



Республиканское научно-исследовательское
унитарное предприятие
«Институт биохимии биологически
активных соединений
Национальной академии наук Беларуси»

ISSN 2957-7349 (Print)
ISSN 2960-2327 (Online)

БИОХИМИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY

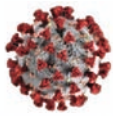


TOM / VOL. 3

1(4)2024



Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие
«ИНСТИТУТ БИОХИМИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»



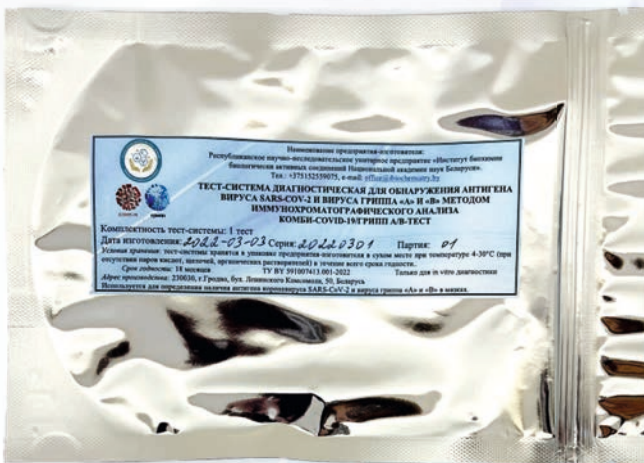
COVID-19



грипп

Тел.: +375152559075, e-mail: office@ibiochemistry.by

ТЕСТ-СИСТЕМА ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ АНТИГЕНОВ ВИРУСА SARS-COV-2 И ВИРУСОВ ГРИППА «А» И «В» МЕТОДОМ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА КОМБИ-COVID-19/ГРИПП А/В-ТЕСТ



Комплектность тест-системы: 1 тест

Условия хранения: тест-системы хранятся в упаковке предприятия-изготовителя в сухом месте при температуре +4...+30 °С (при отсутствии паров кислот, щелочей, органических растворителей) в течение всего срока годности.

Срок годности: 18 месяцев

ТУ BY 591007413.001-2023

Только для *in vitro* диагностики

Используется для определения наличия антигена коронавируса SARS-CoV-2 и вируса гриппа «А» и «В» в мазках



Адрес производства:

230030, г. Гродно,
б-р Ленинского Комсомола, 50,
Республика Беларусь

БИОХИМИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

БІАХІМІЯ І МАЛЕКУЛЯРНАЯ БІЯЛОГІЯ

ISSN 2957-7349 (Print)
ISSN 2960-2327 (Online)



РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ

Основан
в 2022 году

Учредитель

Республиканское научно-исследовательское
унитарное предприятие
«Институт биохимии биологически
активных соединений
Национальной академии наук Беларуси»

**Журнал входит в Перечень
научных изданий Республики Беларусь
для опубликования результатов
диссертационных исследований**

*Издано при финансовой поддержке
Белорусского республиканского фонда
фундаментальных исследований*

Адрес редакции:

пл. Антония Тызенгауза, 7,
230023, г. Гродно, Республика Беларусь,
Институт биохимии биологически
активных соединений НАН Беларуси,
тел.: +375 152 55-87-78,
e-mail: journal@ibiochemistry.by

Официальный сайт журнала
<https://ibiochemistry.by>

Подписные индексы:

для индивидуальных подписчиков **И**
для ведомственных подписчиков **В**

Отпечатано в типографии УП «ИВЦ Минфина»
Подписано в печать 07.04.2024.
Формат 60×84/8. Бумага офсетная.
Гарнитура TimesNewRoman. Печать цифровая.
Усл. печ. л. 30,69. Уч.-изд. л. 28,71.
Тираж 75 экз. Заказ 170.
ЛП № 02330/89 от 3 марта 2014 г.
Ул. Кальварийская, 17, 220004, г. Минск.

В номере:

Экспериментальные
и клинические исследования

Обзоры

Ученые Беларуси

Том 3

1 (4) / 2024

Biochemistry and Molecular Biology

ISSN 2957-7349 (Print)

ISSN 2960-2327 (Online)



PEER-REVIEWED
SCIENTIFIC AND PRACTICAL
JOURNAL

*Founded
in 2022*

Founder

Republican Scientific Research
Unitary Enterprise “Institute of Biochemistry
of Biologically Active Compounds
of the National Academy
of Sciences of Belarus”

**The Journal is included
in The List of Journals
for Publication of the Results of Dissertation
Research in the Republic of Belarus**

*Published with the financial support from
the Belarusian Republican Foundation
for Fundamental Research*

Address of the Editorial Office:

230023 Grodno, 7 Antoni Tyzenhauz Square,
Belarus Institute of Biochemistry
of Biologically Active Compounds of the National
Academy of Sciences of Belarus,
phone: +375 152 55-87-78,
e-mail: journal@ibiochemistry.by
Website – <https://ibiochemistry.by>

Subscription indexes

For individuals ①
For legal entities ②

Printed at UE “IVC Minfina”
It is sent of the press 07.04.2024
Format 60x84/8. Offset paper.
TimesNewRoman. Offset printing.
Printed pages 30,69.
Publisher’s signatures 28,71.
Circulation 75 copies. Order 170.
LP № 02330/89 of 3 March 2014
17, Kalvaryiskaya str., Minsk 220004

In this issue:

**Experimental
and Clinical Research**

Reviews

Scientists of Belarus

Vol. 3

1 (4) / 2024

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ / EDITORIAL BOARD

Кузнецов Олег Евгеньевич (*главный редактор*) – кандидат биологических наук, доцент, Директор Института биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси, Гродно, Беларусь

Мойсеёнок Андрей Георгиевич (*заместитель главного редактора*) – член-корреспондент Национальной академии наук Беларуси, доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом Института биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси, Гродно, Беларусь

Сутько Ирина Петровна (*ответственный секретарь*) – кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник Института биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси, Гродно, Беларусь

Гнедько Татьяна Васильевна – доктор медицинских наук, заместитель академика-секретаря Отделения медицинских наук Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Державец Лилия Александровна – доктор биологических наук, профессор, заведующий клинико-диагностической лабораторией Республиканского научно-практического центра онкологии и медицинской радиологии имени Н. Н. Александрова, Минская область, Беларусь

Заводник Илья Борисович – доктор биологических наук, профессор, профессор Гродненского государственного университета имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь

Капунникова Нина Павловна – доктор биологических наук, профессор, профессор Гродненского государственного университета имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь

Кильчевский Александр Владимирович – академик Национальной академии наук Беларуси, доктор биологических наук, профессор, заместитель Председателя Президиума Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Костиук Светлана Андреевна – доктор медицинских наук, профессор, профессор Института повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Беларусь

Макарчиков Александр Федорович – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой Гродненского государственного аграрного университета имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь

Надольник Лилия Ивановна – доктор биологических наук, доцент, заведующий отделом Института биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси, Гродно, Беларусь

Нефедов Леонид Иванович – доктор медицинских наук, профессор, профессор Гродненского государственного университета имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь

Островский Александр Александрович – доктор медицинских наук, профессор, руководитель группы функциональной морфологии Института биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси, Гродно, Беларусь

Хованская Галина Николаевна – кандидат медицинских наук, доцент, заместитель директора по научной работе Института биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси, Гродно, Беларусь

Хрусталёв Владислав Викторович – доктор биологических наук, доцент, заведующий кафедрой Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Беларусь

Чумак Анатолий Георгиевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

Шкуматов Владимир Макарович – член-корреспондент Национальной академии наук Беларуси, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией биохимии лекарственных препаратов учреждения БГУ «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем», Минск, Беларусь

Aleh Y. Kuzniatsou (*Editor-in-Chief*) – Ph. D. (Biology), Associate Professor, director of the Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Belarus

Andrey G. Moiseenok (*Associate Editor-in-Chief*) – Correspondent member of the National Academy of Sciences of Belarus, D. Sc. (Biology), Professor, Head of the Department of the Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Belarus

Iryna P. Sutsko (*Executive Editor*) – Ph. D. (Biology), Associate Professor, Senior Researcher of the Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Belarus

Tatyana V. Gnedko – D. Sc. (Medicine), Deputy Academic Secretary of the Department of Medical Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Liliya A. Derzhavets – D. Sc. (Biology), Professor, Head of the Laboratory of N. N. Alexandrov National Cancer Center of Belarus, Minsk District, Belarus

Ilya B. Zavodnik – D. Sc. (Biology), Professor, Professor of the Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Belarus

Nina P. Kanunnikava – D. Sc. (Biology), Professor, Professor of the Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Belarus

Alexander V. Kilchevskiy – Academician of the National Academy of Sciences of Belarus, D. Sc. (Biology), Professor, Deputy Chairman of the Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Svetlana A. Kostiuk – D. Sc. (Medicine), Professor, Professor of the Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Alexander F. Makarchikov – D. Sc. (Biology), Associate Professor, Head of the Department of the Grodno State Agrarian University, Grodno, Belarus

Liliya I. Nadolnik – D. Sc. (Biology), Associate Professor, Head of the Department of the Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Belarus

Leonid I. Nefedov – D. Sc. (Medicine), Professor, Professor of the Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Belarus

Aliaksandr A. Astrowski – D. Sc. (Medicine), Professor, Head of the Functional Morphology Group of the Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Belarus

Halina N. Khovanskaya – Ph. D. (Medicine), Associate Professor, Deputy Director for Research of the Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Belarus

Vladislav V. Khrustalev – D. Sc. (Biology), Associate Professor, Head of the Department of the Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Anatoly G. Chumak – D. Sc. (Biology), Professor, Head of the Department of the Belarusian State University, Minsk, Belarus

Vladimir V. Shkumatov – D. Sc. (Biology), Professor, Correspondent member of the National Academy of Sciences of Belarus, The Head of the laboratory of the Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University, Minsk, Belarus

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
EXPERIMENTAL AND CLINICAL RESEARCH

<p>О. Е. Кузнецов, В. М. Цыркунов МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПРОТЕИНОВ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА ПРИ РАКЕ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА, ОТЯГОЩЕННОГО МУТАЦИЯМИ ГЕНОВ (BRCA 1/2, HMSH2) И ДНК/РНК ВИРУСОВ</p>	9	<p>A. Kuzniatsou, V. Tsyrcunov MOLECULAR-BIOLOGICAL SIGNIFICANCE OF CELL CYCLE PROTEINS IN COLON CANCER BARGAINED BY GENE MUTATIONS (BRCA 1/2, hMSH2) AND DNA/RNA VIRUSES</p>
<p>Л. И. Надольник, В. Ч. Полубок, Р. Е. Лис ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА СТВОРОК ПЛОДОВ ФАСОЛИ ОБЫКНОВЕННОЙ (VALVAE FRUCTUUM PHASEOLI VULGARIS) НА ЛИПИДНЫЙ И УГЛЕВОДНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ У КРЫС ПРИ ДИАБЕТЕ II ТИПА</p>	22	<p>L. I. Nadolnik, V. Ch. Polubok, R. Ye Lis EFFECT OF BEAN FRUIT VALVE EXTRACT (VALVAE FRUCTUUM PHASEOLI VULGARES) ON LIPID AND CARBOHYDRATE METABOLISM IN TYPE 2 DIABETIC RATS</p>
<p>А. Д. Таганович, Н. Н. Ковганко, Ж. А. Рутковская, О. В. Готько, В. И. Прохорова БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ В ДООПЕРАЦИОННОЙ ОЦЕНКЕ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО</p>	29	<p>A. D. Tahanovich, M. M. Kauhanka, Zh. A. Rutkovskaya, O. V. Gotko, V. I. Prokhorova BIOCHEMICAL MARKERS IN PREOPERATIVE ASSESSMENT OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER PREVALENCE</p>
<p>Д. Н. Велеменчук, Т. В. Савицкая, А. В. Солнцева ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАЦИЙ ГЕНА GSK СРЕДИ ДЕТЕЙ С ФЕНОТИПИЧЕ- СКИМИ ПРОЯВЛЕНИЯМИ МОНОГЕННО- ГО САХАРНОГО ДИАБЕТА В РЕСПУБЛИ- КЕ БЕЛАРУСЬ</p>	37	<p>D. N. Velemianchuk, T. V. Savitskaya, A. V. Solntseva CHARACTERISTICS OF GCK GENE MUTATIONS AMONG CHILDREN WITH PHENOTYPICAL MANIFESTATIONS OF MONOGENIC DIABETES MELLITUS IN THE REPUBLIC OF BELARUS</p>
<p>А. В. Туманов, А. И. Марчик, В. Ч. Полубок, О. Б. Островская, А. Г. Шляхтун, А. А. Островский ВЛИЯНИЕ АЛКОГОЛЬНОГО АБСТИНЕНТНОГО СИНДРОМА НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ НЕЙРОНОВ И МИТОХОН- ДРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ ПРОИЗВОДНОГО ПЛАСТОХИНОНА</p>	42	<p>A. V. Tumanov, A. I. Marchik, V. Ch. Polubok, A. B. Astrowskaja, A. H. Shlyahtun, A. A. Astrowski THE EFFECT OF ALCOHOL WITHDRAWAL SYNDROME ON THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATE OF NEURONS AND MITOCHONDRIA OF THE RAT BRAIN AGAINST THE BACKGROUND OF ADMINISTRATION OF A PLASTOQUINONE DERIVATIVE</p>
<p>С. А. Костиук, Л. Ф. Можейко, Т. В. Пинчук, О. С. Полуян УРОВНИ НОРМАЛИЗОВАННОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ IL-1β, COL, MMP У ПАЦИЕНТОК С ЦЕРВИКАЛЬНЫМИ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫМИ ПОРАЖЕНИЯМИ КАК МАРКЕРЫ ТКАНЕВОЙ ДЕСТРУКЦИИ</p>	52	<p>S. A. Kostiuik, L. F. Mozheiko, T. V. Pinchuk, O. S. Poluyan LEVELS OF NORMALIZED EXPRESSION OF GENETIC DETERMINANTS IL-1β, COL, MMP IN PATIENTS WITH CERVICAL INTRAEPITHELIAL LESIONS AS MARKERS OF TISSUE DESTRUCTURE</p>

<p>А. А. Чиркин, О. М. Балаева-Тихомирова, Е. И. Качнельсон, Е. М. Дорошенко АНАЛИЗ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОФИЛЕЙ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ ДЛЯ ОБОСНОВАНИЯ ВЫБОРА МОДЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗМОВ</p>	60	<p>A. A. Chirkin, O. M. Balaeva-Tikhomirova, E. I. Katsnelson, E. M. Doroshenko ANALYSIS OF METABOLIC PROFILES OF FREE AMINO ACIDS FOR JUSTIFICATION FOR CHOICE OF MODEL ORGANISMS</p>
<p>Г. Н. Семенкова, И. Э. Адзерихо, Т. Э. Владимирская, Н. В. Амаэгбери, А. М. Устемчук, А. В. Жилкевич, А. В. Богданова, Т. А. Кулагова РОЛЬ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В РАЗВИТИИ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ</p>	67	<p>G. N. Semenkova, I. E. Adzerikho, T. E. Vladimirskaia, N. V. Amaegberi, A. M. Ustiamchuk, A. V. Zhilkevich, A. V. Bahdanava, T. A. Kulahava ROLE OF OXIDATIVE STRESS IN THE INFLAMMATION DEVELOPMENT IN PULMONARY ARTERIAL HYPERTENSION</p>
<p>В. Ч. Полубок, Е. М. Дорошенко, В. В. Виноградов, Л. И. Надольник ВЛИЯНИЕ КОМПОЗИЦИИ (ЛИПОВАЯ КИСЛОТА, ТИАМИН, ТИРОЗИН) НА УРОВНИ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В КРОВИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕН- ТАЛЬНОМ ДИАБЕТЕ</p>	74	<p>V. Ch. Polubok, E. M. Doroshenko, V. V. Vinogradov, L. I. Nadolnik EFFECT OF LIPOIC ACID, THIAMINE AND TYROSINE COMPOSITION ON THE LEVELS OF FREE AMINO ACIDS IN BLOOD OF RATS WITH EXPERIMENTAL DIABETES</p>
<p>Н. В. Трусов, В. А. Шипелин, И. В. Гмошинский ПОЛНОТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ПЕЧЕНИ КРЫС, ПОЛУЧАЮЩИХ КОМПЛЕКС L-КАРНИТИНА И РЕСВЕРАТРОЛА</p>	83	<p>N. V. Trusov, V. A. Shipelin, I. V. Gmoshinski LIVER FULL TRANSCRIPTOME ANALYSIS IN RATS RECEIVING COMPLEX OF L-CARNITINE AND RESVERATROL</p>
<p>Ю. Л. Горбич, С. А. Костюк, Т. В. Руденкова ИДЕНТИФИКАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ПОЛИМИКСИНАМ (КОЛИСТИНУ) В БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУРАХ <i>KLEBSIELLA</i> <i>PNEUMONIAE</i></p>	89	<p>Y. L. Gorbich, S. A. Kostiuk, T. V. Rudenkova IDENTIFICATION OF POLYMYXIN (COLISTIN) RESISTANCE MOLECULAR GENETIC MARKERS IN <i>KLEBSIELLA</i> <i>PNEUMONIAE</i> BACTERIAL CULTURES</p>
<p>О. Е. Кузнецов, В. М. Цыркунов ИЗМЕНЕНИЯ В ГЕНАХ, УЧАСТВУЮЩИХ В ПУТЯХ Rb1 И P53, ПРИ ИНОКУЛЯЦИИ КРЫСАМ ВИРУСНОЙ ДНК И РНК</p>	96	<p>A. E. Kuzniatsou, V. M. Tsyrcunov CHANGES IN THE GENES INVOLVED IN THE RB1 AND P53 PATHWAYS WHEN INOCULATING RATS WITH VIRAL DNA AND RNA</p>
<p>Т. А. Митюкова, Е. Н. Чудиловская, А. А. Басалай, О. Е. Полулях МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КРЫС-САМЦОВ ВИСТАР В ЗАВИСИМО- СТИ ОТ ИХ СКЛОННОСТИ К ДИЕТ-ИН- ДУЦИРОВАННОМУ ОЖИРЕНИЮ</p>	104	<p>T. A. Mityukova, K. N. Chudilovskaya, A. A. Basalai, O. Y. Poluliakh METABOLIC AND PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF MALE WISTAR RATS DEPENDING ON THEIR SUSCEPTIBILITY TO DIET-INDUCED OBESITY</p>

<p>А. Д. Таганович, Н. Н. Ковганко, А. В. Колб, Е. А. Хотько, О. В. Готько, В. И. Прохорова ОПТИМИЗАЦИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МАРКЕРОВ В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМЕ И ПЛОСКОКЛЕТОЧ- НОМ РАКЕ ЛЕГКОГО ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОВЕДЕННОГО ЛЕЧЕНИЯ</p>	111	<p>A. D. Tahanovich, M. M. Kauhanka, A. V. Kolb, E. A. Khotko, O. V. Gotko, V. I. Prokhorova OPTIMIZATION OF THE USE OF MARKERS IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH ADENOCARCINOMA AND SQUAMOUS CELL LUNG CANCER TO EVALUATE THE EFFECTIVENESS OF TREATMENT</p>
<p>Е. Б. Маркевич, Д. Ф. Хворик, Э. П. Станько ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ ПЕПТИДНЫХ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ И ИХ РЕЦЕПТОРОВ ПРИ ПСОРИАЗЕ, АССОЦИИРОВАННОМ С ПСИХИЧЕСКИ- МИ РАССТРОЙСТВАМИ</p>	120	<p>E. B. Markevich, D. F. Khvorik, E. P. Stanko DIAGNOSTIC VALUE OF PEPTIDE NEUROMEDIATORS AND THEIR RECEPTORS IN PSORIASIS ASSOCIATED WITH MENTAL DISORDERS</p>
<p>Джаббар Мустафа Салех ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ РАСТИТЕЛЬНОГО ЭКСТРАКТА <i>BUXUS SEMPERVIRENS L.</i></p>	128	<p>Jabbar Mustafa Saleh CHEMICAL COMPOSITION OF PLANT EXTRACT <i>BUXUS SEMPERVIRENS L.</i></p>
<p>Т. И. Терпинская, Т. Л. Янченко, М. А. Рубинская, Е. Ф. Полукошко ВЛИЯНИЕ БЕТУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ И МОДУЛЯТОРОВ КАЛЬЦИЕВОГО ОБМЕНА НА РОСТ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТО</p>	136	<p>T. I. Terpinskaya, T. L. Yanchanka, M. A. Rubinskaya, A. F. Palukoshka ANTI-TUMOR EFFECT OF COMBINED APPLICATION OF BETULIC ACID AND CALCIUM CHANNEL INHIBITORS</p>
<p>И. И. Степуρο, С. А. Агейко, В. И. Степуρο, В. Ю. Смирнов ИНГИБИРОВАНИЕ ТИАМИНОМ НИТРОВАНИЯ ТИРОЗИНА И ТИРОЗИЛЬ- НЫХ ОСТАТКОВ БЕЛКОВ В РЕАКЦИЯХ, КАТАЛИЗИРУЕМЫХ МЕТМИОГЛОБИ- НОМ В ПРИСУТСТВИИ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА И НИТРИТА</p>	143	<p>I. I. Stepuro, S. A. Aheika, V. I. Stsiapura, V. Y. Smirnov THIAMINE INHIBITS NITRATION OF TYROSINE AND TYROSYL RESIDUES OF PROTEINS IN REACTIONS CATALYZED BY METMYOGLOBIN IN PRESENCE OF HYDROGEN PEROXIDE AND NITRITE</p>
<p>Н. М. Тихон, С. А. Ляликoв, М. В. Белевцев, В. Л. Зверко, А. Н. Купчинская, О. С. Дубовик, А. К. Никольская СОДЕРЖАНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ В ГРУДНОМ МОЛОКЕ ЖЕНЩИН, ПРОЖИВАЮЩИХ В ЗАПАДНОМ РЕГИОНЕ БЕЛАРУСИ</p>	155	<p>N. M. Tsikhan, S. A. Lialikau, M. V. Belevtsev, U. L. Zverko, A. N. Kupchynskaya, V. S. Dubovik, A. K. Nikolskaya BREAST MILK CONCENTRATION OF IMMUNOLOGICALLY ACTIVE FACTORS IN WOMEN RESIDING IN THE WESTERN REGION OF BELARUS</p>
<p>Ю. С. Бакакина, Д. В. Бабарико, Т. В. Цыбрук, А. В. Свирид, М. С. Кисель, А. М. Тумилович, Ю. Г. Походня, А. А. Гилеп, В. Э. Сяхович БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ГИДРОКСИПРОИЗВОДНЫХ СТАНОЗОЛО- ЛА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕКОМБИ- НАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ СЕМЕЙСТВА ЦИТОХРОМОВ P450 ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ДОПИНГ-КОНТРОЛЯ</p>	163	<p>Y. S. Bakakina, D. V. Babaryko, T. V. Tsybruk, A. V. Svirid, M. S. Kisel, A. M. Tumilovich, Y. G. Pokhodnya, A. A. Gilep, V. E. Syakhovich BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF HYDROXYDERIVATIVES OF STANOZOLOL USING HUMAN RECOMBINANT CYTOCHROME P450 ENZYMES FOR DOPING CONTROL PURPOSES</p>

