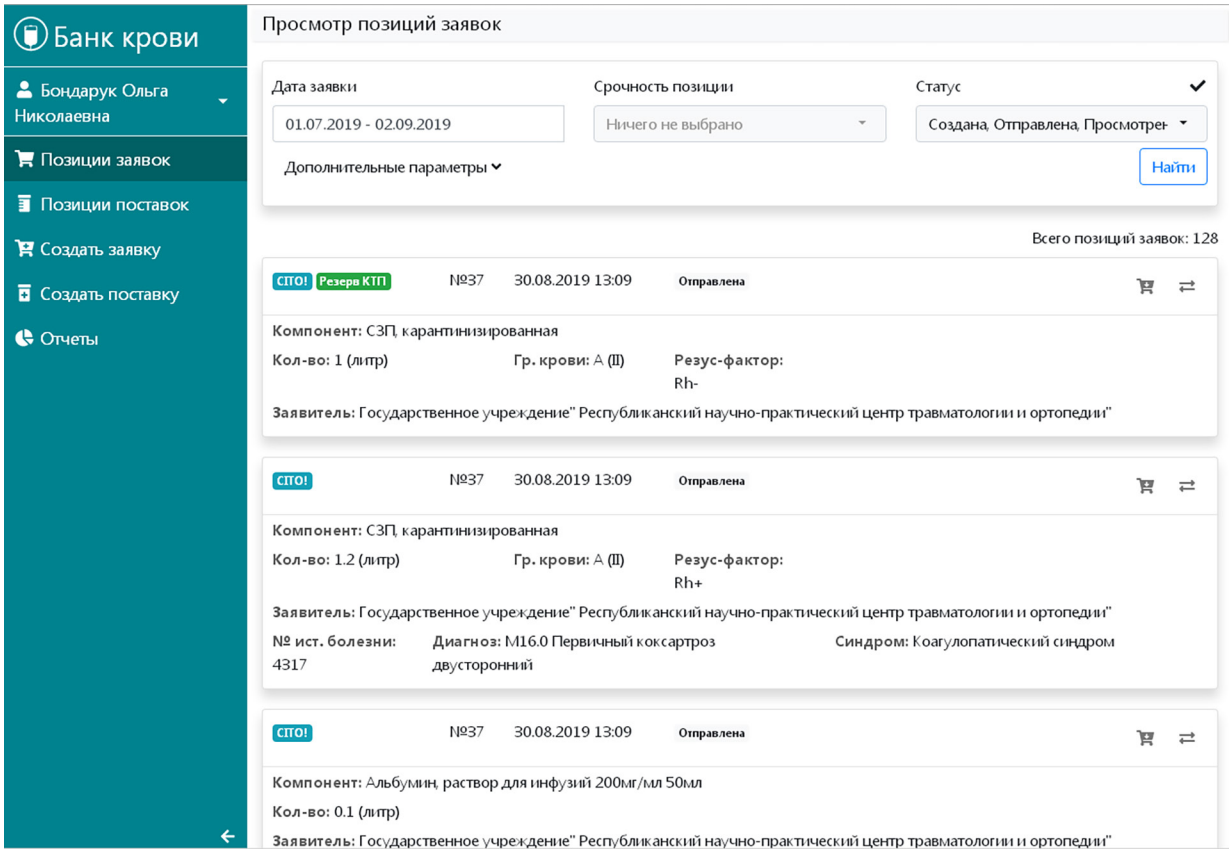


Рис. 2. Главное окно программы онлайн-заявки

Fig 2. Main window of the online application program

наименование и объем продукта крови в соответствии с действующей номенклатурой, а также диагноз пациента и объективные показания для трансфузионной терапии либо для иной цели (с обоснованием) (рис. 2).

Для больничной организации здравоохранения система позволяет сделать автоматизированный выбор заложенных в программе параметров: диагноза – в соответствии с международной классификацией болезней (МКБ-10), показаний (обоснования) – синдрома, подлежащего трансфузионной коррекции и соответствующей номенклатурной позиции продукта крови. Электронная форма заявки позволит сократить время оформления заявки и передачи данных, выполнить требования по формированию обоснованной персонифицированной заявки, снизить вероятность ошибки, обеспечив варианты выбора и сократив влияние человеческого фактора.

Для учреждения службы крови с помощью этой программы можно своевременно уточнить клиническую ситуацию, согласовать временной промежуток выдачи и необходимость дополнительного резервирования крови, а следовательно, обеспечить управление текущими ресурсами.

Программа позволит службе крови страны объективно анализировать объемы фактического потребления продуктов крови по номенклатуре, учитывая нозологические формы заболеваний, различные уровни оказания медицинской помощи и их региональное распределение в зависимости от численности населения. Кроме того, доступным для расчета в автоматическом режиме будет среднее количество трансфузионной среды на одного пациента с учетом нозологической формы заболевания за определенный период времени (месяц, квартал, год), что также является основой для формирования потребности на прогнозируемый временной промежуток. Программное обеспечение онлайн-заявки и методика расчета потребности позволяют обеспечить объективное прогнозирование обязательной потребности больничных организаций здравоохранения (региона, страны) в продуктах крови и, соответственно, эффективное управление запасами.

Выдача компонентов крови организациями трансфузиологического профиля осуществляется на основании заявок организаций с указанием сведений о пациенте, компоненте, что может быть предметом ретроспективного анализа, определения «моделей» пациентов с учетом профиля, нозологии, объема, кратности ввода и вида компонента (сочетания компонентов). Это позволяет сформировать стандартизированную потребность в компонентах крови и обеспечить планирование заготовки крови для клинических и производственных нужд, за счет чего будет достигаться адекватное управление ресурсами и использованием крови, включая разработку системы и порядок практической деятельности по инвентаризации запасов крови и анализу ее потребления.

Регистр HLA-типированных доноров. Главными задачами программного комплекса Регистра доноров HLA являются: ведение общереспубликанского эпидемиологического регистра на базе учреждений службы переливания крови; автоматизация процессов сбора, накопления и передачи информации по донорам HLA в Республике Беларусь; обеспечение возможности поиска информации по определенным критериям в базе данных регистра, а также интеграции в информационную систему европейского банка данных. Разработанный программный комплекс позволяет осуществлять учет, поиск и подбор доноров для неродственных трансплантаций костного мозга при гематологических заболеваниях (рис. 3).

СППР – программа, позволяющая проводить выбор компонента крови в соответствии с алгоритмами (рис. 4).

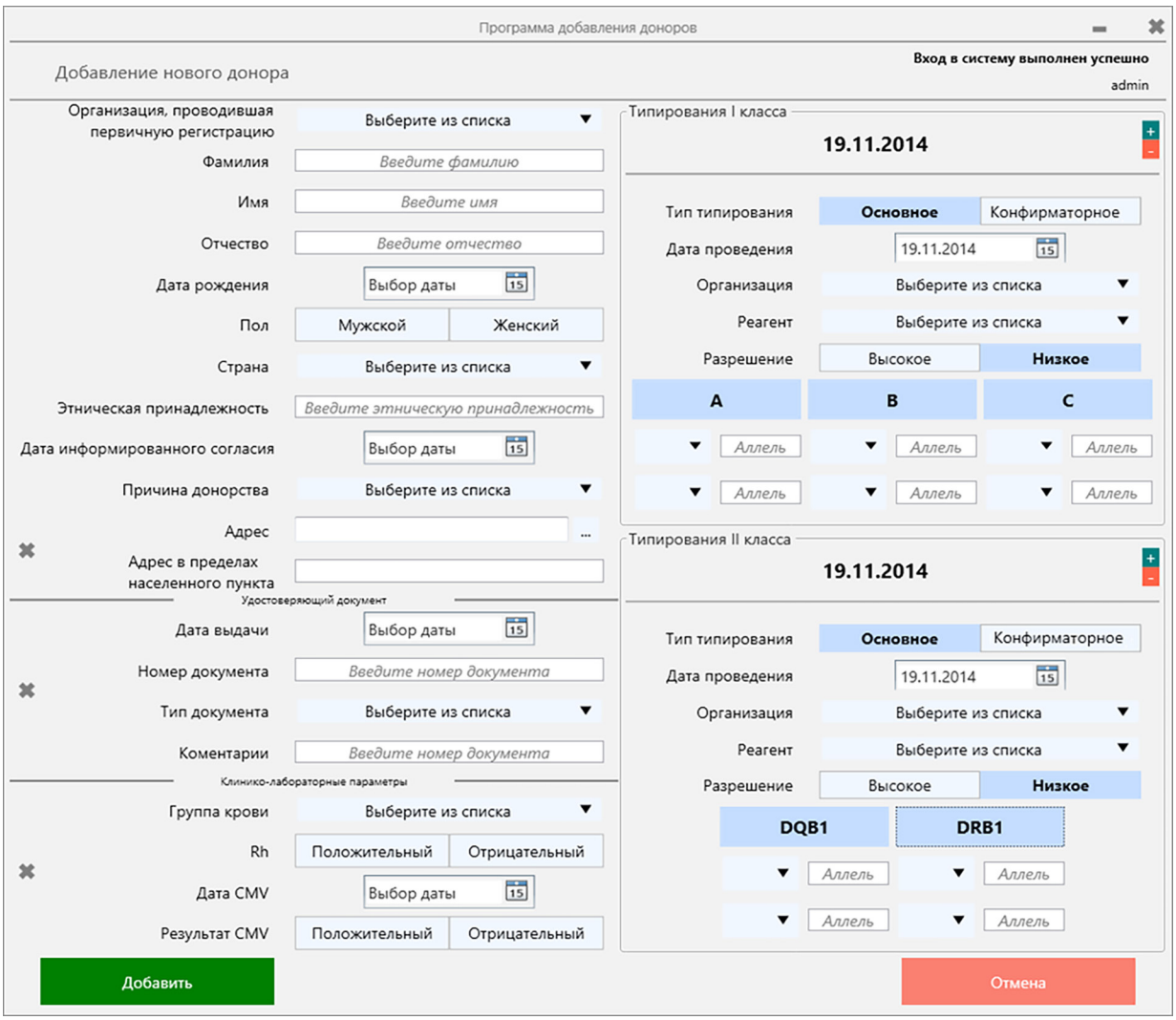


Рис. 3. Окно программы Регистр HLA-типированных доноров

Fig. 3. Window of the program Register of HLA typed donors

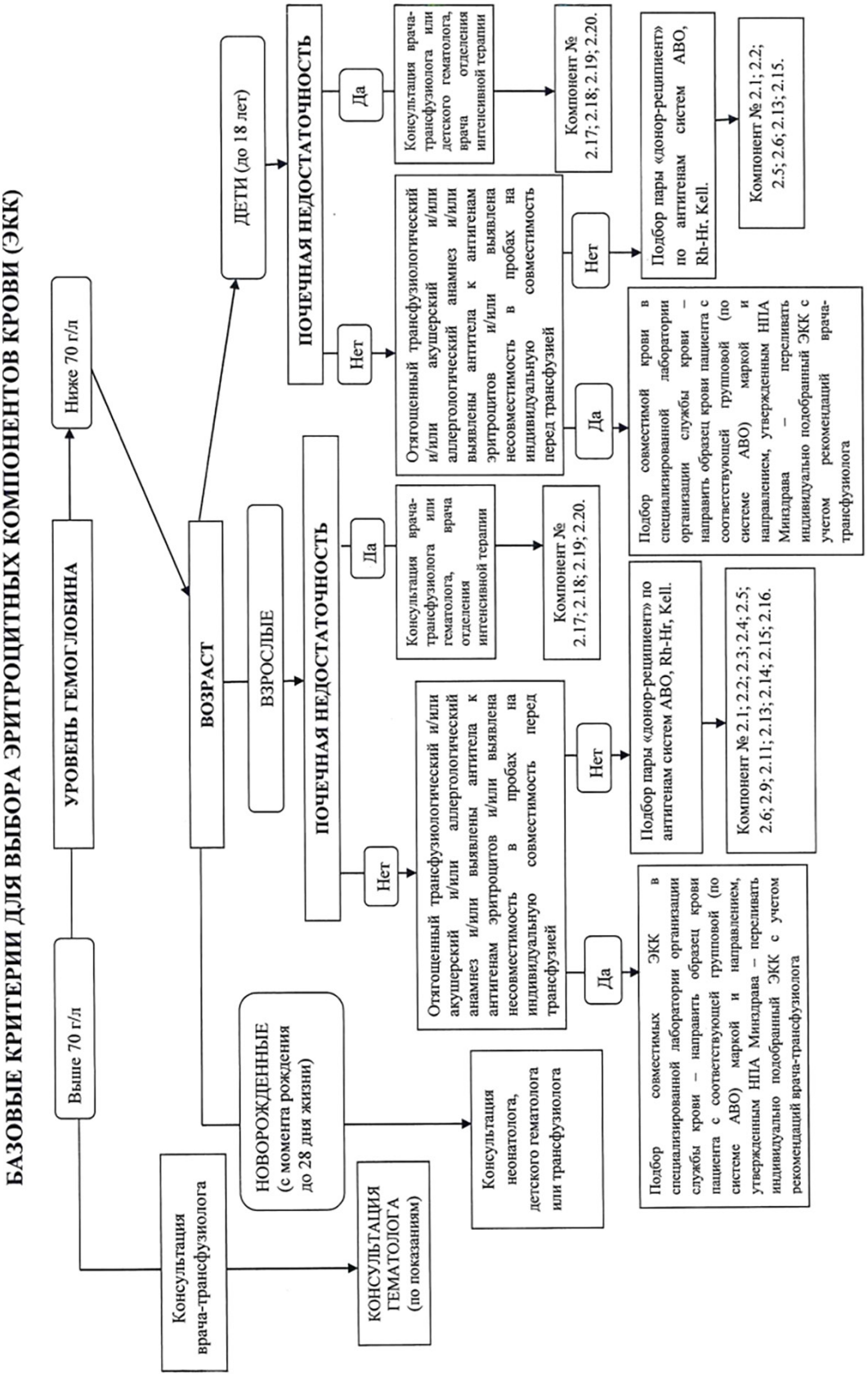


Рис. 4. Примерная схема выбора эритроцитных компонентов крови в программе СППР

Fig. 4. Example of a scheme for selecting erythrocyte blood components in the DSS

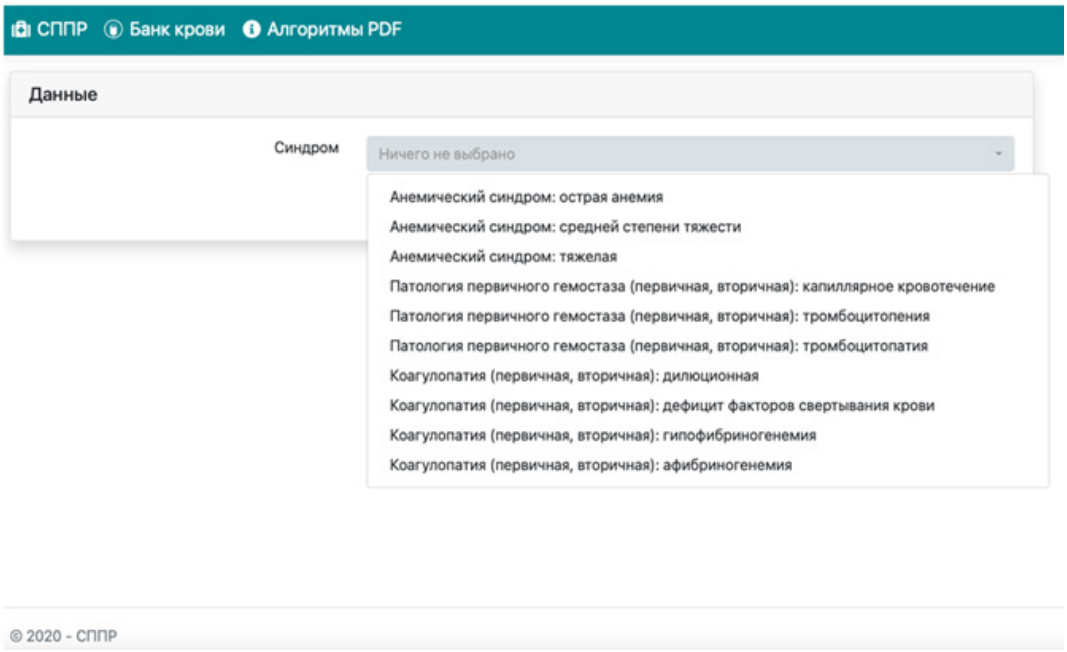


Рис. 5. Окно программы системы поддержки принятия решений

Fig. 5. DSS program window

Кровь и ее компоненты используются для коррекции клинических синдромов, профилактики осложнений, угрожающих жизни пациентов, и применяются в различных областях медицины. Клиническая значимость того или иного синдрома зависит от индивидуальных особенностей пациента и клинической ситуации (пол, возраст, масса тела, жалобы, анамнез, сопутствующие заболевания, прием лекарственных средств, результаты лабораторных и инструментальных методов исследования), на основании которых и формируются обоснованные показания к медицинскому применению компонентов крови [8].

Система предназначена для врачей-специалистов, оказывающих персонифицированную трансфузиологическую помощь с учетом трансфузионных синдромов и таксономических критериев (рис. 5):

1) анемический синдром: острая, средней степени тяжести, тяжелая анемия;

2) патология первичного гемостаза (первичная, вторичная): капиллярное кровотечение, тромбоцитопения, тромбоцитопатия;

3) коагулопатия (первичная, вторичная): дилюционная, дефицит факторов свертывания крови, гипофибриногенемия, афибриногенемия [9].

На основании базовых клинических и лабораторных показаний для использования компонентов крови разработаны алгоритмы для определения тактики лечения в зависимости от вида оказываемой трансфузиологической помощи. Установлены особенности применения компонентов крови в зависимости от наличия признаков, определяющих способ донации, их заготовку, переработку и производство, а также главные критерии для назначения компонентов крови, которые лежат в основе разработанных алгоритмов трансфузионной терапии.

Предложены справочники и алгоритмы выбора совместимой (одно- и иногруппной) трансфузионной среды по антигенам систем АВО, Резус и Келл с учетом заготовки и переработки донорской крови, а также в случае, когда реципиент отнесен к группе риска возникновения сенсибилизации и, как следствие, появления трансфузионных реакций и посттрансфузионных осложнений.

В информационных системах обработки медицинской информации, которые управляют обеспечением качества трансфузиологической помощи и системного многоуровневого мониторинга медицинского применения крови, ее компонентов, лекарственных средств из плазмы крови, использование программного комплекса позволяет избежать нежелательных эффектов после их применения.

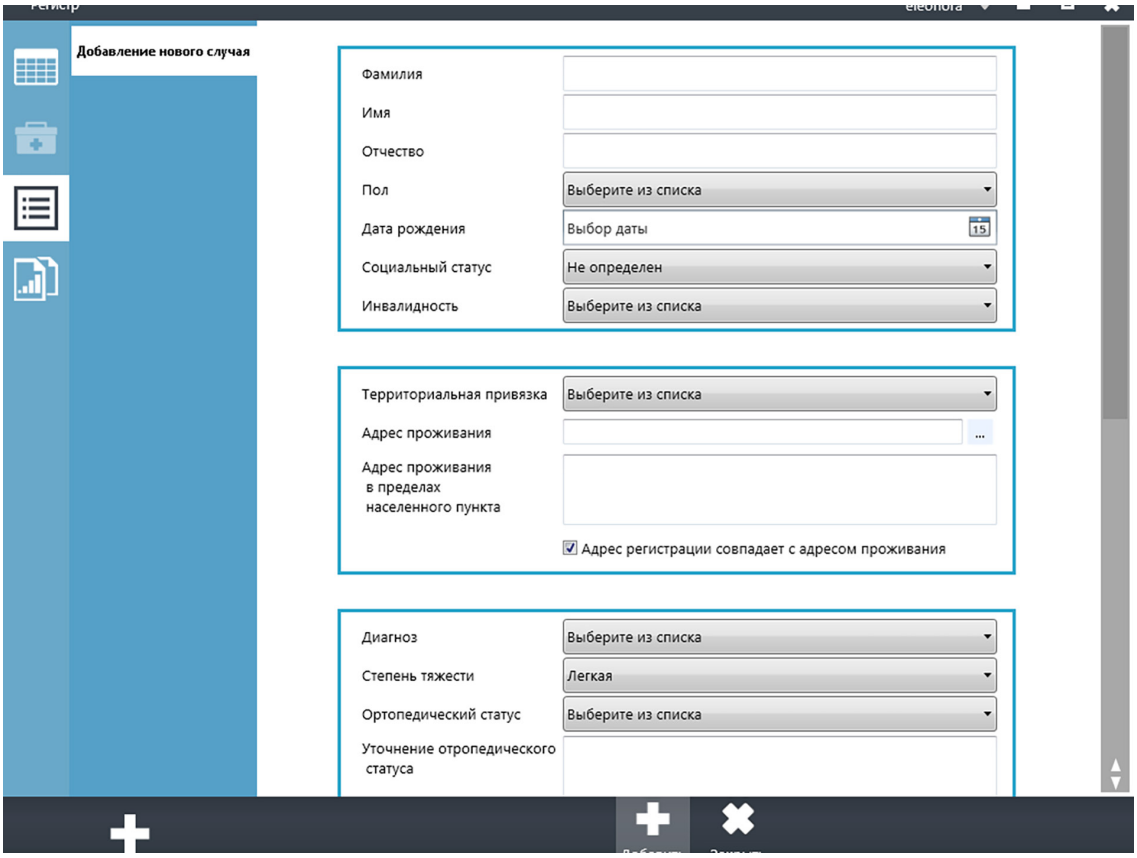


Рис. 6. Окна ИАС-регистра коагулопатий

Fig. 6. IAS windows of the coagulopathy register

ИАС-регистр гемофилии. Согласно регистру ИАС РГ (рис. 6), кроме внесенных о пациенте данных можно оценить динамику распространения определенной группы заболеваний: в 2017 г. распространенность гемостазиопатий в Республике Беларусь по сравнению с 2009 г. увеличилась и составила 8,7 ± 0,3 на 100 000 населения [10].

На основании протоколов лечения пациентов с гемофилией А и В были разработаны таблицы расчета, с помощью которых помимо учета заболеваемости и смертности может быть определена годовая потребность в факторах (с учетом тяжести заболевания и возраста пациента) [11]. Для этого сформированы модели, характеризующие пациентов с гемофилией (табл. 1).

Таблица 1. **Модели, характеризующие пациентов в зависимости от вида гемофилии, степени тяжести, артропатии, необходимости хирургических и реабилитационных мероприятий**

Table 1. **Models of patients depending on the type of hemophilia, severity, arthropathy, the need for surgical and rehabilitation measures**

Модель	Диагноз	Течение осложнения: наличие ингибитора	Соц. статус (учащиеся студенты)	Предшествующая схема лечения (операция, реабилитация и т. д.) до 3 лет	Критерии	Ортопедический статус
2.17	Гемофилия А сверхтяжелая	Классическое, кровотечения более 4 раз в квартал	Не учатся, не работают	Операции не проводились, реабилитация 1–3 раза за 5 лет	Гематомный тип кровоточивости с рождения у мальчиков, уровень фактора IX – до 1 %, отсутствие ингибиторов, хороший венозный доступ для регулярных инъекций, адекватность и ответственность пациента	Артропатия
2.18	Гемофилия В сверхтяжелая	Классическое, кровотечения более 4 раз в квартал	Не учатся, не работают	Операции проводились, реабилитация 1–3 раза за 5 лет		

Для составления алгоритма учитывают формулы расчета коагуляционного фактора VIII (табл. 2). После этого ИАС рассчитывает потребность препарата фактора VIII для оказания помощи пациентам с гемофилией А по регионам (рис. 7).

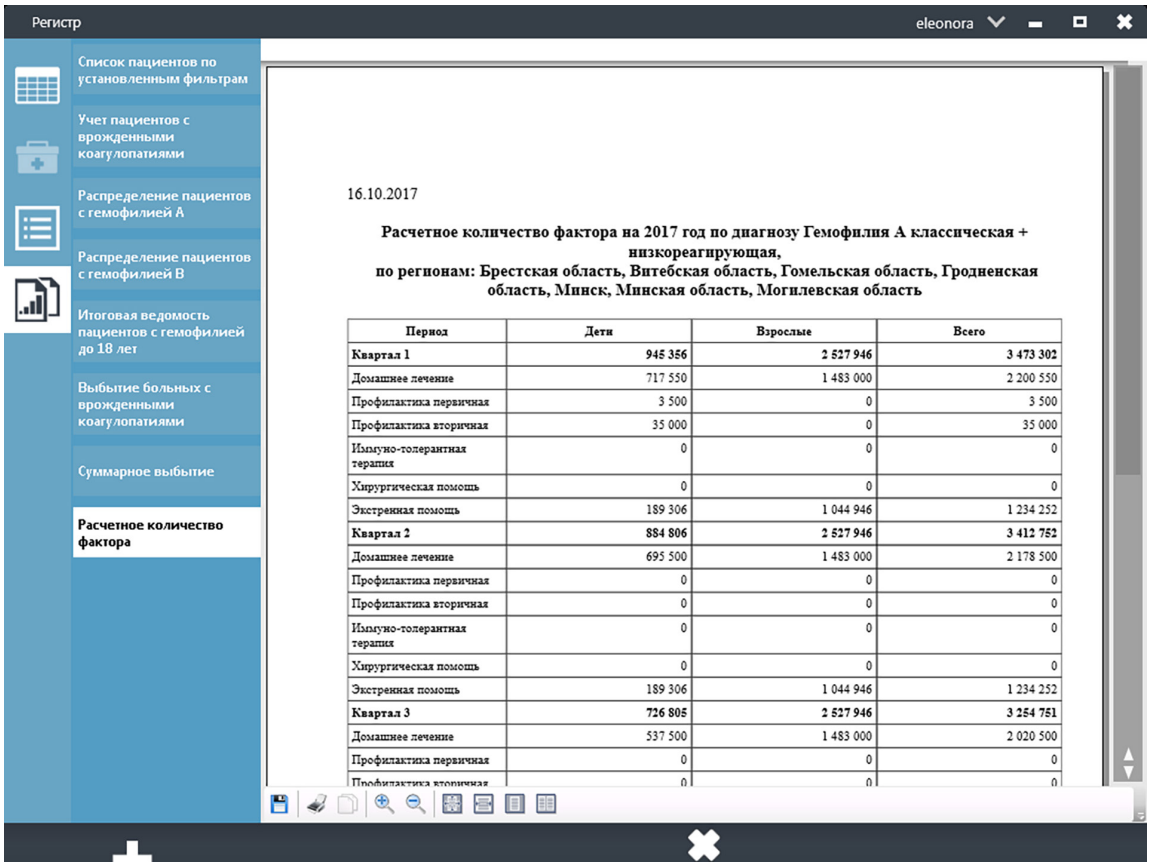
Т а б л и ц а 2. **Мероприятия, не зависящие от числа кровотечений у пациентов (пример)**

T a b l e 2. **Interventions that do not depend on the number of bleedings in patients (example)**

Нозология	Лечебное мероприятие			
	Операция ортопедическая	Операция стоматологическая у взрослых и детей	Плановая реабилитация	Экстренная хирургическая операция
Гемофилия А классическая (взрослые), VIII фактор	Стадия 0: (90 %–1 %) · *m* · K Стадия 1: (70 %–1 %) · *m* · K · 2,5* · 2** Стадия 2: (50 %–1 %) · *m* · K · 2,5* · 5** Стадия 3: (40 %–1 %) · *m* · K · 2,5* · 14**	Стадия 0: (70 %–1 %) · *m* · K Стадия 1: (70 %–1 %) · *m* · K · 2* · 2,5** Стадия 2: (40 %–1 %) · *m* · K · 2* · 1**	(40 %–1 %) · *m* · K · 1* · 14**	Стадия 0: (90 %–1 %) · *m* · K Стадия 1: (70 %–1 %) · *m* · K · 2,5* · 2** Стадия 2: (50 %–1 %) · *m* · K · 2,5* · 2** Стадия 3: (40 %–1 %) · *m* · K · 2,5* · 5**

П р и м е ч а н и е. *m* – масса тела пациента, K – коэффициент коррекции, * – количество раз, ** – число дней.