<p>А. В. Тамашевский, Ю. М. Гармаза, Д. С. Мигун МОЛЕКУЛЯРНО-МЕМБРАННЫЕ ОСОБЕННОСТИ IN VITRO ВЗАИМОДЕЙ- СТВИЯ ЛЕКТИНОВ, СПЕЦИФИЧНЫХ К ФУКОЗЕ И СИАЛОВОЙ КИСЛОТЕ, С ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ КРОВИ</p>	<p>170</p>	<p>A. V. Tamashevski, Y. M. Harmaza, D. S. Migun MOLECULAR AND MEMBRANE FEATURES OF IN VITRO INTERACTION OF FUCOSE / SIALIC ACID SPECIFIC LECTINS WITH BLOOD TUMOR CELLS</p>
<p>Е. А. Мельникова, Н. В. Амаэгбери, Г. Н. Семенкова, К. А. Лукьянова, О. В. Орешко МЕХАНИЗМЫ МОДИФИКАЦИИ ФУНК- ЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРО- ФИЛОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ КОРИЧНОЙ И КОФЕЙНОЙ КИСЛОТ</p>	<p>178</p>	<p>E. A. Melnikova, N. V. Amaegberi, G. N. Semenkova, K. A. Lukyanava, O. V. Oreshko MECHANISMS OF NEUTROPHILS' FUNCTIONAL ACTIVITY MODIFICATION UNDER THE ACTION OF CINNAMIC AND CAFFEIC ACIDS</p>
<p>Е. Г. Бадун, А. В. Шуриберко, Е. О. Казинец, Ю. Е. Разводовский, А. В. Шульга, О. Е. Кузнецов ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ И БИОЭЛЕМЕНТНЫЙ СТАТУС МИТОХОНДРИЙ МИОКАРДА КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ</p>	<p>186</p>	<p>E. G. Badun, A. V. Shuriberko, E. O. Kazinets, Y. E. Razvodovsky, A. V. Shulga, A. E. Kuzniatsou FUNCTIONAL ACTIVITY AND BIO- ELEMENT STATUS OF RATS MYOCARDIAL MITOCHONDRIA UNDER CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION</p>
<p>Л. И. Алехнович, В. С. Камышников, Ю. И. Степанова, Т. И. Седова ОЦЕНКА АНАЛИТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК АВТОМАТИЧЕСКОГО КОАГУЛОМЕТРА DIAGON COAG M</p>	<p>196</p>	<p>L. I. Aliakhnovich, V. S. Kamyshnikov, J. I. Stepanova, T. I. Siadova EVALUATION OF ANALYTICAL CHARACTERISTICS OF AUTOMATIC COAGULOMETER DIAGON COAG M</p>
<p>Ю. В. Дюбо, М. А. Шарангович, Е. А. Николайчик ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР CITJ КОНТРОЛИРУЕТ УТИЛИЗАЦИЮ ЦИТРА- ТА, АРАБИНОЗЫ И ВИРУЛЕНТНОСТЬ ФИТОПАТОГЕНА <i>PECTOBACTERIUM</i> <i>VERSATILE</i></p>	<p>202</p>	<p>Yu. V. Dubo, M. A. Sharangovich, E. A. Nikolaichik TRANSCRIPTION FACTOR CITJ CONTROLS UTILIZATION OF CITRATE, ARABINOSE AND VIRULENCE OF PLANT PATHOGEN <i>PECTOBACTERIUM VERSATILE</i></p>
<p>G. Sysa, E. I. Kvasyuk, A. Shihad, E.R. Gritskevitch THE POTENTIAL OF MODIFIED NUCLEOSIDES AND NUCLEOTIDES AS NOVEL ANTIBACTERIAL AGENTS: AN IN VITRO STUDY OF BACTERIAL GROWTH INHIBITION AND OXIDATIVE STRESS INDUCTION</p>	<p>211</p>	<p>А. Г. Сыса, Е. И. Квасюк, А. Шихад, Е. Р. Грицкевич ПОТЕНЦИАЛ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОЗИДОВ И НУКЛЕОТИДОВ КАК НОВЫХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ АГЕНТОВ: IN VITRO ИССЛЕДОВАНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ РОСТА БАКТЕРИЙ И ИНДУКЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА</p>
<p>А. Н. Shlyahtun, Yu. Z. Maksimchik, A. Zakrzeska, А. Ф. Радута, В. Ч. Полубок, Е. В. Букша, Е. В. Богдевич, Р. Китлас, М. Томулевич, И. Р. Sutsko PROTECTIVE EFFECTS OF TRITERPENOID BETULIN ON TYPE 2 DIABETES MELLITUS IN RATS</p>	<p>220</p>	<p>А. Г. Шляхтун, Ю. З. Максимчик, А. Закшэска, Е. Ф. Радута, В. Ч. Полубок, Е. В. Букша, Е. В. Богдевич, П. Китлас, М. Томулевич, Д. В. Пицко, И. П. Сутько ПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ ТРИТЕРПЕНОИДА БЕТУЛИНА ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА У КРЫС</p>

ОБЗОРЫ / REVIEWS

И. П. Сутько, А. Г. Шляхтун, О. В. Титко ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ БЕРБЕРИНА В КОМБИНАЦИИ С ДРУГИМИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВ- НЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ РАСТИТЕЛЬ- НОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ: МИНИ-ОБЗОР И СОБСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ	230	I. P. Sutsko, A. H. Shlyahun, O. V. Titko EFFICIENCY OF USE OF BERBERINE IN COMBINATIONS WITH OTHER BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS OF PLANT ORIGIN: A MINI REVIEW AND OWN RESULTS
С. А. Костюк, Л. Ф. Можейко, О. С. Полуян, Т. В. Пинчук СОВРЕМЕННЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ПРИКЛАДНЫХ ЗАДАЧ В АКУШЕРСТВЕ И ГИНЕКОЛОГИИ	238	S. A. Kostiuik, L. F. Mozheiko, O. S. Poluyan, T. V. Pinchuk MODERN GENETIC METHODS FOR SOLVING APPLIED PROBLEMS IN OBSTETRICS AND GYNECOLOGY

УЧЕНЫЕ БЕЛАРУСИ / SCIENTISTS OF BELARUS

К юбилею профессора Камышникова Владимира Семеновича	247	On the occasion of the anniversary of Professor Vladimir S. Kamyshnikov
In memoriam. Шкуматов Владимир Макарович	249	In memoriam. Vladimir M. Shkumatov
In memoriam. Кульчицкий Владимир Адамович	251	In memoriam. Vladimir A. Kulchitsky

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПРОТЕИНОВ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА ПРИ РАКЕ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА, ОТЯГОЩЕННОГО МУТАЦИЯМИ ГЕНОВ (*BRCA 1/2*, *hMSH2*) И ДНК/РНК ВИРУСОВ

О. Е. Кузнецов¹, В. М. Цыркунов²

¹Институт биохимии биологически активных соединений
Национальной академии наук Беларуси, г. Гродно, Республика Беларусь

²Гродненский государственный медицинский университет,
г. Гродно, Республика Беларусь

Введение. Рост заболеваемости и смертности от новообразований толстого кишечника предопределяет необходимость поиска дополнительных прогностических маркеров. Потенциальными маркерами рака толстой кишки (РТК) могут быть протеины клеточного цикла.

Цель исследования: молекулярно-биологическая оценка протеинов клеточного цикла (p53, bcl-2, NF1, pRb1) при РТК, отягощенного мутациями генов (*BRCA 1/2*, *hMSH2*) и ДНК/РНК вирусов.

Материал и методы. Материалом для исследования являлись образцы тканей и сыворотки крови пациентов с РТК, в которых оценена роль протеинов во взаимосвязи с присутствующей вирусной ДНК/РНК и мутациями генов *BRCA1/2* и *hMSH2*.

Результаты. Установлено, что концентрации антител к протеинам p53, bcl-2, NF1, pRb1 в сыворотке крови лиц с РТК была достоверно выше уровня концентраций у здоровых лиц ($p < 10^{-6}$). Встречаемость мутаций генов *BRCA1/2* среди женщин, имела зависимость при РТК с геном *hMSH2* ($p < 0,05$). Показано, что у лиц с РТК на фоне носительства ЦМВ в присутствии ВЭБ повышается активность «хранителя клеточного цикла» – NF1, а при микст-персистенции вирусов гепатитов и герпес-вируса 6 типа – p53. Концентрация антител к протеинам не зависит от возраста и пола пациентов, что позволяет использовать данные показатели, превышающие предсказанные концентрации, как диагностические маркеры возможной опухолевой патологии.

Заключение. Определение концентрации антител к протеинам клеточного цикла может использоваться для диагностических исследований, при котором клинические методы обследования не выявляют признаков новообразования.

Ключевые слова: опухоль, клеточный цикл, ткань, сыворотка, мутации, вирусы, толстый кишечник.

Для цитирования: Молекулярно-биологическое значение протеинов клеточного цикла при раке толстого кишечника, отягощенного мутациями генов (*BRCA 1/2*, *hMSH2*) и ДНК/РНК вирусов / О. Е. Кузнецов, В. М. Цыркунов // Биохимия и молекулярная биология. – 2024. – Т. 3, № 1(4). – С. 9–21.

Введение

Ежегодно в мире диагностируется около миллиона новых случаев опухолей толстого кишечника, являющихся причиной смерти у половины пациентов. В экономически развитых странах рак толстого кишечника/колоректальный рак (РТК/КРР) являются распространенными болезнями, в структуре которых заболеваемость раком ободочной и прямой кишки составляет 58,7/100 тыс. и 28,8/100 тыс. населения, соответственно, а пятилетняя выживаемость – 60 %. Последний показатель в странах с ограниченными ресурсами равен менее 40 % [1].

Согласно результатам исследований, в России общие ежегодные экономические потери из-за смертности от онкологических заболеваний выросли с 6,5 млрд долларов США в период с 2001–2005 гг. до 8,1 млрд долларов США в 2011–2015 гг., что составило 0,24 % от ежегодного внутреннего валового продукта (ВВП). По оценкам экспертов, к 2030 году этот показатель останется также на высоком уровне и составит 7,5 млрд долларов США (0,14 % от ВВП) [2].

В Беларуси ежегодно обнаруживается около 50 тыс. пациентов с впервые установленным диагнозом злокачественных новообразований. За по-

следнее десятилетие заболеваемость РТК/КРР увеличилась в три раза [3]. Ежегодно выявляется около 2,5 тыс. новых случаев опухолей толстой кишки и 1,9 тыс. случаев рака прямой кишки, 35 % из них диагностируется на III и IV стадиях. Пятилетняя выживаемость пациентов, в зависимости от стадии заболевания, варьирует от 60,6 до 14,5 % [4].

Время, необходимое клетке для совершения клеточного деления и появления двух дочерних клеток формирует клеточный цикл: G_0 (фаза покоя); G_1 (фаза начального роста); S (синтез ДНК); G_2 (подготовка клетки к митозу); M_1 (митоз). Клетки опухоли имеют более короткий жизненный цикл, и, как правило, меньшее количество клеток находится в фазе покоя. За экспоненциальным ростом опухоли следует «плато», где гибель и образование дочерних клеток находятся примерно на одном уровне. Субпопуляция клеток при новообразовании часто имеет свойства стволовых клеток, способных переходить в стадию пролиферации. Клеточная кинетика рака является важным фактором: специфические онкогены, регулирующие клеточный цикл, могут иметь значение для постановки диагноза, выбора терапии и определения прогноза заболевания [5, 6, 7, 8].

Причиной развития злокачественных клеток могут являться поломки ДНК, которые изменяют количество или функцию белковых структур, регулирующих рост, деление клеток, а также репарацию ДНК. Из около 19 миллионов новых случаев рака (GLOBOCAN, 2020) 15,7 % связаны с различными видами инфекций. При этом роль в инфекционном канцерогенезе в 51,2–64,2 % случаев принадлежит различным ДНК/РНК вирусам [9].

Гены, участвующие в нормальном делении клетки и восстановлении ДНК, важны для выявления нарушенного сигнала роста и повреждений ДНК в клетках. Если гены, в результате наследственных или приобретенных мутаций, перестают функционировать, система выявления повреждений ДНК становится неэффективной, и клетки со спонтанными генетическими мутациями выживают и начинают размножаться, что приводит к развитию опухоли [10, 11].

Процесс программируемой клеточной гибели – один из основных механизмов уничтожения дефектных (повреждённых, мутантных, инфицированных) клеток [12, 13]. Протеин bcl-2 является антиапоптотическим белком митохондриального пути активации апоптоза, регулирующегося p53 [14]. Белок p53 является продуктом гена-супрессора опухоли TP53 и транскрипционным фактором, выполняющим супрессорную функцию, результатом которой является остановка клеточного цикла [15]. Ген NF1 относится к группе «хранителей клеточно-

го цикла», кодирует нейрофибромин, который регулирует активность белков Ras (мутации RAS обнаруживают в 15 % случаев новообразований у человека) [16]. Протеин pRb1 – регулятор клеточной пролиферации, кодирует белок, регулирующий клеточный цикл, тормозя репликацию ДНК [17].

Степень участия данных протеинов в делении клетки зависит от фазы клеточного цикла, что позволяет рассматривать их в качестве возможных диагностических маркеров при опухолевых процессах [18, 19, 20].

Анализ исследований в области молекулярной биологии клеточного цикла при злокачественной трансформации показал противоречивый характер оценки связи маркеров апоптоза (p53, bcl-2), протеинов генов NF1 и Rb, как с клинико-морфологическими характеристиками опухоли и выживаемостью пациентов, так и с возможностью их использования с диагностической целью и прогнозом развития заболевания. Кроме того, изучению взаимосвязи их коэкспрессии с прогностической значимостью их определения у пациентов с РТК посвящены единичные исследования, а их диагностическая оценка, как биологических маркеров с учетом вирусоносительства и мутаций, обеспечивающих выявление опухоли на ранних стадиях, является перспективным направлением [21, 22].

Цель исследования – молекулярно-биологическая оценка протеинов клеточного цикла (p53, bcl-2, NF1, pRb1) при РТК, отягощенного мутациями генов (BRCA 1/2, hMSH2) и ДНК/РНК вирусов.

Материалы и методы

Материалом для исследования являлись образцы тканей и сыворотки крови пациентов с РТК (КРР, рак ободочной кишки, рак ректосигмоидного соединения). Время установления диагноза: от 6 месяцев до 13 лет. Возраст обследуемых на момент постановки диагноза варьировал от 39 до 87 лет; медиана возраста (Me) – 62,0, интерквартильный размах (49,0–75,0) лет. Диагноз онкологического заболевания подтвержден морфологическими методами в патоморфологической лаборатории Гродненского областного клинического патологоанатомического бюро в соответствии с Международной гистологической классификацией [23].

Исследованы образцы тканей из архива Гродненского областного клинического патологоанатомического бюро ($n=106$) и образцы крови пациентов регионального онкологического диспансера ($n=53$). Исследование в образцах экстракта ткани кишечника выполнялось в двух зонах: в зоне опухоли и на участке ткани с «отсутствием критериев злокачественности» – морфологически не описанные ($n=34$). Исследованные образцы нативной тка-

ни (НТ) толстого кишечника (не изменённая, не модифицированная, сохранившая структуру при-сушную живой клетке, отсутствие злокачественного процесса – рака) получены во время оперативных вмешательств ($n=31$).

Среди обследуемых с опухолевым процессом кишечника было 45 женщин (42,5 %) и 61 мужчина (57,5 %). Опухоль чаще локализовалась в прямой кишке (54/50,9 %), сигмовидной кишке (8/7,6 %), поперечно ободочной кишке (7/6,6 %), слепой кишке и печёночном изгибе ободочной кишки (37/34,9 %). Распределение пациентов с РТК выполнено в соответствии с Международной клинической классификацией TNM: T3 – 52,8 % ($n=56$); T4 – 23,6 % ($n=25$), T2 – 16,0 % ($n=17$), T1 – 7,6 % ($n=8$). У 31,4 % ($n=33$) пациентов на момент постановки диагноза отмечены метастазы в регионарные лимфатические узлы (N1), у 9,4 % ($n=10$) – отдаленные метастазы (M1). Частота встречаемости опухоли с низкой степенью злокачественности (высокодифференцированные, G1) составила 70,8 % (75 человек), опухоли средней степени злокачественности (низкодифференцированные, G2) – 17,9 % (19 человек), опухоли высокой степени злокачественности (недифференцированные, G3) – 11,3 % (12 человек).

Для исследования выделены группы: группа 1 – пациенты с установленным диагнозом РТК ($n=53$, материал исследования – сыворотка крови); группа 2 – пациенты с установленным диагнозом РТК ($n=106$, материал исследования – экстракт ткани); группа 3 – образцы нативной ткани (НТ) толстого кишечника ($n=31$, материал исследования – экстракт НТ).

Группа контрольных исследований была представлена образцами крови 80 практически здоровых лиц с отсутствием злокачественного новообразования и маркеров вирусных инфекций на момент обследования (56,5; 48,0–65,0 лет), у которых не было родственников с онкопатологией: 46 мужчин (57,5 %) и 34 женщины (42,5 %).

Объектом исследования являлись антитела к протеинам NF1, p53, bcl-2, pRB, ДНК/РНК вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ, HHV4), гепатита В (ВГВ/НВВ), гепатита С (ВГС/НСВ), папилломы человека (ВПЧ/HPV), цитомегаловируса (ЦМВ/CMV), простого герпеса 1/2 типа (ВПГ 1/2; HSV 1/2), вируса герпеса 6 типа (HHV6), ген BRCA1 (экзон 2, экзон 5, экзон 11, экзон 20), ген BRCA2 (экзон 11) и ген hMSH2 (экзон 1-16).

Исследование определения концентрации антител к протеинам гена NF1, p53, bcl-2 и pRB выполняли методом иммуноферментного анализа (ИФА) в образцах ткани и сыворотки крови пациентов при помощи набора реагентов «FineTest» произ-

водства «Wuhan Fine Biological Technology Co. Ltd» (Китай) на иммуноферментном анализаторе «Mindray 96RA» (Китай). Из блоков ткани в парафине готовили серийные срезы. В соответствии со стандартным протоколом проводили пробоподготовку образцов ткани к исследованию набором реагентов производства «MagneSil Genomic, Fixed System» (Promega, США). Образцы биологического материала (сыворотки крови) получали стандартным способом с использованием систем с активатором свертывания производства «Greiner Bio-One» (Австрия). Подготовка проб крови для исследования проводилась унифицированным способом: центрифугированием (центрифуга «Fenox-24M», Китай) при 3000g в течение 10 мин. Образцы сыворотки крови отбирали в отдельные системы, в которых выполнялось исследование.

Выполнено 476 исследований ДНК/РНК генома вирусов: ВЭБ (HHV4), гепатита В (ВГВ/НВВ), гепатита С (ВГС/НСВ), папилломы человека (ВПЧ/HPV), цитомегаловирус (ЦМВ/CMV), простого герпеса 1/2 типа (ВПГ 1/2; HSV 1/2) и герпеса 6 типа (HHV6).

Молекулярно-биологическое исследование генов *BRCA1* (экзон 2, экзон 5, экзон 11, экзон 20), *BRCA2* (экзон 11) и *hMSH2* (экзон 1-16) выполнено в 143 случаях (анализ 1077 детекций).

Выделение ДНК/РНК (ПЦР-анализ) из образцов ткани и крови проводилось согласно инструкциям производителя (Applied Biosystems, США; MagneSil Genomic, США; Сорб-В, Россия). Исследование генов *BRCA1/BRCA2* и гена *hMSH2* выполнено при помощи наборов MLPA-Tests (HNPCC-deletion/duplication) производства Pronto Diagnostics Ltd. (Израиль).

Аmplификация ДНК/РНК вирусов выполнена по заданному протоколу в автоматическом режиме на амплификаторе «RotorGene» (Германия), тест-системы «AmpliSens» (Россия), дополнительный контроль количественных и качественных характеристик ДНК/РНК – на спектрофотометре «BioPhotometer Plus» (Eppendorf, Германия).

Результаты, полученные в ходе исследования, заносились в оригинальную базу данных. Статистическая обработка данных проводилась с использованием стандартного пакета прикладных статистических программ. Различия между изучаемыми параметрами признавали достоверным при $p<0,05$. Среди методов математической обработки использовали:

- изучение вида распределения и получение числовых характеристик. В случае нормального распределения переменную характеризовали с помощью математического ожидания (среднего) – M и среднего квадратического отклонения (\pm выявле-

ние отклика на воздействие в двухвыборочной задаче: при нормальном распределении для проверки гипотезы о равенстве средних значений двух групп переменной использовали критерий Стьюдента (t), если распределение переменной не соответствовало нормальному, сравнение двух независимых групп изучаемой переменной проводили с помощью теста Манна-Уитни (U), а зависимых групп – теста Вилкоксона (Z);

- при сравнении долей (процентов) использовался метод Хила;
- оценку информативности диагностических маркеров возможной патологии выполняли при помощи ROC-кривых (Area under ROC curve – AUC);
- предсказания относительно действий переменной и/или измерения выполняли при помощи модели множественной линейной регрессии;

Таблица 1 – Концентрации антител к протеинам p53, bcl-2, pRb1 и NF1 в образцах сыворотки крови и ткани пациентов с РТК и в контроле

Table 1 – Concentrations of antibodies to p53, bcl-2, pRb1 and NF1 proteins in blood serum and tissue samples from patients with colon cancer and in controls

Группа	Показатель	M	m	min	max	p
Здоровые (p _к , сыворотка), n=80	p53, нг/мл	2,54	2,18	0,90	17,30	$p_{k-1}=0,073$
	bcl-2, нг/мл	8,01	6,11	1,01	30,90	$p_{k-2}=0,000001$
	pRb1, нг/мл	0,31	0,09	0,18	0,51	$p_{k-3}=0,00001$
	NF1, пг/мл	1077,86	132,47	840,00	1285,00	$p_{k-1}=0,0000001$
Группа 1, РТК _{сыворотка} , n=53	p53, нг/мл	4,99	4,13	0,85	21,05	$p_{k-2}=0,0000001$
	bcl-2, нг/мл	36,19	14,42	14,60	70,80	$p_{k-3}=0,0000001$
	pRb1, нг/мл	4,14	3,83	0,330	22,20	$p_{k-1}=0,000934$
	NF1, пг/мл	3836,62	3573,95	655,00	15155,00	$p_{k-2}=0,0000001$
Группа 2, РТК _{ткань} , n=106	p53, нг/мл	26,08	14,98	4,25	74,00	$p_{k-3}=0,0000001$
	bcl-2, нг/мл	32,69	11,36	4,90	46,01	$p_{k-1}=0,000131$
	pRb1, нг/мл	7,36	1,96	4,50	14,50	$p_{k-2}=0,0000001$
	NF1, пг/мл	4093,40	942,64	3350,00	6750,00	$p_{k-3}=0,000001$
Группа 3 - НТ, n=31	p53, нг/мл	23,91	8,39	8,90	36,50	$p_{1-2}=0,000001$
	bcl-2, нг/мл	35,04	10,14	13,20	49,00	$p_{1-3}=0,000001$
	pRb1, нг/мл	4,58	0,58	3,40	6,80	$p_{1-2}=0,283$
	NF1, пг/мл	4397,84	664,48	2411,00	5609,00	$p_{1-3}=0,709$
						$p_{1-2}=0,0052$
						$p_{1-3}=0,6779$
						$p_{1-2}=0,703$
						$p_{1-3}=0,392$
						$p_{2-3}=0,4906$
						$p_{2-3}=0,3986$
						$p_{2-3}=0,000001$
						$p_{2-3}=0,149$

Примечание: НТ – нативная ткань, образец ткани не измененный; не модифицированный, сохранивший структуру, присутствующую ему в живой клетке, отсутствие рака толстого кишечника

Note: NT – native tissue, tissue sample unaltered; unmodified, retaining the structure inherent in a living cell, no colon cancer

Установленные концентрации антител к протеинам p53, bcl-2, pRb1 и NF1 в образцах экстрактов нативной ткани (ткань толстого кишечника при отсутствии морфологически доказанного РТК) оценены как референтные величины,

- выявление взаимосвязи между двумя переменными: при нормальном распределении для оценки линейности связи между переменными использовали коэффициент корреляции Пирсона (r), если распределение переменных не соответствовало нормальному, для оценки связи между ними применяли непараметрический корреляционный анализ Спирмена (R_s).

Результаты и их обсуждение

Установленные концентрации антител к протеинам клеточного цикла p53, bcl-2, pRb1 и NF1 в образцах сыворотки крови у практически здоровых лиц в популяции, в образцах крови и экстрактах ткани лиц с диагностированным РТК и образцах нативной ткани, представлены в таблице 1.

которые составили для протеинов клеточного цикла: p53 – 23,91±8,39 нг/мл; bcl-2 – 35,04±10,14 нг/мл; pRb1 – 4,58±0,58 нг/мл; NF1 – 4397,84±664,48 пг/мл. Стоит отметить, что в предыдущем нашем исследовании, где ис-

следованы образцы нативной ткани, получены схожие результаты [24].

Уровень концентраций антител к протеинам в образцах сыворотки крови и образцах экстрактов ткани лиц с РТК, были достоверно выше, чем в сыворотке крови практически здоровых лиц (Mann-Whitney U Test, $p < 10^{-6}$).

При определении концентраций антител установлены следующие корреляционные зависимости:

- p53 (РТК, сыворотка) и NF1 (РТК, сыворотка): $r_s = 0,680, p = 0,0001$;
- bcl-2 (РТК, сыворотка) и pRb1 (РТК, сыворотка): $r_s = 0,395, p = 0,006$;
- pRb1 (РТК, сыворотка) и bcl-2 (РТК, сыворотка): $r_s = 0,395, p = 0,006$; pRb1 (контроль) и bcl-2 (РТК, ткань): $r_s = -0,385, p = 0,003$; pRb1 (контроль) и p53, (РТК, ткань): $r_s = -0,432, p = 0,0021$;
- NF1 (РТК, сыворотка) и pRb1 (РТК, ткань): $r_s = -0,418, p = 0,002$;
- p53 (РТК, ткань) и bcl-2 (РТК, ткань): $r_s = 0,469, p = 0,003$; p53 (РТК, ткань) и pRb1 (контроль): $r_s = -0,432, p = 0,002$;
- bcl-2 (РТК, ткань) и pRb1 (контроль): $r_s = -0,385, p = 0,002$;
- pRb1 (РТК, ткань) и NF1 (РТК, сыворотка): $r_s = -0,418, p = 0,002$.

Таким образом, прослеживается корреляционная связь показателя pRb1, обладающего функцией предотвращения прогрессии чрезмерного роста клеток путём ингибирования клеточного цикла, от данных контрольной группы до показателей регулятора апоптоза bcl-2, транскрипционного фактора p53 и «хранителя клеточного цикла» NF1, как в сыворотке крови пациентов с РТК, так в образцах ткани опухоли [25]. Обращает на себя внимание отсутствие корреляции между протеинами клеточного цикла в образцах НТ и в образцах сыворотки крови контрольной группы, что можно расценивать как наличие контроля «биохимических переключателей» и переходов между различными фазами клеточного цикла: переключатели поддерживают упорядоченное развитие клеточного цикла и действуют, вероятно, как контрольные точки, гарантирующие правильное завершение каждой фазы перед переходом к следующей фазе [26, 27].

Среди лиц контрольной группы, у которых не было родственников с онкопатологией, встречаемость мутаций генов *BRCA1*, *BRCA2* и *hMSH2* составила 1,25 % для *BRCA1* (экзон 20) и 1,25 % для *hMSH2* (экзон 11). Мутаций гена *BRCA2* в контроле не обнаружено [28].

Встречаемость мутаций в исследуемых генах в образцах ткани и крови лиц с установленным диагнозом РТК, представлена в таблице 2.

Таблица 2 – Частота выявления мутаций в генах *BRCA1/2* и *hMSH2* в образцах ткани и крови у лиц с РТК

Table 2 – Frequency of detection of mutations in the *BRCA1/2* and *hMSH2* genes in tissue and blood samples from individuals with colon cancer

Исследуемый ген, экзон	n	Мутации, ткань		Мутации, кровь	
		Количество	Удельный вес, %	Количество	Удельный вес, %
BRCA 1 экзон 5	129	1*	0,77	0**	0,00
BRCA 1 экзон 2	129	2*	1,55	0**	0,00
BRCA 1 экзон 20	129	2*	1,55	2**	1,55
BRCA 1 экзон 11	129	1*	0,77	1**	0,78
BRCA 2 экзон 11	129	2*	1,55	1**	0,78
MSH2, экзон 1	27	8	29,6	1	3,70
MSH2, экзон 2	27	6	22,2	0	0,00
MSH2, экзон 3	27	4	14,8	0	0,00
MSH2, экзон 4	27	0	0,0	0	0,00
MSH2, экзон 5	27	0	0,0	0	0,00
MSH2, экзон 6	27	14	51,9	4	14,81
MSH2, экзон 7	27	4	14,8	0	0,00
MSH2, экзон 8	27	10	37,0	1	3,70
MSH2, экзон 9	27	17	63,0	0	0,00
MSH2, экзон 10	27	4	14,8	3	11,11
MSH2, экзон 11	27	8	29,6	8	29,63
MSH2, экзон 12	27	1	3,7	1	3,70
MSH2, экзон 13	27	0	0,0	0	0,00
MSH2, экзон 14	27	2	7,4	0	0,00
MSH2, экзон 15	27	0	0,0	0	0,00
MSH2, экзон 16	27	0	0,0	0	0,00

Примечание: * – образцы тканей лиц женского пола (n=28 – лица женского пола, от общего количества исследуемых образцов)

Note: * – tissue samples of female persons (n=28 – female persons, of the total number of samples studied)

Общее количество мутаций в образцах тканей при РТК составило 86/7,98 % от общего количества исследований ($n=1077$). При оценке 432 исследований гена *hMSH2* (1-16 экзон) в образцах тканей при РТК показано, что встречаемость мутаций составила 78/18,05 %. Количество изменений в гене *hMSH2* варьировало: наибольшее в экзоне 9 (17/63 %), далее экзон 6 (14/51,9 %), экзон 8 (10/37 %), экзон 1 и экзон 11 (по 8/29,6 %), экзон 2 (6/22,2 %), экзон 3 и экзон 10 (по 4/14,8 %), экзон 14 (2/7,4 %), экзон 12 (1/3,7 %). В других исследуемых экзонах гена изменений не обнаружено.

Мутации гена *BRCA1* и *BRCA2*, в образцах тканей пациентов с РТК, детектированы с частотой от 0,77 % (*BRCA1*: экзон 5 и 11) до 1,55 % (*BRCA1*: экзон 2 и 20; *BRCA2*: экзон 11) и только у лиц женского пола ($n=8$). Удельный вес детектируемых мутаций, от всех исследуемых образцов лиц с диагнозом РТК составил 1,24 % от общего количества исследований ($n=645$), или 28,5 % – от исследуемых образцов у лиц женского пола с диагнозом РТК ($n=28$).

Общее количество мутаций в образцах крови при РТК составило 22/2,04 % от общего количества исследований ($n=1077$). При оценке генетических изменений в образцах крови у лиц с диагнозом РТК установлено, что мутации в экзонах гена *hMSH2* обнаружены в 18 случаях (4,17 %): экзон 11 гена (8/29,63 %), экзон 6 (4/14,81 %), экзон 10 (3/11,11 %), экзон 1, экзон 8 и экзон 12 (по 1/3,7 %). В других исследуемых экзонах гена *hMSH2* изменений не обнаружено.

Выполненное параллельное исследование по определению экзонов гена *hMSH2* с использованием отечественных праймеров показало соответствие полученных результатов с данными при использовании коммерческих наборов.

Анализ детектированных мутаций гена *hMSH2* в крови, в сравнении с образцами тканей, показал, что количество изменений в гене *hMSH2* в образцах тканей при РТК выше, чем в крови: 86/7,98 % и 22/2,04 % ($p < 0,05$).

При разведочном и корреляционном анализе встречаемости исследованных мутаций в опухолевой ткани по экзонам гена *hMSH2* установлено, что компонента экзона 10, экзона 11 и экзона 12 с выявленной мутационной характеристикой в крови (вероятностная наследственная природа изменений), обеспечивает варьирование в ткани, в частности ($p < 0,05$):

- экзоны 11 и 3 ($r_s=0,414$), экзоны 11 и 6 ($r_s=0,463$), экзоны 11 и 10 ($r_s=0,414$);
- экзоны 10 и 6 ($r_s=0,402$), экзоны 10 и 12 ($r_s=0,470$);

- экзоны 12 и 14 ($r_s=0,693$).

Анализ мутаций в ткани показал, что компонента экзонов 1, 2, 3, 6, 7, 8 и 9 гена *hMSH2* (вероятностная спонтанная и/или индуцированная природа генетических изменений), обеспечивает их варьирование в ткани ($p < 0,05$):

- экзона 1 с экзонами 3 ($r_s=0,643$) и экзонами 7 ($r_s=0,529$);
- экзона 6 с экзонами 7, экзонами 8 и экзонами 9 ($r_s=0,402$; $r_s=0,586$; $r_s=0,489$);
- экзона 8 с экзонами 6 и 9 ($r_s=0,586$; $r_s=0,429$).

Во всех случаях, в образцах опухолевой ткани, как главная компонента опухолевого процесса выделен экзон 6 гена *hMSH2* (мощность – 0,921). Анализ множественной регрессии предсказанного значения возраста вероятного развития РТК при носительстве мутации гена *hMSH2* (экзон 6) установлен для 58,5±3,7 лет (–95,0 % ИС=50,7 лет; +95,0 % ИС=66,3 года; $t=15,538$; $p=0,00001$).

В образцах тканей пациентов с установленным диагнозом РТК мутации гена *BRCA1/2* детектировались с частотой от 0,78 % до 1,55 % и только у 4 лиц женского пола (таблица 2). Удельный вес детектируемых мутаций, от всех исследуемых образцов лиц с диагнозом РТК составил 0,62 % от общего количества исследований ($n=645$), или 14,24 % от исследуемых образцов у лиц женского пола с диагнозом РТК ($n=28$).

Мутации гена *BRCA1* и *BRCA2* в крови женщин обнаружены в 4/3,1 % случаях от всех исследуемых образцов лиц с диагнозом РТК.

Анализ встречаемости мутаций генов *BRCA1/2* при РТК среди женщин показал значимые ранговые корреляции с геном *hMSH2*: экзон 11 гена *BRCA2* и экзон 5 гена *BRCA1* ($r_s=0,705$; $p=0,002$), экзон 2 гена *BRCA1* ($r_s=0,493$; $p=0,01$) и экзоны 14 гена *hMSH2* и экзон 2 гена *BRCA1* ($r_s=0,460$; $r_s=0,461$; $p=0,03$).

Как главная компонента опухоли, у женщин с РТК, значение мутации генов распределяется по мощности ($p < 0,05$): 1-я мощность (0,932) – экзон 11 гена *BRCA2*; 2-я (0,627) – экзон 5 гена *BRCA1*; 3-я (0,295) – экзон 2 гена *BRCA1*.

Встречаемость ДНК/РНК вирусов в образцах тканей лиц с установленным диагнозом РТК представлена в таблице 3.

Как видно, микст-персистирование вирусов при РТК в ткани опухоли было представлено 8-мю сочетаниями: по 1 случаю у мужчин (ВЭБ + HHV6; ВПГ 1/2 типа + ВЭБ; ВПГ 1/2 типа + HHV6; HCV + HHV6); 3 случая комбинации ЦМВ+ВЭБ (2 мужчины, 1 женщина); 1 случай у мужчины ЦМВ+ВЭБ+HHV6.

Таблица 3 – Частота выявления ДНК/РНК вирусов в образцах ткани при РТК (n, %)

Table 3 – Frequency of detection of DNA/RNA viruses in tissue samples from colon cancer (n, %)

Возбудитель	Общее число	Женский		Мужской		Сумма, %
		n	%	n	%	
ВПЧ	68	0	0	0	0	0
ВПГ 1/2 типов	68	48	70,6	11	16,2	86,8
ЦМВ	68	4	5,9	3	4,4	10,3
ВЭБ	68	3	4,4	10	14,7	19,1
HBV	68	1	1,47	1	1,47	2,94
HCV	68	0	0	3	4,4	4,4
HHV6	68	3	4,4	14	20,6	25,0
Микст-персистирование	8	1	12,5	7	87,5	11,76*

Примечание: * – относительно всех образцов ткани при РТК

Note: * – relative to all tissue samples from colon cancer

Между генетическими изменениями в ткани опухоли и образцах крови лиц с РТК установлен ряд зависимостей с вирусной ДНК/РНК ($p < 0,05$):

- при носительстве мутаций гена *BRCA1* экзон 5: ВПГ 1/2 типов ($r_s = 0,265$);
- при носительстве мутаций гена *BRCA1* экзон 20: HHV6/ВПГ6 типа ($r_s = 0,292$);
- при носительстве мутаций гена *hMSH2* экзон 10: HBV ($r_s = 0,470$);
- при носительстве ВЭБ: ЦМВ ($r_s = 0,454$);
- при носительстве HHV6/ВПГ 6 типа: HCV ($r_s = 0,419$).

Принимая во внимание прослеживаемую связь исследуемых протеинов клеточного цикла (здоровый – опухоль) и оцененную встречаемость мутаций генов *BRCA1/2*, *hMSH2* и ДНК/РНК вирусов в исследуемых группах, выполнен анализ возможных зависимостей между концентрацией антител к протеинам p53, bcl-2, pRb1, NF1, мутациями генов и ДНК/РНК вирусов.

Анализ вирусной ДНК/РНК и антител к протеинам клеточного цикла у лиц с установленным диагнозом РТК выявил связи между ними: ЦМВ и ВЭБ (сыворотка крови: $r_s = 0,453$, $p = 0,001$); HBV и p53 (сыворотка крови: $r_s = 0,364$, $p = 0,003$); HCV и HHV6 (сыворотка крови: $r_s = 0,418$, $p = 0,002$); ВЭБ и NF1 (ткань: $r_s = 0,371$, $p = 0,003$).

Обращает на себя внимание факт носительства ЦМВ, при котором в организме практически всегда присутствует ВЭБ, влияющий на уровень концентрации «хранителей клеточного цикла» – NF1 ($p = 0,003$). В тоже время у пациентов с РТК, инфицированных вирусами гепатитов (HBV, HCV) отмечена повышенная активность p53 ($p = 0,003$).

Оценка корреляционных зависимостей между уровнем p53, bcl-2, pRb1 и NF1 и мутациями ге-

нов *BRCA1*, *BRCA2*, *hMSH2* обнаружила взаимосвязи:

- ген *BRCA2* (экзон 11) и p53 (контроль): $r_s = 0,448$, $p = 0,002$;
- ген *hMSH2* (экзон 1) и p53 (РТК, ткань): $r_s = 0,453$, $p = 0,002$;
- ген *hMSH2* (экзон 3) и p53 (РТК, ткань): $r_s = 0,388$, $p = 0,002$;
- ген *hMSH2* (экзон 8) и p53 (РТК, ткань): $r_s = 0,404032$, $p = 0,001$;
- ген *hMSH2* (экзон 14) и bcl-2 (контроль): $r_s = -0,417$, $p = 0,002$;
- ген *hMSH2* (экзон 14) и pRb1 (контроль): $r_s = -0,428$, $p = 0,002$.

Как и в случае с вирусной ДНК/РНК, показаны положительные и отрицательные корреляционные зависимости в группах. Внимание на себя обращали гены *BRCA2* (экзон 11) и ген *hMSH2* (экзон 1, 3, 8, 14), когда наличие в них мутаций способствует увеличению концентрации антител протеинов p53, bcl-2 и pRb1, как в контрольной группе (практически здоровые лица, $p = 0,002$), так и среди лиц с РТК (ткань, $p = 0,001$). Наличие мутаций в гене *hMSH2*, за исключением экзона 14, сопровождалось ростом pRb1 и bcl-2 у практически здоровых лиц ($p = 0,002$). Полученный результат концентрации антител к протеинам клеточного цикла практически здоровых лиц в популяции и лиц с РТК (0,77 % при носительстве мутации гена *BRCA2*_{экзон 11}; 18,6 % при носительстве мутации гена *hMSH2*_{экзон 1,2,8,14}) свидетельствует о необходимости включения «здоровых» лиц, носителей мутаций данных генов в группы возможного риска развития РТК.

Оценена зависимость влияния уровня антител к p53, bcl-2, pRb1 и NF1 с полом и возрастом пациентов в исследуемых группах. Зависимости p53,

bcl-2, pRb1 и NF1 в экстракте ткани толстого кишечника пораженной опухолью, образцах сыворотки крови лиц с РТК и нативной ткани с полом пациентов не установлено (Spearman, $p > 0,05$): p53 (здоровые), $r_s = -0,045$; bcl-2 (здоровые), $r_s = -0,027$; pRb1 (здоровые), $r_s = 0,349$; NF1 (здоровые), $r_s = -0,217$; p53 (РТК, ткань), $r_s = -0,195$; bcl-2 (РТК, ткань), $r_s = -0,164$; pRb1 (РТК, ткань), $r_s = 0,164$; NF1 (РТК, ткань), $r_s = 0,180$; p53 (НТ), $r_s = 0,203$; bcl-2 (НТ), $r_s = 0,170$; pRb1 (НТ), $r_s = 0,171$; NF1 (НТ), $r_s = 0,063$; p53 (РТК, сыворотка), $r_s = -0,251$; bcl-2 (РТК, сыворотка) $r_s = -0,020$; pRb1 (РТК, сыворотка), $r_s = -0,041$; NF1 (РТК, сыворотка), $r_s = -0,056$.

Аналогичная картина антител к протеинам p53, bcl-2, pRb1 и NF1 наблюдалась в экстракте ткани толстого кишечника пораженной опухолью, образцах сыворотки крови лиц с РТК и нативной ткани с возрастом пациентов – достоверных корреляци-

онных связей не установлено (Spearman, Tau корреляции Кендалла, $p > 0,05$): p53 (здоровые), $r_s = -0,157$; bcl-2 (здоровые), $r_s = 0,267$; pRb1 (здоровые), $r_s = 0,103$; NF1 (здоровые), $r_s = 0,122$; p53 (РТК, ткань), $r_s = 0,169$; bcl-2 (РТК, ткань), $r_s = 0,109$; pRb1 (РТК, ткань), $r_s = 0,074$; NF1 (РТК, ткань), $r_s = -0,208$; p53 (НТ), $r_s = -0,294$; bcl-2 (НТ), $r_s = 0,115$; NF1 (НТ), $r_s = 0,113$; p53 (РТК, сыворотка), $r_s = 0,020$; bcl-2 (РТК, сыворотка), $r_s = -0,172$; pRb1 (РТК, сыворотка), $r_s = 0,126$; NF1 (РТК, сыворотка), $r_s = 0,026$.

Зависимость от возраста пациентов установлена только к протеину pRb1 в образцах нативной ткани и в молодом возрасте: $r_s = -0,358$; $p = 0,002$.

При анализе концентраций антител в сыворотке крови, экстрактах ткани опухоли с подтвержденным диагнозом РТК, не установлено достоверной связи ни с возрастом ($p = 0,303$), ни с полом ($p = 0,322$), таблица 4.

Таблица 4 – Корреляционные связи между уровнем концентраций антител протеинов p53, bcl-2, pRb1 и NF1 и возрастом, $p > 0,05$

Table 4 – Correlation between the level of antibody concentrations of proteins p53, bcl-2, pRb1 and NF1 and age, $p > 0.05$

Возраст / Пол	Возраст, пол (РТК)	bcl-2, нг/мл (РТК)	pRb1, нг/мл (РТК)	NF1, пг/мл (РТК)
Возраст, пол	1,000	0,286	-0,214	-0,021
bcl-2, нг/мл	0,186	1,000	-0,325	0,068
pRb1, нг/мл	-0,214	-0,324	1,000	-0,208
NF1, пг/мл	-0,012	0,079	-0,188	1,000

Не установлено достоверных корреляционных связей между антителами к протеинам клеточного цикла в экстракте ткани толстого кишечника, пораженной опухолью, с возрастом пациентов ($R = 0,101$, $p = 0,44$). Связи между протеинами в ткани и половой принадлежностью пациентов с РТК также не было выявлено (Mann-Whitney U Test – $p = 0,711$).

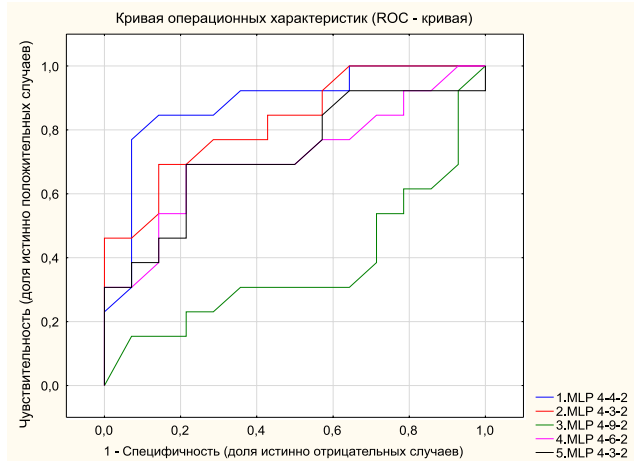
На основании анализа зависимости p53, bcl-2, pRb1 и NF1 в образцах ткани РТК, НТ и сыворотки крови обследованных, можно утверждать, что их концентрация в ткани не зависит от локализации опухоли, возраста и пола пациентов. Оцененные зависимости показали отсутствие влияния возраста и пола лиц с диагнозом РТК на показатели антител к протеинам клеточного цикла, за исключением белка pRb1 в нативной ткани. Поскольку уровень антител к NF1, p53, bcl-2 и pR1 в образцах ткани и сыворотки крови не коррелирует с полом и возрастом пациентов, определение их концентраций в ткани неопухоловой природы и сыворотке крови, целесообразно осуществлять независимо от пола и возраста. Данные показатели можно расценивать как диа-

гностические маркеры возможной опухолевой патологии и потенциального риска развития заболевания.

Результаты оценены на соответствие их общепринятым критериям диагностических маркеров. Для количественной оценки информативности использовался сравнительный анализ площадей под ROC-кривыми. Принято считать, что коэффициент площади кривой, лежащий в интервале 0,9–1, следует рассматривать как показатель наивысшей информативности диагностического метода, в интервале 0,8–0,9 – хорошая информативность, в интервале 0,7–0,8 – удовлетворительная, в интервале 0,6–0,7 – посредственная, и ниже – бесполезная классификация. ROC-анализ позволяет выбрать оптимальное пороговое значение балла (cut-off value) и оценить прогностическую способность исследования [29].

Построены ROC-кривые или кривые ошибок зависимости доли верных положительных классификаций от доли ложных положительных классификаций при варьировании порога решающего правила при РТК и у здоровых лиц в популяции (рисунок 1).