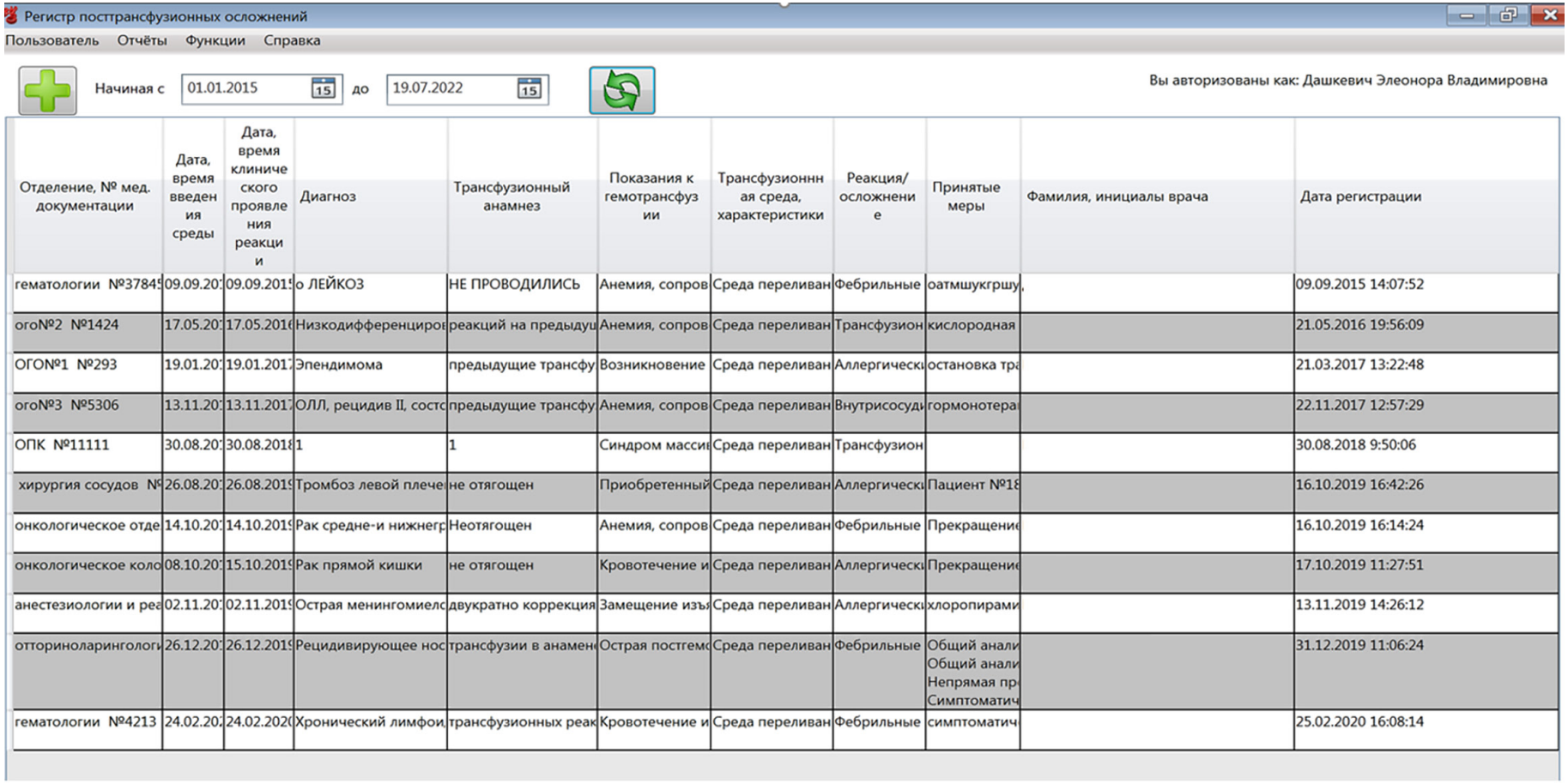
ИАС ПТО. В 2017 г. Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) предложено руководство по созданию национальной системы гематологического надзора (далее – гемонадзор), роль которого, как признает ВОЗ, очень важна в выявлении и предотвращении связанных с трансфузией нежелательных событий или при их повторении, а также в повышении безопасности и эффективности переливания крови и ее компонентов на протяжении всей цепочки – от донора до



Период	Дети	Взрослые	Всего
Квартал 1	**945 356**	**2 527 946**	**3 473 302**
Домашнее лечение	717 550	1 483 000	2 200 550
Профилактика первичная	3 500	0	3 500
Профилактика вторичная	35 000	0	35 000
Иммуно-толерантная терапия	0	0	0
Хирургическая помощь	0	0	0
Экстренная помощь	189 306	1 044 946	1 234 252
Квартал 2	**884 806**	**2 527 946**	**3 412 752**
Домашнее лечение	695 500	1 483 000	2 178 500
Профилактика первичная	0	0	0
Профилактика вторичная	0	0	0
Иммуно-толерантная терапия	0	0	0
Хирургическая помощь	0	0	0
Экстренная помощь	189 306	1 044 946	1 234 252
Квартал 3	**726 805**	**2 527 946**	**3 254 751**
Домашнее лечение	537 500	1 483 000	2 020 500
Профилактика первичная	0	0	0
Профилактика вторичная	0	0	0

Рис. 7. Окно программы расчета количества фактора в ИАС регистра коагулопатий

Fig. 7. Program window for calculating the amount of the factor in the IAS of the coagulopathy register



Отделение, № мед. документации	Дата, время введения среды	Дата, время клинического проявления реакции	Диагноз	Трансфузионный анамнез	Показания к гемотрансфузии	Трансфузионная среда, характеристики	Реакция/ осложнение	Принятые меры	Фамилия, инициалы врача	Дата регистрации
гематологии №3784	09.09.20	09.09.201	о ЛЕЙКОЗ	НЕ ПРОВОДИЛИСЬ	Анемия, сопров	Среда переливан	Фебрильные	оатмшукгршу,		09.09.2015 14:07:52
огоN°2 №1424	17.05.20	17.05.201	Низкодифференциров	реакций на предыду	Анемия, сопров	Среда переливан	Трансфузион	кислородная		21.05.2016 19:56:09
ОГОN°1 №293	19.01.20	19.01.201	Эпендимома	предыдущие трансфу	Возникновение	Среда переливан	Аллергически	остановка тра		21.03.2017 13:22:48
огоN°3 №5306	13.11.20	13.11.201	ОЛЛ, рецидив II, сост	предыдущие трансфу	Анемия, сопров	Среда переливан	Внутрисосуди	гормонотера		22.11.2017 12:57:29
ОПК №11111	30.08.20	30.08.201	1	1	Синдром масси	Среда переливан	Трансфузион			30.08.2018 9:50:06
хирургия сосудов N	26.08.20	26.08.201	Тромбоз левой плече	не отягощен	Приобретенный	Среда переливан	Аллергически	Пациент №18		16.10.2019 16:42:26
онкологическое отде	14.10.20	14.10.201	Рак средне-и нижнегр	Неотягощен	Анемия, сопров	Среда переливан	Фебрильные	Прекращение		16.10.2019 16:14:24
онкологическое коло	08.10.20	15.10.201	Рак прямой кишки	не отягощен	Кровотечение и	Среда переливан	Аллергически	Прекращение		17.10.2019 11:27:51
анестезиологии и ре	02.11.20	02.11.201	Острая менингомиело	двукратно коррекция	Замещение изъ	Среда переливан	Аллергически	хлоропирами		13.11.2019 14:26:12
отториноларингологи	26.12.20	26.12.201	Рецидивирующее нос	трансфузии в анамне	Острая постгемо	Среда переливан	Фебрильные	Общий анали Общий анали Непрямая пр Симптоматич		31.12.2019 11:06:24
гематологии №4213	24.02.20	24.02.202	Хронический лимфои	трансфузионных реак	Кровотечение и	Среда переливан	Фебрильные	симптоматич		25.02.2020 16:08:14

Рис. 8. Окно программы – отчет о посттрансфузионных осложнениях

Fig. 8. Program window – report on post-transfusion complications

Распределение случаев осложнений по типам осложнений и областям
Период реакции/осложнения с 01.01.2015 по 19.07.2022
Возраст пациентов на момент реакции/осложнения с 3 по 85 лет

Реакция/осложнение	Брестская область	Витебская область	Гомельская область	Гродненская область	Минск	Минская область	Могилёвская область	Респ. Подчинения	Всего
Фебрильные негемолитические реакции	0	0	0	0	1	0	2	1	4
Аллергические реакции : уртикарные реакции (крапивница)	0	0	0	0	1	0	1	2	4
Аллергические реакции : отек Квинке	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Аллергические реакции : анафилактический шок	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Внутрисосудистый гемолиз: острый	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Внутрисосудистый гемолиз: отсроченный	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Трансфузионно обусловленное поражение легких (ТООПЛ)	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Циркуляторная перегрузка	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Недоброкачественность перелитой крови (бактериальное загрязнение, нарушение температурного режима) : бактериальный шок	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Цитратная интоксикация (гипокальциемия)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Калиевая интоксикация	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Перегрузка железом	0	0	0	0	0	0	0	0	0
РТПХ	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Эмболия: воздушная	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Эмболия: тромбами	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Эмболия: иная	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Перенос возбудителей инфекционных заболеваний: вирусы HA, HB, HC	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Перенос возбудителей инфекционных заболеваний: ВИЧ	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Перенос возбудителей инфекционных заболеваний: сифилиса	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Рис. 9. Отчет о случаях посттрансфузионных осложнений в ИАС по типам и областям

Fig. 9. Case report of post-transfusion complications in IAS by type and area

реципиента. По данным литературы, в 0,3 % пациентов от трансфузий компонентов крови и лекарственных средств на основе крови могут возникать трансфузионные реакции и посттрансфузионные осложнения, у 10 % пациентов диагностируются тяжелые формы осложнений, требующие высокозатратных методов лечения. Республиканский регистр посттрансфузионных осложнений, в свою очередь, позволяет в режиме реального времени анализировать нежелательные последствия трансфузионной терапии, обеспечивать своевременное реагирование по конкретному случаю и принимать превентивные меры. Кроме того, регистр позволяет провести анализ зарегистрированных случаев по заданным параметрам и/или за выбранный период времени, принять производственные решения (рис. 8). Возможность автоматизированного выбора заложенных «правильных» и необходимых для анализа позиций исключает ошибки при регистрации и не допускает упущения важных критериев. Следовательно, протокол лечения будет соответствовать действующим нормативным документам.

ИАС ПТО является структурным элементом разрабатываемой системы гемонадзора Республики Беларусь (рис. 9).

Заключение. Разработанные программные продукты (ИАС Регистра гемофилии, ИАС ПТО, ИАС HLA-типированные доноры, онлайн-заявка, СППР в трансфузиологии) наряду с программой АИС Донор формируют трансфузионно-гемостазиологический кластер в информационном пространстве Беларуси.

На сегодняшний день часть программных продуктов поддерживает стандарт обмена медицинскими данными FHIR. Остальные продукты функционируют автономно и могут быть использованы в общей платформе здравоохранения Республики Беларусь.

Накопление и обработка стандартизированными методами оперативной информации о донорских кадрах, посттрансфузионных осложнениях, закономерностях распространения и структуре заболеваемости гемофилией (гемостазиопатиями) в Республике Беларусь обеспечивают организационно-методическое сопровождение и существенно повышают эффективность принимаемых решений.

Использование данного вида технологий, который предполагает унифицированный фармакоэкономический подход к алгоритму помощи пациентам с гемостазиопатиями и трансфузионно-значимыми синдромами, а также учет тяжести заболеваний и наличия осложнений позволяют планировать необходимый запас компонентов и препаратов для заместительной терапии.

Применение моделирования схем лечения пациентов расширяет возможности медицинских информационных систем (МИС), реализуя персонифицированный подход в медицине.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Информатизация здравоохранения Республики Беларусь: текущее состояние, проблемы, перспективы / Д. Л. Пиневич [и др.] // Развитие информатизации и государственной системы научно-технической информации (РИНТИ–2011): докл. X Междунар. конф., Минск, 23 нояб. 2011 г. / Объед. ин-т проблем информатики НАН Беларуси; ред. А. В. Тузиков, Р. Б. Григянец, В. Н. Венгеров. – Минск, 2011. – С. 68–75.

2. Лапицкий, В. А. Электронное здравоохранение Беларуси: состояние и перспективы / В. А. Лапицкий, И. Э. Том // Информатика. – 2018. – Т. 15, № 4. – С. 7–15.

3. Бондарук, О. Н. Изучение распространенности трансфузионных реакций / О. Н. Бондарук, Э. В. Дашкевич, О. В. Красько // Актуальные вопросы медицины: тез. докл. IV Ежегод. науч.-практ. конф., Баку, 29–30 октября 2015 г. – Баку, 2015. – С. 55–56.

4. Международный стандарт HL7 FHIR как основа для создания информационных систем в здравоохранении Республики Беларусь / К. И. Костюк [и др.] // Информатика. – 2020. – Т. 17, № 4. – С. 83–91.

5. Использование информационных технологий для проведения расчетов потребности в факторах свертывания для пациентов с гемофилией А и В / Э. В. Дашкевич [и др.] // Вопр. организации и информатизации здравоохранения. – 2010. – № 4. – С. 64–68.

6. Информационно-аналитическая система «Республиканский эпидемиологический регистр пациентов с гематологическими заболеваниями / И. А. Искров [и др.] // Гематология. Трансфузиология. Вост. Европа. – 2023. – Т. 9, № 2. – С. 120–127.

7. Система поддержки принятия решения в трансфузиологии / Э. В. Дашкевич [и др.] // Информационные технологии в промышленности, логистике и социальной сфере (ITI*2021): тез. докл. XI Междунар. науч.-техн. конф., Минск, 26–27 мая 2021 г. / науч. ред.: М. Я. Ковалев [и др.]. – Минск, 2021. – С. 43–45.

8. О качестве крови и (или) ее компонентов и номенклатуре крови и (или) ее компонентов: постановление М-ва здравоохр. Респ. Беларусь, 19 мая 2023 г., № 89 [Электронный ресурс] // Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь. – 8/40127. – Режим доступа: https://pravo.by/document/?guid=12551&p0=W22340127. – Дата доступа: 30.04.2024.

9. Дашкевич, Э. В. Применение компонентов крови при трансфузионно значимых синдромах, как стандарт лечебной тактики / Э. В. Дашкевич, Н. Н. Климкович // Гематология. Трансфузиология. Вост. Европа. – 2022. – Т. 8, № 4. – С. 471–479.

10. Анализ распространенности гемофилии в Республике Беларусь / Э. В. Дашкевич [и др.] // Мед. новости. – 2014. – № 8. – С. 29–30.

11. Дашкевич, Э. В. Новые подходы к расчету и обеспечению потребности в крови и ее компонентах и повышению качества трансфузиологической помощи в Республике Беларусь / Э. В. Дашкевич, Т. В. Ваганова, О. Н. Бондарук // Гематология. Трансфузиология. Вост. Европа. – 2018. – Т. 4, № 4. – С. 514–519.

References

1. Pinevich D. L., Sachek M. M., Astashevich Zh. G., Polyakov S. M., Lapitskii V. A. Informatization of healthcare in the Republic of Belarus: current state, problems, prospects. *Razvitie informatizatsii i gosudarstvennoi sistemy nauchno-tekhnicheskoi informatsii (RINTI–2011): doklady X Mezhdunarodnoi konferentsii, Minsk, 23 noyabrya 2011 g.* [Development of Informatization and the State System of Scientific and Technical Information (RINTI–2011): reports of X International conference, Minsk, November 23, 2011]. Minsk, 2011, pp. 68–75 (in Russian).

2. Lapitskii V. A., Tom I. E. Electronic health care in Belarus: current state and prospects. *Informatika* [Informatics], 2018, vol. 15, no. 4, pp. 7–15 (in Russian).

3. Bondaruk O. N., Dashkevich E. V., Kras'ko O. V. The study of the prevalence of transfusion reactions. *Aktual'nye voprosy meditsiny: tezisy dokladov IV Ezhegodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, Baku,29–30 oktyabrya 2015 goda* [Current Issues in Medicine: abstracts of IV Annual scientific and practical conference, Baku, October 29–30, 2015]. Baku, 2015, pp. 55–56 (in Russian).

4. Kostyuk K. I., Branitskii A. V., Roubo V. V., Nesterovich I. M. International standard HL7 FHIR as a working framework for development of common healthcare information space of the Republic of Belarus. *Informatika* [Informatics], 2020, vol. 17, no. 4, pp. 83–91 (in Russian).

5. Dashkevich E. V., Potapnev M. P., Kras'ko O. V., Kukhta T. S., Novoselova N. A., Roubo V. V. Use of the information technology for carrying out of calculations of requirement of coagulation factors for patients with the hemophilia A and B.

Voprosy organizatsii i informatizatsii zdravookhraneniya [Issues of organization and informatization of healthcare], 2010, no. 4, pp. 64–68 (in Russian).

6. Iskrov I. A., Uss A. L., Talako T. M., Kras'ko O. V. Information and analytical system "Republican epidemiological register of patients with hematological diseases. *Gematologiya. Transfuziologiya. Vostochnaya Evropa* [Hematology. Transfusiology. Eastern Europe], 2023, vol. 9, no. 2, pp. 120–127 (in Russian).

7. Dashkevich E. V., Kras'ko O. V., Bondaruk O. N., Kostyuk K. I., Bukhval'd N. A., Peshnyak Zh. V. Decision support system in transfusiology. *Informatsionnye tekhnologii v promyshlennosti, logistike i sotsial'noi sfere (ITI*2021): tezisy dokladov XI Mezhdunarodnoi nauchno-tekhnicheskoi konferentsii, Minsk, 26–27 maya 2021 g.* [Information technologies in industry, logistics and social sphere (ITI*2021): abstracts of XI International scientific and technical conference, Minsk, May 26–27, 2021]. Minsk, 2021, pp. 43–45 (in Russian).

8. On the quality of blood and (or) its components and the nomenclature of blood and (or) its components: Resolution of the Ministry of Health of the Republic of Belarus, May 19, 2023, No. 89. *National legal Internet portal of the Republic of Belarus*. Available at: https://pravo.by/document/?guid=3961&p0=W22340127 (accessed 30.04.2024).

9. Dashkevich E. V., Klimkovich N. N. The use of blood components in transfusion-significant syndromes as a standard of treatment. *Gematologiya. Transfuziologiya. Vostochnaya Evropa* [Hematology. Transfusiology. Eastern Europe], 2022, vol. 8, no. 4, pp. 471–479 (in Russian).

10. Dashkevich E. V., Ol'khovik Yu. V., Rud' M. S., Volobueva V. V., Mikhailovskaya E. N. Analysis of the prevalence of hemophilia in the Republic of Belarus. *Meditsinskie novosti* [Medical news], 2014, no. 8, pp. 29–30 (in Russian).

11. Dashkevich E. V., Vaganova T. V., Bondaruk O. N. New approaches to calculating and ensuring the need for blood and its components and improving the quality of transfusiological care in the Republic of Belarus. *Gematologiya. Transfuziologiya. Vostochnaya Evropa* [Hematology. Transfusiology. Eastern Europe], 2018, vol. 4, no. 4, pp. 514–519 (in Russian).

Информация об авторах

Дашкевич Элеонора Владимировна – канд. мед. наук, доцент, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий (Долгиновский тракт, 160, 220053, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: eleonoravdoc@gmail.com

Климкович Наталья Николаевна – д-р мед. наук, доцент, 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: det.hematologiya@gmail.com

Красько Ольга Владимировна – канд. тех. наук, доцент, науч. сотрудник. Объединенный институт проблем информатики (ул. Сурганова, 6, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: olga.krasko.ok@gmail.com

Пасюков Вадим Владимирович – канд. биол. наук, ученый секретарь. Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий (Долгиновский тракт, 160, 220053, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: pasyukov@blood.by

Пешняк Жанна Витальевна – канд. мед. наук, вед. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий (Долгиновский тракт, 160, 220053, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: jannapeshnyak@tut.by

Расюк Елена Дмитриевна – канд. биол. наук, заместитель директора по науке. Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий (Долгиновский тракт, 160, 220053, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: erasiuk@mail.ru

Information about the authors

Eleonora V. Dashkevich – Ph. D. (Med.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnology (160, Dolginovski Trakt, 220053, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: eleonoravdoc@gmail.com

Natalya N. Klimkovich – D. Sc. (Med.), Associate Professor, Head of the Department. Institute for Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Educational Institution "Belarusian State Medical University" (3/3, P. Brovka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: det.hematologiya@gmail.com

Olga V. Krasko – Ph. D. (Tech.), Associate Professor, Researcher. United Institute of Informatics Problems of the National Academy of Sciences of Belarus (6, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: olga.krasko.ok@gmail.com

Vadim V. Pasyukov – Ph. D. (Biol.), Scientific Secretary. Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies (160, Dolginovski Trakt, 220053, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pasyukov@blood.by

Janna V. Peshnyak – Ph. D. (Med.), Leading Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies (160, Dolginovski Trakt, 220053, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: jannapeshnyak@tut.by

Elena D. Rasyuk – Ph. D. (Biol.), Deputy Director for Science. Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies (160, Dolginovski Trakt, 220053, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: erasiuk@mail.ru

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 575.174.015.3:616.127-005.8
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-138-148

Поступила в редакцию 28.03.2023
Received 28.03.2023

Т. П. Пронько, В. А. Снежицкий, Т. Л. Степуро, О. В. Горчакова

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Республика Беларусь

ОСОБЕННОСТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ *CYP2C19*, *P2RY12*, *ITGB3*, *ITGA2* И *eNOS3* СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ С ИНФАРКТОМ МИОКАРДА

Аннотация. Цель исследования – оценить распространение полиморфных вариантов G681A (*2) гена *CYP2C19*, H1/H2 гена *P2RY12*, T1565C гена *ITGB3*, C807T гена *ITGA2* и T786C гена *eNOS3* в популяции Гродненского региона и изучить их ассоциации с инфарктом миокарда (ИМ).

В исследование были включены 493 человека – 400 пациентов с ИМ (возраст от 31 года до 74 лет) и 93 человека контрольной группы (возраст от 32 до 60 лет). Данные обследований (общеклинических и генотипирования, выполненного методом ПЦР) проанализированы с помощью программы STATISTICA 10.0. Распространенность носительства генотипов, ассоциированных с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов и вариабельностью ответа на двойную антитромбоцитарную терапию, среди пациентов с ИМ по полиморфному локусу G681A гена *CYP2C19* (GA + AA) составила 25,2 %, по полиморфному локусу H1/H2 гена *P2RY12* (H1/H2 + H2/H2) – 40,0, по полиморфному локусу C807T гена *ITGA2* (CT + TT) – 65,8, по полиморфному локусу T1565C гена *ITGB3* (TC + CC) – 25,5, по полиморфному локусу T786C гена *eNOS* (TC + CC) – 69,2 %, а среди лиц контрольной группы – 18,3; 46,2; 60,2; 37,6; 48,4 % соответственно. У пациентов с ИМ при сравнении с контрольной группой реже встречался генотип TT гена *eNOS* (χ^2 = 13,6, p = 0,0002), но чаще выявлялись генотип CC гена *eNOS* (χ^2 = 5,4, p = 0,02) и аллель 786C гена *eNOS* (χ^2 = 15,1, p = 0,0001). Носительство аллеля 786C гена *eNOS* увеличивало риск развития ИМ в исследованной выборке (ОШ = 2,0; 95 % ДИ: 1,41–2,82; p = 0,0001). Не выявлено гендерных различий по распределению генотипов и аллелей между пациентами исследуемых групп, а также различий по носительству в зависимости от количества комбинаций минорных аллелей у лиц контрольной группы и у пациентов с ИМ. Наиболее часто встречающиеся комбинации минорных аллелей в обеих группах были сопоставимы.

Ключевые слова: полиморфизм генов *CYP2C19*, *P2RY12*, *ITGB3*, *ITGA2*, *eNOS3*, инфаркт миокарда

Для цитирования: Особенности распространения полиморфных вариантов генов *CYP2C19*, *P2RY12*, *ITGB3*, *ITGA2* И *eNOS3* среди пациентов с инфарктом миокарда / Т. П. Пронько [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2024. – Т. 21, № 2. – С. 138–148. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-138-148

Tatyana P. Pronko, Viktor A. Snezhitskiy, Tatsiana L. Stsiapura, Olga V. Gorchakova

Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

FREQUENCY OF *CYP2C19*, *P2RY12*, *ITGB3*, *ITGA2*, AND *eNOS3* GENE POLYMORPHISM IN PATIENTS WITH MYOCARDIAL INFARCTION

Abstract. The aim of the study was to assess the distribution of polymorphic variants G681A (*2) of the *CYP2C19* gene, H1/H2 of the *P2RY12* gene, T1565C of the *ITGB3* gene, C807T of the *ITGA2* gene, and T786C of the *eNOS3* gene in the population of the Grodno region, and to study their associations with myocardial infarction (MI). The study of the population consists of 493 people, including 400 patients with MI aged 31 to 74 years and 93 people of the control group aged 32 to 60 years. Research data (clinical and genotyping performed by polymerase chain reaction) were analyzed using STATISTICA 10.0 software. The prevalence of carriage of genotypes associated with high residual platelet reactivity and variability in response to dual antiplatelet therapy among patients with MI was 25.2 % for the G681A polymorphic locus of the *CYP2C19* gene (GA + AA), and for the H1/H2 polymorphic locus of the *P2RY12* gene (H1/H2 + H2/H2) – 40.0 %, for the C807T polymorphic locus of the *ITGA2* gene (CT + TT) – 65.8, for the T1565C polymorphic locus of the *ITGB3* gene (TC + CC) – 25.5, for the polymorphic locus T786C of the *eNOS* gene (TC + CC) – 69.2 %. Among the individuals of the control group, the frequency of occurrence of these genotypes was 18.3, 46.2, 60.2, 37.6, 48.4 %, respectively. In patients with MI, compared to the control group, the TT genotype of the *eNOS* gene was less common (χ^2 = 13.6, p = 0.0002), the CC genotype of the *eNOS* gene (χ^2 = 5.4, p = 0.02) and the allele 786C of the *eNOS* gene (χ^2 = 15.1, p = 0.0001) were more often detected. The carriage of the 786C allele of the *eNOS* gene increased the risk of MI in the studied population (OR = 2.0, 95 % CI: 1.41–2.82, p = 0.0001). Gender differences were not found in the distribution of genotypes and alleles within the studied groups. There were no differences in carriage by the number of combinations of minor alleles between the control group and patients with MI. The most common combinations of minor alleles in both groups were comparable.

Keywords: polymorphism of *CYP2C19*, *P2RY12*, *ITGB3*, *ITGA2*, *eNOS3* genes, myocardial infarction

For citation: Pronko T. P., Snezhitskiy V. A., Stsiapura T. L., Gorchakova O. V. Frequency of *CYP2C19*, *P2RY12*, *ITGB3*, *ITGA2*, and *eNOS3* gene polymorphism in patients with myocardial infarction. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2024, vol. 21, no. 2, pp. 138–148 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-138-148

Введение. Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), такие как ишемическая болезнь сердца (ИБС) и артериальная гипертензия, остаются одной из ведущих причин смертности и инвалидности населения как в мире, так и в Республике Беларусь. Роль избыточного функционирования тромбоцитов в патогенезе атеротромботических осложнений, в частности инфаркта миокарда (ИМ) и инсульта, во многом является определяющей [1], в связи с чем антитромбоцитарная терапия ССЗ осуществляется длительно, а обязательными условиями ее проведения являются эффективность и безопасность. Основными антитромбоцитарными лекарственными средствами являются ацетилсалициловая кислота (АСК) и клопидогрел. Однако существует определенная вариабельность ответа тромбоцитов на данную терапию в виде высокой остаточной реактивности тромбоцитов (ВОРТ), определяемой лабораторно при помощи агрегометрии [2]. Одной из причин ВОРТ может быть генетический полиморфизм генов рецепторов тромбоцитов – пуринергических (*P2RY12*) H1/H2, фибриногена (*ITGB3*) T1565C, коллагена (*ITGA2*) C807T, а также полиморфизм гена фермента-метаболизатора *CYP2C19* (G681A) и гена эндотелиальной NO-синтазы (*eNOS3*) (T786C) [3, 4].

CYP2C19 – один из основных изоферментов, участвующих в биотрансформации клопидогрела, являющегося пролекарством, поэтому функциональная недостаточность CYP2C19 сопровождается образованием чрезмерно низких концентраций активного метаболита клопидогрела и развитием ВОРТ при стандартном режиме дозирования [5, 6]. Аллель 681A (CYP2C19*2) гена *CYP2C19* является «медленным», а его носительство приводит к пониженной функции изофермента CYP2C19 [5, 6].

Тромбоцитарные рецепторы аденозиндифосфата (АДФ) P2Y1 и P2Y12, участвующие в активации и необратимой агрегации тромбоцитов, являются терапевтической мишенью клопидогрела [7]. В гене *P2RY12* выявлено 4 мутации, которые наследуются сцепленно и обусловливают формирование двух гаплотипов – H1 (C139, T744, G52 и отсутствие вставки) и H2 (139T, 744C, 52T, ins801A) [7]. Гаплотип H2 ассоциируется с гиперактивностью тромбоцитов и повышенным риском атеротромбоза, а также с развитием резистентности к клопидогрелу и повторных коронарных событий после чрескожного коронарного вмешательства (ЧКВ) при остром коронарном синдроме [7–9].

Ген тромбоцитарного рецептора фибриногена (*ITGB3*) кодирует бета-3 субъединицу интегрин-комплекса поверхностного рецептора тромбоцитов GPIIb/IIIa, известную также как гликопротеин-3a (GPIIIa). Данный рецептор участвует в быстрой агрегации тромбоцитов через взаимодействие последних с фибриногеном плазмы крови [10]. Мутация, приводящая к замене лейцина на пролин в 33-м положении белка GPIIIa (замена T на C в экзоне 2 гена *GPIIIa* в положении 1565), способствует повышенной склонности тромбоцитов к агрегации, что увеличивает риск развития ССЗ и может снижать эффективность АСК и клопидогрела [10, 11].

Ген *ITGA2* кодирует аминокислотную последовательность a2-субъединицы, входящей в состав интегрина α2β1 (гликопротеин GP Ia/IIa) трансмембранного рецептора коллагена. Аллель T полиморфного маркера C807T гена *ITGA2* ассоциирован с повышенной экспрессией GPIa-рецепторов тромбоцитов, повышенной адгезией тромбоцитов к коллагену и пониженной эффективностью АСК [4, 10, 12].

Дисфункция эндотелия, возникающая в результате снижения синтеза оксида азота (NO), играет значимую роль не только в процессах регуляции сосудистого тонуса, но и в процессах тромбообразования. NO участвует в ингибировании адгезии тромбоцитов и лейкоцитов к эндотелию, замедлении образования артериальных тромбов. В результате снижения синтеза NO эндотелий может менять свой антитромботический потенциал на тромбогенный [13]. Показано, что уровень экспрессии гена эндотелиальной NO-синтазы (*eNOS3*) определяется наличием мутации T786C в его промоторной области [14]. Наличие данной мутации может быть фактором риска развития ИБС, ИМ и потенциально ВОРТ [15].

Очевидно, что влияние полиморфных вариантов данных генов на активность тромбоцитов и развитие ВОРТ к АСК и клопидогрелу, их связь с ИБС и ИМ могут иметь определенную вариабельность в зависимости от конкретного региона и популяции. Распространенность полиморфных вариантов G681A гена *CYP2C19*, H1/H2 гена *P2RY12*, T1565C гена *ITGB3*, C807T гена *ITGA2* и T786C гена *eNOS3* в белорусской популяции изучена недостаточно.

Цель исследования – оценить распространение полиморфных вариантов G681A (*2) гена *CYP2C19*, H1/H2 гена *P2RY12*, T1565C гена *ITGB3*, C807T гена *ITGA2* и T786C гена *eNOS3* и изучить их ассоциации с инфарктом миокарда.

Материалы и методы исследования. В исследование были включены 493 человека – 400 пациентов с ИМ (возраст от 31 года до 74 лет) и 93 человека контрольной группы (возраст от 32 до 60 лет). Пациенты проходили обследование и лечение на базе Гродненского областного клинического кардиологического центра, реабилитацию – на базе Гродненской областной клинической больницы медицинской реабилитации. Из 322 пациентов с Q-ИМ и 78 человек с не-Q-ИМ тромболитическая терапия (ТЛТ) была назначена 29 (7,2 %); ТЛТ, а в дальнейшем процедура отсроченного ЧКВ – 98 (24,5 %); первичное ЧКВ было выполнено 239 (59,8 %) пациентам; консервативное лечение получили 34 (8,5 %) человека. Все обследуемые подписывали информированное согласие на участие в исследовании (протокол № 3 от 13.01.2016, одобрен комитетом по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета).

Критерии включения в контрольную группу: лица обоего пола; отсутствие ССЗ, острых и хронических заболеваний другой этиологии; информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии включения в исследование: наличие ИМ не более 2-дневной давности, лица обоего пола, информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии невключения в исследование: ИМ более 2-дневной давности, наличие фибрилляции/трепетания предсердий, хроническая сердечная недостаточность выше НПА, наличие сопутствующих острых воспалительных и онкологических заболеваний, активное внутреннее кровотечение, анемии различного генеза, количество тромбоцитов менее $150 \cdot 10^9$/л, выраженная почечная и печеночная недостаточность, отказ от участия в исследовании.

Все пациенты получали стандартную терапию, включающую АСК 75 мг/сут, клопидогрел (нагрузочная доза 300 мг, поддерживающая – 75 мг/сут), низкомолекулярные гепарины (эноксапарин), аторвастатин (нагрузочная доза 80 мг, последующее снижение до поддерживающей дозы 20–40 мг), бета-блокаторы (бисопролол 5–10 мг, метопролол 50–100 мг), и-АПФ (лизиноприл 5–20 мг, рамиприл 5–10 мг), нитраты.

Все исследования проводили при поступлении в стационар. Лиц контрольной группы обследовали однократно амбулаторно.

Исследования выполняли по стандартной методике: сбор анамнестических данных, физикальное обследование, электрокардиография, эхокардиография, биохимический анализ крови.

Экстракцию геномной ДНК из лейкоцитов цельной крови проводили с помощью набора реагентов «ДНК-ЭКСТРАН-1» (НПК «Синтол», Россия). Для молекулярно-биологического исследования генотипов полиморфных локусов гена тромбоцитарного рецептора фибриногена *ITGB3* (Leu33Pro), rs5918 и гена фермента-метаболизатора цитохрома *CYP2C19* (G681A), rs4244285, гена тромбоцитарного рецептора коллагена *ITGA2* (C807T), rs1126643 применяли метод ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени и реагенты (НПК «Синтол», Россия), используя амплификатор Rotor Geene (Qiagen, Германия). Аллельные варианты генотипа АДФ рецептора тромбоцитов *P2RY12*, H1/H2 (T744C), rs2046934 определяли методом ПЦР с электрофоретической детекцией, используя камеру трансилюминатора GelDocTM XR+ (BioRad, США) и комплект реагентов НПФ «Литех» (Россия). ПЦР выполняли на амплификаторе (термоциклере) Applied Biosystems 2720 (Thermal Cycler, США). Полиморфные локусы T786C гена *eNOS* (rs2070744) выявляли с помощью набора реагентов «SNP-экспресс-РВ» (НПФ «Литех», Россия).

Статистический анализ данных выполняли при помощи программы STATISTICA 10.0. Полученные результаты представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей (Me [LQ; UQ]). Две независимые группы сравнивали по численному показателю с помощью *U*-критерия

Манна–Уитни. При сравнении долей (процентов) бинарных переменных между двумя и более независимыми группами использовали точный критерий Фишера (ТКФ) либо критерий χ^2 с поправкой Йетса. Соответствие распределения генотипов закону Харди–Вайнберга оценивали при помощи критерия χ^2. Риск развития ИМ при наличии минорного аллеля изучаемых полиморфизмов оценивали по отношению шансов, используя таблицы сопряженности. Пороговый уровень статистической значимости был принят равным 0,05.

Результаты исследования. В табл. 1 представлена клиническая характеристика обследуемых пациентов.

Таблица 1. **Клиническая характеристика обследуемых лиц**

Table 1. **Clinical characteristics of the examined persons**

Показатель	Группа ИМ (n = 400)	Группа контроля (n = 93)
Возраст, лет	58,0 [52,0; 65,0]	48,0 [41,0; 53,0]*****
Мужчины/женщины, *n*	317 (79,3 %)/83 (20,7 %)	47 (50,5 %)/46 (49,5 %)*****
Локализация ИМ (передний/нижний и заднебазальный), *n*	193 (48,3 %)/207 (51,7 %)	–
Продолжительность ИБС, лет	0,0 [0,0; 2,5]	–
Инфаркт миокарда в анамнезе, *n*	60 (15,0 %)	–
Число лиц с АГ, *n*/продолжительность АГ, лет	387 (96,8 %)/5,0 [1,0; 13,5]	–
Число лиц с сахарным диабетом, *n*	52 (13,0 %)	–
Число курящих, *n*	263 (65,8 %)	18 (19,4 %)*****
Продолжительность курения, лет	30,0 [20,0; 40,0]	15,5 [10,0; 25,0]
Количество сигарет в сутки, шт.	20,0 [15,0; 30,0]	15,0 [4,0; 20,0]
Индекс массы тела, кг/м^2	27,8 [25,3; 31,1]	26,5 [23,3; 28,6]****
Окружность талии, см	99,0 [92,0; 106,0]	91,0 [78,0; 98,0]*****
Число лиц с ожирением, *n*	130 (32,5 %)	13 (13,9 %)***
Тропонин, нг/л	4,1 [1,0; 10,4]	–
Глюкоза, ммоль/л	5,5 [5,0; 6,0]	5,1 [4,6; 5,3]*****
Общий холестерин, ммоль/л	6,1 [5,2; 7,5]	5,6 [4,8; 6,1]****
Креатинин, мкмоль/л	87,0 [78,0; 98,0]	75,0 [67,5; 86,5]***
СКФ по формуле CKD – EPI, мл/мин/1,73 м^2	81,0 [70,0; 92,0]	90 [88,0; 94,0]*****

Примечание. Достоверные различия между группами: *** – $p < 0{,}001$; **** – $p < 0{,}0001$; ***** – $p < 0{,}00001$. АГ – артериальная гипертензия, ИБС – ишемическая болезнь сердца.

Как видно из табл. 1, включенные в группу контроля лица были моложе ($p < 0{,}00001$), в группе было больше женщин ($\chi^2 = 30{,}9$; $p < 0{,}00001$), они меньше курили ($\chi^2 = 61{,}2$; $p < 0{,}00001$), у них были меньше индекс массы тела ($p = 0{,}000021$) и окружность талии ($p < 0{,}00001$); реже встречались лица с ожирением ($\chi^2 = 11{,}8$; $p = 0{,}0006$), у них было ниже содержание глюкозы в крови ($p < 0{,}00001$), общего холестерина ($p = 0{,}00006$) и креатинина ($p = 0{,}00042$), выше скорость клубочковой фильтрации ($p = 0{,}000001$). Обращает на себя внимание непродолжительный анамнез ИБС у обследуемых лиц. Так, у 221 (55,3 %) пациентов ИБС дебютировала в виде острого ИМ, у 39 (9,7 %) человек продолжительность ИБС составляла до 6 мес., у 79 (19,7 %) – от 1 года до 5 лет и только у 61 (15,3 %) пациента был более длительный (от 6 до 30 лет) анамнез ИБС.

Распределение частот генотипов генов *CYP2C19*, *P2RY12*, *ITGA2*, *ITGB3*, *eNOS3* соответствовало ожидаемому равновесию Харди–Вайнберга как в группе контроля ($\chi^2 = 1{,}36$, $p = 0{,}24$; $\chi^2 = 0{,}02$, $p = 0{,}88$; $\chi^2 = 0{,}6$, $p = 0{,}43$; $\chi^2 = 0{,}003$, $p = 0{,}96$; $\chi^2 = 0{,}34$, $p = 0{,}56$ соответственно), так и в группе пациентов с ИМ ($\chi^2 = 0{,}25$, $p = 0{,}61$; $\chi^2 = 0{,}34$, $p = 0{,}55$; $\chi^2 = 0{,}07$, $p = 0{,}79$; $\chi^2 = 0{,}8$, $p = 0{,}37$; $\chi^2 = 0{,}16$, $p = 0{,}69$ соответственно).

Как видно из табл. 2, в группе контроля по сравнению с пациентами с ИМ чаще встречался аллель 1565C полиморфного локуса T1565C гена *ITGB3* ($\chi^2 = 5{,}1$, $p = 0{,}024$).

Таблица 2. **Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных локусов исследуемых генов у обследуемых лиц**

Table 2. **Distribution of frequencies of alleles and genotypes of polymorphic loci of the studied genes in the examined persons**

Показатель		Группа ИМ			Группа контроля			χ^2, p при сравнении общих групп
		Общая группа (n = 400)	Мужчины (n = 317)	Женщины (n = 83)	Общая группа (n = 93)	Мужчины (n = 47)	Женщины (n = 46)	
Полиморфный локус G681A (*2) гена *CYP2C19*, rs4244285								
Генотип	GG	299 (74,8 %)	239 (75,4 %)	60 (72,3 %)	76 (81,7 %)	41 (87,2 %)	35 (76,1 %)	$\chi^2 = 2,6$, $p = 0,27$
	GA	95 (23,7 %)	72 (22,7 %)	23 (27,7 %)	15 (16,1 %)	4 (8,5 %)	11 (23,9 %)	
	AA	6 (1,5 %)	6 (1,9 %)	–	2 (2,2 %)	2 (2,3 %)	–	
Аллель	G	86,6 %	86,8 %	86,1 %	89,8 %	91,5 %	88,0 %	$\chi^2 = 1,1$, $p = 0,29$
	A	13,4 %	13,2 %	13,9 %	10,2 %	8,5 %	12,0 %	
Полиморфный локус H1/H2 гена *P2RY12*, rs2046934								
Генотип	H1/H1	240 (60,0 %)	192 (60,6 %)	48 (57,8 %)	50 (53,8 %)	22 (46,8 %)	28 (60,9 %)	$\chi^2 = 1,3$, $p = 0,52$
	H1/H2	137 (34,2 %)	107 (33,7 %)	30 (36,2 %)	36 (38,7 %)	23 (48,9 %)	13 (28,2 %)	
	H2/H2	23 (5,8 %)	18 (5,7 %)	5 (6,0 %)	7 (7,5 %)	2 (4,2 %)	5 (10,9 %)	
Аллель	H1	77,1 %	77,4 %	75,9 %	73,1 %	71,3 %	75,0 %	$\chi^2 = 1,1$, $p = 0,28$
	H2	22,9 %	22,6 %	24,1 %	26,9 %	28,7 %	25,0 %	
Полиморфный локус C807T гена *ITGA2*, rs1126643								
Генотип	CC	137 (34,2 %)	108 (34,1 %)	29 (34,9 %)	37 (39,8 %)	20 (42,6 %)	17 (36,9 %)	$\chi^2 = 2,9$, $p = 0,23$
	CT	192 (48,0 %)	148 (46,7 %)	44 (53,0 %)	46 (49,5 %)	22 (46,8 %)	24 (52,2 %)	
	TT	71 (17,8 %)	61 (19,2 %)	10 (12,1 %)	10 (10,7 %)	5 (10,6 %)	5 (10,9 %)	
Аллель	C	58,2 %	57,4 %	61,4 %	64,5 %	66,0 %	63,0 %	$\chi^2 = 2,2$, $p = 0,14$
	T	41,8 %	42,6 %	38,6 %	35,5 %	34,0 %	37,0 %	
Полиморфный локус T1565C гена *ITGB3*, rs5918								
Генотип	TT	298 (74,5 %)	237 (74,8 %)	61 (73,5 %)	58 (62,4 %)	31 (65,9 %)	27 (58,7 %)	$\chi^2 = 5,6$, $p = 0,06$
	TC	92 (23,0 %)	73 (23,0 %)	19 (22,9 %)	31 (33,3 %)	13 (27,7 %)	18 (39,1 %)	
	CC	10 (2,5 %)	7 (2,2 %)	3 (3,6 %)	4 (4,3 %)	3 (6,4 %)	1 (2,2 %)	
Аллель	T	86,0 %	86,3 %	84,9 %	79,0 %	79,8 %	78,3 %	$\chi^2 = 5,1$, $p = 0,024$
	C	14,0 %	13,7 %	15,1 %	21,0 %	20,2 %	21,7 %	
Полиморфный локус T786C гена *eNOS3*, rs2070744								
Генотип	TT	123 (30,8 %)***	100 (31,6 %)	23 (27,7 %)***	48 (51,6 %)	20 (42,6 %)	28 (60,9 %)	$\chi^2 = 15,9$, $p = 0,0004$
	TC	194 (48,5 %)	151 (47,6 %)	43 (51,8 %)*	36 (38,7 %)	23 (48,9 %)	13 (28,2 %)	
	CC	83 (20,7 %)*	66 (20,8 %)*	17 (20,5 %)	9 (9,7 %)	4 (8,5 %)	5 (10,9 %)	
Аллель	T	55,0 %	55,4 %	53,6 %	71,0 %	67,0 %	75,0 %	$\chi^2 = 15,1$, $p = 0,0001$
	C	45,0 %	44,6 %*	46,4 %**	29,0 %	33,0 %	25,0 %	

Примечание. Достоверные различия между лицами группы контроля и пациентами с ИМ: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Кроме того, группа пациентов с ИМ и группа контроля различались по распределению полиморфного локуса T786C гена *eNOS* (χ^2 = 15,9, p = 0,0004). У пациентов с ИМ по сравнению с группой контроля реже встречался генотип TT гена *eNOS* (χ^2 = 13,6, p = 0,0002), но чаще выявлялись генотип CC гена *eNOS* (χ^2 = 5,4, p = 0,02) и аллель 786C гена *eNOS* (χ^2 = 15,1, p = 0,0001). У женщин с ИМ по сравнению женщинами контрольной группы реже встречался генотип TT гена *eNOS* (χ^2 = 12,3, p = 0,0005), но чаще выявлялись генотип TC (χ^2 = 5,8, p = 0,017) и аллель 786C (χ^2 = 10,5, p = 0,002). У мужчин с ИМ по сравнению мужчинами контрольной группы чаще встречались генотип CC гена *eNOS* (ТКФ = 0,04) и аллель 786C гена *eNOS* (χ^2 = 4,1, p = 0,044).

Носительство аллеля 786C гена *eNOS* увеличивало риск развития ИМ в исследованной выборке (ОШ = 2,0; 95 % ДИ: 1,41–2,82; $p = 0,0001$).

Гендерных различий по распределению генотипов и аллелей в группах не выявлено.

Таким образом, распространенность носительства генотипов, ассоциированных с ВОРТ и вариабельностью ответа на двойную антитромбоцитарную терапию, среди пациентов с ИМ составила: по полиморфному локусу G681A гена *CYP2C19* (GA + AA) – 25,2 %, по полиморфному локусу H1/H2 гена *P2RY12* (H1/H2 + H2/H2) – 40,0, по полиморфному локусу C807T гена *ITGA2* (CT + TT) – 65,8, по полиморфному локусу T1565C гена *ITGB3* (TC + CC) – 25,5, по полиморфному локусу T786C гена *eNOS* (TC + CC) – 69,2 %, а среди лиц контрольной группы – 18,3; 46,2; 60,2; 37,6; 48,4 % соответственно. При этом только для полиморфного локуса T786C гена *eNOS* частота встречаемости генотипов, ассоциированных с ВОРТ и вариабельностью ответа на двойную антитромбоцитарную терапию, была выше среди пациентов с ИМ по сравнению с практически здоровыми лицами ($\chi^2 = 13,6$, $p = 0,0002$).

В результате анализа ассоциации полиморфизмов нами обнаружено мультигенное носительство минорных аллелей двух, трех и более изученных полиморфизмов в гомо- и гетерозиготном состоянии. В табл. 3 представлены данные по частоте встречаемости гаплотипов с минорными аллелями исследованных полиморфных вариантов генов.

Таблица 3. **Частота встречаемости гаплотипов минорных аллелей в исследуемых группах**

Table 3. **Occurrence frequency of haplotypes with minor alleles in the studied groups**

Кол-во минорных аллелей в гаплотипе	Группа контроля ($n = 93$)	Группа ИМ ($n = 400$)
0	4 (4,3 %)	18 (4,5 %)
1	20 (21,5 %)	76 (19,0 %)
2	40 (43,0 %)	147 (36,8 %)
3	21 (22,6 %)	109 (27,2 %)
4	7 (7,5 %)	44 (11,0 %)
5	1 (1,1 %)	6 (1,5 %)

Как видно из табл. 3, у лиц контрольной группы и у пациентов с ИМ показатели частоты встречаемости гаплотипов с минорными аллелями были сопоставимы.

Наиболее часто встречающимися гаплотипами с минорными аллелями у пациентов с ИМ были следующие: *ITGA2* + *ITGB3* + *P2RY12* + *eNOS* – 21 (47,7 %), *ITGA2* + *eNOS* – 60 (40,8 %), *ITGA2* + *P2RY12* + *eNOS* – 39 (35,8 %), *CYP2C19* + *ITGA2* + *P2RY12* + *eNOS* – 11 (25,0 %), *CYP2C19* + *ITGA2* + *eNOS* – 16 (14,7 %). В свою очередь, у лиц контрольной группы чаще выявлялись гаплотипы *ITGA2* + *ITGB3* + *P2RY12* + *eNOS* – 4 (57,1 %), *ITGA2* + *P2RY12* + *eNOS* – 6 (28,6 %), *ITGA2* + *P2RY12* – 10 (25,0 %).

В обеих группах наиболее часто встречающиеся гаплотипы с минорными аллелями изучаемых генов были сопоставимы.

Обсуждение. В настоящем исследовании впервые определена частота носительства полиморфных аллелей генов *CYP2C19*, *P2RY12*, *ITGB3*, *ITGA2* и *eNOS3* в крупной когорте обследуемых ($n = 493$), проживающих в Республике Беларусь.

Частота встречаемости полиморфных вариантов гена *CYP2C19* значительно варьируется в разных этнических группах [16]. Распространенность аллеля 681A в Европе колеблется от 8 до 21 % [16, 17], в России – от 8 до 15 % [6, 18]. Полученный нами результат (в среднем 11,8 %) сопоставим с данными российских и словенских коллег [17, 18]. Нами не выявлено различий в распределении генотипов гена *CYP2C19* среди лиц контрольной группы и пациентов с ИМ, что согласуется с данными литературы [19, 20].

Согласно литературным данным, частота встречаемости гаплотипа H2 гена *P2RY12* в европейской популяции варьируется в пределах 8,6–24,3 % [9, 21], в российской популяции – 12,7–17,5 % [20, 22, 23]. В нашем исследовании носительство гаплотипа H2 составило в среднем

24,9 %, что оказалось выше значений, полученных российскими коллегами. Дискуссионным остается и вопрос об ассоциации полиморфизма H1/H2 гена *P2RY12* с ИБС. Так, часть работ демонстрирует преобладание гаплотипа H2 у пациентов с ИБС по сравнению со здоровыми лицами – 22,7 % против 19,1 % [24], 35,4 % против 25,8 % [25] и 41,3 % против 27,0 % [26] соответственно, но в ряде работ такая связь не установлена [20, 21]. Нами также не выявлено различий в частоте встречаемости гаплотипа H2 у пациентов с ИМ и у лиц контрольной группы (22,9 % против 26,9 % соответственно).

Изучение европейской популяции показало, что частота встречаемости минорного аллеля 1565C гена *ITGB3* варьируется в пределах 14–16 % [11, 21], а в российской популяции – в пределах 18–22 % [20, 22, 23]. В нашем исследовании частота встречаемости аллеля 1565C гена *ITGB3* в среднем составила 17,5 %, что сопоставимо с европейской и российской популяциями. В ряде исследований демонстрируется преобладание аллеля 1565C гена *ITGB3* у пациентов с ИБС по сравнению со здоровыми лицами [26], а также его связь с риском развития ИМ, особенно у лиц моложе 45 лет [27, 28], в других же работах такая связь не обнаружена [21, 29]. В нашей работе аллель 1565C чаще встречался в группе контроля, что может быть связано с возрастными различиями (в группе контроля пациенты были моложе и патологический аллель не успел себя реализовать). Более того, в работе E. L. Grove с соавт. показано, что связь между носительством аллеля 1565C и ИМ уменьшалась по мере повышения уровня холестерина [27]. По результатам крупного мета-анализа авторы делают вывод о том, что носительство аллеля 1565C является значимым фактором риска развития острых коронарных событий у молодых, а с возрастом эффект аллеля 1565C может быть ослаблен и, следовательно, скрыт за эффектами сопутствующих традиционных факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний [28].

Согласно литературным данным, частота встречаемости мутантного аллеля 807T гена *ITGA2* как в европейской, так и в российской популяции колеблется от 22 до 47 % [21, 22, 30, 31]. Полученные нами данные о частоте встречаемости аллеля 807T имели схожее значение (для обеих групп показатель составил в среднем 38,0 %). В отношении взаимосвязи полиморфизма C807T гена *ITGA2* с ИБС данные литературы противоречивы. В одних работах показана более высокая частота встречаемости аллеля 807T у пациентов с ИБС по сравнению со здоровыми лицами [32], в других исследованиях частота встречаемости аллеля 807T у пациентов с ИБС не отличалась от таковой у здоровых лиц [21, 33]. В нашей работе также не выявлены различия в частоте встречаемости аллеля 807T у пациентов с ИМ и у лиц контрольной группы.

Распределение генотипов полиморфного варианта T786C гена *eNOS3* в зависимости от исследуемой популяции и этнической группы характеризуется большой вариабельностью [15]. Частота носительства аллеля 786C в европейской популяции составляет 19–47 % [15], в российской популяции – 34,9–40,0 [34], в украинской – 27,3–40,7 % [35]. В нашем исследовании аллель 786C в среднем выявлялся с частотой 37,0 %, что сопоставимо с данными о ближайших соседних популяциях. Согласно результатам мета-анализов и систематических обзоров, большинство исследований демонстрируют связь полиморфизма T786C гена *eNOS* с ИБС и ИМ, что особенно характерно для европейской популяции [15, 36]. В нашей работе выявлена аналогичная ассоциация: у пациентов с ИМ по сравнению с лицами контрольной группы реже встречался генотип TT гена *eNOS*, но чаще выявлялись генотип CC и аллель 786C. Более того, в нашем исследовании обнаружены различия в носительстве генотипов TT и TC гена *eNOS* у женщин с ИМ по сравнению с женщинами контрольной группы. Согласно данным литературы, наличие аллеля 786C полиморфизма T786C гена *eNOS3* приводит к снижению продукции NO [37]. Однако доказано, что у женщин имеется механизм усиления синтеза NO эстрогенами путем активации фермента *eNOS*. Известно, что прямое фосфорилирование эстрогеновых рецепторов обеспечивает передачу сигнала через протеинкиназные каскады, приводящие к активации фермента *eNOS* [38]. В ряде работ не выявлено различий в уровне нитратов и нитритов у молодых девушек с разными генотипами T786C гена *eNOS3* [39]. У женщин, находящихся в постменопаузе, уменьшается число эстрогеновых рецепторов в стенках сосудов и снижается их активность, что ослабляет вазодилатационную функцию эндотелия [40] и способствует фенотипическому проявлению генетически предопределенных нарушений. В нашей работе женщины с ИМ находились в состоянии

менопаузы, когда уровень эстрогенов значительно снижен, поэтому нет дополнительной активации синтеза NO, что могло привести к развитию сердечно-сосудистых осложнений.

Заключение. Распространенность носительства генотипов, ассоциированных с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов и вариабельностью ответа на двойную антитромбоцитарную терапию, среди пациентов с ИМ по полиморфному локусу G681A гена *CYP2C19* (GA + AA) составила 25,2 %, по полиморфному локусу H1/H2 гена *P2RY12* (H1/H2+H2/H2) – 40,0, по полиморфному локусу C807T гена *ITGA2* (CT + TT) – 65,8, по полиморфному локусу T1565C гена *ITGB3* (TC + CC) – 25,5, по полиморфному локусу T786C гена *eNOS* (TC + CC) – 69,2 %, а среди лиц контрольной группы – 18,3; 46,2; 60,2; 37,6; 48,4 % соответственно. У пациентов с ИМ при сравнении с лицами контрольной группой реже встречался генотип TT гена *eNOS* (χ^2 = 13,6, p = 0,0002), но чаще выявлялись генотип CC гена *eNOS* (χ^2 = 5,4, p = 0,02) и аллель 786C гена *eNOS* (χ^2 = 15,1, p = 0,0001). Носительство аллеля 786C гена *eNOS* увеличивало риск развития ИМ в исследованной выборке (ОШ = 2,0; 95 % ДИ: 1,41–2,82; p = 0,0001). Гендерных различий по распределению генотипов и аллелей между пациентами исследуемых групп не обнаружено. Не выявлено различий носительства по количеству комбинаций минорных аллелей у лиц контрольной группы и у пациентов с ИМ, а наиболее часто встречающиеся комбинации минорных аллелей в обеих группах были сопоставимы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Molecular pathways used by platelets to initiate and accelerate atherogenesis / S. Lindemann [et al.] // Curr. Opin. Lipidol. – 2007. – Vol. 18, N 5. – P. 566–573. https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3282ef7c1e

2. Fontana, P. Platelet function test use for patients with coronary artery disease in the early 2020s / P. Fontana, M. Roffi, J. L. Reny // J. Clin. Med. – 2020. – Vol. 9, N 1. – Art. 194. https://doi.org/10.3390/jcm9010194

3. Кропачева, Е. С. Фармакогенетика антитромботических препаратов: современное состояние проблемы / Е. С. Кропачева // Атеротромбоз. – 2018. – № 2. – С. 115–129.

4. Impact of genetic polymorphisms on platelet function and response to anti platelet drugs / T. Strisciuglio [et al.] // Cardiovasc. Diagn. Ther. – 2018. – Vol. 8, N 5. – P. 610–620. https://doi.org/10.21037/cdt.2018.05.06

5. Cytochrome allelic variants and clopidogrel metabolism in cardiovascular diseases therapy / M. Jarrar [et al.] // Mol. Biol. Rep. – 2016. – Vol. 43, N 6. – P. 473–484. https://doi.org/10.1007/s11033-016-3983-1

6. Мультиэтнический анализ кардиологических фармакогенетических маркеров генов цитохрома P450 и мембранных транспортеров в российской популяции / К. Б. Мирзаев [и др.] // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2019. – Т. 15, № 3. – С. 393–406.

7. Purinergic receptor P2Y, G protein coupled, 12 gene variants and risk of incident ischemic stroke, myocardial infarction, and venous thromboembolism / R. Y. Zee [et al] // Atherosclerosis. – 2008. – Vol. 197, N 2. – P. 694–699. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.07.001

8. P2Y12 receptor gene polymorphism and the risk of resistance to clopidogrel: A meta-analysis and review of the literature / G. Cui [et al.] // Adv. Clin. Exp. Med. – 2017. – Vol. 26, N 2. – P. 343–349. https://doi.org/10.17219/acem/63745

9. Influence of genetic and epigenetic factors of P2Y12 receptor on the safety and efficacy of antiplatelet drugs / D. Danielak [et al.] // Cardiovasc. Drugs Ther. – 2022. https://doi.org/10.1007/s10557-022-07370-8

10. Identification of ITGA2B and ITGB3 single-nucleotide polymorphisms and their influences on the platelet function / Q. Xiang [et al.] // Biomed. Res. Int. – 2016. – Vol. 2016. – Art. ID 5675084. https://doi.org/10.1155/2016/5675084

11. Evaluation of platelet reactivity during combined antiplatelet therapy in patients with stable coronary artery disease in relation to diabetes type 2 and the GPIIB/IIIA receptor gene polymorphism / M. Jastrzebska [et al.] // J. Physiol. Pharmacol. – 2019. – Vol. 70, N 2. – P. 175–185. https://doi.org/10.26402/jpp.2019.2.01

12. The association of four common polymorphisms from four candidate genes (COX-1, COX-2, ITGA2B, ITGA2) with aspirin insensitivity: A meta-analysis / Z. Weng [et al.] // PLOS ONE. – 2013. – Vol. 8, N 11. – P. e78093. – https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078093

13. Власов, Т. Д. Эндотелиальная дисфункция: от частного к общему. Возврат к «старой парадигме»? / Т. Д. Власов, И. И. Нестерович, Д. А. Шиманьски // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2019. – Т. 18, № 2. – С. 19–27.