а



б

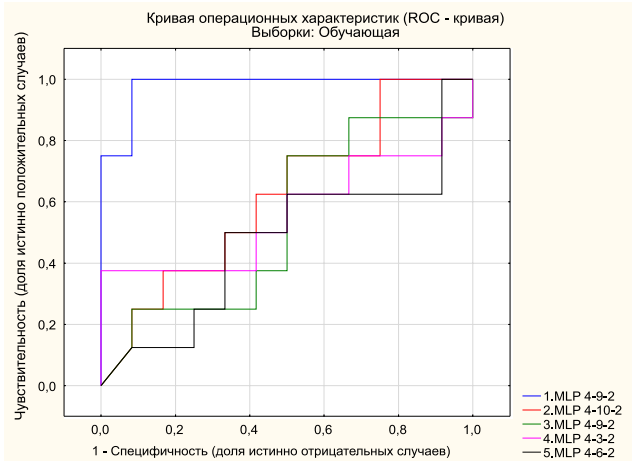


Рисунок 1 – ROC-кривые зависимости доли верных положительных классификаций от доли ложных положительных классификаций уровня концентраций антител протеинов p53, bcl-2, pRb1 и NF1 при раке толстого кишечника (а) и у практически здоровых лиц в популяции (б)

Figure 1 – ROC curves of the dependence of the proportion of correct positive classifications on the proportion of false positive classifications of the level of antibody concentrations of proteins p53, bcl-2, pRb1 and NF1 in colon cancer (а) and in practically healthy individuals in the population (b)

Установлено, что коэффициент площади под кривой для антител к протеинам клеточного цикла при РТК составил следующую информативность:

- при РТК:
 - p53: чувствительность – 66,8 %, специфичность – 48,0 % (посредственная);
 - bcl-2: чувствительность – 82,7 %, специфичность – 45,8% (хорошая);
 - pRb1: чувствительность – 88,2 %, специфичность – 49,3 % (хорошая);
 - NF1: чувствительность – 71,4 %, специфичность – 71,4 % (удовлетворительная);
- у практически здоровых лиц в популяции:
 - p53: чувствительность – 55,2 %, специфичность – 40,0 % (бесполезная);
 - bcl-2: чувствительность – 61,9 %, специфичность – 39,9 % (посредственная);
 - pRb1: чувствительность – 75,5 %, специфичность – 74,9 % (удовлетворительная);
 - NF1: чувствительность – 72,4 %, специфичность – 50,1 % (удовлетворительная).

Таким образом, установленная диагностическая информативность концентрации антител к p53, bcl-2, pRb1 и NF1, как маркеров возможной опухолевой патологии и потенциального риска развития заболевания составила: при РТК – pRb1 / bcl-2 / NF1 – хорошая / удовлетворительная, у практически здоровых лиц в популяции – pRb1 / NF1 – удовлетворительная.

По результатам множественной регрессии, с учетом возрастных групп лиц с установленным диагнозом РТК, оценено предсказанное значение концентраций антител к p53, bcl-2, pRb1 и NF1 для

лиц с опухолевыми процессами в толстом кишечнике (рисунок 2, 3, 4 и 5).

Предсказанное значение концентраций антител к NF1 для лиц с РТК в сыворотке крови составило: для возрастной группы 52 года – 4 089,83 пг/мл, (В-Веса/значение = –2 736 ,92; –95,0 % ИС = 2 821,84 пг/мл, +95,0 % ИС=5 357,82 пг/мл); для возрастной группы 72 года – 3 037,17 пг/мл, (В-Веса/значение = –3 789,58; –95,0 % ИС = 1 197,48 пг/мл, +95,0 % ИС=4 876,86 пг/мл), $t=2,57, p=0,01$.

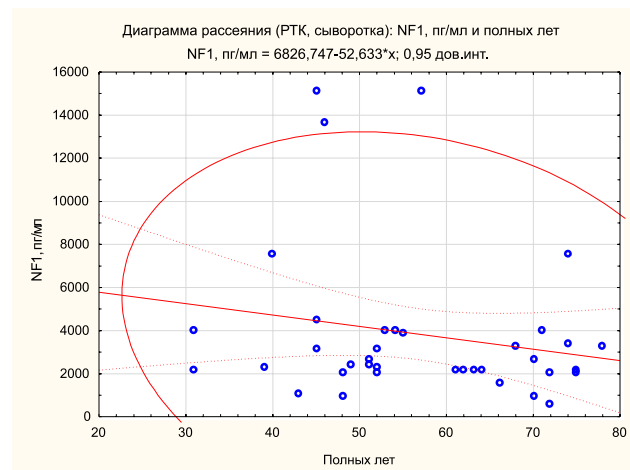


Рисунок 2 = Предсказанное значение концентрации антител протеина клеточного цикла NF1 для лиц со злокачественными процессами РТК в сыворотке крови

Figure 2 – Predicted value of NF1 cell cycle protein antibody concentration for individuals with malignant processes of colon cancer in blood serum

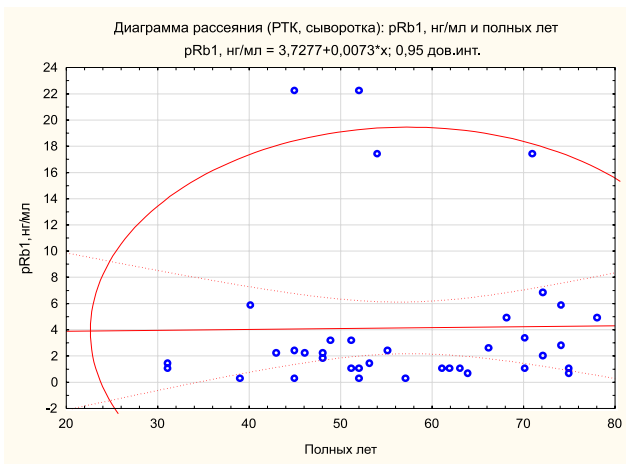


Рисунок 3 – Предсказанное значение концентрации антител протеина клеточного цикла pRb1 для лиц со злокачественными процессами РТК в сыворотке крови

Figure 3 – Predicted value of pRb1 cell cycle protein antibody concentration for individuals with malignant processes of colon cancer in blood serum

Предсказанное значение концентраций антител к pRb1 для лиц с РТК в сыворотке крови составило: для возрастной группы 52 года – 4,11 нг/мл, (В-Веса/значение = 0,379; –95,0 % ИС=2,01 нг/мл, +95,0 % ИС=6,21 нг/мл); для возрастной группы 72 года – 4,25 нг/мл, (В-Веса/значение = 0,526; –95,0 % ИС=1,19 нг/мл, +95,0 % ИС=7,31 нг/мл), $t=1,84, p=0,04$.



Рисунок 4 – Предсказанное значение концентрации антител протеина клеточного цикла bcl-2, для лиц со злокачественными процессами РТК в сыворотке крови

Figure 4 – Predicted value of bcl-2 cell cycle protein antibody concentration for individuals with malignant processes of colon cancer in blood serum

Предсказанное значение концентраций антител к bcl-2 для лиц с РТК в сыворотке крови составило: для возрастной группы 52 года – 36,96 нг/мл,

(В-Веса/значение = –8,409; –95,0 % ИС=31,80 нг/мл, +95,0 % ИС=42,12 нг/мл); для возрастной группы 72 года – 33,73 нг/мл, (В-Веса/значение = –11,644; –95,0 % ИС=26,24 нг/мл, +95,0 % ИС=41,21 нг/мл), $t=4,202, p=0,0002$.

Предсказанное значение концентраций антител к p53 для лиц с РТК в сыворотке крови составило: для возрастной группы 52 года – 5,24 нг/мл, (В-Веса/значение = –2,68881; –95,0 % ИС=3,03 нг/мл, +95,0 % ИС=7,44 нг/мл); для возрастной группы 72 года – 4,20 нг/мл, (В-Веса/значение = –3,722; –95,0 % ИС=1,01 нг/мл, +95,0 % ИС=7,40 нг/мл), $t=1,720, p=0,05$.

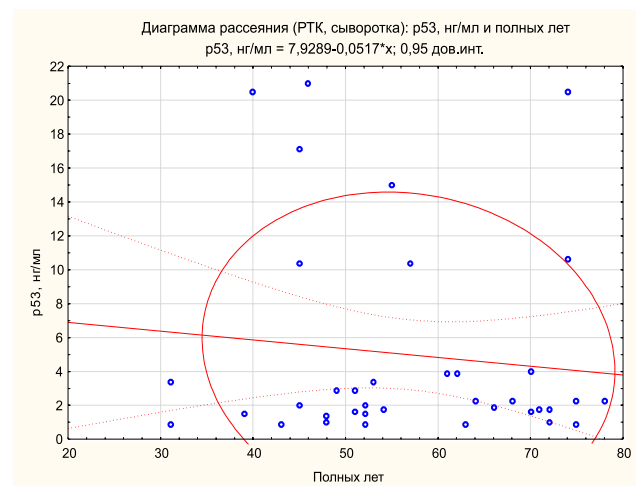


Рисунок 5 – Предсказанное значение концентрации антител протеина клеточного цикла p53 для лиц со злокачественными процессами РТК в сыворотке крови

Figure 5 – Predicted value of p53 cell cycle protein antibody concentration for individuals with malignant processes of colon cancer in blood serum

Заключение

Анализ зависимостей антител к bcl-2, p53, pRb1 и NF1 показал взаимосвязь pRb1 с регулятором апоптоза bcl-2, транскрипционным фактором p53 и NF1 как в образцах сыворотки крови, так и в образцах экстрактов ткани. Отсутствие зависимостей антител к протеинам в образцах НТ и в образцах сыворотки крови контрольной группы можно расценивать как наличие контроля «биохимических переключателей» и переходов между различными фазами клеточного цикла: переключатели поддерживают упорядоченное развитие клеточного цикла и действуют, вероятно, как контрольные точки, гарантирующие правильное завершение каждой фазы цикла клетки.

Количество мутаций генов *BRCA1/2*, *hMSH2* в образцах крови у лиц с РТК – 2,04 %, при частоте изменений в гене *hMSH2* (экзон 1-16) – 4,17 %, что

значимо ниже частоты детектируемых мутаций в этих же генах в образцах опухолевой ткани – 7,98 % ($p=0,003$), при частоте генетических изменений в гене *hMSH2* (экзон 1-16) равной 18,05 % ($p=0,001$).

Встречаемость мутаций генов *BRCA1/2* среди женщин, показала их зависимость при РТК с экзонами гена *hMSH2* ($p<0,05$): наличие мутаций в генах *BRCA1/2* (*BRCA2* экзон 11, *BRCA1* экзон 5 и 2) у женщин следует рассматривать как потенциальный риск развития РТК. Во всех случаях обнаружения мутаций в образцах опухолевой ткани, как главная компонента опухолевого процесса выделен экзон 6 гена *hMSH2* (мощность – 0,921). Предсказанное значение возраста вероятного развития РТК при носительстве мутации гена *hMSH2* (экзон 6) установлено для $58,5\pm 3,7$ лет ($p=0,00001$).

Список цитированных источников

1. Bray, F. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, A. Jemal // *CA Cancer J Clin.* – 2018. – Vol. 68, № 6. – P. 394–424. doi: 10.3322/caac.21492.
2. Ушкалова, Е. А. Экономические проблемы фармакотерапии онкологических заболеваний / Е. А. Ушкалова, С. К. Зырянов, И. А. Гопиенко // *Фармакоэкономика. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология.* – 2020. – Т.13, № 1. – С. 64–70.
3. Рак в Беларуси: цифры и факты. Анализ данных Белорусского канцер-регистра за 2010-2019 гг. / [А. Е. Океанов и др.; под ред. С. Л. Полякова]. – Минск: РНПЦ ОМР им. Н. Н. Александрова, 2020. – 298 с.
4. Статистика онкологических заболеваний в Республике Беларусь (2008-2017) / А. Е. Океанов [и др.]; под ред. О. Г. Сукошко; Министерство здравоохранения Республики Беларусь, Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова». – Минск: Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии, 2018. – 284 с.
5. Якунина, Е. Ю. Распределение клеток по фазам клеточного цикла в неизменной и опухолевой ткани при уротелиальном раке / Е. Ю. Якунина, Э. В., Мазаев А. В. Семенов, Ю. В. Козина, А. А. Модестов // *Сибирское медицинское обозрение.* – 2016. – № 5(101). – С. 114–115.
6. Кисурина-Евгеньева, О. П. Энтоз и клеточный цикл в культуре опухолевых клеток / О. П. Кисурина-Евгеньева, Л. А. Хашба, М. А. Савицкая, Г. Е. Онищенко // *Цитология. Наука.* СПб. – 2018. – Т. 60, № 9. – 2018. – С.693–703. doi: 10.31116/tsitol.2018.09.05.
7. Базанов, К. В. Моделирование кинетики роста рецидивного и метастатического колоректального рака с целью оценки эффективности химиотерапевтического лечения / К. В. Базанов, С. С. Кузнецов, И. Г. Терентьев // *Современные технологии в медицине.* – 2014. – Т. 6, № 4. – С. 85–91.
8. Харченко, Е. П. Метастазирование и раковая спячка / Е. П. Харченко, И. А. Соловьев // *Онкология. Журнал им. П. А. Герцена.* – 2016. – № 5(5). – С. 72–77.

Ассоциации мутаций исследованных генов в крови и ткани опухоли с различными вирусами позволяют заключить, что наиболее высокий онкогенный потенциал несут в себе ВГП1/2, ННВ6, ВЭБ, ЦМВ, HCV и HBV, что, несомненно, необходимо дальше исследовать. Удельный вес носительства вирусной ДНК/РНК при РТК составил 11,7 %.

Концентрация антител к протеинам клеточного цикла у практически здоровых лиц в популяции и лиц с РТК (0,77 % при носительстве мутации гена *BRCA2*^{экзон11}; 18,6 % при носительстве мутации гена *hMSH2*^{экзон1,2,8,14}) свидетельствует о необходимости включения «практически здоровых» лиц, в группы возможного риска развития РТК. Определение их концентрации может использоваться для диагностических исследований, при котором клинические методы обследования не выявляют признаков новообразования.

9. Kuznetsov, O. E. Mucin expression in liver tumors / O. E. Kuznetsov, V. M. Tsyrunov, H. A. Ali, S. S. Kerimova // *International Journal of Health Sciences.* – 2022. – № 6(S5). – P. 12000–12012. doi: 10.53730/ijhs.v6nS5.11810.
10. Petitjean, A. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes / A. Petitjean, M. I. Achatz, A. L. Borresen-Dale // *Oncogene.* – 2007. – № 26. – P. 2157–2165.
11. Молекулярно-генетические исследования в практике онкологической клиники / Н. Е. Торопова [и др.] // *Известия Самарского научного центра Российской академии наук.* – 2015. – № 17(2–3). – С.690–696.
12. Krammer, P. H. Life and death in peripheral T cells / P. H. Krammer, R. Arnold., I. N. Lavrik // *Nat. Rev. Immunol.* – 2007. – Vol. 7. – P. 532–542.
13. Относительная копияность апоптоз-регулирующих генов как показатель малигнизации тканей желудка / О. И. Кит [и др.] // *Успехи современного естествознания.* – 2015. – № 3. – С. 40–45.
14. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways / T. Vanden Berghe [et al.] // *Nature reviews. Molecular cell biology.* – 2014. – Vol. 15, № 2. – P.135–147. doi:10.1038/nrm3737.
15. Jensen, O. N. Interpreting the protein language using proteomics / O. N. Jensen // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2006. – Vol. 7. – P. 391–403. doi:10.1038/nrm1939.
16. Phenotype genotype correlation in children with neurofibromatosis type 1. / C. Barrea [et al.] // *Neuropediatrics.* – 2018. – Vol. 49 (3). – P. 180–184. doi: 10.1055/s-0037-1620239.
17. Momand, J. MDM2-master regulator of the p53 tumor suppressor protein / J. Momand, H. H. Wu, G. Dasgupta // *Gene.* – 2000. – Vol. 242, № 1–2. – P. 15–29. doi:10.1016/S0378-1119(99)00487-4.
18. pRb Inactivation in mammary cells reveals common mechanisms for tumor initiation and progression in divergent epithelia / K. Simin [et al.] // *PLoS Biol.* – 2006. – Vol. 2, № 2. – P. 22. doi:10.1371/journal.pbio.0020022.
19. Classon, M. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer / M. Classon, E. Harlow // *Nature Reviews Cancer.* – 2003. – Vol. 2, № 12. – P. 910–917. doi:10.1038/nrc950.
20. The role of the retinoblastoma protein (Rb) in the nuclear localization of BAG-1: implications for colorectal tumour

- cell survival / N. K. Clemler [et al.] // *Biochem. Soc. Trans.* – 2005. – Vol. 33. – P. 676–678.
21. Role of Bcl-2 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis / B. Martin [et al.] // *Br. J. Cancer.* – 2003. – Vol. 89 (1). – P. 55–64.
 22. Immunohistochemical markers of prognosis in non-small cell lung cancer: a review and proposal for a multiphase approach to marker evaluation / C. Q. Zhu [et al.] // *J. Clin. Pathol.* – 2006. – Vol. 59 (8). – P.790–800.
 23. Morson, B. C. Invasion of veins by carcinoma of rectum: method of detection, histological features and significance / B. C. Morson // *Mater. Med. Pol.* – 1981. – Vol. 13, № 2. – P. 85–92.
 24. Кузнецов, О. Е. Взаимосвязь экспрессии протеинов NF1, p53, bcl-2, pRb с ДНК/РНК вирусов и мутациями генов BRCA 1/2 и hMSH2 при раке печени / О. Е. Кузнецов // *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук.* – 2023. – Т. 20, № 2. – С. 126–139. doi: 10.29235/1814-6023-2023-20-2-126-139.
 25. Classon, M. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer / M. Classon, E. Harlow // *Nature Reviews Cancer.* – 2003. – Vol. 2, № 12. – P. 910–917. doi:10.1038/nrc950.
 26. Bloom, J. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control / J. Bloom // *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* – 2007 – Vol. 8 (2). – P. 149–160. doi:10.1038/nrm2105.
 27. Santos, S. Spatial positive feedback at the onset of mitosis / S. Santos // *Cell.* – 2012. – Vol. 149 (7). – P. 1500–1513. doi:10.1016/j.cell.2012.05.028.
 28. Кузнецов, О. Е. Ассоциации генетических вариантов генов и вирусной ДНК/РНК при раке печени и толстого кишечника / О. Е. Кузнецов, В. М. Цыркунов // *Вестник ВГМУ.* – 2022. – Том 21, № 6. – С. 38–46.
 29. Кореновский, Ю. В. Сравнение компьютерных программ для проведения описательной статистики и ROC-анализа / Ю. В. Кореновский, А. В. Кудинов, Е. В. Сузопов, А. В. Поповцева // *Медицина в Кузбассе.* – 2017. – Т. 15, № 3. – С.40–44.
 30. *Sibirskoe medicinskoe obozrenie.* 2016;5(101): 114-115. (Russian)
 6. Kisurina-Evgen'eva OP, Hashba LA, Savickaya MA, Onishchenko GE. Entoz i kletochnyj cikl v kul'ture opuholevykh kletok. *Citologiya. Nauka. SPb*, 2018;60(9):693-703. doi: 10.31116/tsitol.2018.09.05. (Russian)
 7. Bazanov KV, Kuznecov SS, Terent'ev IG. Modelirovanie kinetiki rosta recidivnogo i metastaticheskogo kolorektal'nogo raka s cel'yu ocenki effektivnosti himioterapevтического lecheniya. *Sovremennye tekhnologii v medicine.* 2014; 6(4):85-91. (Russian)
 8. Harchenko EP, Solov'ev IA. Metastazirovanie i rakovaya spyachka. *Onkologiya. Zhurnal im. P.A. Gercena.* 2016;5(5):72-77. (Russian)
 9. Kuzniatsou AE, Tsyrukunov VM, Ali HAA., Kerimova SS. Mucin expression in liver tumors. *International Journal of Health Sciences.* 2022;6(S5):12000-12012. doi: 10.53730/ijhs.v6nS5.11810. (Russian)
 10. Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene.* 2007 Apr 2;26(15):2157-65. doi: 10.1038/sj.onc.1210302.
 11. Toropova NE, Zakamova EV, Teterina Yu, Kozlov S, Timofeeva N, Moroshkina G, Neteleva S, Lipatova E, Trukhova L, Frolova E. Molecular and genetic research in practice of oncology clinic. *Izvestiya Samarskogo nauchnogocentra Rossijskoj akademii nauk.* 2015;17(2-3):690-696. (Russian)
 12. Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN. Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol.* 2007 Jul;7(7):532-42. doi: 10.1038/nri2115.
 13. Kit OI, Vodolazhskij DI, Kutilin DS, Malejko ML, Dvadenko KV, Enin YaS, Gudueva EN, Il'chenko SA. Otnositel'naya kopijnost' apoptoz-reguliruyushchih genov kak pokazatel' malignizacii tkanej zheludka. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya.* 2015;3: 40-45.
 14. Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhout S, Walczak H, Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Feb;15(2):135-47. doi: 10.1038/nrm3737.
 15. Jensen ON. Interpreting the protein language using proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Jun;7(6):391-403. doi: 10.1038/nrm1939.
 16. Barrea C, Vaessen S, Bulk S, Harvengt J, Misson JP. Phenotype-Genotype Correlation in Children with Neurofibromatosis Type 1. *Neuropediatrics.* 2018 Jun;49(3):180-184. doi: 10.1055/s-0037-1620239.
 17. Momand J, Wu HH, Dasgupta G. MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene.* 2000 Jan 25;242(1-2):15-29. doi: 10.1016/s0378-1119(99)00487-4.
 18. Simin K, Wu H, Lu L, Pinkel D, Albertson D, Cardiff RD, Van Dyke T. pRb inactivation in mammary cells reveals common mechanisms for tumor initiation and progression in divergent epithelia. *PLoS Biol.* 2004 Feb;2(2):E22. doi: 10.1371/journal.pbio.0020022.
 19. Classon M, Harlow E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002 Dec;2(12):910-7. doi: 10.1038/nrc950.
 20. Clemler NK, Arhel NJ, Barnes JD, Baker J, Moorghen M, Packham GK, Paraskeva C, Williams AC. The role of the retinoblastoma protein (Rb) in the nuclear localization of BAG-1: implications for colorectal tumour cell survival. *Biochem Soc Trans.* 2005 Aug;33(Pt 4):676-8. doi: 10.1042/BST0330676.
 21. Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Branle F, Ghisdal L, Mascaux C, Meert AP, Steels E, Vallot F, Verdebout JM, Lafitte JJ, Sculier JP. Role of Bcl-2 as a prognostic factor for

References

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov;68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492.
2. Ushkalova E.A., Zyryanov S.K., Gopienko I.A. Ekonomicheskie problemy farmakoterapii onkologicheskikh zabolevanij. *Farmakoekonomika. Sovremennaya farmakoekonomika i farmakoepidemiologiya*, 2020; 13(1): 64–70. (Russian)
3. Rak v Belarusi: cifry i fakty. Analiz dannyh Belorusskogo kancer-registra za 2010-2019 gg. [AE Okeanov i dr.; pod red. SL Polyakova]. Minsk: RNPC OMR im. N.N. Aleksandrova, 2020: 298 p. (Russian)
4. Okeanov AE. [i dr.]. Statistika onkologicheskikh zabolevanij v Respublike Belarus' (2008-2017). Pod red. OG Sukonko; Ministerstvo zdravoohraneniya Respubliki Belarus', Gosudarstvennoe uchrezhdenie «Respublikanskij nauchno-prakticheskij centr onkologii i medicinskoj radiologii im. N. N. Aleksandrova». Minsk : Respublikanskij nauchno-prakticheskij centr onkologii i medicinskoj radiologii, 2018: 284 p. (Russian)
5. Yakunina EYu, Mazaev EV, Semenov AV, Kozina YuV, Modestov AA. Raspredelenie kletok po fazam kletochnogo cikla v neizmennoj i opuholevoj tkani pri urotelial'nom rake.