14. Allelic polymorphism of endothelial NO-synthase gene and its functional manifestations / V. E. Dosenko [et al.] // Acta Biochimica Polonica. – 2006. – Vol. 53. – P. 299–302.

15. Association between the –786T>C 1polymorphism in the promoter region of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and risk of coronary artery disease: a systematic review and meta-analysis / D. Liu [et al.] // Gene. – 2014. – Vol. 545, N 1. – P. 175–183. https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.09.099

16. Shah, R. R. Precision medicine: does ethnicity information complement genotype-based prescribing decisions? / R. R. Shah, A. Gaedigk // Ther. Adv. Drug Saf. – 2018. – Vol. 9, N 1. – P. 45–62. https://doi.org/10.1177/2042098617743393

17. Petrović, J. Frequencies of clinically important CYP2C19 and CYP2D6 alleles are graded across Europe / J. Petrović, V. Pešić, V. M. Lauschke // Eur. J. Hum. Genet. – 2020. – Vol. 28, N 1. – P. 88–94. https://doi.org/10.1038/s41431-019-0480-8

18. Фармакогенетические основы индивидуальной чувствительности и персонализированного назначения антиагрегантной терапии в различных этнических группах / Б. И. Кантемирова [и др.] // Фармация и фармакология. – 2020. – Т. 8, № 6. – С. 392–404.

19. Polymorphisms of CYP2C8, CYP2C9 and CYP2C19 and risk of coronary heart disease in Russian population / A. Polonikov [et al.] // Gene. – 2017. – Vol. 627. – P. 451–459. https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.07.004

20. Возможные генетические предикторы развития сердечно-сосудистых осложнений после коронарного шунтирования / Ю. И. Гринштейн [и др.] // Кардиология. – 2018. – Т. 58, № 7. – С. 77–84. https://doi.org/10.18087/cardio.2018.7.10148

21. The frequencies of ten platelet polymorphisms associated with atherosclerotic cardiovascular disease in patients with venous thromboembolism: A population-based case-control study / T. Kvasnicka [et al.] // Heredit. Genet. – 2015. – Vol. 4, N 3. – Art. 153. https://doi.org/10.4172/2161-1041.1000153

22. Страмбовская, Н. Н. Агрегационная активность тромбоцитов у носителей генетического полиморфизма GPIA (C807T), GPIIIA (T1565C), GPIβα (C434T), P2RY12 (H1/H2), SELP (G1087A) тромбоцитарных рецепторов / Н. Н. Страмбовская // Бюл. Вост.-Сиб. науч. центра Сиб. отд-ния Рос. акад. мед. наук. – 2013. – № 6. – С. 65–70.

23. Ассоциация полиморфизмов генов ITGB3, P2RY12, CYP2C19 с функциональной активностью тромбоцитов у пациентов с ишемической болезнью сердца на фоне двухкомпонентной антиагрегантной терапии / Э. Ф. Муслимова [и др.] // Тер. архив. – 2017. – Т. 89, № 5. – С. 74–78.

24. Does i-T744C P2Y12 polymorphism modulate clopidogrel response among moroccan acute coronary syndromes patients? / H. Hassani Idrissi // Genet. Res. Int. – 2017. – Vol. 2017. – Art. ID 9532471. https://doi.org/10.1155/2017/9532471

25. Yang, H.-H. Associations of P2Y12R gene polymorphisms with susceptibility to coronary heart disease and clinical efficacy of antiplatelet treatment with clopidogrel / H.-H. Yang, Y. Chen, C.-Y. Gao // Cardiovasc. Ther. – 2016. – Vol. 34, N 6. – P. 460–467. https://doi.org/10.1111/1755-5922.12223

26. Распространенность полиморфизмов некоторых генов, связанных с функцией плазменно-тромбоцитарного звена гемостаза, при аспиринорезистентности в казахской популяции / Л. К. Каражанова [и др.] // Наука и здравоохранение. – 2018. – Т. 20, № 5. – С. 164–171.

27. The platelet polymorphism PlA2 is a genetic risk factor for myocardial infarction / E. L. Grove [et al.] // J. Inter. Med. – 2004. – Vol. 255, N 6. – P. 637–644. https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2004.01327.x

28. Floyd, C.N. The PlA1/A2 polymorphism of glycoprotein IIIa as a risk factor for myocardial infarction: A meta-analysis / C. N. Floyd, A. Mustafa, A. Ferro // PLOS ONE. – 2014. – Vol. 9, N 7. – P. e101518. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101518

29. Clinical significance of Platelet Antigen 1/Platelet Antigen 2 (PlA1/A2) polymorphism of integrin β 3 (ITGB3) gene in coronary artery disease / Al. H. Abdel [et al.] // Med. J. Cairo Univ. – 2019. – Vol. 87, N 6. – P. 3969–3975. https://doi.org/10.21608/MJCU.2019.70350

30. GPIa polymorphisms are associated with outcomes in patients at high cardiovascular risk / D. Rath [et al.] // Front. Cardiovasc. Med. – 2017. – Vol. 4, art. 52. https://doi.org/10/3389/fcvm.2017.00052

31. Значимость полиморфизма C807T гена рецептора к коллагену ITGA2 и агрегационной активности тромбоцитов у пациентов с артериальной гипертензией / Е. А. Шишкина [и др.] // Казан. мед. журн. – 2019. – Т. 100, № 3. – С. 386–391.

32. Glycoprotein Ia C807T: Polymorphisms and their association with platelet function in patients with the acute coronary syndrome / Q. Zhang [et al.] // Cardiology. – 2015. – Vol. 132, N 4. – P. 213–220. https://doi.org/10.1159/000435906

33. Lack of association between the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism and coronary artery disease: a meta-analysis / A. E. Tsantes [et al.] // Int. J. Cardiol. – 2007. – Vol. 118, N 2. – P. 189–196. https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2006.06.047

34. Генотип –786CC гена эндотелиальной NO-синтазы NOS3 как фактор неблагоприятного течения ишемической болезни сердца и риска повышенной агрегации тромбоцитов на фоне приема антиагрегантов / Э. Ф. Муслимова [и др.] // Рос. кардиол. журн. – 2017. – № 10. – С. 29–32.

35. Short-term clinical outcomes in patients with acute myocardial infarction after successful percutaneous coronary revascularization: the role of promoter polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene / O. Petyunina [et al.] // Biomed. Res. Ther. – 2019. – Vol. 6, N 5. – P. 3166–3179. https://doi.org/10.15419/bmrat.v6i5.543

36. Li, X. Associations between eNOS gene polymorphisms and the risk of coronary artery disease: a systematic review and meta-analysis of 132 case-control studies / X. Li, Y. Lin, R. Zhang // Eur. J. Prev. Cardiol. – 2019. – Vol. 26. – P. 160–170. https://doi.org/10.1177/2047487318780748

37. Анализ влияния структурной перестройки промотора гена NOS3 на продукцию вазоактивных эндотелиальных факторов / А. В. Хромова [и др.] // Вестн. Сев. (Аркт.) фед. ун-та. Сер. Мед.-биол. науки. – 2015. – № 4. – С. 107–115.

38. Сметник, В. П. Женские половые гормоны и сердечно-сосудистая система / В. П. Сметник, А. А. Сметник // Мед. совет. – 2011. – № 3–4. – С. 40–45.

39. Бебякова, Н. А. Влияние полиморфизма -786T>C гена eNOS на параметры гемодинамики у девушек / Н. А. Бебякова, Н. А. Фадеева, А. В. Хромова // Журн. мед.-биол. исслед. – 2018. – Т. 6, № 3. – С. 205–213.

40. Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause / J. E. Rossouw [et al.] // JAMA. – 2007. – Vol. 297, N 13. – P. 1465–1477. https://doi.org/10.1001/jama.297.13.1465

References

1. Lindemann S., Kramer B., Daub K., Stellos K., Gawaz M. Molecular pathways used by platelets to initiate and accelerate atherogenesis. *Current Opinion in Lipidology*, 2007, vol. 18, no. 5, pp. 566–573. https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3282ef7c1e

2. Fontana P., Roffi M., Reny J. L. Platelet function test use for patients with coronary artery disease in the early 2020s. *Journal of Clinical Medicine*, 2020, vol. 9, no. 1, art. 194. https://doi.org/10.3390/jcm9010194

3. Kropacheva E. S. Pharmacogenetics of antithrombotic drugs: current state of the problem. *Aterotromboz* [Atherothrombosis], 2018, no. 2, pp. 115–129 (in Russian).

4. Strisciuglio T., Franco D., Di Gioia G., De Biase C., Morisco C., Trimarco B., Barbato E. Impact of genetic polymorphisms on platelet function and response to anti platelet drugs. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*, 2018, vol. 8, no. 5, pp. 610–620. https://doi.org/10.21037/cdt.2018.05.06

5. Jarrar M., Behl S., Manyam G., Ganah H., Nazir M., Nasab R., Moustafa K. Cytochrome allelic variants and clopidogrel metabolism in cardiovascular diseases therapy. *Molecular Biology Reports*, 2016, vol. 43, no. 6, pp. 473–484. https://doi.org/10.1007/s11033-016-3983-1

6. Mirzaev K. B., Fedorinov D. S., Ivashchenko D. V., Sychev D. A. Multiethnic analysis of cardiological pharmacogenetic markers of cytochrome P450 genes and membrane transporters in the Russian population. *Ratsional'naya farmakoterapiya v kardiologii* [Rational pharmacotherapy in cardiology], 2019, vol. 15, no. 3, pp. 393–406 (in Russian).

7. Zee R. Y., Michaud Sh. E., Diehl K. A., Chasman D. I. [et al.]. Purinergic receptor P2Y, G protein coupled, 12 gene variants and risk of incident ischemic stroke, myocardial infarction, and venous thromboembolism. *Atherosclerosis*, 2008, vol. 197, no. 2, pp. 694–699. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.07.001

8. Cui G., Zhang Sh., Zou J., Chen Y., Chen H. P2Y12 receptor gene polymorphism and the risk of resistance to clopidogrel: A meta-analysis and review of the literature. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 2017, vol. 26, no. 2, pp. 343–349. https://doi.org/10.17219/acem/63745

9. Danielak D., Pawlak K., Główka F., Karaźniewicz-Łada M. Influence of genetic and epigenetic factors of P2Y12 receptor on the safety and efficacy of antiplatelet drugs. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 2022. https://doi.org/10.1007/s10557-022-07370-8

10. Xiang Q., Ji Sh-D., Zhang Zh., Zhao X., Cui Y-M. Identification of ITGA2B and ITGB3 single-nucleotide polymorphisms and their influences on the platelet function. *BioMed Research International*, 2016, vol. 2016, art. ID 5675084. https://doi.org/10.1155/2016/5675084

11. Jastrzebska M., Lisman D., Szelepajlo A., Oledzki S., Chelstowski K., Clark J. S., Siennicka A. Evaluation of platelet reactivity during combined antiplatelet therapy in patients with stable coronary artery disease in relation to diabetes type 2 and the GPIIB/IIIA receptor gene polymorphism. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2019, vol. 70, no. 2, pp. 175–185. https://doi.org/10.26402/jpp.2019.2.01

12. Weng Z., Li X., Li Y., Lin J., Peng F., Niu W. The association of four common polymorphisms from four candidate genes (COX-1, COX-2, ITGA2B, ITGA2) with aspirin insensitivity: A meta-analysis. *PLOS ONE*, 2013, vol. 8, no. 11, p. e78093. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078093

13. Vlasov T. D., Nesterovich I. I., Shiman'ski D. A. Endothelial dysfunction: from particular to general. A return to the "old paradigm"? *Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya* [Regional circulation and microcirculation], 2019, vol. 18, no. 2, pp. 19–27 (in Russian).

14. Dosenko V. E., Zagoriy V. Y., Haytovich N. V., Gordok O. A., Moibenko A. A. Allelic polymorphism of endothelial NO-synthase gene and its functional manifestations. *Acta Biochimica Polonica*, 2006, vol. 53, pp. 299–302.

15. Liu D., Jiang Z., Dai L. [et al]. Association between the –786T>C 1polymorphism in the promoter region of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and risk of coronary artery disease: a systematic review and meta-analysis. *Gene*, 2014, vol. 545, no. 1, pp. 175–183. https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.09.099

16. Shah R. R., Gaedigk A. Precision medicine: does ethnicity information complement genotype-based prescribing decisions? *Therapeutic Advances in Drug Safety*, 2018, vol. 9, no. 1, pp. 45–62. https://doi.org/10.1177/2042098617743393

17. Petrović, J., Pešić V., Lauschke V. M. Frequencies of clinically important CYP2C19 and CYP2D6 alleles are graded across Europe. *European Journal of Human Genetics*, 2020, vol. 28, no. 1, pp. 88–94. https://doi.org/10.1038/s41431-019-0480-8

18. Kantemirova B. I., Orlova E. A., Polunina O. S., Chernysheva E. N., Abdullaev M. A., Sychev D. A. Pharmacogenetic basis of individual sensitivity and personalized prescription of antiplatelet therapy in various ethnic groups. *Farmatsiya i farmakologiya* [Pharmacy and pharmacology], 2020, vol. 8, no. 6, pp. 392–404 (in Russian). https://doi.org/10.19163/2307-9266-2020-8-6-392-404

19. Polonikov A., Kharchenko A., Bykanova M., Sirotina S., Ponomarenko I., Bocharova A., Vagaytseva K., Stepanov V., Bushueva O., Churnosov M., Solodilova M. Polymorphisms of CYP2C8, CYP2C9 and CYP2C19 and risk of coronary heart disease in Russian population. *Gene*, 2017, vol. 627, pp. 451–459. https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.07.004

20. Grinshtein Yu. I., Kosinova A. A., Grinshtein I. Yu., Subbotina T. N., Savchenko A. A. Possible genetic predictors of the development of cardiovascular complications after coronary bypass surgery. *Kardiologiya* [Cardiology], 2018, vol. 58, no. 7, pp. 77–84 (in Russian). https://doi.org/10.18087/cardio.2018.7.10148

21. Kvasnicka T., Bobcikova P., Malikova I., Hajkova J., Zima T., Ulrych J. [et al.]. The frequencies of ten platelet polymorphisms associated with atherosclerotic cardiovascular disease in patients with venous thromboembolism: A population-based case-control study. *Hereditary Genetics*, 2015, vol. 4, no. 3, art. 153. https://doi.org/10.4172/2161-1041.1000153

22. Strambovskaya N. N. Platelet functions in healthy persons with genetic polymorphisms GPIA (C807T), GPIIIA (T1565C), GPIβα (C434T), P2RY12 (H1/H2), SELP (G1087A) platelet receptions]. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk* [Bulletin of the East Siberian Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences], 2013, no. 6, pp. 65–70.

23. Muslimova E. F., Afanas'ev S. A., Rebrova T. Yu., Sergienko T. N., Repin A. N. Association of ITGB3, P2RY12, CYP2C19 gene polymorphisms with platelet functional activity in patients with coronary heart disease on the background of two-component antiplatelet therapy. *Terapevticheskii arkhiv* [Therapeutic archive], 2017, vol. 89, no. 5, pp. 74–78 (in Russian).

24. Hassani Idrissi H., Hmimech W., Khorb N. El., Akoudad H., Habbal R., Nadif S. Does i-T744C P2Y12 polymorphism modulate clopidogrel response among moroccan acute coronary syndromes patients? *Genetics Research International*, 2017, vol. 2017, art. ID 9532471. https://doi.org/10.1155/2017/9532471

25. Yang H.-H., Chen Y., Gao C.-Y. Associations of P2Y12R gene polymorphisms with susceptibility to coronary heart disease and clinical efficacy of antiplatelet treatment with clopidogrel. *Cardiovasc Therapeutics*, 2016, vol. 34, no. 6, pp. 460–467. https://doi.org/10.1111/1755-5922.12223

26. Karazhanova L. K., Zhukusheva Sh. T., Esimbekova E. I., Kapakova M. A. The prevalence of polymorphisms of some genes associated with the function of the plasma-platelet hemostasis link in aspirin resistance in the Kazakh population. *Nauka i zdravookhranenie* [Science and health], 2018, vol. 20, no. 5, pp. 164–171 (in Russian).

27. Grove E. L., Ørntoft T. F., Lassen J. F., Jensen H. K., Kristensen S. D. The platelet polymorphism PlA2 is a genetic risk factor for myocardial infarction. *Journal of Internal Medicine*, 2004, vol. 255, no. 6, pp. 637–644. https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2004.01327.x

28. Floyd C. N., Mustafa A., Ferro A. The PlA1/A2 polymorphism of glycoprotein IIIa as a risk factor for myocardial infarction: A meta-analysis. *PLOS ONE*, 2014, vol. 9, no. 7, p. e101518. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101518

29. Abdel Al. H., Bawady S. A., Saab A. A., Kilany W. El., Allam A. S., Metwally S. S. Clinical significance of Platelet Antigen 1/Platelet Antigen 2 (PlA1/A2) polymorphism of integrin β 3 (ITGB3) gene in coronary artery disease. *Medical Journal of Cairo University*, 2019, vol. 87, no. 6, pp. 3969–3975. https://doi.org/10.21608/MJCU.2019.70350

30. Rath D., Schaeffeler E., Winter S., Levertov S., Müller K., Droppa M., Stimpfle F., Langer H. F., Gawaz M., Schwab M., Geisler T. GPIa polymorphisms are associated with outcomes in patients at high cardiovascular risk. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 2017, vol. 4, art. 52. https://doi.org/10.3389/fcvm.2017.00052

31. Shishkina E. A., Khlynova O. V., Vasilets L. M., Sakhena V., Krivtsov A. V. Significance of C807T polymorphism of ITGA2 collagen receptor gene and platelet aggregation activity in patients with arterial hypertension. *Kazanskii meditsinskii zhurnal* [Kazan medical journal], 2019, vol. 100, no. 3, pp. 386–391 (in Russian).

32. Zhang Q., Jin Y., Shi D., Gong J., Liu J., Lu Y., Tong M., Wang J., Song Q., Dong J., Chen W., Lv K. Glycoprotein Ia C807T: Polymorphisms and their association with platelet function in patients with the acute coronary syndrome. *Cardiology*, 2015, vol. 132, no. 4, pp. 213–220. https://doi.org/10.1159/000435906

33. Tsantes A. E., Georgios K., Nikolopoulos G. K., Bagos P. G., Vaiopoulos G., Travlou A. Lack of association between the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism and coronary artery disease: a meta-analysis. *International Journal of Cardiology*, 2007, vol. 118, no. 2, pp. 189–196. https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2006.06.047

34. Muslimova E. F., Rebrova T. Yu., Afanas'ev S. A., Sergienko T. N., Repin A. N. Genotype –786CC of the endothelial NO-synthase gene NOS3 as a factor in the adverse course of coronary heart disease and the risk of increased platelet aggregation while taking antiplatelet agents. *Rossiiskii kardiologicheskii zhurnal = Russian journal of cardiology*, 2017, vol. 10, pp. 29–32 (in Russian).

35. Petyunina O., Kopytsy M., Babichev D., Berezin A. Short-term clinical outcomes in patients with acute myocardial infarction after successful percutaneous coronary revascularization: the role of promoter polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Biomedical Research and Therapy*, 2019, vol. 6, no. 5, pp. 3166–3179. https://doi.org/10.15419/bmrat.v6i5.543

36. Li X., Lin Y., Zhang R. Associations between eNOS gene polymorphisms and the risk of coronary artery disease: a systematic review and meta-analysis of 132 case-control studies. *European Journal of Preventive Cardiology*, 2019, vol. 26, pp. 160–170. https://doi.org/10.1177/2047487318780748

37. Khromova A. V., Feliksova O. M., Kuba A. A., Bebyakova N. A. Analysis of the effect of structural rearrangement of the NOS3 gene promoter on the production of vasoactive endothelial factors. *Vestnik Severnogo (Arkticheskogo) Federal'nogo universiteta. Seriya: Mediko-biologicheskie nauki* [Bulletin of the Northern (Arctic) Federal University. Series: Medical and biological sciences], 2015, no. 4, pp. 107–115 (in Russian).

38. Smetnik V. P., Smetnik A. A. Female sex hormones and the cardiovascular system. *Meditsinskii sovet* [Medical council], 2011, no. 3–4, pp. 40–45 (in Russian).

39. Bebyakova N. A., Fadeeva N. A., Khromova A. V. Effect of –786T>C polymorphism of the eNOS gene on hemodynamic parameters in girls. *Zhurnal mediko-biologicheskikh issledovanii* [Journal of biomedical research], 2018, vol. 6, no. 3, pp. 205–213.

40. Rossouw J. E., Prentice R. L., Manson J. E., Wu L., Barad D., Barnabei V. M., Ko M., La Croix A. Z., Margolis K. L., Stefanick M. L. Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *JAMA*, 2007, vol. 297, no. 13, pp. 1465–1477. https://doi.org/10.1001/jama.297.13.1465

Информация об авторах

Пронько Татьяна Павловна – канд. мед. наук, доцент, заведующий кафедрой. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0003-2126-5246. E-mail: tanya_pronko@mail.ru

Снежицкий Виктор Александрович – член-корресспондент, д-р мед. наук, профессор. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0002-1706-1243. E-mail: vsnez@mail.ru

Степуро Татьяна Леонидовна – канд. биол. наук, доцент. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0002-3337-4231. E-mail: tatianastepuro31@gmail.com

Горчакова Ольга Владимировна – ст. науч. сотрудник. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0001-9998-4350. E-mail: daniil_go@inbox.ru

Information about the authors

Tatyana P. Pronko – Ph. D. (Med.), Associate Professor, Head of the Department. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0003-2126-5246. E-mail: tanya_pronko@ mail.ru

Viktor A. Snezhitskiy – Corresponding Member, D. Sc. (Med.), Professor. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0002-1706-1243. E-mail: vsnez@mail.ru

Tatsiana L. Stsiapura – Ph. D. (Biol.), Associate Professor. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0002-3337-4231. E-mail: tatianastepuro31@gmail.com

Olga V. Gorchakova – Senior Researcher. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0001-9998-4350. E-mail: daniil_go@inbox.ru

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 577.151.42:004.94
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-149-155

Поступила в редакцию 16.01.2024
Received 16.01.2024

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

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

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ ОРФАННЫХ РЕЦЕПТОРОВ С АМИДАМИ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Аннотация. Одним из перспективных направлений разработки новых фармакологических препаратов для ослабления боли и других последствий повреждения периферических нервов считается изучение физиологических эффектов потенциальных агонистов рецепторов, связанных с G-белком, – амидов жирных кислот. С помощью методов молекулярного докинга и квантовой химии проведена оценка потенциальной селективности антагонистов рецепторов, связанных с G-белком, а также построены их комплексы с амидами жирных кислот. В результате докинга установлено, что для GPR18-рецепторов селективным антагонистом является PSB-CB5, а для GPR55 – O-1918. Показано, что между амидами жирных кислот (PEA, SEA) и орфанными рецепторами GPR18 и GPR55 образуются стабильные комплексы, в которых при взаимодействии этих соединений с рецепторами ключевую роль играют многочисленные ван-дер-ваальсовые контакты и водородные связи.

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

Для цитирования: Молекулярный докинг орфанных рецепторов с амидами жирных кислот / А. С. Доронькина [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2024. – Т. 21, № 2. – С. 149–155. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-149-155

Anastasya S. Doronkina[1], Anhelina A. Rudak[1], Irina P. Zhavoronok[1], Vasiliy G. Bogdan[2]

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

MOLECULAR DOCKING OF ORPHAN RECEPTORS WITH FATTY ACID AMIDES

Abstract. One of the promising directions for development of new pharmacological drugs for analgesia and other consequences of peripheral nerve damage is the study of the physiological effects of fatty acid amides. The potential selectivity of G-protein receptor antagonists has been evaluated using molecular docking and quantum chemistry methods, and its complexes with fatty acid amides have been constructed. As a result of docking, it was found that PSB-CB5 is a selective antagonist for GPR18 receptors, and O-1918 is a selective antagonist for GPR55. It was found that stable complexes are formed between fatty acid amides (REA, SEO) and orphan receptors (GPR 18, GPR55). Numerous van der Waals contacts and hydrogen bonds play a major role in the interaction of these compounds with receptors.

Keywords: palmitoylethanolamide, stearoylethanolamide, palmitamide glycine, nociceptive sensitivity, molecular docking, GPRC receptors

For citation: Doronkina A. S., Rudak A. A., Zhavoronok I. P., Bogdan V. G. Molecular docking of orphan receptors with fatty acid amides. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2024, vol. 21, no. 2, pp. 149–155 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-149-155

Введение. Хронический болевой синдром является ключевым фактором, который негативно влияет на качество жизни пациентов, затрудняет их социализацию, снижает работоспособность. Несмотря на наличие широкого спектра медикаментозных средств антиноцицептивного действия, в настоящее время актуальным представляется поиск новых путей патогенетического лечения хронической боли [1, 2].

Амиды жирных кислот (FAAs) относятся к семейству эндогенных биоактивных соединений, которые обладают физиологическим, прогомеостатическим и терапевтическим потенциалом для коррекции воспаления, нейродегенеративных состояний и нейропатической боли [3]. Предполагается, что среди данного класса соединений терапевтическим эффектом обладают пальмитоилэтаноламид (PEA), стеароилэтаноламид (SEA) и пальмитамид глицина (PGlyA) [4].

В настоящее время одобрено 475 препаратов, которые действуют на 108 различных рецепторов, связанных с G-белком (GPRC) [5, 6]. В свою очередь, амиды жирных кислот считаются потенциальными агонистами GPR18 и GPR55 и могут играть определенную роль в модуляции острой и хронической боли [7, 8].

Для уточнения фармакокинетических свойств различных природных и искусственно синтезированных соединений до проведения эксперимента *in vivo* используют компьютерные технологии, позволяющие существенно сократить сроки разработки лекарств и снизить финансовые расходы [9–11]. В данном исследовании для оценки возможности докинга амидов жирных кислот с орфанными мембранными рецепторами нами использованы методы *in silico*.

Проведенные исследования позволили установить, что селективными антагонистами для GPR18 считаются PSB-CB27, PSB-CB5, PSB-CB148, а для GPR55 – Abn-CBD, CID16020046, CID-85469571, O-1602, O-1821, Δ9-THC. Однако информация о возможном блокировании данных рецепторов неселективными антагонистами в доступной литературе отсутствует. Проведен молекулярный докинг для исключения взаимодействия неселективных антагонистов с GPR18- и GPR55-рецепторами [12, 13].

Цель работы – изучить взаимодействие орфанных рецепторов с амидами жирных кислот с помощью методов компьютерного моделирования.

Задачи исследования:

1. Определение селективности антагонистов PSB-CB5 и O-1918 посредством построения и анализа комплексов с GPR18, GPR55.

2. Проведение молекулярного докинга рецепторов GPR18 и GPR55 с PEA, SEA и PGlyA, анализ свойств полученных комплексов.

Материалы и методы исследования. 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 ее с использованием методов молекулярной механики.

Кристаллическая структура целевых белков-рецепторов (PDB ID: GPR18 – AF-H9NIM1-F1-model_v4, GPR55 – 7WCM, GPR119 – AF-Q9Y2T6-F1-model_4) была загружена из Банков данных белков (http://www.resb.org/pdb и https://alpha.ebi.ac.uk) в формате PDB и подготовлена средствами AutoDock tools. Первоначальная оптимизация геометрии соединений была выполнена с помощью HyperChem (версия 8.0 Hypercube, Inc., Альберта, Канада). Визуализация закрепленного положения была установлена с помощью USCF CHIMERA (версия 1.16, Сан-Франциско, США), Molegro Molecular Viewer 2.5 (Оддер, Дания) и Discovery Studio Visualizer 2016 (Бостон, США). Молекулы, не принадлежащие белку, были удалены 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 антагонисты к GPR18 (PSB-CB5) и GPR55 (O-1918) с одним из рецепторов GPRC (GPR18, GPR55), а на втором этапе осуществляли докинг между GPR18 либо GPR55 и одним из амидов жирных кислот – PEA, SEA и PGlyA. После добавления двух соединений в программу рисовали прямоугольник размером 101,17 × 45,78 × 77,23 Å для точного определения размера и местоположения веществ в пространстве и запускали докинг молекул. Для исследования молекулярного докинга использовали инструмент AutoDock/Vina (алгоритм Бройдена – Флетчера – Гольдфарба – Шанно) [10].

Результаты и их обсуждение. Установлено, что при возбуждении GPR18-рецепторов активируются иммунологические и нейродегенеративные процессы, включая болезнь Альцгеймера и рассеянный склероз, а также иммунная регуляция организма, участвующие в стимулировании воспаления, апоптозе макрофагов. В свою очередь, при активации GPR55 повышаются эндотелий-зависимая вазодилатация, клеточная пролиферация, которые также вовлечены в процессы воспаления и нейропатической боли, сопровождаемой механической гипералгезией [14, 15].