- survival in lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003 Jul 7;89(1):55-64. doi: 10.1038/sj.bjc.6601095.
22. Zhu CQ, Shih W, Ling CH, Tsao MS. Immunohistochemical markers of prognosis in non-small cell lung cancer: a review and proposal for a multiphase approach to marker evaluation. *J Clin Pathol*. 2006 Aug;59(8):790-800. doi: 10.1136/jcp.2005.031351.
 23. Morson BC. Invasion of veins by carcinoma of rectum: method of detection, histological features and significance. *Mater Med Pol*. 1981;13(2):85-92.
 24. Kuzniatsou AE. Vzaimosvyaz' ekspressii proteinov NF1, r53, bcl-2, rRB s DNK/RNK virusov i mutacijami genov BRCA 1/2 i hMSH2 pri rake pecheni. *Izvestiya Nacional'noj akademii nauk Belarusi. Seriya medicinskih nauk*. 2023;20(2):126-139. doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-2-126-139. (Russian)
 25. Classon M, Harlow E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002 Dec;2(12):910-7. doi: 10.1038/nrc950.
 26. Bloom J, Cross FR. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Feb;8(2):149-60. doi: 10.1038/nrm2105.
 27. Santos SD, Wollman R, Meyer T, Ferrell JE Jr. Spatial positive feedback at the onset of mitosis. *Cell*. 2012 Jun 22;149(7):1500-13. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.028.
 28. Kuzniatsou AE, Tsyrukunov VM. Associacii geneticheskikh variantov genov i virusnoj DNK/RNK pri rake pecheni i tolstogo kishechnika. *Vestnik VGMU*. 2022;21(6):38-46. (Russian)
 29. Korenovskij YuV, Kudinov AV, Suzopov EV, Popovceva AV. Sravnenie komp'yuternyh programm dlya provedeniya opisatel'noj statistiki i ROC-analiza. *Medicina v Kuzbasse*. 2017;15(3):40-44. (Russian)

Финансирование. Исследование проведено при финансовой поддержке Гранта Президента Республики Беларусь.

Financing. The study was performed out with financial support from the Grant of the President of the Republic of Belarus

MOLECULAR-BIOLOGICAL SIGNIFICANCE OF CELL CYCLE PROTEINS IN COLON CANCER BARGAINED BY GENE MUTATIONS (BRCA 1/2, HMSH2) AND DNA/RNA VIRUSES

A. Kuzniatsou¹, V. Tsyrukunov²

¹*Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Republic of Belarus*

²*Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus*

Background. The increasing incidence and high incidence of deaths from colon tumors necessitate the search for additional prognostic markers. Cell cycle proteins may be potential markers for colon cancer (CC).

Objective – molecular biological assessment of cell cycle proteins (p53, bcl-2, NF1, pRb1) in CC, burdened by gene mutations (BRCA 1/2, hMSH2) and DNA/RNA viruses.

Materials and methods. The material for the study was tissue and serum samples from patients with cancer, in which the role of proteins in relation to the presence of viral DNA/RNA and mutations of the BRCA1/2 and hMSH2 genes was assessed.

Results. It was found that the concentrations of antibodies to proteins in the blood serum of healthy individuals differed from those in patients with CC ($p < 10^{-6}$). The occurrence of BRCA1/2 gene mutations among women was related with the hMSH2 gene ($p < 0.05$) and with CC. It has been shown that in individuals with CC, while carrying CMV in the presence of EBV, the activity of the “guardian of the cell cycle” – NF1, increases, and in case of mixed persistence of hepatitis viruses and herpes virus type 6 – p53. The concentration of antibodies to proteins does not depend on the age and gender of patients, which allows the use of these indicators exceeding the predicted concentrations as diagnostic markers of possible tumor pathology.

Conclusions. Determining the concentration of antibodies to cell cycle proteins can be used for diagnostic studies, in which clinical examination methods do not reveal signs of a neoplasm.

Keywords: tumor, cell cycle, tissue, serum, mutations, viruses, colon cancer.

For citation: Kuzniatsou A, Tsyrukunov V. Molecular-biological significance of cell cycle proteins in colon cancer bargained by gene mutations (BRCA 1/2, hMSH2) and dna/rna viruses. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2024, vol. 3, no. 1(4). pp. 9–21 (in Russian).

Поступила 19.02.2024

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА СТВОРОК ПЛОДОВ ФАСОЛИ ОБЫКНОВЕННОЙ (*VALVAE FRUCTUUM PHASEOLI VULGARIS*) НА ЛИПИДНЫЙ И УГЛЕВОДНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ У КРЫС ПРИ ДИАБЕТЕ II ТИПА

Л. И. Надольник¹, В. Ч. Полубок¹, Р. Е. Лис²

¹Институт биохимии биологически активных соединений
Национальной академии наук Беларуси, г. Гродно, Республика Беларусь

²Гродненский государственный медицинский университет,
г. Гродно, Республика Беларусь

Введение. Развитие дислипидемии и гипергликемии связано с ожирением, диабетом 2 типа, метаболическим синдромом и является проявлением нарушений механизмов регуляции различных метаболических систем организма.

Цель работы – оценить влияние экстракта створок плодов фасоли обыкновенной (*Valvae fructuum Phaseoli vulgaris*) на липидный и углеводный метаболизм у крыс с диабетом на фоне длительного употребления высокожировой диеты.

Материалы и методы. Диабет моделировали введением стрептозотоцина (СТЗ) самкам крыс в дозе 40 мг/кг на фоне высокожировой диеты (ВЖД), которую животные получали в течение 18 недель. Водный экстракт створок плодов фасоли обыкновенной (ЭСФО) вводился интрагастрально в дозе 100 мг/кг в течение 4 недель. Исследовались его эффекты на уровень глюкозы в крови, а также триглицеридов, общего холестерина, ЛПВП, ЛПНП, гистологическую структуру печени и поджелудочной железы крыс.

Результаты. Показано, что введение экстракта СФО снижает степень дислипидемии и проявления стеатоза печени крыс с диабетом на фоне длительного употребления ВЖД. Выявлено улучшение клиренса глюкозы и снижение степени инсулинорезистентности, а также повышение плотности клеток в β -островках.

Заключение. Полученные результаты представляют интерес для профилактики и коррекции метаболических нарушений, связанных с ожирением и диабетом II типа.

Ключевые слова: диабет, стеатоз печени, глюкоза, липиды, экстракт створок плодов фасоли обыкновенной.

Для цитирования: Влияние экстракта створок плодов фасоли обыкновенной (*Valvae fructuum Phaseoli vulgaris*) на липидный и углеводный метаболизм у крыс при диабете II типа / Л. И. Надольник, В. Ч. Полубок, Р. Е. Лис // Биохимия и молекулярная биология. – 2024. – Т. 3, № 1(4). – С. 22–28.

Введение

Длительное употребление высокожировых диет (ВЖД) может являться причиной повышения массы тела, развития дислипидемии, ожирения, а также инсулинорезистентности и диабета II типа. Связь между ожирением и гиперхолестеринемией, гипертонией, сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ) и сахарным диабетом 2-го типа (СД2) хорошо известна. Кроме того, важно отметить, что более значимым показателем, чем масса тела является развитие дисфункции жировой ткани, которая является основным фактором инсулинорезистентности и метаболического синдрома [1].

Несовершенство механизмов адаптации к ВЖД проявляется нарушением регуляции аппетита, метаболизма липидов, углеводов, функционирования важнейших гормональных систем организма [2].

Сложность и многоуровневость метаболических изменений, пока не находит должного способа их коррекции, но в этом направлении проводится большая работа. Актуальным является использование индивидуальных биологически активных соединений, полученных из лекарственного растительного сырья, а также их комплексов в виде сухих и жидких экстрактов [3–6].

Створки плодов фасоли обыкновенной (*Valvae fructuum Phaseoli vulgaris*) применяются в народной медицине при диабете; изучается их химический состав для разработки способов коррекции различных форм диабета. В стручках фасоли обнаружены аминокислоты (аргинин, триптофан, тирозин, лейцин, лизин, аспарагин), холин, бетаин, сахара, органические и жирные кислоты, сапонины, флавоноиды (кемпферол-3-глюкозид, кемпфе-

рол-3-глюкоксилозид, мирицетин-3-глюкозид кверцитурон), кумарины, стерины (β - и γ -ситостерины, стигмастерин), тритерпеновые гликозиды, антоцианы [7, 8, 9]. Фармакологические свойства водного экстракта створок фасоли: сахаропонижающее, противовоспалительное, репаративное, мочегонное, антимикробное и др. Богатый химический состав *Valvae fructuum Phaseoli vulgaris* предполагает эффективным их использование для коррекции нарушений не только при развитии гипергликемии, но и при дислипидемии и метаболическом синдроме.

Цель работы: оценить влияние экстракта створок плодов фасоли обыкновенной (*Valvae fructuum Phaseoli vulgaris*) на липидный и углеводный метаболизм у крыс с диабетом II типа на фоне длительного употребления высокожировой диеты.

Материалы и методы

Исследования выполнены на 30 половозрелых самках крыс линии Вистар массой 210–250 г, которые на протяжении эксперимента содержались в стандартных условиях по 5 особей в клетке. Все манипуляции с животными проводились согласно требованиям Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для научных целей (№ 123; [ETS 123 – Protection of Vertebrate Animals, 18.III.1986]).

Исследования проведены в течение 18 недель на трех группах животных: интактный контроль, высокожировая диета+введение стрептозотоцина (ВЖД+СТЗ), высокожировая диета+введение стрептозотоцина+введение экстракта створок плодов фасоли обыкновенной (ВЖД+СТЗ+ЭСФО). Калорийность ВЖД составляла 4,5 ккал/г [10], контрольные животные содержались на стандартной диете вивария (2,2 ккал/г). Моделирование сахарного диабета II типа проводилось внутрибрюшинной инъекцией СТЗ (ChemCruz, U-9889) в дозе 40 мг/кг после 12 недель употребления животными ВЖД. Группе крыс ВЖД+СТЗ+ЭСФО после введения СТЗ на протяжении 4 недель интрагастрально вводился экстракт СФО в дозе 100 мг/кг. Экстракт был получен в виде сухого порошка после 60-минутной водной экстракции створок плодов фасоли, концентрирования и упаривания под вакуумом.

Уровень глюкозы в капиллярной крови контролировали утром натощак с использованием тест-полосок (Rightest Test Strips GS 100) и глюкометра Rightest GM 100 («Bionime GmbH», Switzerland). В сыворотке крови концентрация глюкозы измерялась глюкозооксидазным методом (коммерческие наборы «Анализ X», Беларусь).

Толерантность к глюкозе оценивалась в интраперитонеальном глюкозотолерантном тесте (ИГТТ) при введении крысам натощак 40 % раствора глюкозы (2 г/кг, в объеме 2 мл), и последующим измерением её концентрации через 0, 30, 60 и 120 мин. В крови крыс были измерены концентрации триглицеридов (ТГ), общего холестерина (ОХЛ), липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) ферментативными методами (коммерческие наборы «АнализМед», Беларусь).

Для гистологического исследования кусочки печени и поджелудочной железы крыс фиксировали в нейтральном 4 % формалине, обезжизняли и заключали в парафин. Срезы толщиной 5 мкм изготавливали на микротоме (Leica RM2125, Германия), окрашивали гематоксилином и эозином. Изучение гистологических препаратов и их микрофотографирование проводили, используя микроскоп Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия) и цифровую видеокамеру Leica DFC 320 (Leica Microsystems GmbH, Германия).

Межгрупповые сравнения проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа по Краскелу-Уоллису в пакете статистических программ STATISTICA 12.0 (StatSoft, USA). Данные представлены как усеченное среднее \pm доверительный интервал, представленные значения среднего – 95 %. Сравнение площадей под кривой (area under curve) ИГТТ проводили с помощью критерия Манна-Уитни для повторяющихся измерений в программе MedCalc v.11.5.0.0. (MedCalc Software, Belgium). За статистически значимые принимались значения при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В таблице 1 представлены результаты по влиянию экстракта СФО на показатели липидного обмена у крыс. Уровень триглицеридов снижался в крови на 31,9 %, уровень общего холестерина – на 27,4 % по сравнению с группой ВЖД+СТЗ после введения экстракта в течение 4 недель ($p > 0,05$). Концентрация ЛПВП и коэффициент ЛПВП/ОХЛ повышались по сравнению с группой контроль соответственно на 23,6 % ($p = 0,004$) и 28,6 % ($p = 0,03$). Уровень ЛПНП снижался в крови крыс группы ВЖД+СТЗ+ЭСФО на 61,0 % ($p = 0,04$) после введения экстракта створок плодов фасоли (по сравнению с животными, не получавшими терапию), а показатель ЛПВП/ЛПНП повышался в 2,23 раза ($p = 0,04$).

Значительное улучшение метаболизма липидов и снижение степени дислипидемии согласуется со структурными изменениями печени крыс (рисунок 1).

Таблица 1 – Влияние экстракта створок плодов фасоли обыкновенной на показатели липидного профиля крови крыс при диабете на фоне высокожировой диеты ($n=9-10$)

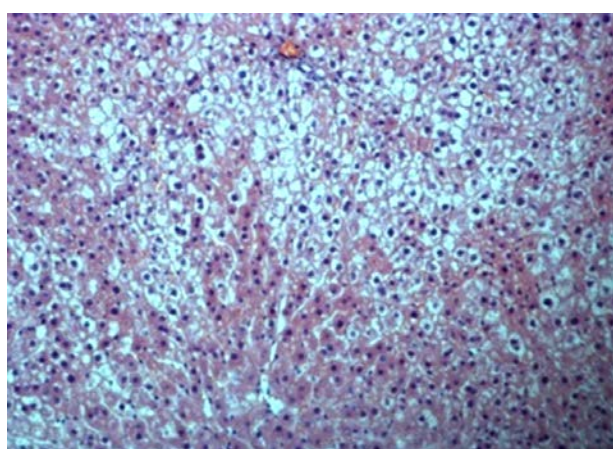
Table 1 – Effect of common bean fruit leaflet extract on the blood lipid profile of diabetic rats on a high-fat diet ($n=9-10$)

Показатель	Контроль	ВЖД+СТЗ	ВЖД+СТЗ+ЭСФ
Триглицериды, ммоль/л	1,79 [1,50;2,36]	2,16 [1,13;4,62]	1,47 [1,13;1,72]
ОХЛ, ммоль/л	2,22 [2,04;2,47]	2,99 [2,06;4,84]	2,17 [1,99;2,36]
Триглицериды/ОХЛ	0,84 [0,65;1,20]	0,73 [0,45;1,03]	0,70 [0,52;0,84]
ЛПВП, ммоль/л	0,93 [0,83;1,01]	1,08* [0,96;1,21]	1,15* [1,08;1,23]
ЛПВП/ОХЛ	0,42 [0,37;0,47]	0,44 [0,30;0,70]	0,54*† [0,49;0,58]
ЛПНП, ммоль/л	0,59 [0,43;0,92]	1,18 [0,69;1,96]	0,46* [0,25;0,76]
ЛПВП/ЛПНП	1,78 [1,31;2,33]	1,22 [0,76;1,86]	2,73† [1,75;4,37]

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к ИК

† – $p < 0,05$ по отношению к ВЖД+СТЗ

a



б

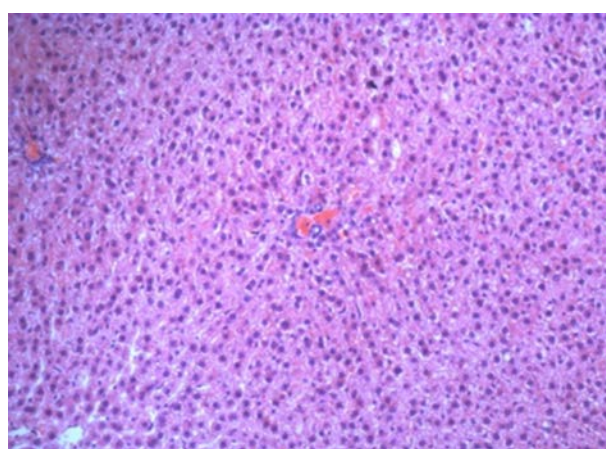


Рисунок 1 – Влияние экстракта створок плодов фасоли обыкновенной на структуру печени самок крыс с диабетом II типа на фоне употребления высокожировой диеты: окраска гематоксилином и эозином ($\times 10$):

a – ВЖД+СТЗ, медиа- и микровезикулярный стеатоз 2-й степени по Hornboll и Olsen; в гепатоцитах со стеатозом наблюдается очаговый кариолизис; *б* – ВЖД+СТЗ + введение экстракта створок плодов фасоли обыкновенной, микровезикулярный стеатоз

Figure 1 – Effect of extract of common bean fruit valves on the structure of the liver of female rats with type II diabetes while consuming a high-fat diet: hematoxylin and eosin staining ($\times 10$):

a – HFD+STZ, media- and microvesicular steatosis of the 2-nd degree according to Hornboll and Olsen; in hepatocytes with steatosis, focal karyolysis is observed; *b* – high-fat diet + STZ + extract of common bean fruit leaves, microvesicular steatosis

У крыс группы ВЖД+СТЗ развивалась жировая дистрофия печени, которая проявлялась медиа- и микровезикулярным стеатозом 2-й степени по Hornboll и Olsen, в гепатоцитах со стеатозом наблюдался очаговый кариолизис (рисунок 1, *a*). После введения экстракта СФО в печени крыс отмечались значительные улучшения: выявлялся, в основном, микровезикулярный стеатоз (рисунок 1, *б*), что предполагает гепатопротекторные свойства комплекса соединений, содержащихся в экстракте, которые проявлялись также снижением концентрации в крови щелочной фосфатазы более чем на 15 %.

Уровень глюкозы в капиллярной крови натощак в группе животных ВЖД+СТЗ составлял

6,16 [4,56; 9,60] ммоль/л. В группе животных, получавших экстракт СФО (4 недели, в дозе 100 мг/кг), концентрация глюкозы составляла 5,15 [4,85; 5,39] ммоль/л, что соответствует норме (таблица 2). Влияние экстракта СФО наиболее значительно проявлялось в сыворотке крови крыс (натощак) – таблица 2. В группе животных с диабетом (ВЖД+СТЗ) концентрация глюкозы была повышена в 2,29 раза по сравнению с группой контроль и составляла 12,85 [8,06; 19,69] ммоль/л ($p=0,0002$). Введение экстракта снизило этот показатель практически до контрольных значений (в 2,1 раза, по сравнению с группой ВЖД+СТЗ, $p=0,05$), что подтверждает его значимый гипогликемический эффект.

Таблица 2 – Влияние экстракта створок плодов фасоли обыкновенной на уровень глюкозы в крови крыс при диабете на фоне ВЖД (n=9–10)

Table 2 – Effect of extract of common bean fruit leaves on the level of glucose in the blood of diabetic rats on a high-fat diet (n=9–10)

Показатель	Контроль	ВЖД+СТЗ	ВЖД+СТЗ+ЭСФ
Глюкоза, натощак, ммоль/л	4,89 [4,58;5,20]	6,16 [4,56;9,60]	5,15 [4,85;5,39]
Глюкоза, сыворотка крови, ммоль/л	5,61 [5,22;5,97]	12,85* [8,06;19,69]	6,39† [5,82;6,88]

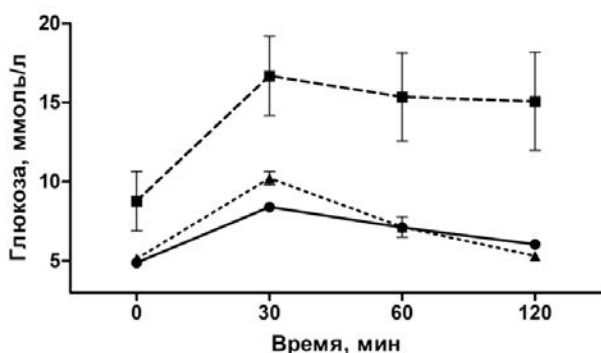
Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к ИК

† $p < 0,05$ – по отношению к ВЖД+СТЗ

Представляют интерес результаты ИГТТ, введение глюкозы в дозе 2 г/кг позволяет оценить эффективность ее поглощения и клиренса (рисунок 2, а). Применение экстракта значительно улучшило метаболизм глюкозы у крыс группы ВЖД+СТЗ+ЭСФО. Площадь под кривой ИГТТ была достоверно снижена в группе

крыс, получавших терапию экстрактом СФО на 51,3 % ($p = 0,0133$), по сравнению с группой ВЖД+СТЗ (рисунок 2, б) и приблизилась к значениям контрольной группы (104,6 %; $p = 0,6607$). В группе ВЖД+СТЗ площадь под кривой на 114,7 % превышала значения контроля ($p = 0,0039$).

а



б

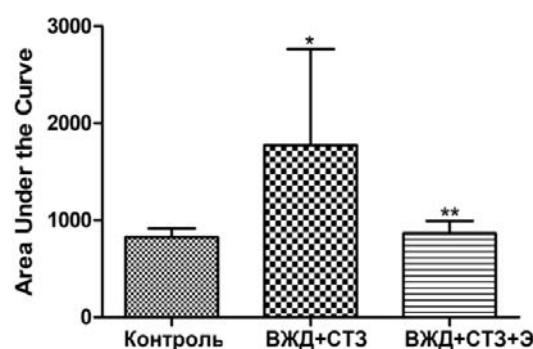


Рисунок 2 – Изменение уровня глюкозы в крови крыс в ИГТТ в течение 120 минут после её введения в дозе 2 г/кг в группах контроль (—●—), ВЖД+СТЗ (---■---), ВЖД+СТЗ+ЭСФО (---▲---) (а); площадь под кривой ИГТТ в группах контроль, ВЖД+СТЗ и ВЖД+СТЗ+ЭСФО (б)

(* $p < 0,05$ по сравнению с группой контроль; ** $p < 0,05$ по сравнению с группой ВЖД+СТЗ)

Figure 2 – Change in the blood glucose level of rats in IGTT for 120 minutes after its administration at a dose of 2 g/kg in the control groups (—●—), HFD+STZ (---■---), HFD+STZ+VFPV (---▲---) (a); area under the IGTT curve in the control, HFD+STZ and HFD+STZ+VFPV groups (b)

(* $p < 0,05$ compared with the control group; ** $p < 0,05$ compared with the HFD+STZ group)

При морфометрических исследованиях поджелудочной железы установлено, что экстракт СФО

положительно влияет на плотность распределения клеток в β -островках (таблица 3).

Таблица 3 – Влияние экстракта створок плодов фасоли обыкновенной на плотность клеток в эндокринных островках поджелудочной железы при диабете у крыс на фоне высокожировой диеты (кл/мм²)

Table 3 – Effect of extract of common bean fruit valves on cell density in the endocrine islets of the pancreas in diabetic rats on a high-fat diet (cells/mm²)

Группы	Медиана	25% перцентиль	75% перцентиль
Контроль	2460	2370	2542,9
ВЖД+СТЗ	2775	1337,5	3670
ВЖД+СТЗ+ЭСФО	4048*	3785,5	4348

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой контроль

Плотность распределения клеток в островках Лангерганса повышалась у животных группы ВЖД+СТЗ+ЭСФО на фоне введения экстракта в 1,46 раза ($p < 0,05$), что предполагает восстановление структуры и функции поджелудочной железы. При этом относительная площадь островков Лангерганса была сравнима с контрольными показателями.