Для определения селективности стыковки антагонистов PSB-CB5 или O-1918 с одним из рецепторов GPRC (GPR18, GPR55) были применены AutoDock/Vina, CHIMERA, Molegro Molecular Viewer 2.5. Молекула антагониста была пристыкована к активному домену рецепторного белка (GPR18, GPR55). Оценка стыковки полученных комплексов представлена в табл. 1.

Таблица 1. **Анализ молекулярного докинга GPRC (GPR18, GPR55) с антагонистами PSB-CB5, O-1918**

Table 1. **Analysis of molecular docking of GPRC (GPR18, GPR55) with antagonists PSB-CB5, O-1918**

Показатель	Комплекс			
	GPR18 + PSB-CB5	GPR18 + O-1918	GPR55 + PSB-CB5	GPR55 + O-1918
Скорость химической реакции, моль/л·с	7,3	6,2	8,3	6,4
Кол-во водородных связей	1	0	0	1
Аминокислотные остатки рецептора, участвующие в образовании водородных связей	LEU A:255	–	–	GLY A:152
Энергия водородной связи, ккал/моль	–2,5	–	–	–2,5
Аминокислотные остатки рецептора, участвующие в образовании ван-дер-ваальсовых связей	GLY A:260 GLY A:258 PHE A:270 THR A:271 CYS A:251 ASN A:265 GLY A:261	ARG A:296 VAL A:39 MET A:309 PHE A:293 VAL A:283 THR A:42	PRO A:193 LEU A:192 PHE A:188 VAL A:149 GLU A:152	THR A:151 PHE A:188 LEU A:148 VAL A:149 PHE A:110 GLY A:189 LEU A:185 PRO A:155
Аминокислотные остатки рецептора, участвующие в образовании π–π-связи	PHE A:254 TRP A:267	–	–	–

Исследование структурных комплексов рецепторов GPRC (GPR18, GPR55) с PSB-CB5 показало, что антагонист с GPR18 образует водородную связь с остатком LEU A:255 (энергия –2,5 ккал/моль), в то время как в комплексе PSB-CB5 с GPR55 водородные связи не найдены (табл. 1). Обнаружены два специфических π–π-взаимодействия аминокислотных остатков GPR18 (PHE A:254, TRP A:267) с пиррольным кольцом лиганда PSB-CB5 (табл. 1).

Схожие результаты получены при анализе комплексов GPRC (GPR18, GPR55) с O-1918. При взаимодействии O-1918 с GPR18 водородные связи обнаружены не были, а в комплексе O-1918 с GPR55 выявлена одна водородная связь GLY A:152 с атомом кислорода. При этом энергия полученной водородной связи во втором комплексе составила –2,5 ккал/моль. Анализ с использованием методов молекулярного моделирования комплексов показал, что все GPRC с лигандами образуют сеть ван-дер-ваальсовых контактов, суммарное число которых варьируется от 5 (GPR55 + PSB-CB5) до 8 (GPR18 + PSB-CB5) (табл. 1).

Таким образом, данные молекулярного докинга свидетельствуют о том, что наличие в комплексах GPR18 + PSB-CB5 и GPR55 + O-1918 по одному водородному контакту с энергией связи –2,5 ккал/моль, π-стэкинга между π-сопряженными системами пиррольного кольца лиганда PSB-CB5 и аминокислотного остатка рецептора GPR18 (TYR C:334), а также 8 и 9 ван-дер-ваальсовых связей способствует стабилизации структуры комплексов и, соответственно, формированию устойчивого соединения рецептор–лиганд.

В комплексах GPR18 + O-1918 и GPR55 + PSB-CB5 водородных связей сформировано не было, но было обнаружено 6 и 5 ван-дер-ваальсовых связей. Следовательно, при отсутствии водородных связей и незначительном количестве ван-дер-ваальсовых контактов комплекс не является устойчивым. Исходя из полученных данных, PSB-CB5 можно считать антагонистом GPR18-рецепторов, а O-1918 – антагонистом GPR55-рецепторов (табл. 1).

При взаимодействии PEA с GPR18 обнаружена водородная связь с остатком ALA A:141 с атомом кислорода, в комплексе SEA с GPR18 выявлены две водородные связи – TYR A:264 и GLU A:20 с атомами кислорода, а при взаимодействии PGlyA с GPR18 водородных связей не зафиксировано. При этом энергия полученных водородных связей в первом комплексе составила –2,5 ккал/моль, а во втором –1,4 ккал/моль. Все исследуемые амиды жирных кислот в комплексе с GPR18 формируют ван-дер-вальсовые связи, суммарное число которых варьируется от 7 (SEA) до 10 (PEA) (рис. 1).

Следовательно, данные молекулярного докинга свидетельствуют о том, что в комплексах GPR18 + PEA и GPR18 + SEA имеются водородные контакты с энергией связи –2,5 и –1,4 ккал/моль,

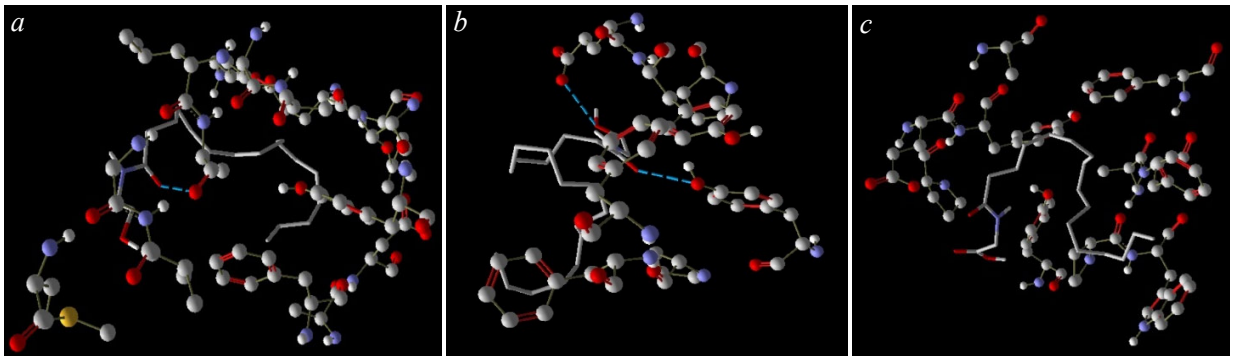


Рис. 1. 3D-структура GPR18 в комплексе с амидами жирных кислот (PEA (*a*), SEA (*b*), PGlyA (*c*))

Fig. 1. 3D structure of GPR18 in complex with fatty acid amides (PEA (*a*), SEA (*b*), PGlyA (*c*))

а также 10 и 7 ван-дер-ваальсовых связей соответственно, что достаточно для формирования полноценного устойчивого комплекса рецептор–лиганд. В свою очередь, между GPR18 PGlyA водородных связей не обнаружено, а наличие 8 ван-дер-ваальсовых контактов не может обеспечить полноценную устойчивость данного комплекса, что, в свою очередь, указывает на более низкий уровень контакта, чем в предыдущих комплексах (табл. 2).

Таблица 2. **Анализ молекулярного докинга GPR18 с амидами жирных кислот (PEA, SEA, PGlyA)**

Table 2. **Analysis of molecular docking of GPR18 with FAAs (PEA, SEA, PGlyA)**

Показатель	Комплекс		
	GPR18 + PEA	GPR18 + SEA	GPR18 + PGlyA
Скорость химической реакции, моль/л·с	4,7	4,2	4,7
Кол-во водородных связей	1	2	0
Аминокислотные остатки рецептора, участвующие в образовании водородных связей	ALA A:141	TYR A:264 GLU A:20	–
Энергия водородной связи, ккал/моль	–2,5	–1,4	–
Аминокислотные остатки рецептора, участвующие в образовании ван-дер-ваальсовых связей	LEU A:132 THR A:56 GLU A:131 MET A:148 LYS A:137 VAL A:145 GLY A:144 LEU A:140 ALA A:138 ASP A:118	TRP A:267 ALA A:269 ALA A:24 PHE A:273 PRO A:18 PRO A:266 TYR A:21	PHE A:273 TYR A:21 PRO A:266 GLU A:20 TYR A:264 PRO A:18 ALA A:24 ALA A:269

Таблица. 3. **Анализ молекулярного докинга GPR55 с амидами жирных кислот (PEA, SEA, PGlyA)**

Table 3. **Analysis of molecular docking of GPR55 with FAAs (PEA, SEA, PGlyA)**

Показатель	Комплекс		
	GPR55 + PEA	GPR55 + SEA	GPR55 + PGlyA
Скорость химической реакции, моль/л·с	5,3	5,7	6,5
Кол-во водородных связей	1	1	0
Аминокислотные остатки рецептора, участвующие в образовании водородных связей	CYS A:113	LEU A:148 GLY A:152	–
Энергия водородной связи, ккал/моль	–2,5	–2,7	–
Аминокислотные остатки рецептора, участвующие в образовании ван-дер-ваальсовых связей	PHE A:114 LEU A:192 PHE A:188 LEU A:148 LEU A:185 GLY A:152 PHE A:110 PRO A:184 THR A:151 PRO A:193 ILE A:196	THR A:176 PHE A:246 ILE A:156 PRO A:184 VAL A:149 GLY A:152 SER A:153 VAL A:181 PRO A:155 THR A:151 PHE A:110 LEU A:185 TYR A:106 PHE A:159	PHE A:188 GLY A:189 PHE A:110 PRO A:184 PHE A:159 TYR A:106 SER A:153 ILE A:156 PHE A:182 THR A:176 MET A:172 PRO A:155 ILE A:154 THR A:151 GLY A:152 PHE A:102

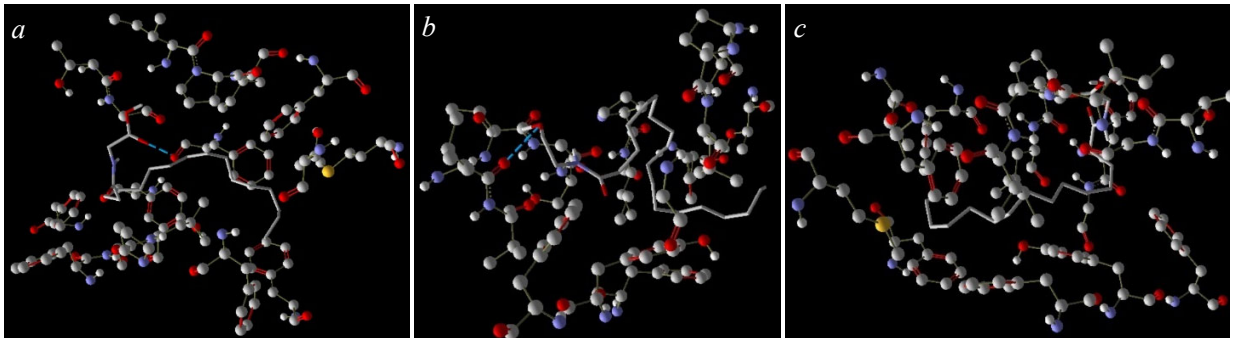


Рис. 2. 3D-структура GPR55 в комплексе с амидами жирных кислот (PEA (*a*), SEA (*b*), PGlyA (*c*))

Fig. 2. 3D structure of GPR55 in complex with fatty acid amides (PEA (*a*), SEA (*b*), PGlyA (*c*))

Анализ с использованием методов молекулярного моделирования комплексов показал, что GPR55 с лигандом (FAAs) образуют сеть ван-дер-ваальсовых контактов, суммарное число которых варьируется от 11 (GPR55 + PEA) до 16 (GPR55 + PGlyA) (табл. 3).

Согласно полученным данным, все исследуемые FAAs участвуют в ван-дер-ваальсовых взаимодействиях с консервативными остатками GLY A:152, PHE A:110, PRO A:184, THR A:151. В свою очередь, PEA и SEA формируют ван-дер-ваальсовы контакты с остатком LEU A:185; PEA и PGlyA – с PHE A:188; SEA и PGLyA – с PHE A:159, TYR A:106, SER A:153, ILE A:156, THR A:176, PRO A:155.

Наряду с ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями анализируемые соединения образуют водородные связи с атомами кислорода аминокислот CYS A:113 (GPR55 + PEA), LEU A:148, GLY A:152 (GPR55 + SEA) с энергией связи –2,5 и –2,7 ккал/моль соответственно. В свою очередь, в комплексе GPR55 и PGlyA водородных связей между данными соединениями не обнаружено (см. рис. 2).

Заключение. Анализ комплексов, построенных методами молекулярного моделирования, свидетельствует о том, что PSB-CB5 является антагонистом GPR18-рецепторов, а O-1918 – антагонистом GPR55-рецепторов. Наибольший вклад в энергию связывания соответствующего лиганда с рецептором вносят водородные связи, ван-дер-ваальсовые контакты, специфические π–π-взаимодействия для формирования стабильного комплекса. На основании полученных данных установлено, что взаимодействие O-1918 с GPR18 и PSB-CB5 с GPR55 не приводит к образованию устойчивых комплексов.

В результате проведения докинга между амидами жирных кислот (PEA, SEA) и орфанными рецепторами GPR18 и GPR55 впервые доказана возможность формирования их стабильных комплексов с наличием водородных связей и сетью ван-дер-ваальсовых контактов. Также обоснована способность PEA, SEA образовывать устойчивые контакты с обоими орфанными мембранными рецепторами.

При взаимодействии PGlyA и орфанных рецепторов (GPR18 и GPR55) в полученных комплексах отмечается низкий уровень контакта, что обусловлено отсутствием водородных связей.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Neuropathic pain / L. Colloca [et al.] // Nat. Rev. Dis. Primers. – 2017. – Vol. 3. – Art. 17002. https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.2

2. The endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, has antiallodynic and anti-hyperalgesic effects in a murine model of neuropathic pain: involvement of CB (1), TRPV1 and PPARs receptors and neurotrophic factors / B. Costa [et al.] // Pain. – 2008. – Vol. 139, N 3. – P. 541–550. https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.06.003

3. Nourbakhsh, F. The role of orphan G protein-coupled receptors in the modulation of pain: A review / F. Nourbakhsh, R. Atabaki, A. Roohbakhsh // Life Sci. – 2018. – Vol. 212. – P. 59–69. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.09.028

4. Investigation of adsorption tyrphostin 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

5. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor / E. Ryberg [et al.] // Br. J. Pharm. – 2007. – Vol. 152, N 7. – P. 1092–1101. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707460

6. Gacasan, S. B. G protein-coupled receptors: The evolution of structural insight / S. B. Gacasan, D. L. Baker, A. L. Parrill // AIMS Biophys. – 2017. – Vol. 4, N 3. – P. 491–527. https://doi.org/10.3934/biophy.2017.3.491

7. Computational investigations on the binding mode of ligands for the cannabinoid-activated G protein-coupled receptor GPR18 / A. Neumann [et al.] // Biomolecules. – 2020. – Vol. 10, N 5. – Art. 686. https://doi.org/10.3390/biom10050686

8. Neuropathic pain in the general population: A systematic review of epidemiological studies / O. van Hecke [et al.] // Pain. – 2014. – Vol. 155, N 4. – P. 654–662. https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.11.013

9. 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

10. Shahab, S. Antioxidant properties of the phorbol: A DFT approach / S. Shahab, M. Sheikhi // Russ. J. Phys. Chem. – 2020. – Vol. 14. – P. 15–18. https://doi.org/10.1134/S199079312001045

11. 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

12. Computational investigations on the binding mode of ligands for the cannabinoid-activated G protein-coupled receptor GPR18 / A. Neumann [et al.] // Biomolecules. – 2020. – Vol. 10, N 5. – P. 686–694. https://doi.org/10.3390/biom10050686

13. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor / E. Ryberg [et al.] // Br. J. Pharmacol. – 2009. – Vol. 157, N 7. – P. 1092–1101. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707460

14. Molecular and functional interaction between GPR18 and cannabinoid CB2 G-protein-coupled receptors. Relevance in neurodegenerative diseases / I. Reyes-Resina [et al.] // Biochem. Pharmacol. – 2018. – N 157. – P. 169–179. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.06.001

15. Alexander, S. P. G protein-coupled receptors / S. P. Alexander, A. Christopoulos, A. P. Davenport // Br. J. Pharmacol. – 2017. – N 175. – P. 117–129.

References

1. Colloca L., Ludman T., Bouhassira D., Baron R., Dickenson A. H., Yarnitsky D. [et al.]. Neuropathic pain. *Nature Reviews Disease Primers*, 2017, vol. 3, art. 17002. https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.2

2. Costa B., Comelli F., Bettoni I., Colleoni M., Giagnoni G. The endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, has antiallodynic and anti-hyperalgesic effects in a murine model of neuropathic pain: involvement of CB (1), TRPV1 and PPARs receptors and neurotrophic factors. *Pain*, 2008, vol. 139, no. 3, pp. 541–550. https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.06.003

3. Nourbakhsh F., Atabaki R. Roohbakhsh A. The role of orphan G protein-coupled receptors in the modulation of pain: A review. *Life Sciences*, 2018, vol. 212, pp. 59–69. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.09.028

4. Sheikhi M., Shahab S., Alnajjar R., Ahmadianarog M., Kaviani S. Investigation of adsorption tyrphostin 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

5. Ryberg E., Larsson N., Sjögren S., Hjorth S., Hermansson N. O., Leonova J., Elebring T., Nilsson K., Drmota T., Greasley P. J. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *British Journal of Pharmacology*, 2007, vol. 152, no. 7, pp. 1092–1101. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707460

6. Gacasan S. B., Baker D. L., Parrill A. L. G protein-coupled receptors: The evolution of structural insight. *AIMS Biophysics*, 2017, vol. 4, no. 3, pp. 491–527. https://doi.org/10.3934/biophy.2017.3.491

7. Neumann A., Engel V., Mahardhika A. B., Schoeder C. T., Namasivayam V., Kieć-Kononowicz K., Müller C. E. Computational investigations on the binding mode of ligands for the cannabinoid-activated G protein-coupled receptor GPR18. *Biomolecules*, 2020, vol. 10, no. 5, art. 686. https://doi.org/10.3390/biom10050686

8. van Hecke O., Austin S. K., Khan R. A., Smith B. H., Torrance N. Neuropathic pain in the general population: A systematic review of epidemiological studies. *Pain*, 2014, vol. 155, no. 4, pp. 654–662. https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.11.013

9. Ezzili C., Otrubova K., Boger D. L. Fatty acid amide signaling molecules. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2010, vol. 20, no. 20, pp. 5959–5968. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.08.048

10. Shahab S., Sheikhi M. Antioxidant properties of the phorbol: A DFT approach. *Russian Journal of Physical Chemistry*, 2020, vol. 14, pp. 15–18. https://doi.org/10.1134/S199079312001045

11. 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

12. Neumann A., Engel V., Mahardhika A. B., Schoeder C. T., Namasivayam V., Kieć-Kononowicz K., Müller C. E. Computational investigations on the binding mode of ligands for the cannabinoid-activated G protein-coupled receptor GPR18. *Biomolecules*, 2020, vol. 10, no. 5, pp. 686–694. https://doi.org/10.3390/biom10050686

13. Ryberg E., Larsson N., Sjögren S., Hjorth S., Hermansson N. O., Leonova J., Elebring T., Nilsson K., Drmota T., Greasley P. J. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *British Journal of Pharmacology*, 2009, vol. 157, no. 7, pp. 1092–1101. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707460

14. Reyes-Resina I., Navarro G., Aguinaga D., Canela E. I., Schoeder C. T., Załuski M., Kieć-Kononowicz K., Saura C. A., Müller Ch. E., Franco R. Molecular and functional interaction between GPR18 and cannabinoid CB2 G-protein-coupled receptors. Relevance in neurodegenerative diseases. *Biochemical Pharmacology*, 2018, no. 157, pp. 169–179. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.06.001

15. Alexander S. P., Christopoulos A., Davenport A. P. G protein-coupled receptors. *British Journal of Pharmacology*, 2017, no. 175, pp. 117–129.

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 центра изучения боли. 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: freya56672@gmail.com

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

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

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 616.34-002-02:614.446.2(476)
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-156-167

Поступила в редакцию 30.03.2023
Received 30.03.2023

Н. В. Поклонская, Т. В. Амвросьева, Ю. Б. Колтунова, Ю. А. Шилова, И. В. Бельская

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь

СПЕКТР ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСТРЫХ ВИРУСНЫХ ГАСТРОЭНТЕРИТОВ В УСЛОВИЯХ СПОРАДИЧЕСКОЙ И ГРУППОВОЙ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ В БЕЛАРУСИ

Аннотация. В работе проведен анализ результатов лабораторной диагностики вирусных острых гастроэнтеритов (ОГЭ) в условиях спорадической и групповой заболеваемости. Для детекции кишечных вирусов использовали биологический материал 1864 пациентов со спорадическими случаями ОГЭ, полученный в 2020–2022 гг., и 443 пациентов, вовлеченных в 52 эпизода групповой заболеваемости вирусными ОГЭ в период с 2009 по 2021 г.

В биологическом материале 53,7 % пациентов со спорадическими случаями ОГЭ выявлены нуклеиновые кислоты одного или нескольких кишечных вирусов, в том числе ротавирусов А (27,0 %), норовирусов геногруппы 2 (13,8 %), аденовируов F (5,3 %), энтеровируов (2,5 %), норовирусов геногруппы 1 (0,4 %). Смешанная вирус-вирусная инфекция обнаружена у 7,4 % пациентов. Доминирующими возбудителями групповой заболеваемости ОГЭ были норовирусы геногруппы 2 (63,5 % зарегистрированных эпизодов). Среди спорадических случаев ОГЭ вирусной этиологии преобладали дети 5 лет и младше, тогда как основная часть эпизодов групповой заболеваемости была зарегистрирована у детей 6–17 лет и у взрослых. В зависимости от возраста заболевших частота выявления кишечных вирусов у пациентов со спорадическими случаями ОГЭ имела значительные различия: у детей 5 лет и младше в спектре этиологических агентов преобладали ротавирусы А, тогда как норовирусы геногруппы 2 обнаруживались в 2,5 раза реже ($p < 0{,}001$). У детей 6–17 лет и у взрослых ротавирусы и норовирусы геногруппы 2 выявлялись с равной частотой, адено- и энтеровирусы чаще обнаруживались у детей от 0 до 17 лет.

Представленные результаты свидетельствуют о существенном вкладе кишечных вирусов в развитие заболеваемости ОГЭ на территории нашей страны. Данный вклад не ограничивается только ротавирусами А, в отношении которых хорошо налажены лабораторная диагностика и эпидемическое слежение. В значительной степени он формируется другими типами кишечных вирусов, среди которых наиболее значимыми являются норовирусы геногруппы 2.

Ключевые слова: острый гастроэнтерит, ротавирус, норовирус, аденовирус, энтеровирус, астровирус, саповирус, бокавирус, парэховирус, пикобирновирус, аичи вирус

Для цитирования: Спектр возбудителей острых вирусных гастроэнтеритов в условиях спорадической и групповой заболеваемости в Беларуси / Н. В. Поклонская [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2024. – Т. 21, № 2. – С. 156–167. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-156-167

Natalia V. Paklonskaya, Tamara V. Amvrosyeva, Yulia B. Kaltunova, Yulia A. Shilava, Ina V. Belskaya

Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

SPORADIC AND GROUP INCIDENCE OF ACUTE VIRAL GASTROENTERITIS IN BELARUS: SPECTRUM OF THE PATHOGENS AND ETIOLOGY FEATURES

Abstract. The paper analyzes the results of virus detection in patients of different age at the time of sporadic and group morbidity of acute gastroenteritis (AGE). Enteric viruses were detected in the biological material of 1864 patients with sporadic cases of AGE in 2020–2022 and in the biological material of 443 patients from 52 episodes of AGE group morbidity in 2009–2021.

Among enteric viruses found in 53.7 % of patients with sporadic AGE cases rotaviruses A were predominated (27.0 %), followed by genogroup 2 noroviruses (13.8 %), adenoviruses F (5.3 %), enteroviruses (2.5 %), genogroup 1 noroviruses (0.4 %). Mixed virus–virus infection was detected in 7.4 % of patients. In AGE group morbidity, genogroup 2 noroviruses were the main etiological agents – they caused 63.5 % of episodes, whereas genogroup 1 noroviruses – 11.5 %, rotaviruses A – 5.8 %, enteroviruses and sapoviruses – 3.9 % of each. Prevailing age group among people with the sporadic cases of AGE were children ≤5 years old, while the main part of the AGE group episodes was registered among children aged 6–17 years and adults. Depending on the age of patients, the frequency of detection of various enteric viruses had significant differences: among children ≤5 years old with sporadic AGE, the main etiologic agents were rotaviruses A, whereas genogroup 2 noroviruses were detected 2.5 times less often ($p < 0.001$), among children aged 6–17 years and adults, rotaviruses and genogroup 2 noroviruses were detected with equal frequency. Adeno- and enteroviruses were found more often in children from 0 to 17 years old than in adults.

The presented results indicate a significant contribution of enteric viruses to the incidence of AGE in our country. Moreover, this contribution is not limited by rotaviruses A only, but is largely formed by other enteric viruses, especially genogroup 2 noroviruses.

Keywords: acute gastroenteritis, rotavirus, norovirus, adenovirus, enterovirus, astrovirus, sapovirus, bocavirus, parechovirus, picobirnovirus, aichi virus

For citation: Paklonskaya N. V., Amvrosyeva T. V., Kaltunova Yu. B., Shilava Yu. A., Belskaya I. V. Sporadic and group incidence of acute viral gastroenteritis in Belarus: spectrum of the pathogens and etiology features. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2024, vol. 21, no. 2, pp. 156–167 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-156-167

Введение. Современные достижения медицины, повышение уровня благосостояния и улучшение санитарно-гигиенического благополучия населения привели к существенному изменению структуры инфекций с фекально-оральным механизмом передачи. В последние десятилетия острые кишечные инфекции (ОКИ) представлены в основном болезнями вирусной этиологии: вирусные возбудители выявляются в среднем у 40–60 % пациентов с острым гастроэнтеритом (ОГЭ). Так, присутствие нуклеиновых кислот (НК) кишечных вирусов наблюдалось: в Финляндии – у 61 % пациентов (2017–2018 гг.) [1], в Испании – у 57,3 % (2016–2017 гг.) [2], в Италии – у 48,6 % (2008–2018 гг.) [3], в ОАЭ – у 42,8 % (2017–2019 гг.) [4]. По результатам масштабных исследований, проведенных в России, возбудители вирусной природы выявлены у 61,5 % детей с ОГЭ [5].

Доминирующими этиологическими агентами вирусных ОГЭ в мировом масштабе являются ротавирус А и норовирусы. Несмотря на успешное внедрение в ряде стран начиная с 2006 г. программы вакцинации против ротавируса, ротавирусная инфекция продолжает оставаться основной причиной заболеваемости вирусным ОГЭ и смертности от диарейных заболеваний у детей до 5 лет [6]. Так, по данным зарубежных исследователей, в Финляндии доля ротавирусных ОГЭ у детей от 0 до 16 лет составляла от 38 до 32 % [1], в Италии – 24,7 [3], в Китае – 20,4 % (у детей до 5 лет – 30,39 %) [7]. По данным российских исследователей, доля детей с ОГЭ, у которых обнаруживалась РНК ротавируса А, составляла 29,5 % [8].

Норовирусы геногруппы 2 являются вторыми по значимости этиологическими агентами ОГЭ после ротавирусов, а в ряде стран, где вакцинация против ротавируса получила широкое распространение, они стали лидирующими возбудителями ОГЭ. Например, в США норовирусы доминируют у пациентов всех возрастов: они являлись причиной ОГЭ у 13–32 % детей и у 7–16 % взрослых [9]. В Финляндии норовирусы составляли 27 % от случаев ОГЭ у пациентов всех возрастных групп [1], в других странах – от 7 до 20 %.

К числу значимых возбудителей вирусных ОГЭ относят также аденовирусы F, астро- и саповирусы, однако в разных странах мира частота их встречаемости существенно колеблется. Так, в Китае аденовирусы F выявлены у 1,1–4,96 % пациентов разного возраста [7], тогда как в ОАЭ – у 17,2 % детей до 5 лет [4]. В последние годы во многих странах было зарегистрировано увеличение частоты детекции саповирусов у детей с ОГЭ. В Испании они обнаруживались у 13,0 % пациентов [2], в Южной Корее – у 0,8 % [10], в Китае – у 1,19–1,89 % [9]. Аналогичные значительные различия обнаружены при диагностике астровирусной инфекции у пациентов с ОГЭ из разных стран: в Испании «классические» астровирусы выявлены у 11,2 % заболевших [2], а в ОАЭ и Южной Корее – всего у 1,0–1,9 % [4, 10].

Энтеровирусы способны вызывать различные клинические проявления, но вследствие широкой распространенности бессимптомного носительства их, как правило, не относят к этиологическим агентам ОГЭ. При этом энтеровирусы могут быть причиной заболевания, сопровождающегося диарейным синдромом, а некоторые штаммы и геновариванты способны вызывать изолированный гастроэнтерит. По результатам исследований в Индии энтеровирусы обнаружены у 14–17 % пациентов, причем они выявлялись достоверно чаще, чем в контрольной группе.

Роль парэховирусов в возникновении ОГЭ до настоящего времени также не выяснена. Однако по данным, полученным в разных странах, эти возбудители регулярно выявляются у пациентов с ОГЭ: в Японии – у 6,8 % [11], в Египте – у 19 %.