Полученные результаты свидетельствуют, что введение экстракта СФО самкам крыс с дислипидемией и гипергликемией значительно нормализует липидный обмен, снижает степень стеатоза печени, а также степень инсулинорезистентности, улучшая клиренс глюкозы и структуру β -островков поджелудочной железы. Механизмы выявленных эффектов представляют значительный интерес для исследования; они могут быть связаны, по-видимому, с высоким уровнем фенольных соединений, сапонинов, антоцианов и других компонентов, содержащихся в полученном экстракте. В составе сухого водного экстракта створок плодов фасоли нами было определено наличие 5,41 % фенольных соединений и 0,62 % флавоноидов.

Данные об эффектах экстрактов створок плодов фасоли обыкновенной при экспериментальном диабете II типа в литературе нам не встречались; тем не менее, выявлены интересные закономерности в отношении употребления вареной фасоли. Установлено, что употребление вареной фасоли или сапонинов может снизить риск развития диабетических осложнений [11], что связывают с гипогликемическими свойствами сапонинов, их антиоксидантной активностью и влиянием на высокий уровень холестерина. Показано, что эффекты вареной фасоли (употребление 10 % в составе диеты) у крыс с СТЗ-диабетом на экспрессию генов почек, связанных с регуляцией воспалительной и окислительной реакции, не связаны с полифенольным и сапониновым профилем, что предполагает более сложные механизмы [12].

Наши результаты согласуются с данными по употреблению вареной фасоли при диабете I типа у крыс, где выявлено снижение глюкозы, триглицеридов, общего холестерина и ЛПНП, что коррелировало с защитой β -клеток поджелудочной же-

лезы [13]. Флавоноиды, присутствующие в черной сое (цианидин-3-глюкозид), облегчают диабет II типа за счет повышенной секреции адипонектина, снижения секреции TNF- α , активации передачи сигналов инсулина и увеличения поглощения глюкозы [14]. Важная защитная роль при развитии диабета принадлежит антоцианам, которые повышают экспрессию гена GLUT4, активируют АМР-протеинкиназу, улучшают секрецию инсулина, что важно для лечения пациентов с СД II [15]. Антоцианы черной сои активируют фосфорилирование рецептора инсулина, повышают экспрессию транспортера GLUT-4, что улучшает клиренс глюкозы и её использование тканями, предотвращают инсулинорезистентность и апоптоз β -клеток поджелудочной железы [16].

Механизмы выявленных терапевтических эффектов *Valvae fructuum Phaseoli vulgaris* могут быть опосредованными, в определенной степени, вышеназванными соединениями. Снижение степени инсулинорезистентности при лечении экстрактом створок плодов фасоли, возможно, обусловлено восстановлением функции инсулинового рецептора, включая его фосфорилирование, что тесно связано со снижением уровня TNF- α и массы белой жировой ткани, восстановлением уровня лептина и повышением продукции адипонектина.

Заключение

Результаты исследования представляют интерес для профилактики и коррекции метаболических нарушений, связанных с ожирением и диабетом II типа. Полученный экстракт СФО (*Valvae fructuum Phaseoli vulgaris*) может быть использован для разработки комплексного БАД или лекарственного средства для коррекции нарушений липидного и углеводного обмена при ожирении и развитии интолерантности к глюкозе. Показана его эффективность в лечении стеатоза печени и инсулинорезистентности. Тестируемый экстракт может применяться как пищевая добавка для создания функциональных продуктов питания для людей с признаками избыточной массы тела, а также различными формами диабета.

Список цитируемых источников

1. Precision nutrition to activate thermogenesis as a complementary approach to target obesity and associated-metabolic-disorders / M. Reguero. [et al.] // *Cancers* (Basel). – 2021. – Vol. 13, № 4. – P. 866.
2. Нейромедиаторы и нейропептиды — биомаркеры метаболических нарушений при ожирении / И. В. Гмошинский [и др.] // *Пробл. эндокринолог.* – 2018. – Т. 64, № 4. – С. 258–269.
3. Anti-hyperglycemic effect of fangchinoline isolated from *Stephania tetrandra* Radix in streptozotocin-diabetic mice / T. Tsutsumi, [et al.] // *Biol. Pharm. Bull.* – 2003. – Vol. 3. – P. 313–317.
4. Ayurvedic formulation of *Embllica officinalis* and *Curcuma longa* alleviates insulin resistance in diabetic rats: Involvement of curcuminoids and polyphenolics / V. Pandaa [et al.] // *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine.* – 2021. – Vol. 12, № 3. – P. 506–513.

5. Hendawy, O. M. Nano-delivery systems for improving therapeutic efficiency of dietary polyphenols / O. M. Hendawy // *Altern. Ther. Health. Med.* – 2021. – Vol. S1. – P. 162–177.
6. Polyphenols and human health: the role of bioavailability / C. Di Lorenzo [et al.] // *Nutrients.* – 2021. – Vol. 13, № 1. – P. 273.
7. Beninger, C. W. Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions, and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. seed coat color genotypes / C. W. Beninger, G. L. Hosfield // *J. Agric. Food Chem.* – 2003. – Vol. 51, № 27. – P. 7879–7883.
8. Chávez-Mendoza, C. Bioactive compounds from mexican varieties of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): implications for health / C. Chávez-Mendoza, E. Sánchez // *Molecules.* – 2017 – Vol. 22, № 8. – P. 1360.
9. Ranilla, L. G. Polyphenols and antioxidant capacity of seed coat and cotyledon from Brazilian and Peruvian bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) / L.G. Ranilla, M. I. Genovese, F. M. Lajolo // *J. Agric. Food Chem.* – 2007. – Vol. 55, № 1. – P. 90–98.
10. Skovsø, S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin / S. Skovsø // *Journal of Diabetes Investigation.* – 2014. – Vol. 5, № 4. – P. 349–358.
11. Consumption of cooked common beans or saponins could reduce the risk of diabetic complications / D. Calderón Guzmán [et al.] // *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* – 2020. – Vol. 13. – P. 3481–3486.
12. Cooked common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) modulate renal genes in streptozotocin-induced diabetic rats / C. Lomas-Soria [et al.] // *J. Nutr. Biochem.* – 2015. – Vol. 7. – P. 761–768.
13. Cooked common beans (*Phaseolus vulgaris*) protect against β -cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats / D. Hernández-Saavedra [et al.] // *Plant. Foods Hum. Nutr.* – 2013. – Vol. 68, № 2 – P. 207–212.
14. Cyanidin-3-glucoside derived from black soybeans ameliorate type 2 diabetes through the induction of differentiation of preadipocytes into smaller and insulin-sensitive adipocytes / T. Matsukawa [et al.] // *J. Nutr. Biochem.* – 2015. – Vol. 26, № 8 – P. 860–8677.
15. Rózańska, D. The significance of anthocyanins in the prevention and treatment of type 2 diabetes / D. Rózańska, B. Regulska-Ilow // *Adv. Clin. Exp. Med.* – 2018. – Vol. 27, № 1 – P. 135–142.
16. The anti-diabetic effect of anthocyanins in streptozotocin-induced diabetic rats through glucose transporter 4 regulation and prevention of insulin resistance and pancreatic apoptosis / I. T. Nizamutdinova [et al.] // *Mol. Nutr. Food Res.* – 2009. – Vol. 53, № 11. – P. 1419–1429.
- dra Radix in streptozotocin-diabetic mice. *Biol Pharm Bull.* 2003 Mar;26(3):313–317. doi: 10.1248/bpb.26.313.
4. Panda V, Deshmukh A, Singh S, Shah T, Hingorani L. An Ayurvedic formulation of *Embllica officinalis* and *Curcuma longa* alleviates insulin resistance in diabetic rats: Involvement of curcuminoids and polyphenolics. *J Ayurveda Integ Med.* 2021 Jul-Sep;12(3):506–513. doi: 10.1016/j.jaim.2021.05.005.
5. Panda V, Deshmukh A, Singh S, Shah T, Hingorani L. An Ayurvedic formulation of *Embllica officinalis* and *Curcuma longa* alleviates insulin resistance in diabetic rats: Involvement of curcuminoids and polyphenolics. *J Ayurveda Integ Med.* 2021 Jul-Sep;12(3):506–513. doi: 10.1016/j.jaim.2021.05.005.
6. Di Lorenzo C, Colombo F, Biella S, Stockley C, Restani P. Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability. *Nutrients.* 2021 Jan 19;13(1):273. doi: 10.3390/nu13010273.
7. Beninger CW, Hosfield GL. Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions, and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. seed coat color genotypes. *J Agric Food Chem.* 2003 Dec 31;51(27):7879–7883. doi: 10.1021/jf0304324.
8. Chávez-Mendoza C, Sánchez E. Bioactive Compounds from Mexican Varieties of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Implications for Health. *Molecules.* 2017 Aug 17;22(8):1360. doi: 10.3390/molecules22081360.
9. Ranilla LG, Genovese MI, Lajolo FM. Polyphenols and antioxidant capacity of seed coat and cotyledon from Brazilian and Peruvian bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agric Food Chem.* 2007 Jan 10;55(1):90–98. doi: 10.1021/jf062785j.
10. Skovsø S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *J Diabetes Investig.* 2014 Jul;5(4):349–358. doi: 10.1111/jdi.12235.
11. Calderón Guzmán D, Juárez Olguín H, Veloz Corona Q, Ortiz Herrera M, Osnaya Brizuela N, Barragán Mejía G. Consumption of Cooked Common Beans or Saponins Could Reduce the Risk of Diabetic Complications. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2020 Oct 2;13:3481–3486. doi: 10.2147/DMSO.S270564.
12. Lomas-Soria C, Pérez-Ramírez IF, Caballero-Pérez J, Guevara-Gonzalez RG, Guevara-Olvera L, Loarca-Piña G, Guzman-Maldonado HS, Reynoso-Camacho R. Cooked common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) modulate renal genes in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr Biochem.* 2015 Jul;26(7):761–768. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.02.006.
13. Hernández-Saavedra D, Mendoza-Sánchez M, Hernández-Montiel HL, Guzmán-Maldonado HS, Loarca-Piña GF, Salgado LM, Reynoso-Camacho R. Cooked common beans (*Phaseolus vulgaris*) protect against β -cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Plant Foods Hum Nutr.* 2013 Jun;68(2):207–12. doi: 10.1007/s11130-013-0353-1.
14. Matsukawa T, Inaguma T, Han J, Villareal MO, Isoda H. Cyanidin-3-glucoside derived from black soybeans ameliorate type 2 diabetes through the induction of differentiation of preadipocytes into smaller and insulin-sensitive adipocytes. *J Nutr Biochem.* 2015 Aug;26(8):860–867. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.03.006.
15. Rózańska D, Regulska-Ilow B. The significance of anthocyanins in the prevention and treatment of type 2 diabetes. *Adv Clin Exp Med.* 2018 Jan;27(1):135–142. doi: 10.17219/acem/64983.
16. Nizamutdinova IT, Jin YC, Chung JI, Shin SC, Lee SJ, Seo HG, Lee JH, Chang KC, Kim HJ. The anti-diabetic effect of anthocyanins in streptozotocin-induced diabetic rats through glucose transporter 4 regulation and prevention of insulin resistance and pancreatic apoptosis. *Mol Nutr Food Res.* 2009 Nov;53(11):1419–1429. doi: 10.1002/mnfr.200800526.

References

1. Reguero M, Gómez de Cedrón M, Wagner S, Reglero G, Quintela JC, Ramírez de Molina A. Precision Nutrition to Activate Thermogenesis as a Complementary Approach to Target Obesity and Associated-Metabolic-Disorders. *Cancers (Basel).* 2021 Feb 18;13(4):866. doi: 10.3390/cancers13040866.
2. Gmoshcinskiy IB, Apryatin SA, Schepelin VA, Nikityuk DB. Nejromediatory i nejropeptidy – biomarkery metabolicheskikh narushchenij pri ozirenii [*Neurotransmitters and neuropeptides - biomarkers of metabolic disorders in obesity*] Probl. Endocrinol. [*Problems of Endocrinology*] 2018; 64(4):258–269. (in Russian)
3. Tsutsumi T, Kobayashi S, Liu YY, Kontani H. Anti-hyperglycemic effect of fangchinoline isolated from *Stephania tetrandra*

EFFECT OF BEAN FRUIT VALVE EXTRACT (VALVAE FRUCTUUM PHASEOLI VULGARES) ON LIPID AND CARBOHYDRATE METABOLISM IN TYPE 2 DIABETIC RATS

L. I. Nadolnik¹, V. Ch. Polubok¹, R. Ye Lis²

¹*Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds, Grodno, Republic of Belarus*

²*Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus*

Background. The development of dyslipidemia and hyperglycemia is associated with obesity, type 2 diabetes, and the metabolic syndrome, and is a manifestation of dysregulation of various metabolic systems of the body.

Objective: to assess the effect of the extract of common bean fruit valves (*Valvae fructuum phaseoli vulgaris*) on lipid and carbohydrate metabolism in diabetic rats continuously fed on a high-fat diet.

Materials and methods. Diabetes was simulated in female by administering streptozotocin (STZ) at a dose of 40 mg/kg to female rats fed on a high-fat diet (HFD) for 18 weeks. An aqueous extract of common bean fruit valves was administered intragastrically at a dose of 100 mg/kg for 4 weeks. Its effects on the levels of blood glucose, as well as triglycerides, total cholesterol, HDL, LDL, and the histological structure of the liver and pancreas were studied.

Results. It has been shown that the administration of the common bean fruit valves extract reduces the degree of dyslipidemia and the manifestations of liver steatosis in diabetic rats against the background of the long-term HFD consumption. An improvement in glucose clearance and a decrease in insulin resistance, as well as an increase in cell density in β -islands were revealed.

Conclusions. The results obtained are of interest for prevention and correction of metabolic disorders associated with obesity and type 2 diabetes.

Keywords: diabetes, steatosis, glucose, lipids, common bean fruit valves extract.

For citation: Nadolnik LI, Polubok VCh, Ye Lis R. Effect of bean fruit valve extract (*Valvae fructuum phaseoli vulgares*) on lipid and carbohydrate metabolism in type 2 diabetic rats. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2024, vol. 3, no. 1(4). pp. 22–28 (in Russian).

Поступила 15.02.2024

БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ В ДООПЕРАЦИОННОЙ ОЦЕНКЕ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

А. Д. Таганович¹, Н. Н. Ковганко¹, Ж. А. Рутковская¹,
О. В. Готько², В. И. Прохорова²

¹Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск, Республика Беларусь

²Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии
имени Н. Н. Александрова, Минская область, Республика Беларусь

Введение. Отсутствие единого мнения о диагностической ценности использования маркеров, с одной стороны, и перспективность, малоинвазивность процедуры подготовки пробы, с другой, побудили нас предпринять настоящее исследование.

Цель исследования. Определить диагностические характеристики онкомаркеров CYFRA 21-1, SCC, РЭА, нейрон-специфической енолазы (НСЕ) и прогастрин-высвобождающего пептида (ПроГВП) у пациентов с операбельным НМРЛ I-IIIВ стадий для диагностики заболевания в ранних стадиях.

Материалы и методы. Обследовано 179 пациентов с НМРЛ I-IIIВ стадий. Контрольная группа включала 25 человек. Определение онкомаркеров в сыворотке крови проводили методом иммунохемилюминесцентного анализа с помощью наборов реагентов на анализаторе Cobas e411 (Roche Diagnostics, США).

Результаты. Концентрации CYFRA 21-1 в сыворотке крови была увеличена у всех обследованных пациентов. Выраженность увеличения коррелировала как со степенью распространенности опухолевого процесса (размер опухоли и наличие регионарных метастазов), так и со степенью дифференцировки клеток опухоли. Остальные биомаркеры (SCC, НСЕ, РЭА и ПроГВП) были неинформативными.

Заключение. Информативность или чувствительность онкомаркеров SCC, НСЕ, РЭА и ПроГВП при НМРЛ, АК и ПКРЛ сравнительно низкая. Их уровень в сыворотке крови пациентов, большей частью, отличается от уровня у здоровых людей и не связан с выраженностью опухолевого дескриптора.

Ключевые слова: аденокарцинома, плоскоклеточный рак легкого, CYFRA 21-1, SCC, РЭА, НСЕ, ПроГВП.

Для цитирования: Биохимические маркеры в дооперационной оценке распространенности немелкоклеточного рака легкого / А. Д. Таганович [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. – 2024. – Т. 3, № 1(4). – С. 29–36.

Введение

Рак легкого является одним из самых частых и неблагоприятных онкологических заболеваний. В мире каждый год регистрируется около 1,8 миллиона новых случаев рака легкого и около 1,6 миллиона умерших от него [1]. В структуре всех случаев рака легкого 80 % принадлежит немелкоклеточному раку (НМРЛ) [2]. Основными его подтипами являются аденокарцинома (АК) и плоскоклеточный рак (ПКРЛ). У большинства пациентов заболевание обнаруживается только в позднем этапе развития опухоли, когда проявления уже получают системное распространение и эффективность лечения невелика. 5-летняя выживаемость пациентов на этом этапе развития заболевания не превышает 10 % [3]. Поэтому актуальной является проблема раннего выявления НМРЛ.

На I и II стадиях заболевания (по классификации TNM) [4] клиническая симптоматика еще отсутствует. В этом трудность диагностики. Зато так

называемая ранняя диагностика опухоли сопряжена лишь с хирургическим удалением опухоли и ближайших метастазов, если таковые имеются. 5-летняя выживаемость пациентов в этот период самая высокая – 55–65 % [1].

Для объективизации диагностики НМРЛ, равно как и других онкологических заболеваний используются визуализация опухоли, гистологические и биохимические методы. Однако имеющиеся протоколы визуализации опухоли (рентгенологические методы) имеют ограничения, обусловленные облучением организма, высокой стоимостью оборудования и их невысокой разрешающей способностью на ранних стадиях опухолевого процесса. Гистологическое исследование предполагает наличие биопсийного материала опухолевой ткани, который чаще можно получить только инвазивным путем. Кроме того, для получения надежных, воспроизводимых результатов необходима многолетняя подготовка высококвалифицированного персонала.

Многообещающим диагностическим инструментом служат циркулирующие в крови биомаркеры [5–15]. Они являлись или компонентами опухолевых клеток, или участниками звеньев молекулярных событий развития опухолевой ткани. К ним, в частности, относятся CYFRA 21-1 (фрагмент цитокератина 19), SCC (антиген плоскоклеточного рака), РЭА (раковый эмбриональный антиген), НСЕ (нейрон-специфическая енолаза) и ПроГВП (прогастрин-высвобождающий пептид). Они могут обнаруживаться в кровотоке на ранней стадии опухолевого процесса. Их уровень зависит от стадии и других дескрипторов опухоли [12–15].

Растворимый фрагмент цитокератина 19 (CYFRA 21-1) является одним из наиболее изученных опухолеассоциированных антигенов [7]. Цитокератины – это фибриллярные белки микрофиламентов, выполняющие, главным образом, структурную функцию. Они достаточно интенсивно экспрессируются нормальными эпителиальными клетками и играют ключевую роль в формировании цитоскелета. В ходе катаболизма этих белков образуются растворимые фрагменты цитокератинов, которые высвобождаются в кровь при интенсивной пролиферации и лизисе эпителиальных клеток [8]. Мнения исследователей относительно целесообразности использования CYFRA 21-1 в диагностике НМРЛ неоднозначны. В литературе есть указания на увеличенный уровень CYFRA 21-1 в крови пациентов с этим заболеванием безотносительно гистологического подтипа [9]. При этом, сообщается о низкой информативности определения уровня этого показателя у пациентов с ранними стадиями заболевания и существенном росте его концентрации лишь при III и IV стадиях НМРЛ [10]. Имеются данные о коррелятивной связи концентрации CYFRA 21-1 в крови пациентов с размером опухоли и наличием метастазов в регионарные лимфоузлы как при АК, так и при ПКРЛ [7]. Результаты других исследований, напротив, указывают на отсутствие статистически значимых различий уровня CYFRA 21-1 в группах пациентов с различными клиническими характеристиками АК и существенное повышение концентрации CYFRA 21-1 в крови пациентов лишь в поздний период ПКРЛ [8].

По данным различных источников, диагностическая чувствительность измерения концентрации этого антигена в крови безотносительно гистологического подтипа НМРЛ варьирует от 33 % до 97 % [5]. При ранних стадиях заболевания она не превышает 61,1 % [6]. Диагностическая чувствительность измерения концентрации этого показателя у пациентов с ПКРЛ более, чем в два раза превосходит таковую при АК [9]. Но даже при ПКРЛ она составляет лишь 57 % [10].

SCC представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 48 кДа, который интенсивно экспрессируется клетками эпителия различных органов. Предполагается, что роль этого антигена в онкогенезе заключается в подавлении активности некоторых внутриклеточных сериновых протеиназ. Так же, как и прочие ингибиторы сериновых протеиназ, SCC обуславливает устойчивость опухолевых клеток к апоптотическим факторам [16].

Сообщается, что уровень этого антигена существенно повышен в крови пациентов с ПКРЛ, но не АК [16]. Результаты корреляционного анализа указывают на связь уровня SCC в крови пациентов с ПКРЛ с размером опухоли, наличием метастазов в регионарные лимфоузлы и внутренние органы [16]. Данные, приведенные в другой работе, продемонстрировали существенное увеличение концентрации SCC в крови пациентов не только с ПКРЛ, но и с АК. Согласно полученным результатам, пятилетняя выживаемость пациентов с АК и высокой концентрацией SCC в крови практически в два раза меньше, чем при его низком уровне. Наряду с этим, повышенная концентрация этого антигена в крови не ассоциирована с плохим прогнозом ПКРЛ [17]. Результаты других исследований показали существенные различия в информативности этого теста при выявлении АК и ПКРЛ [18,19]. Оказалось, что диагностическая чувствительность определения SCC при АК значительно ниже, чем при ПКРЛ, и составляет лишь 14,2 % [18]. Однако даже при ПКРЛ она не превышает 52,7 % [19].

Диагностическая ценность опухолеассоциированных маркеров РЭА, НСЕ и ПроГВП, в основном, изучена при немелкоклеточном раке легкого, определение этих показателей в группе пациентов с I–III стадиями АК и ПКРЛ в отдельности не проводилось. В тоже время, значительное количество исследований, в том числе за последний период времени, посвящено изучению диагностической ценности определения этих показателей при злокачественных опухолях другой локализации и результаты оказались также противоречивы [20–23].

Следует отметить, что ни один из этих маркеров не является специфичным для рака легкого. Что касается связи с гистологическим типом, наиболее четкая она лишь для SCC, который нередко определяется для подтверждения наличия или отсутствия ПКРЛ. Хотя и здесь полученные результаты противоречивы [18, 19]. Видимо, поэтому ни один из известных биохимических лабораторных показателей, кроме простат-специфического антигена при раке предстательной железы не включен в протоколы диагностики и лечения онкологических заболеваний.

Отсутствие единого мнения о диагностической ценности использования вышеназванных маркеров, с одной стороны, и перспективность, малоинвазивность процедуры подготовки пробы, с другой, побудили нас предпринять исследование, целью которого явилось выяснение наличия или отсутствия изменений уровня этих показателей у пациентов с АК, ПКРЛ и в целом, НМРЛ, чтобы убедиться в целесообразности их использования в качестве биомаркеров при этих формах рака легкого.