Смешанная кишечная инфекция (присутствие одновременно двух и более вирусов в биологическом материале пациентов с ОГЭ) – очень распространенное явление, особенно у детей. По данным исследователей из разных стран мира, смешанные вирус-вирусные кишечные инфекции диагностируются у 7,3–40 % пациентов. Анализ этиологической структуры инфекционных диарей

в России показал, что сочетанная этиология заболевания имела место у 13,1 % пациентов, причем у 42,9 % из них были обнаружены вирус-вирусные микст-инфекции [12].

Помимо географических особенностей распространения тех или иных возбудителей ОГЭ значительную роль играет возраст заболевших. Так, во всех странах максимальная частота инфекций, вызванных ротавирусами, регистрируется у детей младшего возраста. Результаты исследований в нашей стране свидетельствуют о том, что основной удельный вес случаев ротавирусного ОГЭ приходится на детей в возрасте 1–2 лет. Аналогичные результаты были получены российскими специалистами: максимальные показатели заболеваемости при ротавирусной инфекции отмечались на 2-м году жизни с последующим их снижением к 30–40-летнему возрасту ($p < 0{,}001$). При этом норовирусы существенно чаще обнаруживались у пациентов более старшего возраста: по данным российских авторов, максимальная частота норовирусной инфекции была зарегистрирована у пациентов 10–20 лет (в Китае норовирусы чаще всего детектировались у лиц 18–59 лет) [7].

В Республике Беларусь диагностикой ротавирусного ОГЭ занимаются преимущественно практические лаборатории, поэтому особенности эпидемиологии ротавирусной инфекции достаточно хорошо изучены [13]. С учетом накопленных сегодня знаний о широком спектре возможных возбудителей ОГЭ очевидно, что для получения информации о реальной этиологической структуре регистрируемой заболеваемости и особенностях ее формирования необходимо расширение перечня регулярно детектируемых вирусов у пациентов с диарейными инфекциями.

Цель исследования – обобщение и анализ результатов, полученных при осуществлении лабораторной диагностики и молекулярно-эпидемиологических исследований вирусных острых гастроэнтеритов, в условиях спорадической и групповой заболеваемости пациентов разных возрастных групп.

Материалы и методы исследования. Этиологическую структуру вирусных ОГЭ в условиях спорадической заболеваемости изучали на основе анализа результатов лабораторной диагностики. Исследованы полученные в 2020–2022 гг. из различных регионов страны образцы биологического материала (фекалии) 1864 пациентов с ОГЭ.

Этиологическую структуру ОГЭ при групповой заболеваемости изучали на основании результатов этиологической расшифровки 52 эпизодов, имевших место с 2009 по 2021 г. в разных регионах страны. В ходе ее проведения было выполнено лабораторное исследование биологического материала (образцы фекалий, рвотных масс) 443 пациентов разного возраста.

Для выделения вирусных НК использовали коммерческие наборы «НК-экстра» (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Беларусь), для постановки ОТ-ПЦР в одной пробирке – «Набор для выявления ДНК (РНК) кишечных вирусов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флюоресцентной детекцией «ОКВИ-ПЦР» (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Беларусь).

Достоверность обнаруженных различий оценивали на основании критерия χ^2, доверительные интервалы долей рассчитывали по распределению Пуассона (через χ^2) [14].

Результаты исследования. Вклад различных кишечных вирусов в формирование этиологической структуры спорадической заболеваемости ОГЭ изучали в течение 2020–2022 гг. с использованием биологического материала, взятого у 1864 пациентов. Возрастной и региональный состав пациентов, от которых был получен биологический материал, представлен в таблице.

В выборку было включено приблизительно равное количество лиц мужского и женского пола – 49,6 и 50,4 % соответственно. В основном она была представлена детьми в возрасте от 0 до 18 лет (77,2 %), которые наиболее подвержены развитию вирусных ОГЭ. Взрослые (лица старше 18 лет) составили 22,8 %. Биологический материал для исследований был получен из 6 регионов страны, максимальное количество проб поступило из Могилевской области (36,1 %).

По результатам выполненных исследований в биологическом материале 53,7 [48,5; 59,2] % пациентов с ОГЭ выявлены НК одного или нескольких кишечных вирусов. У 46,3 [41,6; 51,5] % пациентов кишечные вирусы не обнаружены. При этом у детей 5 лет и младше ($n = 1067$) частота их детекции составила 59,0 [54,4; 63,7] %, у детей 6–17 лет ($n = 351$) – 52,1 [44,9; 60,3], у взрослых ($n = 419$) – 30,3 [25,3; 36,1] %. Следует отметить, что у взрослых пациентов кишечные вирусы выявлялись достоверно реже, чем у детей ($p < 0{,}001$).

Демографические характеристики пациентов (*n* = 1864), биологический материал которых использовали в исследованиях

Demographic characteristics of patients (*n* = 1864), whose biological material was used in the studies

Характеристика пациентов	Кол-во пациентов, *n* (%)
Пол:	
мужской	925 (49,6 [46,5; 52,9])
женский	939 (50,4 [47,2; 53,7])
Возраст:	
до 5 лет	1067 (57,24 [53,86; 60,78]
6–17 лет	351 (18,83 [16,91; 20,91])
взрослые старше 18 лет	419 (22,48 [20,38; 24,74])
не указан	27 (1,45 [0,95; 2,11])
Регион проживания:	
Брестская обл.	178 (9,5)
Витебская обл.	252 (13,5)
Гомельская обл.	142 (7,6)
Минская обл.	448 (24,0)
Могилевская обл.	672 (36,1)
г. Минск	132 (7,1)
не указан	40 (2,0)

Максимальный вклад в формирование этиологической структуры ОГЭ вносили ротавирусы А (27,0 [24,7; 29,5] % пациентов), на втором месте были норовирусы геногруппы 2 (13,8 [12,2; 15,7] %). Все остальные кишечные вирусы детектировались значительно реже: аденовирусы F – у 5,3 [4,3; 6,5] % пациентов, энтеровирусы – у 2,5 [1,8; 3,3] %, норовирусы геногруппы 1 – у 0,4 [0,2; 0,9] %. В 50,9 % случаев этиология вируса не установлена.

Для оценки вклада минорных возбудителей (астро-, сапо-, бока-, парэхо-, пикобирно- и аичи вирусов) в формирование заболеваемости ОГЭ были проведены дополнительные исследования с целью определения частоты их встречаемости у 513 пациентов. Согласно полученным результатам, данные вирусные патогены были выявлены у 9,2 [6,7; 12,2] % обследованных. Чаще всего детектировались бока- и пикобирнавирусы (2,9 и 2,5 % соответственно), реже выявлялись сапо- и астровирусы (2,0 и 1,4 % соответственно), парэхо- и аичи вирусы удалось обнаружить только у единичных пациентов (0,19 %).

В биологическом материале 137 пациентов с ОГЭ (7,4 [6,2; 8,3] %) обнаружены два и более кишечных вируса, что указывало на наличие в их организме смешанной инфекции. Спектр и частота выявленных смешанных инфекций представлены на рис. 1.

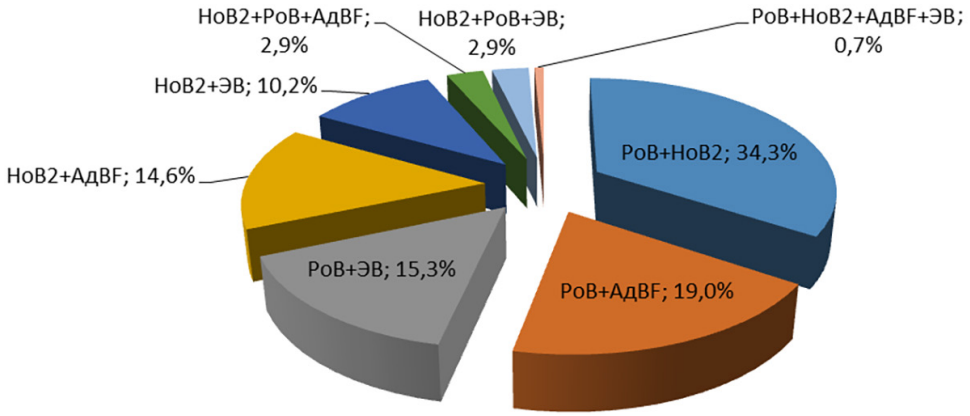


Рис. 1. Спектр и частота смешанных вирус-вирусных инфекций у пациентов с ОКИ (*n* = 137).
РоВ – ротавирус А, НоВ2 – норовирус геногруппы 2, АдВF – аденовирус F, ЭВ – энтеровирус

Fig. 1. Spectrum and frequency of mixed virus–virus infections in patients with acute intestinal infections (*n* = 137).
RoV – rotavirus A, HoB2 – norovirus of genogroup 2, AdBF – adenovirus F, EV – enterovirus

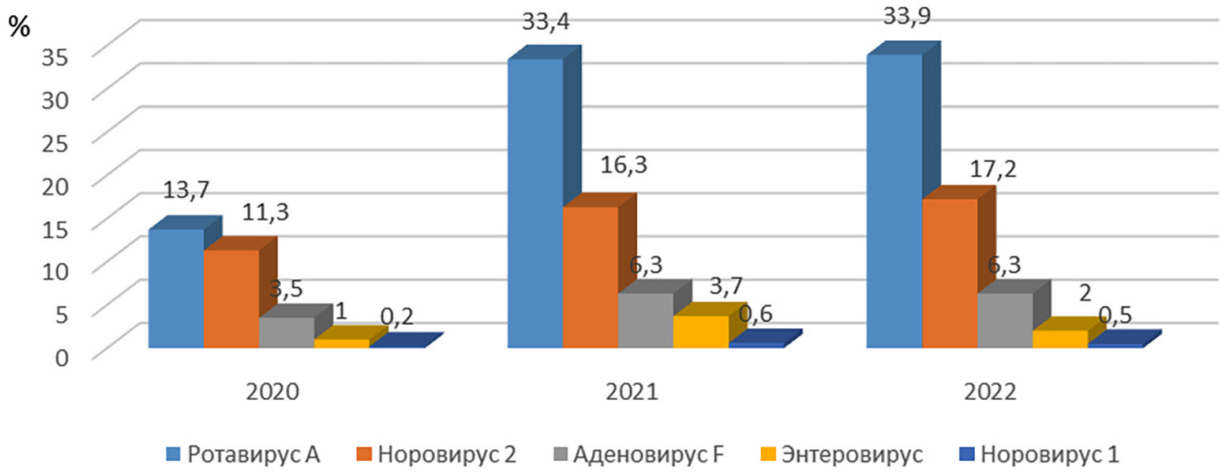


Рис. 2. Частота обнаружения кишечных вирусов у пациентов с ОГЭ (n = 1837) по годам в период с 2020 по 2022 г.

Fig. 2. Frequency of detection of enteric viruses in patients with AGE (n = 1837) by years in the period from 2020 to 2022

Чаще всего у пациентов обнаруживались смешанные инфекции, вызванные ротавирусом А в сочетании с другими вирусами – норовирусом геногруппы 2 (34,3 [25,2; 45,6] %), аденовирусом F (19 [12,4; 27,8] %), энтеровирусом (15,3 [9,5; 23,4] %). Достаточно часто встречались также смешанные инфекции, вызванные норовирусом 2 в сочетании с аденовирусом F (14,6 [8,9; 22,6] %) и энтеровирусом (10,2 [5,6; 17,2] %).

В динамике наблюдения по годам (2020–2022 гг.) установлено (рис. 2), что в 2021 г. имел место существенный рост частоты обнаружения всех кишечных вирусов у пациентов с ОКИ. Наиболее значительным он был в отношении ротавирусов А – с 13,9 % в 2020 г. до 33,6 % в 2021 г. (p < 0,001). Частота детекции норовирусов геногруппы 2 увеличилась с 11,3 % в 2020 г. до 16,3 % в 2021 г. (p = 0,01), аденовирусов F – с 3,5 до 6,4 % (p = 0,019), энтеровирусов – с 1,1 до 3,7 % (p = 0,004). При этом в 2022 г. не обнаружено значимых изменений в показателях выявления у пациентов кишечных вирусных агентов по сравнению с 2021 г.

Для изучения этиологической структуры вирусных ОГЭ разных возрастных групп в условиях спорадической заболеваемости в исследования был включен биологический материал (фекалии) 1837 пациентов, полученный в течение 2020–2022 гг. Пациенты были разделены на три группы: дети от 0 до 5 лет включительно (n = 1067), дети от 6 до 17 лет включительно (n = 351), взрослые (старше 18 лет) (n = 419). Такое деление было обусловлено существенными различиями, в том числе социальными, которые могут влиять на заболеваемость кишечными инфекциями у пациентов разного возраста.

Установлено (рис. 3), что частота выявления ротавирусов А была максимальной у детей 5 лет и младше и достоверно ниже (p < 0,001) у детей 6–17 лет и у взрослых. Частота выявления норовирусов геногруппы 2 у детей 5 лет и младше, наоборот, была достоверно ниже, чем у детей 6–17 лет (p = 0,003), но не имела статистических различий с таковой у взрослых. Аденовирусы F чаще обнаруживались у детей 5 лет и младше и у детей 6–17 лет, достоверно реже – у взрослых (p = 0,021). Энтеровирусы выявлялись у взрослых достоверно реже, чем у детей 6–17 лет и младше 5 лет (p = 0,061, p = 0,064). Норовирусы геногруппы 1 реже детектировались у детей 5 лет и младше, чем у детей 6–17 лет и у взрослых, однако достоверных различий в полученных результатах не выявлено.

Из полученных данных видно, что доминирующей возрастной группой среди пациентов с инфекцией, вызванной ротавирусом А, были дети 5 лет и младше, с норовирусом геногруппы 2 – дети 6–17 лет, с аденовирусом F и энтеровирусом – дети 0–18 лет, с норовирусом геногруппы 1 – дети 6–17 лет (рис. 3).

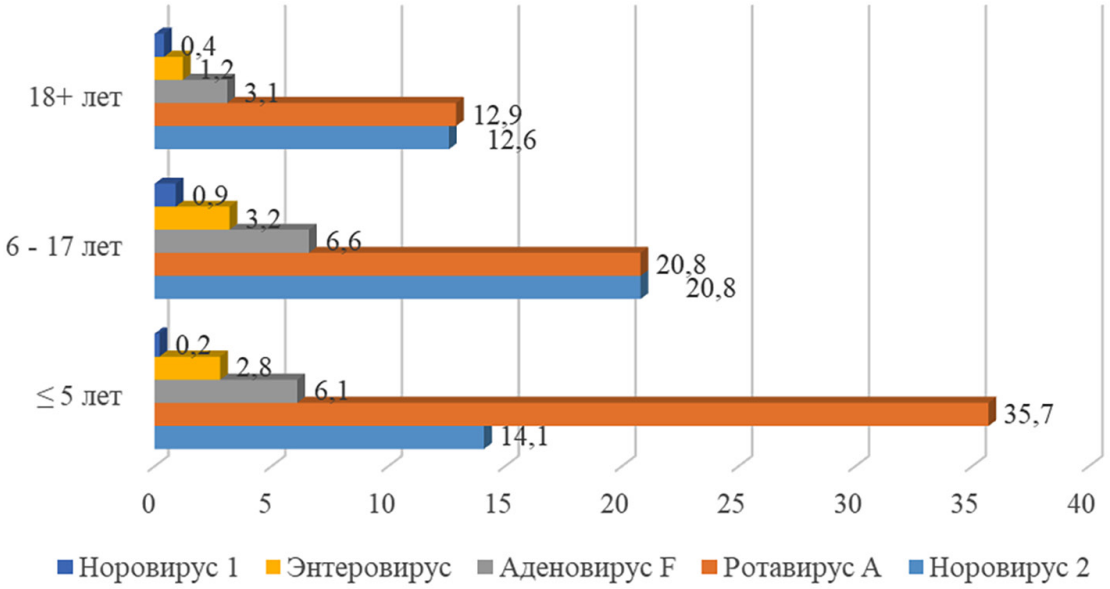


Рис. 3. Частота выявления кишечных вирусов (%) в разных возрастных группах пациентов с ОГЭ (*n* = 1837)

Fig. 3. Frequency of detection of intestinal viruses (%) in different age groups of patients with AGE (*n* = 1837)

Для анализа этиологической структуры групповой заболеваемости использовали материал от 443 пациентов разного возраста, полученный при расшифровке 52 эпизодов групповой заболеваемости, имевших место в разных регионах страны. Этиологические агенты, вызвавшие групповую заболеваемость, были установлены для 92 % эпизодов (48 из 52), причем 88,9 % из них (46 из 52) были связаны с кишечными вирусами. Абсолютное большинство (63,5 [43,7; 89,1] %) эпизодов было вызвано норовирусами геногруппы 2 (рис. 4). На втором месте среди возбудителей групповой заболеваемости были норовирусы геногруппы 1 (11,5 [4,2; 25,1] % эпизодов), затем следовали ротавирусы А (5,8 [1,2; 16,86] %), энтеровирусы и саповирусы (по 3,85 [0,47; 13,95] %

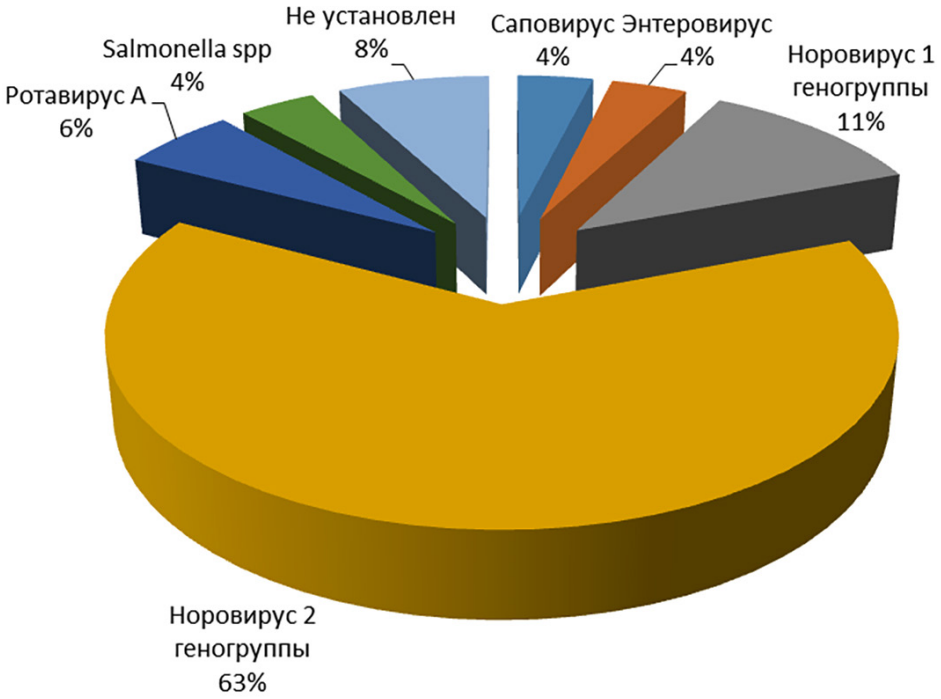


Рис. 4. Спектр возбудителей групповой заболеваемости ОГЭ и ее этиологическая структура в период с 2009 по 2021 г.

Fig. 4. Spectrum of causative agents of AGE group morbidity and its etiological structure in the period since 2009 to 2021

каждый). Полученные результаты указывают на то, что норовирусы геногруппы 2 достоверно чаще вызывали групповую заболеваемость ОГЭ, чем все остальные кишечные возбудители. Следует отметить, что норовирусы геногруппы 1, занимавшие второе место по количеству вызванных ими эпизодов групповой заболеваемости, в структуре этиологических агентов спорадической заболеваемости ОГЭ занимали последнее место. При этом ротавирусы А, являющиеся доминирующими возбудителями спорадических случаев ОГЭ у детей 5 лет и младше и занимавшие второе место в спектре возбудителей спорадических случаев ОГЭ в других возрастных группах, были причиной групповой заболеваемости всего в 6 % эпизодов.

Анализ возрастной структуры показал, что групповая заболеваемость вирусными ОГЭ имела место преимущественно у взрослых (48,0 [31,1; 71,0] % эпизодов) и у детей 6–17 лет (44,2 [28,0; 66,4] % эпизодов), тогда как у детей 5 лет и младше было зарегистрировано только 7,7 [2,1; 19,7] % эпизодов.

Обсуждение. Представленные нами данные позволяют охарактеризовать спектр возбудителей и особенности этиологической структуры вызванных ими вирусных ОГЭ в нашей стране в условиях спорадической и групповой заболеваемости.

На основе результатов лабораторной диагностики, проводившейся в течение 2020–2022 гг., установлено, что доля пациентов со спорадическими случаями ОГЭ, в биологическом материале которых были обнаружены кишечные вирусы, составила 53,7 %. Этот результат хорошо согласуется с данными, представленными учеными разных стран, согласно которым вирусная этиология ОГЭ, как правило, имеет место у 40–60 % пациентов. При этом процент заболевших вирусными инфекциями значительно отличается, в зависимости от возраста пациентов. В наших исследованиях у взрослых кишечные вирусы выявлялись достоверно реже, чем у детей ($p < 0{,}001$). Сходные результаты были получены российскими исследователями: у взрослых пациентов со спорадическими случаями ОКИ преобладали возбудители бактериальной природы, а у детей – вирусы.

Анализ частоты обнаружения инфекций, вызванных отдельными типами кишечных вирусов, показал закономерное преобладание ротавирусной инфекции у пациентов с ОГЭ. Этот факт обусловлен тем, что большинство заболевших составляли дети, причем в основном дети до 6 лет (доминирующая возрастная группа при ротавирусной инфекции). Проведенный нами анализ результатов лабораторной диагностики показал, что ротавирусы А закономерно чаще выявлялись у детей 5 лет и младше (35,7 %), тогда как у детей 6–17 лет и у взрослых они были обнаружены только у 20,8 и 12,9 % пациентов соответственно ($p < 0{,}001$).

На втором месте по частоте обнаружения у пациентов с ОГЭ были норовирусы геногруппы 2, которые в настоящее время являются широко распространенными этиологическими агентами данного заболевания [15]. Полученные результаты показали, что у детей школьного возраста (6–17 лет) и у взрослых пациентов с ОГЭ рота- и норовирусы геногруппы 2 обнаруживались с равной частотой, что указывало на одинаковый вклад данных возбудителей в этиологическую структуру ОГЭ у пациентов от 6 лет и старше. Наиболее часто норовирусы геногруппы 2 выявлялись у детей 6–17 лет (20,8 %, $p < 0{,}001$), что согласуется с результатами российских ученых, установившими, что доминирующей возрастной группой при норовирусной инфекции были пациенты 10–20 лет. Исходя их полученных данных, очевидно, что лабораторную диагностику вирусных ОГЭ нельзя ограничивать только выявлением ротавируса А, предполагая его доминирующую роль, так как норовирусы геногруппы 2 имеют сопоставимую этиологическую значимость, особенно в старших возрастных группах – у детей школьного возраста и у взрослых.

Аденовирусы F являются важными этиологическими агентами ОГЭ. Так, по данным за 2016 г., во всем мире на них приходится 75 млн случаев диареи у детей младше 5 лет и 11,8 % смертей (уступают только ротавирусам А и шигелле) [16]. При этом наибольший вклад в формирование заболеваемости ОГЭ (до 30 %) аденовирусы F вносят в развивающихся странах Африки и Юго-Восточной Азии, тогда как в других государствах их доля в спектре этиологических агентов составляет 1–5 % [17]. По результатам наших исследований аденовирусы F занимали третье место по частоте их обнаружения у пациентов со спорадическими случаями ОГЭ. Их доля в спектре идентифицированных возбудителей составила 5,3 [4,3; 6,5] %. При этом с приблизительно рав-

ной частотой они обнаруживались у детей 5 лет и младше и у детей 6–17 лет, в 2 раза реже – у взрослых пациентов (p = 0,003). Эти данные, однако, отличаются от результатов, полученных в других странах, согласно которым ОГЭ, вызванные аденовирусами F, чаще всего регистрируются у детей до 2 лет. Можно предположить, что причиной относительно высокой частоты выявления аденовирусов F у детей 6–17 лет стала эпидемия COVID-19, во время которой были значительно снижены социальные контакты и введены серьезные противоэпидемические меры, что привело к снижению уровня «проэпидемичивания» детей раннего возраста и, соответственно, к росту заболеваемости в более старшем возрасте. Групповая заболеваемость, вызванная аденовирусами F, за период наблюдения с 2011 по 2021 г. в нашей стране не регистрировалась.

Энтеровирусы, согласно полученным нами результатам, детектировались у 2,5 [1,8; 3,3] % обследованных. Из 46 позитивных пациентов только у 7 они были единственным выявленным патогеном, тогда как у остальных обнаруживались совместно с другими кишечными вирусами – ротавирусом А, норовирусом геногруппы 2 или аденовирусом F. Можно предположить, что у большинства пациентов со спорадическими случаями ОГЭ энтеровирусы вряд ли могли быть этиологическими агентами заболевания, а их выявление, скорее всего, было связано с их широким бессимптомным носительством. За период наблюдения с 2011 г. в стране было зарегистрировано два эпизода групповой заболеваемости, при этом энтеровирусы были единственным выявленным патогеном и обнаруживались у 70–100 % заболевших. Таким образом, очевидно, что в ряде случаев энтеровирусы являются этиологическим агентом ОГЭ, а в других их обнаружение обусловлено бессимптомным носительством. С этих позиций идентификация энтеровирусов, способных вызвать ОГЭ у пациентов, до типов и разработка специфической диагностики, направленной на их выявление, является важным направлением исследований в области повышения качества и результативности лабораторного контроля за кишечными инфекциями.

Накопленный мировой опыт по изучаемой проблеме свидетельствует о том, что к минорным возбудителям вирусных ОГЭ относятся астро- и саповирусы. Согласно полученным нами результатам, саповирусы обнаруживались у 2,0 [0,9; 3,8] % пациентов со спорадическими случаями ОГЭ, астровирусы – у 1,4 [0,6; 2,8] %, что указывало на относительно небольшой их вклад в этиологическую структуру данной патологии. Несмотря на это, саповирусы в нашей стране были причиной двух зарегистрированных эпизодов групповой заболеваемости (4 % от всех расшифрованных), что сопоставимо с энтеровирусами (4 %) и даже с ротавирусами А (6 %). Таким образом, несмотря на незначительную роль саповирусов в формировании спорадической заболеваемости ОГЭ, они могут вносить заметный вклад в развитие групповой заболеваемости.

Сегодня известно, что бока-, пикобирна-, парэхо- и аичи вирусы ассоциируются с развитием диарей, однако их этиологическая роль в возникновении ОГЭ до конца не установлена. В настоящих исследованиях бока- и пикобирновирусы регулярно обнаруживались у пациентов с ОГЭ (2,9 и 2,5 % соответственно), тогда как парэхо- и аичи вирус выявлялись редко (у 0,2 % пациентов каждый). Поскольку групповая заболеваемость, связанная с этими возбудителями, не регистрировалась, исследования по изучению роли этих вирусов в формировании заболеваемости ОГЭ будут продолжены с включением соответствующей по полу и возрасту контрольной группы пациентов, не имеющих признаков заболевания.

Анализ частоты выявления различных возбудителей по годам показал, что в 2021 г. имел место резкий рост частоты обнаружения всех кишечных вирусов по сравнению с 2020 г. Можно предположить, что данный факт был обусловлен началом пандемии COVID-19 (в 2020 г.) и связанным с ней повышенным вниманием населения к соблюдению санитарно-гигиенических мер предосторожности. Более частое мытье рук и сокращение контактов привело к снижению распространения кишечных вирусов в 2020 г. В 2021 г., когда появилась информация о том, что SARS-CoV-2 не передается контактно-бытовым путем, по-видимому, произошло ослабление санитарных мер профилактики и возросла частота заражения кишечными вирусами, которая сохранилась на том же уровне и в 2022 г.

В настоящее время отмечается свободная циркуляция в популяции разных кишечных вирусов, поэтому нельзя исключать близкого по времени (или одновременного) заражения несколькими патогенами, приводящего к развитию смешанных инфекций. Широкое использование

мультиплексного формата лабораторной диагностики позволило установить, что смешанная вирус-вирусная кишечная инфекция является регулярно регистрируемым событием. Основными факторами риска возникновения смешанной инфекции являются ранний возраст детей, посещение детских дошкольных учреждений, наличие в семье трех и более детей [18]. Кроме того, смешанные инфекции могут передаваться через воду – при наличии фекальной контаминации водоисточников [19], однако в этих случаях речь идет не о спорадической, а о групповой заболеваемости ОГЭ. Высокая частота смешанных инфекций обычно регистрируется в странах с низким уровнем жизни, тогда как в развитых странах она значительно ниже [20]. В России этот показатель у пациентов с ОКИ составил 14,8 % [8]. В наших исследованиях частота одновременного выявления нескольких кишечных вирусов у пациентов со спорадическими случаями ОГЭ составила 7,4 %, причем у 81,8 % из них обнаруживался ротавирус А и какой-то другой кишечный вирус – норовирус, аденовирус F, энтеровирус. Эти результаты чрезвычайно близки к полученным французскими авторами данным, согласно которым у 95 % пациентов со смешанной инфекцией она была вызвана ротавирусом А и другим (другими) кишечными вирусами [20].