Материалы и методы

Обследовано 179 пациентов с резектабельным НМРЛ I-III стадий (57 женщин и 122 мужчины) при поступлении их в ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова» в период 2021–2022 гг. Средний возраст пациентов составил 57 ± 21 лет. Характеристика пациентов представлена в таблице 1. В качестве группы сравнения обследовано 25 человек без проявлений заболевания в возрасте 53 ± 17 лет.

Таблица 1 – Характеристика пациентов с НМРЛ

Table 1 – Characteristics of patients with non-small cell lung cancer

Стадия НМРЛ			
I	II	III	
42	71	66	
Размер опухоли (T)			
T1	T2	T3	T4
51	63	35	30
Метаастазы в регионарные лимфоузлы (N)			
N0	N1	N2	
61	77	41	
Степень дифференцировки опухоли (Grade)			
G1	G2	G3	
57	69	53	

Для получения сыворотки крови из локтевой вены пациентов и здоровых людей собирали натощак в пробирку с тромбином и разделительным гелем (Improvacuter, КНР).

Определение концентрации CYFRA 21-1, SCC, РЭА, HCE и ПроГВП в сыворотке крови осуществляли методом иммунохемилюминесцентного анализа с помощью наборов реагентов на анализаторе Cobas e411 (Rosche Diagnostics, США).

Для всех выборок проверяли гипотезу нормальности распределения по критерию Колмогорова-Смирнова. Поскольку значения показателей не подчинялись нормальному распределению, анализ проводили методами непараметрической статистики с использованием программного пакета MedCalc (MedCalc Software Ltd., Бельгия). Рассчитывались медиана и интерквартильный размах

(25%–75%). Для оценки различий уровня определяемых показателей в нескольких независимых группах применяли H-критерий Краскелла-Уоллиса. Критический уровень его значимости принимали равным 5 % ($p < 0,05$). Дальнейшие сравнения концентрации показателей в анализируемых группах осуществлялись с применением U-критерия Манна-Уитни. В соответствии с поправкой Холма-Бонферрони на множественные сравнения, критический уровень его значимости рассчитывали по общепринятой формуле.

Результаты и их обсуждение

При I-II стадиях развития НМРЛ в сыворотке крови пациентов повышена по сравнению с контрольной группой концентрация CYFRA 21-1 и ПроГВП (таблица 2А). При III стадии повышение уровня сохранялось только для CYFRA 21-1. В случае ПроГВП он остался таким же как у пациентов с ранними стадиями. У пациентов с III стадией увеличена концентрация SCC и HCE, в то время как на ранних стадиях концентрация этих белков у пациентов с НМРЛ не отличалась от уровня у здоровых людей. Отсутствовали значимые изменения и уровня РЭА по сравнению с контрольной группой как у пациентов с ранними, так и с поздними стадиями НМРЛ.

Концентрация CYFRA 21-1 в сыворотке крови пациентов с НМРЛ и размером опухоли более 5 см (T3-4) возрастала почти в 2,5 раза по сравнению с показателями у пациентов на ранних стадиях (таблица 3А). Также отличия наблюдались и в уровне HCE при сравнении показателей у пациентов с T1-2 и T3-4. Однако у HCE, в отличие от CYFRA 21-1, малый размер опухоли не вызывал значимых изменений в уровне показателя по сравнению со здоровыми людьми. Уровень SCC, РЭА и ПроГВП не отличался у пациентов с НМРЛ с различным размером опухоли.

Из всех изучаемых показателей только CYFRA 21-1 демонстрирует рост концентрации в крови при N1,2 по сравнению с N0 (таблица 3Б), так и с увеличением степени злокачественности клеток опухоли. При Grade3 отмечается рост на 37 % по сравнению с Grade 1,2 (таблица 3В).

Наиболее информативным маркером у пациентов с АК также является концентрация CYFRA 21-1, которая повысилась как по сравнению со здоровыми людьми, так и по мере увеличения стадии заболевания (таблица 2Б). Уровень HCE возрастает только на поздних стадиях АК. Подъем концентрации ПроГВП в сыворотке крови наблюдался только по сравнению с группой здоровых лиц, и не зависел от стадии. Уровень SCC и РЭА не отличался у пациентов с АК и здоровых людей.

Таблица 2 – Уровень маркеров в зависимости от стадии опухолевого процесса

Table 2 – Level of markers depending on the stage of the tumor process

Показатель	Здоровые	I и II стадии	ШАВ стадии
А. НМРЛ			
СУFRA, нг/мл	1,49 [1,23; 2,09]	2,63 [1,78; 3,56] ¹	4,27 [2,97; 9,65] ^{1,2}
SCC, нг/мл	1,24 [0,86; 1,61]	1,31 [0,99; 1,85]	1,68 [1,09; 2,28] ¹
РЭА, нг/мл	2,48 [1,41; 3,50]	2,77 [1,67; 5,01]	2,72 [2,06; 4,48]
НСЕ, нг/мл	11,19 [9,00; 13,56]	13,57 [11,39; 18,43]	16,96 [15,19; 20,71] ¹
ПроГВП, пг/мл	31,56 [24,43; 39,28]	41,65 [30,93; 55,82] ¹	41,90 [33,33; 59,57] ¹
Б. АК			
СУFRA, нг/мл	см. выше	2,49 [1,66; 2,89] ¹	3,54 [2,58; 7,82] ^{1,2}
SCC, нг/мл		1,29 [0,88; 1,82]	1,95 [1,87; 1,92]
РЭА, нг/мл		2,73 [1,55; 4,97]	2,45 [2,06; 4,39]
НСЕ, нг/мл		13,39 [11,88; 18,14]	16,87 [16,04; 22,74] ¹
ПроГВП, пг/мл		40,93 [29,64; 56,05] ¹	47,41 [29,14; 73,25] ¹
В. ПКРЛ			
СУFRA, нг/мл	см. выше	3,59 [2,03; 5,44] ¹	5,65 [3,02; 10,17] ^{1,2}
SCC, нг/мл		1,53 [1,18; 2,99] ¹	1,73 [1,52; 2,35] ¹
РЭА, нг/мл		3,11 [1,84; 5,10]	2,74 [2,13; 4,15]
НСЕ, нг/мл		14,97 [10,40; 19,24]	16,96 [13,07; 20,56] ¹
ПроГВП, пг/мл		42,15 [32,43; 51,68] ¹	40,62 [34,75; 51,22] ¹

Примечание (здесь и в последующих таблицах):

¹статистическая достоверность значимости различий по сравнению со здоровыми людьми;

²статистическая достоверность значимости различий между группами пациентов

Note (here and in subsequent tables):

¹statistical reliability of the significance of differences compared to healthy people;

²statistical significance of the significance of differences between groups of patients

Таблица 3 – Уровень маркеров у пациентов с НМРЛ в зависимости от дескрипторов опухоли и степени дифференцировки клеток опухоли

Table 3 – Level of markers in patients with non-small cell lung cancer depending on tumor descriptors and degree of tumor cell differentiation

А. Размер опухоли (T)		
Показатель	T1,2	T3,4
СУFRA, нг/мл	2,77 [1,99; 3,85] ¹	6,77 [2,51; 11,04] ^{1,2}
SCC, нг/мл	1,37 [0,98; 2,07]	1,68 [1,10; 2,19] ¹
РЭА, нг/мл	2,62 [1,69; 4,73]	3,51 [2,14; 4,82]
НСЕ, нг/мл	13,56 [10,37; 18,05]	18,14 [16,37; 21,34] ^{1,2}
ПроГВП, пг/мл	41,65 [30,25; 56,03] ¹	41,90 [34,26; 59,47] ¹
Б. Метастазы в регионарные лимфоузлы (N)		
Показатель	N0	N1,2
СУFRA, нг/мл	2,49 [1,59; 3,46] ¹	3,74 [2,49; 6,80] ^{1,2}
SCC, нг/мл	1,29 [0,97; 1,83]	1,62 [1,12; 2,40] ¹
РЭА, нг/мл	2,73 [1,59; 4,80]	2,86 [1,99; 4,82]
НСЕ, нг/мл	13,57 [10,76; 18,97]	16,91 [13,11; 20,68] ¹
ПроГВП, пг/мл	44,96 [34,69; 56,03] ¹	40,31 [29,52; 57,12] ¹
В. Дифференцировка клеток опухоли (Grade)		
Показатель	Grade 1,2	Grade 3
СУFRA, нг/мл	2,97 [1,93; 6,05] ¹	4,08 [2,48; 6,48] ^{1,2}
SCC, нг/мл	1,47 [0,95; 2,23]	1,53 [1,10; 1,88]
РЭА, нг/мл	2,57 [1,82; 4,12]	3,12 [2,02; 5,38]
НСЕ, нг/мл	15,74 [11,76; 18,11] ¹	16,13 [12,67; 20,55] ¹
ПроГВП, пг/мл	40,70 [33,89; 51,56] ¹	41,90 [27,89; 59,57] ¹

У пациентов с АК и размером опухоли более 5 см (таблица 4А) уровень CYFRA 21-1 и HCE был выше, чем у пациентов с размером опухоли до 5 см. У пациентов с размером опухоли до 5 см более высокими по сравнению с контролем были только значения CYFRA 21-1.

У пациентов с АК значительно увеличена концентрация ПроГВП по сравнению со здоровыми людьми. Разница уровня этого маркера в зависимости от размера опухоли отсутствует. Полностью отсутствуют изменения концентрации SCC и РЭА у пациентов с разным размером опухоли между собой и по сравнению с контрольной группой.

У пациентов с АК и отсутствием регионарных метастазов концентрация ПроГВП и CYFRA 21-1 выше, чем у здоровых людей (таблица 4Б). Уровень CYFRA 21-1 и HCE при N1,2 становится еще более высоким, чем при N0. Разница по сравнению с N0 статистически достоверна.

У пациентов с АК и различной степенью дифференцировки опухолевых клеток концентрация CYFRA 21-1 и ПроГВП существенно превышала контрольный уровень. При этом, для CYFRA 21-1 он был выше у пациентов с Grade 3 по сравнению с Grade 1,2. Для остальных изучаемых показателей изменение концентрации в сыворотке крови отсутствует в зависимости от степени дифференцировки.

Таблица 4 – Уровень маркеров у пациентов с АК в зависимости от дескрипторов опухоли и степени дифференцировка клеток опухоли

Table 4 – Level of markers in patients with adenocarcinoma depending on tumor descriptors and degree of differentiation of tumor cells

А. Размер опухоли		
Показатель	T1,2	T3,4
CYFRA, нг/мл	2,51 [1,80; 2,96] ¹	4,51 [2,30; 9,38] ^{1,2}
SCC, нг/мл	1,28 [0,88; 1,83]	0,99 [0,88; 1,79]
РЭА, нг/мл	2,45 [1,54; 4,65]	4,13 [2,56; 7,33]
HCE, нг/мл	13,48 [11,87; 17,00]	19,54 [16,97; 29,04] ^{1,2}
ПроГВП, пг/мл	41,16 [27,72; 56,68] ¹	41,75 [29,58; 67,61] ¹
Б. Метастазы в регионарные лимфоузлы		
Показатель	N0	N1,2
CYFRA, нг/мл	2,42 [1,59; 3,08] ¹	4,82 [2,36; 8,56] ^{1,2}
SCC, нг/мл	1,17 [0,87; 1,61]	1,21 [0,88; 1,92]
РЭА, нг/мл	2,67 [1,48; 4,66]	2,85 [2,19; 5,32]
HCE, нг/мл	13,39 [11,88; 17,62]	16,87 [13,59; 20,67] ^{1,2}
ПроГВП, пг/мл	43,21 [32,37; 53,23] ¹	40,19 [28,52; 60,37] ¹
В. Степень дифференцировки клеток опухоли		
Показатель	Grade 1,2	Grade 3
CYFRA, нг/мл	2,51 [1,54; 3,38] ¹	4,75 [2,36; 8,08] ^{1,2}
SCC, нг/мл	0,99 [0,87; 1,36]	1,41 [1,01; 2,12]
РЭА, нг/мл	2,39 [1,56; 4,63]	3,12 [2,28; 6,01]
HCE, нг/мл	13,48 [11,95; 17,58]	16,07 [12,65; 19,17]
ПроГВП, пг/мл	40,70 [30,28; 48,22] ¹	41,25 [27,51; 60,63] ¹

Анализ уровня определяемых показателей при I-II стадиях ПКРЛ демонстрирует отличие их уровня от контрольного для CYFRA 21-1, SCC и ПроГВП (таблица 2В). Аналогичные изменения по сравнению с контролем имеют место и при IIIA,B стадии. Вместе с тем, концентрация CYFRA 21-1 при IIIA,B стадии еще больше увеличивается, что показывает статистически достоверная разница для этого показателя между группой пациентов с ранними стадиями и IIIA,B стадией. Увеличение концентрации HCE по сравнению с контрольной группой имеет место, но только для пациентов с III

стадией. Уровень РЭА у пациентов с ПКРЛ не отличался от контрольного.

Самым чувствительным к дескрипторам опухоли оказался уровень CYFRA 21-1 (таблица 5). Не чувствительность к дескрипторам демонстрирует РЭА, концентрация которого не отличалась ни от контрольной величины, ни от выраженности опухолевого дескриптора. Остальные определяемые показатели существенно превышают контрольный уровень (за исключением HCE у пациентов с N0), но не отличаются между группами с различной выраженностью дескриптора.

Таблица 5 – Уровень маркеров у пациентов с ПКРЛ в зависимости от дескрипторов опухоли и степени дифференцировка клеток опухоли

Table 5 – Level of markers in patients with squamous cell lung cancer depending on tumor descriptors and the degree of differentiation of tumor cells

А. Размер опухоли		
Показатель	T1,2	T3,4
CYFRA, нг/мл	3,98 [2,10; 5,44] ¹	6,83 [2,35; 11,65] ^{1,2}
SCC, нг/мл	1,68 [1,27; 2,35] ¹	1,70 [1,49; 2,20] ¹
РЭА, нг/мл	3,11 [1,84; 5,10]	2,88 [2,13; 4,26]
НСЕ, нг/мл	13,93 [10,35; 19,24]	17,94 [15,94; 20,73] ¹
ПроГВП, пг/мл	42,14 [33,72; 51,71] ¹	41,90 [34,95; 55,71] ¹
Б. Метастазы в регионарные лимфоузлы		
Показатель	N0	N1,2
CYFRA, нг/мл	2,79 [1,75; 6,80] ¹	4,70 [3,11; 8,84] ^{1,2}
SCC, нг/мл	1,71 [1,08; 2,45] ¹	1,68 [1,41; 2,61] ¹
РЭА, нг/мл	3,37 [1,85; 5,19]	2,88 [1,89; 4,15]
НСЕ, нг/мл	16,13 [10,14; 19,71]	16,94 [12,26; 20,59] ¹
ПроГВП, пг/мл	45,12 [37,35; 59,27] ¹	40,62 [33,49; 50,35] ¹
В. Степень дифференцировки опухолевых клеток		
Показатель	Grade 1,2	Grade 3
CYFRA, нг/мл	3,43 [2,10; 6,89] ¹	4,76 [4,05; 14,48] ^{1,2}
SCC, нг/мл	2,00 [1,33; 2,40]	1,54 [1,20; 1,79]
РЭА, нг/мл	2,88 [1,89; 4,07]	3,12 [1,91; 5,16]
НСЕ, нг/мл	16,21 [11,25; 18,15] ¹	16,98 [12,53; 21,76] ¹
ПроГВП, пг/мл	41,23 [34,75; 51,81] ¹	41,90 [27,69; 48,55] ¹

Заключение

Проведенное исследование позволяет сформулировать следующие выводы:

Для пациентов с НМРЛ, АК и ПКРЛ характерен подъем уровня CYFRA 21-1 в сыворотке крови. Его выраженность зависит от стадии заболевания и соответствующих стадии дескрипторов (размеров опухоли и метастазов в региональные лимфоузлы), а также от дифференцировки опухолевых клеток.

Информативность или чувствительность онкомаркеров SCC, НСЕ, РЭА и ПроГВП при НМРЛ,

АК и ПКРЛ сравнительно низкая. Их уровень в сыворотке крови пациентов, большей частью, отличается от уровня у здоровых людей и не связан с выраженностью опухолевого дескриптора.

Результаты проведенного исследования подтверждают имеющиеся сомнения относительно целесообразности использования SCC, НСЕ, РЭА и ПроГВП для диагностики рака легкого. Тем самым, имеется необходимость продолжения поиска биохимических маркеров этого заболевания.

Список использованных источников

1. Cancer statistics, 2023. / R. L. Siegel [et al] // CA Cancer J. Clin. – 2023. – Vol. 73, № 1. – P. 17–48.
2. Schabath, M. B. Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer / M. B. Schabath, M. L. Cote // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 2019. – Vol. 28, № 10. – P. 1563–1579.
3. Oliver, A. L. Lung Cancer: Epidemiology and Screening / A. L. Oliver // Surg. Clin. North Am. – 2022. – Vol. 102, № 3. – P. 335–344.
4. The 8th lung cancer TNM classification and clinical staging system: review of the changes and clinical implications / W. Lim [et al.] // Quant. Imaging Med. Surg. – 2018. – Vol. 8, №7. – P. 709–718.
5. Usefulness of serum tumor markers, including progastrin-releasing peptide, in patients with lung cancer: correlation with histology / R. Molina [et al] // Tumor Biol. – 2009. – Vol. 30, № 3. – P. 121–129.
6. Рыков, И. В. Значение циркулирующих опухолевых маркеров при раке легкого в клинической практике / И. В. Рыков // Злокачественные опухоли. – 2020. – Т. 10, № 2. – С. 31–35.
7. Greenberg, A. K. Biomarkers for lung cancer: clinical uses / A. K. Greenberg, M. S. Lee // Curr. Opin. Pulm. Med. – 2007. – Vol. 13. – P. 249–255.
8. Soluble cytokeratin-19 and E-selectin biomarkers: their relevance for lung cancer detection when tested independently or in combinations / M. Swellam [et al] // Cancer Biomarkers. – 2008. – Vol. 4. – P. 43–54.
9. New and old biomarkers in the differential diagnosis of lung cancer: Pro-gastrin-releasing peptide in comparison with neuron-specific enolase, carcinoembryonic antigen, and CYFRA 21-1 / C. Mauro [et al] // Int. J. Biol. Markers. – 2019. – Vol. 34, № 2. – P. 163–167.
10. CYFRA 21-1. A new marker in lung cancer / P. Stieber [et al.] // Cancer. – 1993. – Vol. 72. – P. 707–713.
11. Squamous cell carcinoma antigen in lung cancer and nonmalignant respiratory diseases / K. Kagohashi [et al] // Lung. – 2008. – Vol. 186, № 5. – P. 323–326.
12. Tumor markers CEA, NSE, SCC, TPA and CYFRA 21.1 in resectable non-small cell lung cancer / P. Foa [et al.] // Anticancer Res. – 1999. – Vol. 19. – P. 3613–3618.
13. Holdenrieder, S. Biomarkers along the continuum of care in lung cancer / S. Holdenrieder // Scand. J. Clin. Lab.

- Invest. Suppl. – 2016. – Vol. 245. – P. S40–S45. doi: 10.1080/00365513.2016.1208446.
14. The diagnostic and prognostic value of ProGRP in lung cancer / B. Nisman [et al.] // *Anticancer Res.* – 2009. Vol. 29 (11). – P. 4827–4832.
 15. Serum neuron specific enolase (S-NSE) and the prognosis in small cell lung cancer (SCLC): a combined multivariable analysis on data from nine centres / L. G. M. Jorgensen [et al.] // *Br. J. Cancer.* – 1996. – Vol. 74. – P. 463–467.
 16. Suminami, Y. Biological role of SCC antigen / Y. Suminami, S. Nawata, H. Kato // *Tumour Biol.* – 1998. – Vol. 19, № 6. – P. 488–493.
 17. Correlation between serum squamous cell carcinoma antigen level and tumor volume in head and neck cancer / K. Jantharapattana [et al.] // *J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.* – 2018. – Vol. 80, № 5–6. – P. 284–289.
 18. Prognostic significance of serum squamous cell carcinoma antigen in surgically treated lung cancer / S. Takeuchi [et al.] // *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2003. – Vol. 9, № 2. – P. 98–104.
 19. Zhu, H. Squamous cell carcinoma antigen: clinical application and research status / Z. Huang // *Diagnostic.* – 2022. – Vol. 12. – P. 1–16.
 20. Tumor Markers and Their Diagnostic Significance in Ovarian Cancer / A. Matsas [et al.] // *Life (Basel).* – 2023. – Vol. 13, № 8. – P. 1689.
 21. The assessment of the prognostic value of tumor markers and cytokines as SCCAg, CYFRA 21.1, IL-6, VEGF and sTNF receptors in patients with squamous cell cervical cancer, particularly with early stage of the disease / B. Kotowicz [et al.] // *Tumour Biol.* – 2016. – Vol. 37, № 1. – P. 1271–1278.
 22. Elevated serum CYFRA 21-1 level as a diagnostic marker for thymic carcinoma / H. Shiiya [et al.] // *Thorac Cancer.* – 2021. – Vol. 12, № 21. – P. 2933–2942.
 23. Lee, J.H. Clinical Usefulness of Serum CYFRA 21-1 in Patients with Colorectal Cancer / J.H. Lee // *Nucl. Med. Mol. Imaging.* – 2013. – Vol. 47, № 3. – P. 181–187.
 7. Greenberg AK, Lee MS. Biomarkers for lung cancer: clinical uses. *Curr Opin Pulm Med.* 2007;13(4):249-55. doi: 10.1097/MCP.0b013e32819f8f06.
 8. Swellam M, Ragab HM, Abdalla NA, El-Asmar AB. Soluble cytokeratin-19 and E-selectin biomarkers: their relevance for lung cancer detection when tested independently or in combinations. *Cancer Biomark.* 2008;4(1):43-54. doi: 10.3233/cbm-2008-4105.
 9. Mauro C, Passerini R, Spaggiari L, Galetta D, Radice D, Lentati P, Sandri MT. New and old biomarkers in the differential diagnosis of lung cancer: Pro-gastrin-releasing peptide in comparison with neuron-specific enolase, carcinoembryonic antigen, and CYFRA 21-1. *Int J Biol Markers.* 2019;34(2):163-167. doi: 10.1177/1724600819834235.
 10. Stieber P, Hasholzner U, Bodenmüller H, Nagel D, Sunder-Plassmann L, Dienemann H, Meier W, Fateh-Moghadam A. CYFRA 21-1. A new marker in lung cancer. *Cancer.* 1993;72(3):707-13. doi: 10.1002/1097-0142(19930801)72:3<707::aid-cnrcr2820720313>3.0.co;2-x.
 11. Kagohashi K, Satoh H, Kurishima K, Kadono K, Ishikawa H, Ohtsuka M, Sekizawa K. Squamous cell carcinoma antigen in lung cancer and nonmalignant respiratory diseases. *Lung.* 2008;186(5):323-6. doi: 10.1007/s00408-008-9108-4.
 12. Foa P, Fornier M, Miceli R, Seregini E, Santambrogio L, Nosotti M, Cataldo I, Sala M, Caldiera S, Bombardieri E. Tumor markers CEA, NSE, SCC, TPA and CYFRA 21.1 in resectable non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 1999;19(4C):3613-8.
 13. Holdenrieder S. Biomarkers along the continuum of care in lung cancer. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 2016;245:S40-5. doi: 10.1080/00365513.2016.1208446.
 14. Nisman B, Biran H, Ramu N, Heching N, Barak V, Peretz T. The diagnostic and prognostic value of ProGRP in lung cancer. *Anticancer Res.* 2009;29(11):4827-32.
 15. Jørgensen LG, Osterlind K, Genollá J, Gomm SA, Hernández JR, Johnson PW, Løber J, Splinter TA, Szturmowicz M. Serum neuron-specific enolase (S-NSE) and the prognosis in small-cell lung cancer (SCLC): a combined multivariable analysis on data from nine centres. *Br J Cancer.* 1996;74(3):463-7. doi: 10.1038/bjc.1996.383. Erratum in: *Br J Cancer* 1996 Dec;74(12):2043.
 16. Suminami Y, Nawata S, Kato H. Biological role of SCC antigen. *Tumour Biol.* 1998;19(6):488-93. doi: 10.1159/000030042.
 17. Jantharapattana K, Kotamnavates T, Hirunpat S, Jarumanokul R. Correlation between Serum Squamous Cell Carcinoma Antigen Level and Tumor Volume in Head and Neck Cancer. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2018;80(5-6):284-289. doi: 10.1159/000491494.
 18. Takeuchi S, Nonaka M, Kadokura M, Takaba T. Prognostic significance of serum squamous cell carcinoma antigen in surgically treated lung cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;9(2):98-104.
 19. Zhu H. Squamous Cell Carcinoma Antigen: Clinical Application and Research Status. *Diagnostics (Basel).* 2022;12(5):1065. doi: 10.3390/diagnostics12051065.
 20. Matsas A, Stefanoudakis D, Troupis T, Kontzoglou K, Eleftheriades M, Christopoulos P, Panoskaltzis T, Stamoula E, Iliopoulos DC. Tumor Markers and Their Diagnostic Significance in Ovarian Cancer. *Life (Basel).* 2023;13(8):1689. doi: 10.3390/life13081689.
 21. Kotowicz B, Fuksiewicz M, Jonska-Gmyrek J, Bidzinski M, Kowalska M. The assessment of the prognostic value of tumor markers and cytokines as SCCAg, CYFRA 21.1, IL-6,

References

1. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin.* 2023;73(1):17-48. doi: 10.3322/caac.21763.
2. Schabath MB, Cote ML. Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2019;28(10):1563-1579. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-19-0221.
3. Oliver AL. Lung Cancer: Epidemiology and Screening. *Surg Clin North Am.* 2022 Jun;102(3):335-344. doi: 10.1016/j.suc.2021.12.001.
4. Lim W, Ridge CA, Nicholson AG, Mirsadraee S. The 8th lung cancer TNM classification and clinical staging system: review of the changes and clinical implications. *Quant Imaging Med Surg.* 2018(7):709-718. doi: 10.21037/qims.2018.08.02.
5. Molina R, Augé JM, Bosch X, Escudero JM, Viñolas N, Marrades R, Ramírez J, Carcereny E, Filella X. Usefulness of serum tumor markers, including progastrin-releasing peptide, in patients with lung cancer: correlation with histology. *Tumour Biol.* 2009;30(3):121-9. doi: 10.1159/000224628.
6. Rykov I.V. Znachenije tsirkuliruyushchikh opukholevykh markerov pri rake legkogo v klinicheskoy praktike [The importance of circulating tumor markers in lung cancer in clinical practice]. *Zlokachestvennyye opukholi [Malignant tumours].* 2020;10(2):31-35. [In Russ.] doi:10.18027/2224-5057-2020-10-2-2.