Спектр возбудителей и возрастная структура заболевших указывают на значительные отличия групповой заболеваемости ОГЭ от спорадической. Норовирусы геногруппы 2 были основным этиологическим агентом групповой заболеваемости (всего за период наблюдения 63,5 [43,7; 89,1] % зарегистрированных эпизодов). Норовирусы геногруппы 1 занимали второе место (11,5 [4,2; 25,1] % эпизодов), при этом они крайне редко регистрировались у пациентов с ОГЭ на фоне спорадической заболеваемости. Групповая заболеваемость вирусными ОГЭ достоверно чаще ($p < 0{,}001$) имела место у детей школьного возраста и у взрослых, чем у детей 5 лет и младше. Это также кардинально отличается от возрастной структуры при спорадической заболеваемости вирусными ОГЭ, при которой наиболее уязвимую группу составляют дети дошкольного возраста (5 лет и младше). Эти данные хорошо согласуются с частотой обнаружения кишечных вирусов в разных возрастных группах. Ротавирусы А являлись доминирующим агентом спорадической заболеваемости у детей 5 лет и младше, но относительно редко вызывали групповую заболеваемость (6 % эпизодов). В период наблюдения именно эта возрастная группа пациентов была минимально вовлечена в групповую заболеваемость вирусными ОГЭ.

Заключение. На основании полученных данных можно сделать следующие основные выводы:

частота обнаружения кишечных вирусов у пациентов со спорадическими случаями ОГЭ в 2020–2022 гг. составила 53,7 %, причем у детей 5 лет и младше они выявлялись почти в 2 раза чаще, чем у взрослых (59,0 и 30,3 % соответственно, $p < 0{,}001$);

максимальный вклад в формирование спорадической заболеваемости ОГЭ вносили ротавирусы А (27,0 % пациентов), на втором месте были норовирусы геногруппы 2 (13,8 % пациентов), все остальные кишечные вирусы детектировались значительно реже: аденовирусы F – у 5,3 % пациентов, энтеровирусы – у 2,5 %, норовирусы геногруппы 1 – у 0,4 %;

частота выявления минорных возбудителей ОГЭ вирусной этиологии (астро-, сапо-, бока-, парэхо-, пикобирно- и аичи вирусов) у пациентов со спорадическими случаями в совокупности составила 9,2 %, чаще всего детектировались бока- и пикобирнавирусы;

доминирующим возбудителем групповой заболеваемости ОГЭ были норовирусы геногруппы 2 (63,5 % эпизодов), норовирусы геногруппы 1 (11,5 %), ротавирусы А (5,8 %), энтеро- и саповирусы (по 3,9 %);

смешанная вирус-вирусная инфекция обнаруживалась у 7,4 % пациентов со спорадическими случаями ОГЭ, у 81,8 % из них детектировался ротавирус А и какой-то другой кишечный вирус – норовирус, аденовирус F, энтеровирус;

спорадические случаи ОГЭ вирусной этиологии преобладали у детей 5 лет и младше, тогда как основная часть эпизодов групповой заболеваемости была зарегистрирована у детей 6–17 лет и у взрослых;

в зависимости от возраста заболевших частота выявления различных кишечных вирусов у пациентов со спорадическими случаями ОГЭ имела значительные различия: у детей 5 лет и младше основную долю возбудителей составляли ротавирусы А, тогда как норовирусы геногруппы 2 обнаруживались в 2,5 раза реже ($p < 0{,}001$), у детей 6–17 лет и у взрослых рота- и норо-

вирусы геногруппы 2 выявлялись с равной частотой, адено- и энтеровирусы обнаруживались у детей от 0 до 17 лет чаще, чем у взрослых;

доминирующей возрастной группой у пациентов с инфекцией, вызванной ротавирусом А, были дети 5 лет и младше, норовирусом геногрупп 1 и 2 – дети 6–17 лет, аденовирусом F и энтеровирусом – дети 0–18 лет;

в 2020 г. частота выявления всех групп кишечных вирусов у пациентов со спорадическими случаями ОГЭ была в 1,4–3,4 раза ниже, чем в 2021 и 2022 гг., что, по-видимому, обусловлено строгим соблюдением санитарно-гигиенических правил в начале пандемии COVID-19.

Представленные результаты свидетельствуют о существенном вкладе кишечных вирусов в развитие заболеваемости ОГЭ на территории нашей страны. Причем этот вклад не ограничивается только ротавирусами А, в отношении которых хорошо налажены лабораторная диагностика и эпидемическое слежение, но в значительной степени формируется другими типами кишечных вирусов, среди которых, безусловно, наиболее значимыми являются норовирусы геногруппы 2.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Pitkänen, O. A major decrease in viral acute gastroenteritis in hospitalized Finnish children as rotavirus returns as the most detected pathogen / O. Pitkänen, J. Markkula, M. Hemming-Harlo // Int. J. Infect. Dis. – 2022. – Vol. 114. – P. 273–278. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.11.016

2. Novel human astroviruses: prevalence and association with common enteric viruses in undiagnosed gastroenteritis cases in Spain / D. L. Vu [et al.] // Viruses. – 2019. – Vol. 11, N 7. – Art. 585. https://doi.org/10.3390/v11070585

3. Assessing the burden of viral co-infections in acute gastroenteritis in children: An eleven-year-long investigation / S. De Grazia [et al.] // J. Clin. Virol. – 2020. – Vol. 129. – Art. 104513. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104513

4. Etiology of diarrhea by multiplex polymerase chain reaction among young children in the United Arab Emirates: a case-control study / A. R. Alsuwaidi [et al.] // BMC Infect. Dis. – 2021. – Vol. 21, N 1. – Art. 7. https://doi.org/10.1186/s12879-020-05693-1

5. Сезонность и возрастная структура заболеваемости острыми кишечными инфекциями на территории РФ / А. Т. Подколзин [и др.] // Тер. архив. – 2007. – Т. 79, № 11. – С. 10–16.

6. Estimating global, regional and national rotavirus deaths in children aged <5 years: Current approaches, new analyses and proposed improvements / A. Clark [et al.] // PLoS ONE. – 2017. – Vol. 12, N 9. – P. e0183392. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183392

7. Rotavirus gastroenteritis in Finnish children in 2006–2008, at the introduction of rotavirus vaccination / S. Räsänen [et al.] // Scand. J. Infect. Dis. – 2011. – Vol. 43, N 1. – P. 58–63. https://doi.org/10.3109/00365548.2010.508462

8. Изучение этиологии острых кишечных инфекций у детей, госпитализированных в инфекционные отделения стационаров Москвы / А. Т. Подколзин [и др.] // Инфекц. болезни. – 2004. – Т. 2, № 4. – С. 85–91.

9. Norovirus and other viral causes of medically attended acute gastroenteritis across the age spectrum: Results from the Medically Attended Acute Gastroenteritis Study in the United States / R. M. Burke [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2021. – Vol. 73, N 4. – P. e913–e920. https://doi.org/10.1093/cid/ciab033

10. Prevalence of eleven infectious viruses causing diarrhea in Korea / G. R. Kim [et al.] // Jpn. J. Infect. Dis. – 2020. – Vol. 73, N 6. – P. 427–430. https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2020.069

11. Diversity of human parechovirus in infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2014–2016 / N. T. K. Pham [et al.] // Infect. Genet. Evol. – 2019. – Vol. 75. – Art. 104001. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104001

12. Бабаян, Л. Острые кишечные инфекции смешанной этиологии у детей // Эксперим. и клин. гастроэнтерология. – 2016. – Т. 133, № 9. – С. 66–70.

13. Ротавирусная инфекция в Республике Беларусь / Н. В. Полякова [и др.] // Здравоохранение. – 2017. – № 7. – С. 12–19.

14. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М.: Практика, 1999. – 459 с.

15. The changing landscape of pediatric viral enteropathogens in the post-rotavirus vaccine era / N. Halasa [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2021. – Vol. 72, N 4. – P. 576–585. https://doi.org/10.1093/cid/ciaa100

16. Lee, B. Pediatric acute gastroenteritis associated with adenovirus 40/41 in low-income and middle-income countries / B. Lee, C. F. Damon, J. A. Platts-Mills // Curr. Opin. Infect. Dis. – 2020. – Vol. 33, N 5. – P. 398–403. https://doi.org/10.1097/qco.0000000000000663

17. High prevalence of enteric viruses associated with acute gastroenteritis in pediatric patients in a low-income area in Vitoria, Southeastern Brazil / R. Pratte-Santos [et al.] // J. Med. Virol. – 2019. – Vol. 91, N 5. – P. 744–750. https://doi.org/10.1002/jmv.25392

18. Clinical relevance of enteropathogen co-infections in preschool children-a population-based repeated cross-sectional study / R. Pijnacker [et al.] // Clin. Microbiol. Infect. – 2019. – Vol. 25, N 8. – P. 1039.e7–1039.e13. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.11.029

19. Co-infection by waterborne enteric viruses in children with gastroenteritis in Nepal / S. Tandukar [et al.] // Healthcare (Basel). – 2019. – Vol. 7, N 1. – Art. 9. https://doi.org/10.3390/healthcare7010009

20. Simultaneous detection of gastrointestinal pathogens with a multiplex Luminex-based molecular assay in stool samples from diarrhoeic patients / C. Mengelle [et al.] // Clin. Microbiol. Infect. – 2013. – Vol. 19, N 10. – P. E458–E465. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12255

References

1. Pitkänen O., Markkula J., Hemming-Harlo M. A major decrease in viral acute gastroenteritis in hospitalized Finnish children as rotavirus returns as the most detected pathogen. *International Journal of Infectious Diseases*, 2022, vol. 114, pp. 273–278. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.11.016

2. Vu D. L., Sabrià A., Aregall N., Michl K., Garrido V. R., Goterris L., Bosch A., Pintó R. M., Guix S. Novel human astroviruses: prevalence and association with common enteric viruses in undiagnosed gastroenteritis cases in Spain. *Viruses*, 2019, vol. 11, no. 7, art. 585. https://doi.org/10.3390/v11070585

3. De Grazia S., Bonura F., Bonura C., Mangiaracina L., Filizzolo Ch., Martella V., Giammanco G. M. Assessing the burden of viral co-infections in acute gastroenteritis in children: An eleven-year-long investigation. *Journal of Clinical Virology*, 2020, art. 129, p. 104513. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104513

4. Alsuwaidi A. R., Al Dhaheri K., Al Hamad S., George J., Ibrahim J., Ghatasheh G., Issa M., Al-Hammadi S., Narchi H. Etiology of diarrhea by multiplex polymerase chain reaction among young children in the United Arab Emirates: a case-control study. *BMC Infectious Diseases*, 2021, vol. 21, no. 1, art. 7. https://doi.org/10.1186/s12879-020-05693-1

5. Podkolzin A. T., Fenske E. B., Abramycheva N. Yu., Shipulin G. A., Bitieva P. L., Sagalova O. I. [et al.]. Seasonality and age structure of the incidence of acute intestinal infections in the Russian Federation *Terapevticheskii arkhiv* [Therapeutic archive], 2007, vol. 79, no. 11, pp. 10–16 (in Russian).

6. Clark A., Black R., Tate J., Roose A., Kotloff K., Lam D. [et al.] Estimating global, regional and national rotavirus deaths in children aged <5 years: Current approaches, new analyses and proposed improvements. *PLoS ONE*, 2017, vol. 12, no. 9, p. e0183392. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183392

7. Räsänen S., Lappalainen S., Halkosalo A., Salminen M., Vesikari T. Rotavirus gastroenteritis in Finnish children in 2006–2008, at the introduction of rotavirus vaccination. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 2011, vol. 43, no. 1, pp. 58–63. https://doi.org/10.3109/00365548.2010.508462

8. Podkolzin A. T., Mukhina A. A., Shipulin G. A., Kuz'mina V. N., Braslavskaya S. I., Maleev V. V. [et al.]. Study of the etiology of acute intestinal infections in children hospitalized in infectious diseases departments of Moscow hospitals. *Infektsionnye bolezni* [Infectious illnesses], 2004, vol. 2, no. 4, pp. 85–91 (in Russian).

9. Burke R. M., Mattison C. P., Marsh Z., Shioda K., Donald J., Salas S. B., Naleway A. L., Biggs Ch., Schmidt M. A., Hall A. J. Norovirus and other viral causes of medically attended acute gastroenteritis across the age spectrum: Results from the Medically Attended Acute Gastroenteritis Study in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 2021, vol. 73, no. 4, pp. e913–e920. https://doi.org/10.1093/cid/ciab033

10. Kim G. R., Kim S. H., Jeon G. W., Shin J. H. Prevalence of eleven infectious viruses causing diarrhea in Korea. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 2020, vol. 73, no. 6, pp. 427–430. https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2020.069

11. Pham N. T. K., Thongprachum A., Shimizu Y., Trinh Q. D., Okitsu S., Komine-Aizawa S., Shimizu H., Hayakawa S., Ushijima H. Diversity of human parechovirus in infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2014–2016. *Infection, Genetics and Evolution*, 2019, vol. 75, art. 104001. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104001

12. Babayan L. Acute intestinal infections of mixed etiology in children. *Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya* [Experimental and clinical gastroenterology], 2016, vol. 133, no. 9, pp. 66–70 (in Russian).

13. Polyakova N. V., Samoilovich E. O., Semeiko G. V., Biskina N. M., Klyuiko N. L. Rotavirus infection in the Republic of Belarus'. *Zdravookhranenie* [Healthcare], 2017, no. 7, pp. 12–19 (in Russian).

14. Glantz S. A. *Primer of Biostatistics.* New York, McGraw-Hill, 1997. 473 p.

15. Halasa N., Piya B., Stewart L. S., Rahman H., Payne D. C., Woron A. [et al.]. The changing landscape of pediatric viral enteropathogens in the post-rotavirus vaccine era. *Clinical Infectious Diseases*, 2021, vol. 72, no. 4, pp. 576–585. https://doi.org/10.1093/cid/ciaa100

16. Lee B., Damon C. F., Platts-Mills J. A. Pediatric acute gastroenteritis associated with adenovirus 40/41 in low-income and middle-income countries. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 2020, vol. 33, no. 5, pp. 398–403. https://doi.org/10.1097/qco.0000000000000663

17. Pratte-Santos R., Miagostovich M. P., Fumian T. M., Maciel E. L., Martins S. A., Cassini S. T., Keller R. High prevalence of enteric viruses associated with acute gastroenteritis in pediatric patients in a low-income area in Vitoria, Southeastern Brazil. *Journal of Medical Virology*, 2019, vol. 91, no. 5, pp. 744–750. https://doi.org/10.1002/jmv.25392

18. Pijnacker R., van Pelt W., Vennema H., Kortbeek L. M., Notermans D. W., Franz E., Mughini-Gras L. Clinical relevance of enteropathogen co-infections in preschool children-a population-based repeated cross-sectional study. *Clinical Microbiology and Infection*, 2019, vol. 25, no. 8, pp. 1039.e7–1039.e13. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.11.029

19. Tandukar S., Sherchand J., Karki S., Malla B., Shrestha R. G., Bhandari D., Thakali O., Haramoto E. Co-infection by waterborne enteric viruses in children with gastroenteritis in Nepal. *Healthcare (Basel)*, 2019, vol. 7, no. 1, art. 9. https://doi.org/10.3390/healthcare7010009

20. Mengelle C., Mansuy J. M., Prere M. F., Grouteau E., Claudet I., Kamar N. [et al.]. Simultaneous detection of gastro-intestinal pathogens with a multiplex Luminex-based molecular assay in stool samples from diarrhoeic patients. *Clinical Microbiology and Infection*, 2013, vol. 19, no. 10, pp. E458–E465. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12255

Информация об авторах

Поклонская Наталья Владимировна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0001-6431-5050. E-mail: labsanvir@ gmail.com

Амвросьева Тамара Васильевна – д-р мед. наук, профессор, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0001-7309-152X. E-mail: amvrosieva@gmail.com

Колтунова Юлия Борисовна – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0002-6488-9422. E-mail: labsanvir@gmail.com

Шилова Юлия Александровна – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0002-4521-6599. E-mail: labsanvir@gmail.com

Бельская Инна Валерьевна – науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0003-4044-6827. E-mail: labsanvir@gmail.com

Information about the authors

Natalia V. Paklonskaya – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0001-6431-5050. E-mail: labsanvir@gmail.com

Tamara V. Amvrosyeva – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Laboratory. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0001-7309-152X. E-mail: amvrosieva@gmail.com

Yulia B. Kaltunova – Junior Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0002-6488-9422. E-mail: labsanvir@gmail.com

Yulia A. Shilava – Junior Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0002-4521-6599. E-mail: labsanvir@gmail.com

Ina V. Belskaya – Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0003-4044-6827. E-mail: labsanvir@gmail.com

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 618.19-006.6:57.085.23]-097.1
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-168-176

Поступила в редакцию 16.02.2024
Received 16.02.2024

А. Н. Шклярова[1], И. А. Челнокова[1], Э. А. Надыров[2], Ю. А. Крылов[3], М. Н. Стародубцева[2]

[1]Институт радиобиологии НАН Беларуси, Гомель, Республика Беларусь
[2]Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Республика Беларусь
[3]Институт повышения квалификации и переподготовки кадров Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь, Минск, Республика Беларусь

МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ РАЗНЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ПОДТИПОВ В РЕАКЦИИ С АНТИТЕЛАМИ ПРОТИВ CD109 АНТИГЕНА

Аннотация. Цитоскелет принимает участие в ключевых событиях в клетках при онкогенезе и реакции раковых клеток на терапевтические факторы. Состояние и структура актинового цитоскелета оказывают существенное влияние на механическое поведение раковых клеток, формируя основные черты их механического фенотипа.

С помощью методов атомно-силовой и флуоресцентной микроскопии нами изучены структура актинового цитоскелета и механические свойства клеток рака молочной железы разных молекулярно-биологических подтипов (гормон-чувствительного, линия ZR-75, и тройного негативного, линия BT-20) при взаимодействии клеток с антигеном CD109 – ингибитором TGF-β-сигнального пути. Установлено, что использование антител для иммобилизации антигена CD109 вызывает значительные изменения пространственной организации актинового цитоскелета, жесткости и адгезионных свойств поверхности клеток обеих клеточных линий. Из-за различий в структуре актинового цитоскелета изменение параметров механических свойств клеток разных молекулярно-биологических подтипов рака и реализация механизмов TGF-β-сигнального пути в них при связывании с антителами против антигена CD109 происходит по-разному. Полученные данные открывают новые перспективы для разработки и оценки эффективности противораковых средств.

Ключевые слова: клетки рака молочной железы, клеточная линия BT-20, клеточная линия ZR-75, CD109, механические свойства, атомно-силовая микроскопия, актиновый цитоскелет

Для цитирования: Механические свойства клеток рака молочной железы разных молекулярно-биологических подтипов в реакции с антителами против CD109 антигена / А. Н. Шклярова [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2024. – Т. 21, № 2. – С. 168–176. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-168-176

Nastassia M. Shkliarava[1], Irina A. Chelnokova[1], Eldar A. Nadyrov[2], Andrey Yu. Krylov[3], Maria N. Starodubtseva[2]

[1]Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus
[2]Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus
[3]State Forensic Examination Committee of the Republic of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

MECHANICAL PROPERTIES OF BREAST CANCER CELLS OF DIFFERENT MOLECULAR BIOLOGICAL SUBTYPES IN REACTION WITH ANTIBODIES AGAINST CD109 ANTIGEN

Abstract. The cytoskeleton is a participant in key cell events in oncogenesis and the reaction of cancer cells to therapeutic factors. The state and structure of the actin cytoskeleton contributes significantly to the mechanical behavior of cancer cells, forming the main features of their mechanical phenotype.

In the work, using atomic-force microscopy and fluorescent microscopy, we studied the changes in the structure of the actin cytoskeleton and parameters of the mechanical properties of breast cancer cells of different molecular biological subtypes (hormone-sensitive, line ZR-75, and triple-negative, BT-20 line, subtypes) when cells interact with the CD109 antigen, a TGF-β signaling pathway inhibitor. The use of antibodies for immobilizing the CD109 antigen has been shown to cause significant changes in the spatial organization of the actin cytoskeleton, stiffness and adhesive properties of the cell surface of both cell lines. Because of differences in the structure of the actin cytoskeleton, changes in the mechanical properties of the cells of different molecular biological breast cancer subtypes and the implementation of the TGF-β signaling pathway in these cells when binding to antibodies against the CD109 antigen occur in different ways. The obtained data open new perspectives for the development and evaluation of the effectiveness of anticancer drugs.

Keywords: breast cancer cells, BT-20 cell line, ZR-75 cell line, CD109, mechanical properties, atomic force microscopy, actin cytoskeleton

For citation: Shkliarava N. M., Chelnokova I. A., Nadyrov E. A., Krylov A. Yu., Starodubtseva M. N. Mechanical properties of breast cancer cells of different molecular biological subtypes in reaction with antibodies against CD109 antigen. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2024, vol. 21, no. 2, pp. 168–176 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-168-176

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) занимает ведущее место в структуре онкологической заболеваемости среди женского населения во всех экономически развитых странах. Несмотря на совершенствование подходов к диагностике и лечению, в 2020 г. во всем мире зарегистрировано более 2,26 млн случаев РМЖ, что составляет 11,7 % от всех случаев злокачественных новообразований у лиц обоего пола [1].

Молекулярно-генетическая классификация РМЖ свидетельствует о том, что разные его подтипы характеризуются специфической биологией, прогнозом, а также предусматривают индивидуальный подбор терапии. Пациентки с люминальным подтипом опухоли А имеют самую высокую общую выживаемость, тройной-негативный и HER-2-позитивный подтипы характеризуются плохим прогнозом и наименьшей выживаемостью, люминальный подтип опухоли В занимает промежуточное место [2].

Биофизические исследования раковых клеток помогают установить связь между механикой клеток и особенностями их биологических свойств. Атомно-силовая микроскопия (АСМ) является одним из эффективных биофизических методов изучения структурных и механических свойств раковых клеток [3–8]. Методы картирования наномеханических свойств поверхности объекта, например режим Bruker Tapping PeakForce QNM, позволяют измерить структурные, упругие и адгезионные свойства поверхностного слоя клеток и на основании этого определить их биологический потенциал (способность к инвазии, метастазированию и др.). Цитоскелет является основным компонентом клетки, определяющим ее механическую устойчивость и деформацию в ответ на внешние раздражители. Цитоскелет состоит из микрофиламентов, микротрубочек и промежуточных филаментов. Актиновый цитоскелет является важным участником различных клеточных событий: клеточной мобильности, клеточной дифференцировки, везикулярного транспорта, клеточной пролиферации и гибели клеток. Перестройки актинового цитоскелета сопровождают эпителиально-мезенхимальный переход в раковых клетках, характерный для малигнизации опухоли [9].

Согласно данным, полученным в результате мета-анализа последних исследований, антиген CD109 (гликозилфосфатидилинозитол-заякоренный белок поверхности клетки) может быть полезным в качестве прогностического биомаркера у больных раком. CD109 является потенциальным регулятором многих сигнальных путей, включая TGF-β, YAP/TAZ, EGFR/AKT/mTOR, EGFR и STAT сигнальные пути. Повышенная экспрессия антигена CD109 имеет место при многих видах рака. CD109 является как белком, выделяемым клетками, так и маркером поверхности клетки. Уровни CD109 в культивируемых плоскоклеточных раковых клетках имеют обратную корреляцию с активацией TGF-β сигнализации, эпителиально-мезенхимальным переходом, миграцией и инвазией. Известно, что CD109 антиген экспрессируется в высоких концентрациях при одном из агрессивных подтипов тройного негативного РМЖ, что считается потенциальным биомаркером для прогрессирования РМЖ [10, 11].

Клеточная линия ZR-75 является одним из подтипов РМЖ, характеризующегося наличием на клеточной поверхности рецепторов эстрогена (прогестерона) и отсутствием рецепторов к HER2. Эти клетки отличаются хорошо развитой структурой цитоскелета и плотными межклеточными соединениями. Клеточная линия BT-20 является репрезентативной для тройного негативного РМЖ подтипа А, так как не имеет рецепторов ни для одного из вышеуказанных соединений. Эти клетки обогащены базальными маркерами, в том числе цитокератинами, и не имеют виментинового цитоскелета [12]. Сравнительный анализ механических параметров раковых клеток разных молекулярно-биологических подтипов дает возможность лучше понять особенности их клеточного взаимодействия, миграции и метастазирования, что в перспективе позволит дополнить стратегии лечения РМЖ.

Целью исследования являлось выявление различий в механических свойствах клеток рака молочной железы разных молекулярно-биологических подтипов при связывании клеток с антителами против антигена CD109.

Материалы и методы исследования. Клеточные линии РМЖ ZR-75 и BT-20 получены из Республиканского научно-практического центра онкологии и медицинской радиологии имени Н. Н. Александрова. Для культивирования клеток использовали среду RPMI-1640 (Capricorn

Scientific, Германия), содержащую 10 % бычьей фетальной сыворотки и 1%-ный раствор антибиотика/антимикотика (Capricorn Scientific, Германия) для линии ZR-75, и среду DMEM/Ham-F-12 (Capricorn Scientific, Германия), содержащую 10 % бычьей фетальной сыворотки со смесью антибиотиков – пенициллина, стрептомицина и амфотерицина B (Capricorn Scientific, Германия) для линии BT-20. Клетки высаживали в чашки Петри в количестве 50 тыс. с дальнейшей инкубацией 24 ч в инкубаторе.

Для иммунофлуоресценции клетки в нативном состоянии фиксировали раствором 3,7%-ного формальдегида, приготовленным в фосфатно-солевом буфере в течение 10 мин при комнатной температуре, а затем двукратно отмывали фосфатно-солевым буфером. Для пермеабилизации использовали раствор клеточного детергента (0,1%-ный Triton) в течение 5 мин и дважды отмывали раствором фосфатно-солевого буфера. Для окраски F-актина клетки инкубировали с фаллоидином, конъюгированным с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, США) (1 : 40), в течение 20 мин при комнатной температуре и дважды промывали фосфатно-солевым буфером. Для окраски виментина использовали первичные антитела против виментина человека (1 : 50) (Abcam, Великобритания), инкубировали в течение суток при 4 °C и дважды промывали фосфатно-солевым буфером. В качестве вторичного антитела использовали козий антикроличий IgG (H + L) с перекрестно адсорбированным вторичным антителом Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, США), с которым клетки инкубировали 3 ч (1 : 500) при 4 °C, а затем промывали фосфатно-солевым буфером. Ядра клеток окрашивали монтирующей средой с 4′,6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI, Abcam, Великобритания). Иммунофлуоресценцию регистрировали с помощью инвертированного светового микроскопа (Axio Observer 3, Zeiss, Германия) с 40-кратным увеличением объектива, используя светодиодный источник света Colibri 3 для многоканальной флуоресценции (λ_{ex} = 353 нм и λ_{em} = 465 нм для DAPI; λ_{ex} = 493 нм и λ_{em} = 517 нм для AF488). Для записи изображений использовали программу Zen Blue.

Для проведения АСМ клетки фиксировали 2%-ным раствором глутарового альдегида, приготовленным на фосфатно-солевом буфере в течение 20 мин, а затем отмывали фосфатно-солевым буфером (pH = 7,4) и дистиллированной водой. Образцы высушивали ламинарным потоком воздуха в комнатных условиях. Сканирование образцов в воздушной среде проводили с помощью атомно-силового микроскопа BioScope Resolve (Bruker, США) в режиме записи MIROview Peak Force QNM Air иглой-зондом SCANASYST AIR, изготовленной из нитрида кремния (SiN) (резонансная частота 70 кГц, радиус закругления острия 2 нм, жесткость консоли 0,4 Н/м). Запись малых участков поверхности клеток над ядром размером 1 × 1 мкм^2 проводили с разрешением 256 × 256 пикселей, скоростью 0,3 Гц, частотой 0,5 кГц и пиковой нагрузкой 290 нН. Структурные и механические свойства клеток оценивали по полученным АСМ-изображениям, используя программу Nanoscope Analysis 1.8. Для оценки силы адгезии ($F_{a)}$ использовали канал Adhesion, а для модуля упругости (E) – канал DMT-Modulus.

Статистическую обработку полученных данных и построение графиков осуществляли с помощью программы OriginPro, version 2019b, и статистического онлайн-калькулятора Statistics Kingdom (Мельбурн, Австралия). При статистическом анализе данных были использованы: тест Шапиро–Уилка на нормальность распределения и U-критерий Манна–Уитни для сравнительного анализа.

Результаты и их обсуждение. По данным, представленным на сайте (https://www.proteinatlas.org/), у двух изучаемых линий имеются поверхностные антигены CD109, экспрессируемые в клетках с невысоким в сравнении с некоторыми другими клеточными линиями РМЖ уровнем. Антиген CD109 является ингибитором TGF-β-сигнального пути, который рассматривается в качестве основного механизма эпителиально-мезенхимального перехода, характерного для агрессивных типов рака. Согласно полученным нами данным, клетки обеих линий существенно меняют свои морфологические, механические характеристики и пространственное распределение структур кортикального актинового цитоскелета в ответ на введение антител против антигена CD109. На рис. 1 представлены двухмерные топографические АСМ-изображения целых клеток клеточных линий двух молекулярно-биологических подтипов РМЖ.

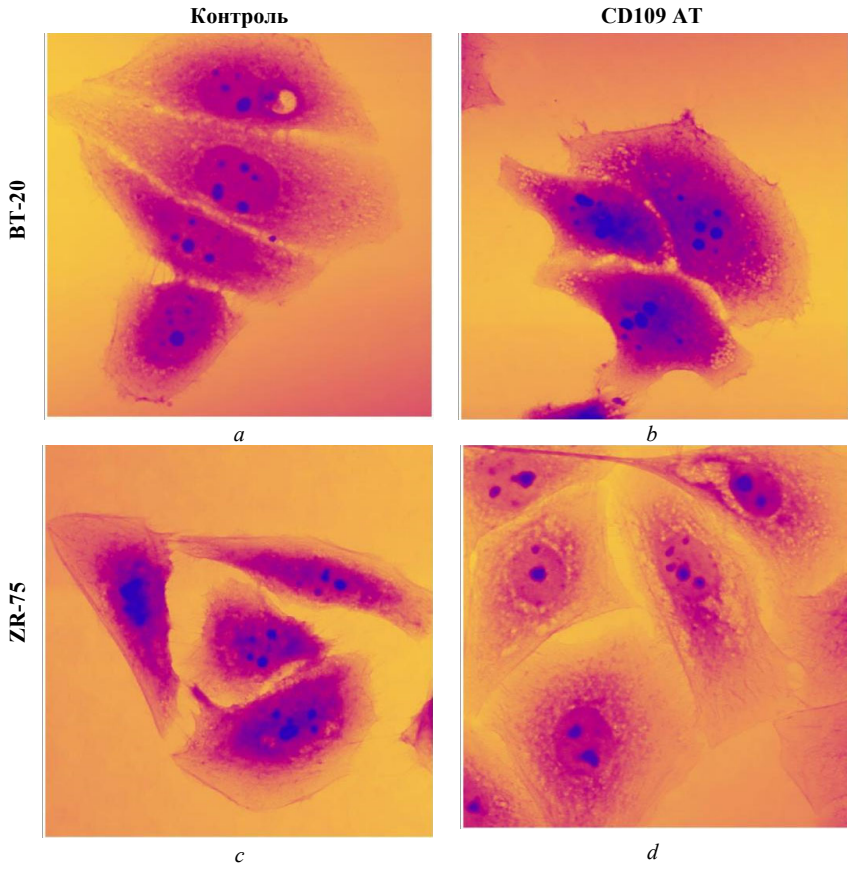


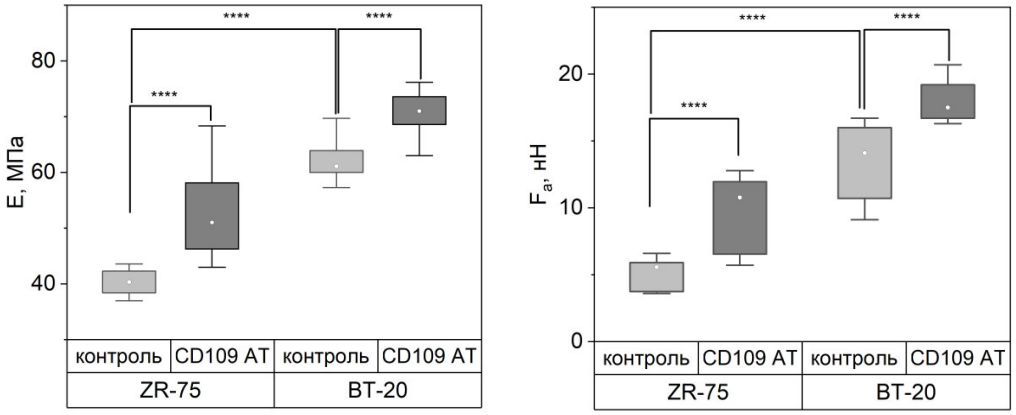
Рис. 1. Топографические АСМ-изображения клеток РМЖ разных молекулярно-биологических подтипов контрольных образцов и образцов после взаимодействия с антителами против антигена CD109 (*a–d*). Размеры области сканирования 94,7 × 94,7 мкм^2, разрешение 512 × 512 пикселей. Изображения искусственно окрашены с помощью фильтров изображения для лучшей визуализации морфологии клеток

Fig. 1. Topographic AFM images of breast cancer cells of different molecular biological subtypes of control samples and samples after interacting with antibodies against the CD109 antigen (*a–d*). The scan size is 94.7 × 94.7 μm^2, the resolution is 512 × 512 pixels. Images are artificially colored using image filters to better visualize the cell morphology

При введении антител против антигена CD109 поверхностный слой клеток становится значительно жестче (рис. 2, *a*). Так, для клеток линии ZR-75 поверхностный слой увеличил жесткость в 1,26 (1,16; 1,42) раза, а для клеток линии BT-20 – в 1,15 (1,09; 1,20) раза (различие между линиями статистически значимо, $p < 10^{-6}$, *U*-критерий Манна–Уитни).

Адгезионные свойства клеточной поверхности усилились также после реакции клеток с антителами против антигена CD109. Так, для клеток линии ZR-75 сила адгезии увеличилась в 1,89 (1,33; 2,22) раза, а для клеток линии BT-20 – в 1,26 (1,1; 1,64) раза (различия между линиями статистически значимы, $p < 10^{-6}$, *U*-критерий Манна–Уитни). При этом имеются различия в механических параметрах, оцененных для контрольных клеток РМЖ разных молекулярно-биологических подтипов. Так, в контрольных выборках (без обработки клеток антителами) показатели модуля упругости и силы адгезии, характерные для поверхности клеток линии BT-20, существенно превышают их значения для клеток линии ZR-75 (рис. 2).

Как установлено нами ранее, клетки линии BT-20, в отличие от клеток линии ZR-75, имеют узкий и плотный слой кортикального актинового цитоскелета, что делает их похожими на мягкий объект с жестким поверхностным слоем [8]. После реакции клеток линии BT-20 с антителами против антигена CD109 имеет место реорганизация структуры актинового цитоскелета с формированием зоны повышенной плотности в очень узком примембранном слое (рис. 3). Для клеток линии ZR-75 характерно более равномерное распределение структур актинового цитоскелета. Помимо этого, клетки в перинуклеарной области имеют хорошо развитый виментиновый



a *b*

Рис. 2. Влияние антител против антигена CD109 на механические параметры (*a, b*) участков поверхности клеток разных молекулярно-биологических подтипов РМЖ. Данные представлены в виде медианы, интерквартильного интервала, максимального и минимального значений. **** – $p < 10^{-6}$, *U*-критерий Манна–Уитни

Fig. 2. Effect of anti-CD109 antibodies on the mechanical parameters (*a, b*) of cell surface areas of different molecular biological subtypes of breast cancer. Data are presented as median, interquartile range, maximum and minimum values. **** – $p < 10^{-6}$, Mann–Whitney *U* test

цитоскелет. При реакции клеток линии ZR-75 с антителами против антигена CD109 актиновый цитоскелет претерпевает изменения в более глубоких областях и затрагивает более объемную область клеток (рис. 3).

Ядрышки клеток, как известно из данных литературы, одними из первых реагируют на сигналы стресса, связанные с факторами роста [13]. При этом клетки наращивают способность синтезировать белки, чтобы удовлетворить повышенные потребности в белках во время роста и пролиферации. Таким образом, по размеру и числу ядрышек можно судить об опухолевой активности. Нами изучены структуры ядер контрольных образцов клеток РМЖ и после их взаимодействия с антителами против антигена CD109. На рис. 4 представлены АСМ-изображения участков поверхности клеток двух изучаемых клеточных линий над ядром.

В отличие от клеток линии BT-20, в клетках линии ZR-75 обнаружено изменение размеров ядрышек после взаимодействия клеток с антителами против антигена CD109 (рис. 4, *i*, *j*). На гистограмме распределения диаметра ядрышек заметно появление дополнительного пика в области больших значений (рис. 4, *i*). Ядрышки клеток ZR-75 становятся неоднородными по размеру после активации TGF-β-сигнального пути при использовании антител против антигена CD109.

По данным литературы, роль сигнального пути с участием TGF-β в развитии рака не однозначна. На раннем этапе малигнизации этот путь способствует подавлению пролиферации клеток, в то время как на более поздних стадиях он стимулирует эпителиально-мезенхимальный переход в клетках. Полагают, что механизмы TGF-β-зависимой клеточной сигнализации могут являться ключевым фактором в устойчивости рака к химио- и иммунотерапии.

TGF-β-зависимая клеточная сигнализация вызывает изменение структур актинового цитоскелета и клеточных контактов, что способствует разрыванию клетками карциномы эпителиального слоя и их миграции в окружающие ткани. TGF-β может быстро индуцировать полимеризацию актина в примембранных областях клеток. Вследствие TGF-β-индуцированной перестройки (ремоделирования) цитоскелета в раковых клетках образуются стрессовые волокна, влияющие на форму и функцию клеток и способствующие инвазии раковых клеток и увеличению их жесткости [14].

Несмотря на то что обе клеточные линии характеризуются небольшим уровнем экспрессии антигена CD109, введение антител против этого антигена вызывает значительные изменения пространственной организации актинового цитоскелета, жесткости и адгезионных свойств поверхности клеток. Это указывает на важность TGF-β-сигнального пути в качестве мишени для модулирования состояния клеток РМЖ данных молекулярно-биологических подтипов. Из-за различий в структуре актинового цитоскелета в разных подтипах клеток РМЖ изменение их

свойств при связывании с антителами против антигена CD109 и реализация механизмов TGF-β-сигнального пути в этих клетках происходят по-разному. В связи с аномальной структурой актинового цитоскелета клеток линии BT-20 проведение TGF-β-сигнала к ядру клеток в глубоких слоях может быть нарушено, в то время как хорошо развитые структуры их кортикального цитоскелета способствуют более выраженному формированию структур края клеток (инвадоподий)

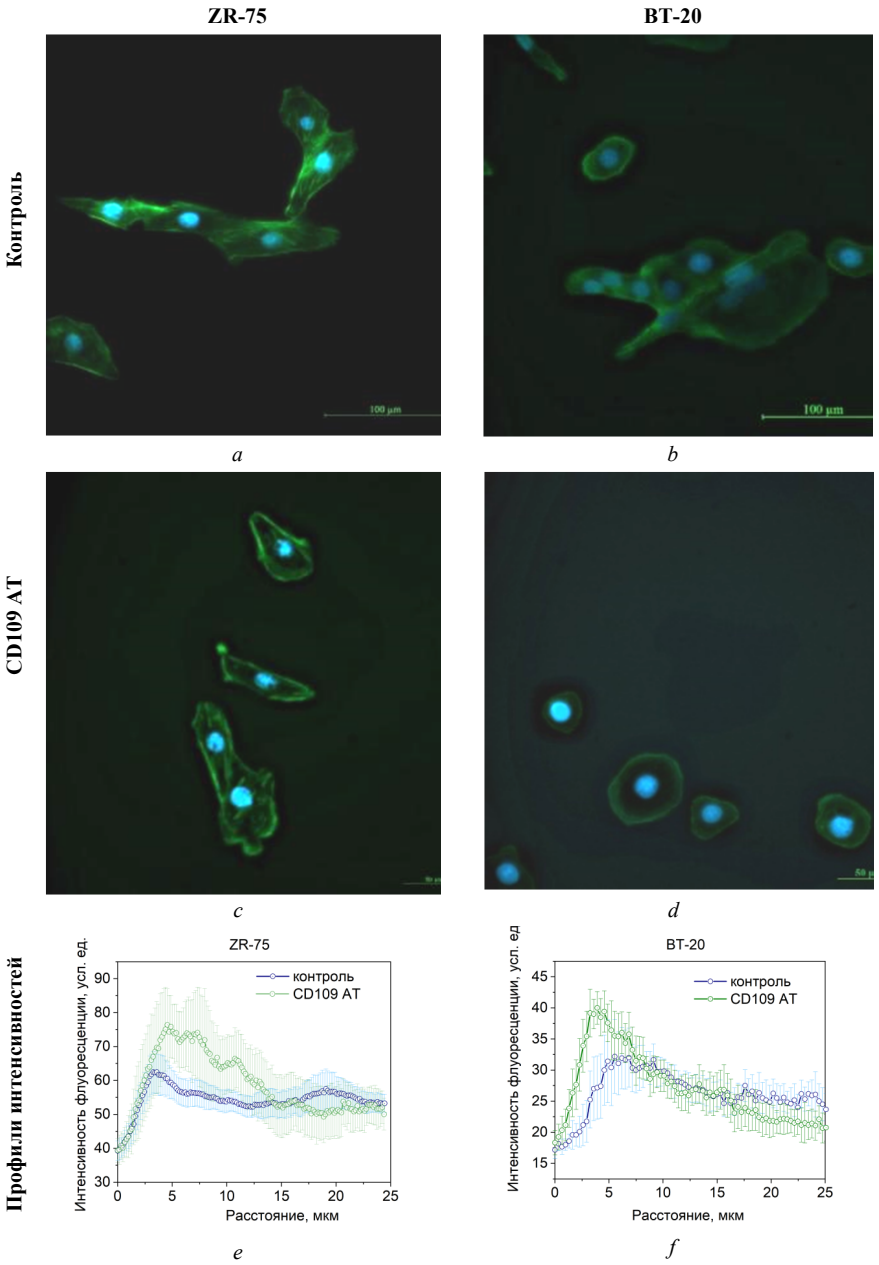


Рис. 3. Влияние антител против антигена CD109 на пространственную структуру актинового цитоскелета клеток РМЖ разных молекулярно-биологических подтипов (*a–d*). Флуоресцентные изображения клеток линий ZR-75 и BT-20 без и с инкубацией с антителами против антигена CD109 с использованием красителей AlexaFluor 488 Phalloidin и DAPI (*e*, *f*). Профили интенсивности флуоресценции красителя AlexaFluor 488 Phalloidin в направлении от края клетки к ядру для клеток двух клеточных линий контрольных образцов и после обработки антителами против антигена CD109. Данные представлены как M ± SD

Fig. 3. Effect of anti-CD109 antibodies on the spatial structure of the actin cytoskeleton of breast cancer cells of different molecular biological subtypes (*a–d*). Fluorescent images of cells of the ZR-75 and BT-20 lines without and with incubation with anti-CD109 antibodies using AlexaFluor 488 Phalloidin and DAPI dyes. (*e*, *f*). The profiles of the AlexaFluor 488 Phalloidin fluorescence intensity in the direction from the cell edge to the nucleus for cells of two cell lines of control samples and after treatment with anti-CD109 antibodies. Data are presented as M ± SD

и более плотным межклеточным контактам. Структура примембранного актинового цитоскелета клеток линии BT-20 значительно более чувствительна к химическим соединениям, разрушающим этот цитоскелет (например, к цитохалазину D), в сравнении со структурой актинового цитоскелета клеток линии ZR-75 [8]. Хорошо развитый цитоскелетный аппарат клеток линии ZR-75 позволяет этим клеткам эффективнее реагировать на запуск сигнальных путей с их поверхности

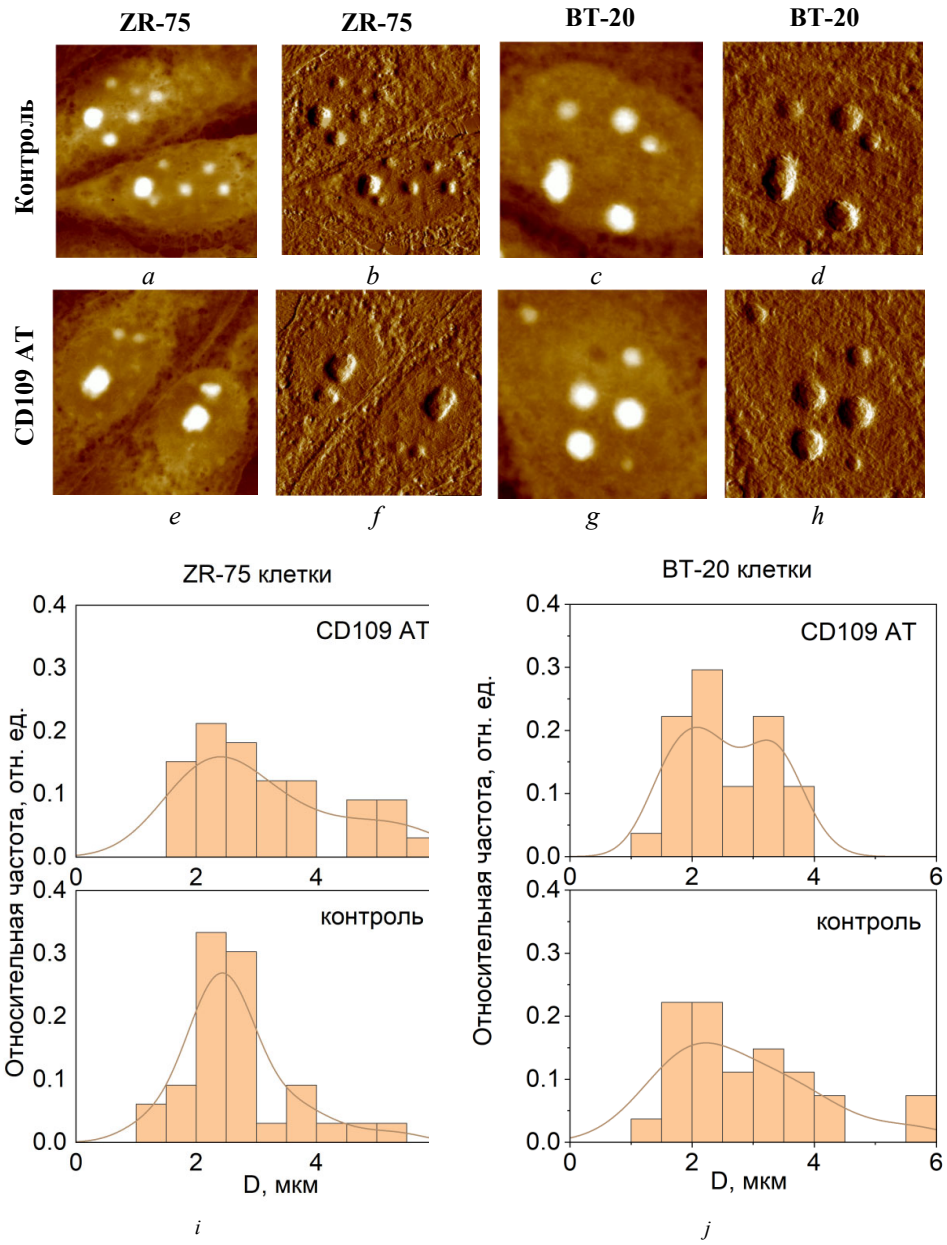


Рис. 4. АСМ-изображения участков поверхности клеток двух клеточных линий РМЖ контрольных образцов (*a*–*d*) и после взаимодействия с антителами против CD109 антигена (*e*–*h*). Топографические изображения (*a*, *c*, *e*, *g*), карты пиковой силы (Peak Force) (*b*, *d*, *f*, *h*). Размер области сканирования: 4 × 4 мкм^2 (*a*, *b*, *e*, *f*), 6 × 6 мкм^2 (*c*, *d*), 7 × 7 мкм^2 (*g*, *h*), разрешение – 256 × 256 пикселей (*i*, *j*). Распределение диаметров ядрышек клеток РМЖ разных клеточных линий и изменение этого распределения после взаимодействия клеток с антителами против антигена CD109

Fig. 4. AFM images of cell surface areas of two breast cancer cell lines of the control samples (*a*–*d*) and after interacting with the anti-CD109 antibodies (*e*–*h*). Topographic images (*a*, *c*, *e*, *g*), Peak Force maps (*b*, *d*, *f*, *h*). The scan sizes are 4 × 4 μm^2 (*a*, *b*, *e*, *f*), 6 × 6 μm^2 (*c*, *d*), 7 ×7 μm^2 (*g*, *h*), the resolution is 256 × 256 pixels (*i*, *j*). Distribution of the nucleolar diameters of breast cancer cells of different cell lines and its changes caused by the interaction of cells with anti-CD109 antibodies

(включая TGF-β-сигнальный путь), что может отражаться как на эффективности трансформации клеток при онкогенезе, так и на их чувствительности к химиотерапии.

Заключение. Полученные в работе данные подтверждают важность TGF-β-сигнального пути в качестве мишени для терапевтического воздействия на клетки РМЖ. Разработка лекарственных средств, направленных на подавление TGF-β-сигнального пути, в том числе с участием антигена CD109, может стать одним из приоритетных направлений разработки новых стратегий для таргетной терапии РМЖ. В то же время полученные данные о различиях в структуре актинового цитоскелета в клетках разных молекулярно-биологических подтипов РМЖ и разных механизмах ответа ядрышек клеток на блокирование антигена CD109 позволяют предложить новые направления терапевтических мероприятий и разработать дифференцированные подходы к моделям оценки эффективности противоопухолевых лекарственных средств.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (проект № М22-048 от 04.05.2022 г.).

Acknowledgements. The work was sponsored by the BRFFR (project No. M22-048 dated of 05.04.2022).

Список использованных источников

1. World Health Organization. Global Cancer Observatory [Electronic resource]. – Mode of access: https://gco.iarc.fr. – Date of access: 20.01.2024.

2. Клинический протокол «Алгоритмы диагностики и лечения злокачественных новообразований» [Электронный ресурс] // Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь. – Режим доступа: https://minzdrav.gov.by/upload/dadvfiles/9660.pdf. – Дата доступа: 22.10.2023.

3. Lekka, M. Applicability of applicability of atomic force microscopy to determine cancer-related changes in cells / M. Lekka // Phil. Trans. R. Soc. A. – 2022. – Vol. 380, art. 20210346. https://doi.org/10.1098/rsta.2021.0346

4. Samani, A. Elastic moduli of normal and pathological human breast tissues: An inversion-technique-based investigation of 169 samples / A. Samani, J. Zubovits, D. Plewes // Phys. Med. Biol. – 2007. – Vol. 52, N 6. – P. 1565–1576. https://doi.org/10.1088/0031-9155/52/6/002

5. Mohammadalipour, A. Deformability of breast cancer cells in correlation with surface markers and cell rolling / A. Mohammadalipour, M. M. Burdick, D. F. J. Tees // FASEB J. – 2018. – Vol. 32, N 4. – P. 1806–1817. https://doi.org/10.1096/fj.201700762R

6. An investigation of the viscoelastic properties and the actin cytoskeletal structure of triple negative breast cancer cells / J. Hu [et al.] // J. Mech. Behav. Biomed. Mater. – 2018. – Vol. 86. – P. 1–13. https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.05.038

7. Biophysical properties of human breast cancer cells measured using silicon MEMS resonators and atomic force microscopy / E. A. Corbin [et al.] // Lab. Chip. – 2015. – Vol. 15, N 3. – P. 839–847. https://doi.org/ 10.1039/c4lc01179a

8. Mechanical properties and nanomotion of BT-20 and ZR-75 breast cancer cells studied by atomic force microscopy and optical nanomotion detection method / M. N. Starodubtseva [et al.] // Cells. – 2023. – Vol. 12, N 19, art. 2362. https://doi.org/10.3390/cells12192362

9. Cytoskeletal dynamics in epithelial-mesenchymal transition: insights into therapeutic targets for cancer metastasis / A. Datta [et al.] // Cancers (Basel). – 2021. – Vol. 13, N 8, art. 1882. https://doi.org/10.3390/cancers13081882

10. Koh, H. Usefulness of CD109 expression as a prognostic biomarker in patients with cancer: A systematic review and meta-analysis / H. M. Koh, H. J. Lee, D. C. Kim // Medicine (Baltimore). – 2021. – Vol. 100, N 11, art. e25006. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000025006

11. CD109 is a potential target for triple-negative breast cancer / J. Tao [et al.] // Tumor Biol. – 2014. – Vol. 35, N 12. – P. 12083–12090. https://doi.org/10.1007/s13277-014-2509-5

12. Breast cancer cell line classification and its relevance with breast tumor subtyping / X. Dai [et al.] // J. Cancer. – 2017. – Vol. 8, N 16. – P. 3131–3141. https://doi.org/10.7150/jca.18457

13. Bahadori, M. New insights into connection of nucleolar functions and cancer / M. Bahadori // Tanaffos. – 2019. – Vol. 18, N 3. – P. 173–179.

14. Transforming growth factor-beta (TGF-β) signaling in cancer-A betrayal within / A. B. Baba [et al.] // Front Pharmacol. – 2022. – Vol. 13, art. 791272. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.791272

References

1. *World Health Organization. Global Cancer Observatory.* Available at: https://gco.iarc.fr (accessed 20.01.2024).

2. Clinical protocol “Algorithms for the diagnosis and treatment of malignant neoplasms”. *National legal Internet portal of the Republic of Belarus*. Available at: https://minzdrav.gov.by/upload/dadvfiles/9660.pdf (accessed 22.10.2023) (in Russian).

3. Lekka M. Applicability of applicability of atomic force microscopy to determine cancer-related changes in cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, A, 2022, vol. 380, art. 20210346. https://doi.org/10.1098/rsta.2021.0346

4. Samani A., Zubovits J., Plewes D. Elastic moduli of normal and pathological human breast tissues: An inversion-technique-based investigation of 169 samples. *Physics in Medicine and Biology*, 2007, vol. 52, no. 6, pp. 1565–1576. https://doi.org/10.1088/0031-9155/52/6/002

5. Mohammadalipour A., Burdick M. M., Tees D. F. J. Deformability of breast cancer cells in correlation with surface markers and cell rolling. *FASEB Journal*, 2018, vol. 32, no. 4, pp. 1806–1817. https://doi.org/10.1096/fj.201700762R

6. Hu J., Zhou Y., Obayemi J. D., Du J., Soboyejo W. O. An investigation of the viscoelastic properties and the actin cytoskeletal structure of triple negative breast cancer cells. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2018, vol. 86, pp. 1–13. https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.05.038

7. Corbin E. A., Kong F., Lim C. T., King W. P., Bashir R. Biophysical properties of human breast cancer cells measured using silicon MEMS resonators and atomic force microscopy. *Lab on a Chip*, 2015, vol. 15, no. 3, pp. 839–847. https://doi.org/10.1039/c4lc01179a

8. Starodubtseva M. N., Shkliarava N. M., Chelnokova I. A., Villalba M. I., Krylov A. Y., Nadyrov E. A., Kasas S. Mechanical properties and nanomotion of BT-20 and ZR-75 breast cancer cells studied by atomic force microscopy and optical nanomotion detection method. *Cells*, 2023, vol. 12, no. 19, art. 2362. https://doi.org/10.3390/cells12192362

9. Datta A., Deng S., Gopal V., Yap K. C., Halim C. E., Lye M. L. [et al.]. Cytoskeletal dynamics in epithelial-mesenchymal transition: insights into therapeutic targets for cancer metastasis. *Cancers (Basel)*, 2021, vol. 13, no. 8, art. 1882. https://doi.org/10.3390/cancers13081882

10. Koh H. M., Lee H. J., Kim D. C. Usefulness of CD109 expression as a prognostic biomarker in patients with cancer: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 2021, vol. 100, no. 11, art. e25006. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000025006

11. Tao J., Li H., Li Q., Yang Y. CD109 is a potential target for triple-negative breast cancer. *Tumor Biology*, 2014, vol. 35, no. 12, pp. 12083–12090. https://doi.org/10.1007/s13277-014-2509-5

12. Dai X., Cheng H., Bai Z., Li J. Breast cancer cell line classification and its relevance with breast tumor subtyping. *Journal of Cancer*, 2017, vol. 8, no. 16, pp. 3131–3141. https://doi.org/10.7150/jca.18457

13. Bahadori M. New insights into connection of nucleolar functions and cancer. *Tanaffos*, 2019, vol. 18, no. 3, pp. 173–179.

14. Baba A. B., Rah B., Bhat G. R., Mushtaq I., Parveen S., Hassan R., Hameed Zargar M., Afroze D. Transforming growth factor-beta (TGF-β) signaling in cancer-A betrayal within. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, vol. 13, art. 791272. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.791272

Информация об авторах

Шклярова Анастасия Николаевна – мл. науч. сотрудник. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, г. Гомель, Республика Беларусь). http://orcid.org/0000-0002-6365-3856. E-mail: nastenassa@mail.ru

Челнокова Ирина Александровна – науч. сотрудник. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, г. Гомель, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0002-6812-753X. E-mail: irenachelnokova@gmail.com

Надыров Эльдар Аркадьевич – канд. мед. наук, доцент. Гомельский государственный медицинский университет (ул. Ланге, 5, 246000, г. Гомель, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0002-0896-5611. E-mail: nadyrov19621@gmail.com

Крылов Андрей Юрьевич – канд. мед. наук, доцент, заведующий кафедрой. Институт повышения квалификации и переподготовки кадров Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь (пр-т Партизанский, 2/5-3, 220033, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail:andrei.krilou@gmail.com

Стародубцева Мария Николаевна – д-р биол. наук, доцент. Гомельский государственный медицинский университет (ул. Ланге, 5, 246000, г. Гомель, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0002-6956-9014. E-mail: maria.n.starodubtseva@gmail.com

Information about the authors

Nastassia M. Shkliarava – Junior Researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyuninski Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). http://orcid.org/0000-0002-6365-3856. E-mail: anshkliarava@ gmail.com

Irina A. Chelnokova – Researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyuninski Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0002-6812-753X. E-mail: irenachelnokova@gmail.com

Eldar A. Nadyrov – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Gomel State Medical University (5, Lange Str., 246000, Gomel, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0002-0896-5611. E-mail: nadyrov19621@gmail.com

Andrey Yu. Krylov – Ph. D. (Med.), Associate Professor, Head of the Department. State Forensic Examination Committee of the Republic of Belarus (2/5-3, Partizanskii Ave., 220033, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: andrei.krilou@gmail.com

Maria N. Starodubtseva – D. Sc. (Biol.), Associate Professor. Gomel State Medical University (4, Fedyuninski Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0002-6956-9014. E-mail: maria.n.starodubtseva@gmail.com