- VEGF and sTNF receptors in patients with squamous cell cervical cancer, particularly with early stage of the disease. *Tumour Biol.* 2016;37(1):1271-8. doi: 10.1007/s13277-015-3914-0.
22. Shiiya H, Ujiie H, Hida Y, Kato T, Kaga K, Wakasa S, Kikuchi E, Shinagawa N, Okada K, Ito YM, Matsuno Y. Elevated serum CYFRA 21-1 level as a diagnostic marker for thymic carcinoma. *Thorac Cancer.* 2021;12(21):2933-2942. doi: 10.1111/1759-7714.14158.
23. Lee JH. Clinical Usefulness of Serum CYFRA 21-1 in Patients with Colorectal Cancer. *Nucl Med Mol Imaging.* 2013;47(3):181-7. doi: 10.1007/s13139-013-0218-4.

BIOCHEMICAL MARKERS IN PREOPERATIVE ASSESSMENT OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER PREVALENCE

A. D. Tahanovich¹, M. M. Kauhanka¹, Zh. A. Rutkovskaya¹, O. V. Gotko², V. I. Prokhorova²

¹ Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

² National Centre of Oncology and Medical Radiology, Minsk, Republic of Belarus

Background. The lack of consensus on the diagnostic value of using the above markers as diagnostic ones, on the one hand, and the promising, minimally invasive sample preparation procedure, on the other, prompted us to undertake this study.

Purpose of the study. To determine the diagnostic characteristics of tumor markers CYFRA 21-1, SCC, CEA, neuron-specific enolase (NSE) and progastrin-releasing peptide (ProGRP) in patients with operable stage I-IIIB NSCLC for diagnosing the disease in the early stages.

Materials and methods. 179 patients with NSCLC stages I-IIIB were examined. The control group included 25 people. Determination of tumor markers in blood serum was carried out by chemiluminescence immunoassay using reagent kits on a Cobas e411 analyzer (Roche Diagnostics, USA).

Results. Serum concentrations of CYFRA 21-1 were increased in all patients examined. The severity of the increase correlated both with the extent of the tumor process (tumor size and the presence of regional metastases) and with the degree of differentiation of tumor cells. The remaining biomarkers (SCC, NSE, CEA and ProGRP) were uninformative.

Conclusions. The information content or sensitivity of tumor markers SCC, NSE, CEA and ProGRP in NSCLC, AC and SCLC is relatively low. Their levels in the blood serum of patients, for the most part, differ from those in healthy people and are not associated with the severity of the tumor descriptor.

Keywords: adenocarcinoma, squamous cell lung cancer, CYFRA 21-1, SCC, CEA, NSE, ProGRP.

For citation: Tahanovich AD, Kauhanka MM, Rutkovskaya ZhA, Gotko OV, Prokhorova VI. Biochemical markers in preoperative assessment of non-small cell lung cancer prevalence. *Biochemistry and Molecular Biology.* 2024, vol. 3, no. 1(4). pp. 29–36 (in Russian).

Поступила 05.02.2024

ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАЦИЙ ГЕНА *GCK* СРЕДИ ДЕТЕЙ С ФЕНОТИПИЧЕСКИМИ ПРОЯВЛЕНИЯМИ МОНОГЕННОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Д. Н. Велеменчук^{1,2}, Т. В. Савицкая^{1,2}, А. В. Солнцева²

¹ Учреждение образования «Международный государственный экологический институт
имени А.Д. Сахарова» Белорусского государственного университета,
г. Минск, Республика Беларусь

² Республиканский научно-практический центр детской онкологии,
гематологии и иммунологии, г. Минск, Республика Беларусь

Введение. Сахарный диабет типа MODY (maturity onset diabetes of the young) – моногенное заболевание, которое обычно проявляется в возрасте 25 лет и имеет аутосомно-доминантный тип наследования. По данным большинства авторов, в детском возрасте наиболее часто встречается GCK-MODY (MODY2), ассоциированный с мутациями в гене *GCK* (glucokinase – глюкокиназа). Несмотря на достаточную известность наиболее распространенных подтипов MODY, случаи моногенного сахарного диабета (МСД) у детей без молекулярно-генетической диагностики остаются не верифицированы и классифицируются как сахарный диабет 1 типа (СД1).

Цель исследования – определить частоту и молекулярные особенности мутаций в гене *GCK* у белорусских детей с симптомами моногенного диабета.

Материалы и методы. В ходе исследования 23 пациентам с фенотипом MODY был проведен молекулярно-генетический анализ (МГА) с определением мутаций в 1-10 экзонах гена *GCK*, а также других наиболее часто встречаемых генах ответственных за развитие данного заболевания, а именно *HNF-1A*, *HNF-4A*, *HNF-1B*.

Результаты. В данном исследовании у 9 (39,0 %) пробандов было выявлено наличие мутаций в гетерозиготном состоянии охарактеризованных как патогенные и вероятно патогенные, ассоциированные с развитием GCK-MODY. У 4 пациентов (17,4 %) в гене *GCK* выявлены новые, не описанные ранее варианты, с неясным влиянием на структуру и функцию изучаемого белка.

Заключение. Распространенность вариантов GCK-MODY указывает на то, что диагностику моногенного диабета у белорусских детей можно начинать с генетического тестирования на MODY2.

Ключевые слова: сахарный диабет, GCK-MODY, секвенирование по Сэнгеру, патогенные мутации, дети.

Для цитирования: Характеристика мутаций гена *GCK* среди детей с фенотипическими проявлениями моногенного сахарного диабета в Республике Беларусь / Д. Н. Велеменчук, Т. В. Савицкая, А. В. Солнцева // Биохимия и молекулярная биология. – 2024. – Т. 3, № 1(4). – С. 37–41.

Введение

Диабет зрелого возраста у молодых MODY (maturity onset diabetes of the young) – это моногенное заболевание, которое обычно проявляется в возрасте <25 лет и имеет аутосомно-доминантный тип наследования. Описаны случаи спонтанного мутагенеза и зародышевого мозаицизма [6, 7].

MODY отличается от классических форм сахарного диабета (СД) клиническим течением, стратегией лечения и прогнозом. В настоящее время в различных источниках описано 14–16 подтипов MODY. Каждый тип связан с мутациями в определенном гене [4, 11]. По данным большинства авторов, в детском возрасте наиболее часто встречается GCK-MODY (MODY2), обусловленный инактивирующими гетерозиготными

мутациями в гене *GCK* (glucokinase – глюкокиназа). В гомозиготном состоянии мутации в гене глюкокиназы ассоциированы с развитием неонатального СД и семейной гиперинсулинемической гипогликемии. GCK-MODY ассоциирован более чем с 600 мутациями в гене *GCK*. При этом, за счет вновь выявленных мутаций данный список постоянно пополняется [8]. В Италии GCK-MODY был верифицирован в 84,7 % случаев MODY. Так же стоит отметить, что доля MODY среди всех форм СД у детей составила 4,74 % [5]. В исследовании А. Chakera et al. выявлена более высокая распространенность GCK-MODY – 1 на 1000 населения [2]. В России GCK-MODY выявлен в 57,6–77,5 % всех случаев MODY в детском возрасте [3,9,10].

Ген *GCK* картирован на хромосоме 7p15.3-p15.1 и состоит из 10 экзонов, которые кодируют протеин глюкокиназу состоящий из 465 аминокислот, который является изоферментом гексокиназы. Глюкокиназа катализирует фосфорилирование глюкозы на первой стадии гликолиза. Данный фермент экспрессируется исключительно в печени и β -клетках поджелудочной железы человека и других млекопитающих. Фермент выполняет важную функцию в метаболизме глюкозы, регулируя секрецию инсулина в β -клетках поджелудочной железы путем изменения скорости фосфорилирования глюкозы. Таким образом, глюкокиназа является связующим звеном между уровнем гликемии и началом секреции инсулина [1, 3].

Фенотипические проявления при разных формах моногенного диабета различны. При *GCK-MODY* сохраняется пожизненная легкая гипергликемия натощак, с незначительным повышением уровня гликированного гемоглобина HbA1c с редким развитием осложнений, таких как нефропатия и ретинопатия. При данном типе диабета в большинстве случаев не требуется фармакотерапия, достаточно соблюдения рекомендаций по режиму питания [11]. Исключением являются случаи гестационного сахарного диабета, ассоциированного с мутациями в гене *GCK*, когда показана инсулинотерапия (ИТ) беременным женщинам при риске макросомии плода [12].

Несмотря на достаточную известность наиболее распространенных подтипов *MODY*, случаи моногенного диабета у детей остаются не верифицированы и классифицируются как СД 1 типа. Подтвержденный диагноз *GCK-MODY* с помощью молекулярно-генетического анализа позволяет прогнозировать течение заболевания, проводить генетическое консультирование родственников пациента, а также отменить получаемую пациентом ИТ, что повышает качество жизни пациентов и способствует снижению затрат на лечение.

Цель исследования – определить частоту и молекулярные особенности мутаций в гене *GCK* у белорусских детей с симптомами моногенного диабета.

Материалы и методы

В ходе исследования пациентам с фенотипом *MODY* был проведен молекулярно-генетический анализ (МГА) с определением мутаций в 1-10 экзонах гена *GCK*, а также других наиболее часто встречаемых генах ответственных за развитие данного заболевания, а именно *HNF-1A* (hepatocyte

nuclear factor 1-alpha – ядерный фактор гепатоцитов 1-альфа), *HNF-4A* (hepatocyte nuclear factor 4 alpha – ядерный фактор гепатоцитов 4 альфа), *HNF-1 β* (transcription factor 2 – фактор транскрипции 2). МГА проведен 23 пробандам в клинико-диагностической лаборатории РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии. Все исследуемые, а так же их законные представители дали согласие на проведение МГА.

Молекулярно-генетическое исследование проводилось методом секвенирования по Сэнгеру. Периферическая кровь с антикоагулянтом К2ЭДТА использовалась для получения лейкоцитарных клеток с последующим выделением геномной ДНК с помощью фенольно-хлороформной экстракции. С ПЦР амплифицированными последовательностями экзонов после очистки проводилась реакция терминирования элонгации (Big Dye Terminator Cycle Sequencing kits V3.1 Applied Biosystems, USA), продукт реакции очищался и анализировался при помощи капиллярного электрофореза (ABI 3500 Applied Biosystems, USA). Биоинформационный анализ результатов электрофореза проводился с помощью программного обеспечения Sequencing Analysis 7.0 (Applied Biosystems, США), BioEdit, баз данных NCBI, Ensembl и Ensembl Variant Effect Predictor (VEP). Кроме того, каждая электрофореграмма визуально просматривалась с целью выявления любых гетерозиготных вариантов ДНК, не обнаруженных с помощью программного обеспечения.

Статистический анализ проводился с помощью компьютерной программы Statistika 8.0 для Windows (StatSoft, Inc., США). Для анализа полученных данных использовали методы непараметрической статистики. Критический уровень статистической значимости критерия принимали равным 5% ($p=0,05$). Рассчитывались медиана и интерквартильный размах (Me [25; 75 перцентиль]).

Результаты и их обсуждение

На исследование было направлено 23 пациента в возрасте от 1 до 18 лет (Me–12[9,0;13]). Среди обследованных было 15 мальчиков (65,2 %) и 8 девочек (34,8 %).

В генах *GCK*, *HNF-1A*, *HNF-4A*, *HNF-1 β* были выявлены множественные генетические варианты, имеющие доброкачественный и вероятно доброкачественный статус. У 3 (13,0 %) пациентов выявлены гетерозиготные однонуклеотидные замены в гене *HNF-1A* с неопределенным клиническим значением (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика гетерозиготных однонуклеотидных замен с неопределенным клиническим значением

Table 1 – Characteristics of heterozygous single nucleotide substitutions of uncertain significance

Пробанд, №	Ген	Экзон	SNP
1	HNF-1A	4	rs539507291
2	HNF-1A	1	rs561269721
3	HNF-1A	8	rs55834942

Таблица 2 – Спектр патогенных и вероятно патогенных мутаций

Table 2 – Spectrum of pathogenic and likely pathogenic mutations

Пробанд, №	Экзон	Мутация	Тип мутации	Статус мутации
1	7	CM1412352 G>A	Миссенс	Патогенная
2	5	rs587780345 C>T	Миссенс	Патогенная
3	6	rs1441649062 G>A	Миссенс	Патогенная
4	6	rs1441649062 G>A	Миссенс	Патогенная
5	7	rs1583596378 G>T	Миссенс	Патогенная
6	7	rs769268803 C>T	Миссенс	Патогенная
7	8	rs193922336 C>A	Миссенс	Вероятно патогенная
8	2	rs193922261 G>C	Миссенс	Вероятно патогенная
9	5	rs587780345 C>T	Миссенс	Патогенная

Кроме вышеперечисленных, в исследованной выборке у 4 пробандов (17,4 %) в гене *GCK* выявлены новые, неописанные ранее варианты замен с неясным влиянием на структуру и функцию изучаемого белка (таблица 3).

Стоит отметить, что в таблице 2 под номером 3 и 4 описаны генетические варианты (NM_000162.5:c.554T>C) у двух братьев. Данная замена обнаружена так же у их матери, что может указывать на связь данного гетерозиготного варианта замены с развитием *GCK-MODY*. В данном случае происходит замена аминокислоты лейцин на аминокислоту пролин, что приводит к изменению структуры белка. Вероятность патогенности выявленной замены оценивали с помощью программного обеспечения для анализа генетических вариантов Ensembl Variant Effect Predictor

В гене *GCK* у 9 (39,0 %) пациентов верифицированы патогенные и вероятно патогенные мутации в гетерозиготном состоянии, ассоциированные с развитием *GCK-MODY*. Под номерами 3 и 4 выявлены одинаковые патогенные мутации у двух родных братьев (таблица 2). Патогенные мутации были верифицированы у 2 девочек и 7 мальчиков. При этом статистического различия по полу выявлено не было ($p=0,401$).

(VEP). Замена соответствует критерию патогенности (SIFT – 0.0; PolyPhen – 1.0). Однако, использование только предикторов патогенности может привести как к ложноположительным, так и к ложноотрицательным результатам. Для того, что бы сделать обоснованные выводы о патогенности варианта замены и связи с развитием *GCK-MODY* необходимо определить частоту в популяции, что требует больших скрининговых исследований. Кроме этого, для подтверждения патогенности ранее неописанных мутаций необходимы научные эксперименты, функциональный анализ мутаций на клетках или животных моделях.

В генах *HNF-4A*, *HNF-1β* патогенных и неописанных ранее генетических вариантов выявлено не было.

Таблица 3 – Характеристика неописанных генетических вариантов

Table 3 – Characteristics of undescribed genetic variants

Пробанд, №	Ген	Экзон	Генетический вариант	Описание
1	GCK	5	c.521 C>A	Гетерозиготная замена в кодоне TCA (кодирующая аминокислоту серин) на TAA, ведущая к образованию стоп-кодона и прекращению (терминации) синтеза полипептидной цепи
2	GCK	8	c.1499 T>A	Гетерозиготная замена
3	GCK	5	c.554 T>C	Гетерозиготная замена аминокислоты лейцин на аминокислоту пролин
4	GCK	5	c.554 T>C	Гетерозиготная замена аминокислоты лейцин на аминокислоту пролин

Заключение

Молекулярно-генетическая диагностика пациентов с фенотипом диабета типа MODY необходима для верификации диагноза. В данном исследовании у 9 (39,0 %) пробандов были выявлены мутации в гетерозиготном состоянии охарактеризованные как патогенные и вероятно патогенные, ассоциированные с развитием GCK-MODY. У 4 пациентов (17,4 %) в гене *GCK* выявлены новые, неописанные ранее варианты с неясным влиянием на структуру и функцию изучаемого белка.

Список цитированных источников

1. Bonfig, W. GCK-MODY (MODY 2) Caused by a Novel p.Phe330Ser Mutation / W. Bonfig, S. Hermanns, K. Warncke [et al.] // *ISRN Pediatr.* – 2011. – №16. – P.1–5.
2. Chakera, A. J. The 0.1% of the population with glucokinase monogenic diabetes can be recognized by clinical characteristics in pregnancy: the Atlantic Diabetes in Pregnancy cohort / A. J. Chakera, G. Spyer, N. Vincent [et al.] // *Diabetes Care.* – 2014. – Vol. 37, № 5. – P.1230–1236.
3. Glotov, O. Whole-exome sequencing in Russian children with non-type 1 diabetes mellitus reveals a wide spectrum of genetic variants in MODY-related and unrelated genes / O. Glotov, E. Serebryakova, M. Turkunova [et al.] // *Mol. Med. Rep.* – 2019. – Vol. 20, № 6. – P.4905–4914.
4. Ivanoshchuk, D. The Mutation Spectrum of Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY) – Associated Genes among Western Siberia Patients / D. Ivanoshchuk, E. Shakhtshneider, O. Rymar [et al.] // *Journal of Personalized Medicine.* – 2021. – Vol. 11, № 1. – P.57.
5. Mozzillo, E. Survey on etiological diagnosis of diabetes in 1244 Italian diabetic children and adolescents: impact of access to genetic testing / E. Mozzillo, G. Salzano, F. Barbetti [et al.] // *Diabetes Res. Clin. Pract.* – 2015. – Vol. 107, № 3. – P.e15–e18.
6. Stanik, J. De novo mutations of GCK, HNF1A and HNF4A may be more frequent in MODY than previously assumed / J. Stanik, P. Dusatkova, O. Cinek [et al.] // *Diabetologia.* – 2014. – Vol. 57. – P.480–484.
7. Yorifuji, T. Neonatal diabetes mellitus and neonatal polycystic, dysplastic kidneys: Phenotypically discordant recurrence of a mutation in the hepatocyte nuclear factor-1beta gene due to germline mosaicism / K. Kurokawa, M. Mamada, T. Imai Kawai [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2004. – № 89. – P. 2905–2908.
8. Молекулярная генетика MODY / М. И. Воевода [и др.] // *Терапевтический архив.* – 2016. – Т. 88, № 4. – С. 117–124.
9. Зубкова, Н. А. Клиническая и молекулярно-генетическая характеристика случаев MODY1-3 в Российской Федерации, выявленных по результатам NGS / Н. А. Зубкова, О. А. Гюева, Ю. В. Тихонович [и др.] // *Проблемы эндокринологии.* – 2017. – Т. 63. – № 6. – С. 369–378.
10. Кураева, Т. Л. Молекулярно-генетические и клинические варианты MODY2 и MODY3 у детей в России / Т. Л. Кураева, Е. А. Сечко, Л. И. Зильберман [и др.] // *Проблемы эндокринологии.* – 2015. – Т. 61. – № 5. – С. 14–25.
11. Мохорт, Т. В. Сахарный диабет: обновление классификации и особенности диагностики различных типов: учебно-методическое пособие / Т. В. Мохорт, А. П. Шепелькевич, Е. И. Шишко [и др.] / – Минск: БГМУ, 2021. – С. 31.
12. Сечко, Е. А. Неиммунный сахарный диабет у детей, обусловленный гетерозиготными мутацией в гене глюкоки-

Таким образом, настоящее исследование демонстрирует высокую частоту и широкий спектр генетических вариантов, вызывающих моногенный диабет у белорусских детей с сахарным диабетом не 1 типа. Спектр включает ранее известные и новые генетические варианты, связанные с GCK-MODY у ряда пациентов. Распространенность вариантов GCK-MODY указывает на то, что диагностику моногенного диабета у белорусских детей можно начинать с тестирования на MODY2.

назы (GCK-MODY) / Е. А. Сечко, Т. Л. Кураева, Л. И. Зильберман [и др.] // *Сахарный диабет.* – 2022. – Т. 25. – № 2. – С. 145–154.

References

1. Bonfig W, Hermanns S, Warncke K, Eder G, Engelsberger I, Burdach S, Ziegler AG, Lohse P. GCK-MODY (MODY 2) Caused by a Novel p.Phe330Ser Mutation. *ISRN Pediatr.* 2011;2011:676549. doi: 10.5402/2011/676549.
2. Chakera AJ, Spyer G, Vincent N, Ellard S, Hattersley AT, Dunne FP. The 0.1% of the population with glucokinase monogenic diabetes can be recognized by clinical characteristics in pregnancy: the Atlantic Diabetes in Pregnancy cohort. *Diabetes Care.* 2014;37(5):1230-6. doi: 10.2337/dc13-2248.
3. Glotov OS, Serebryakova EA, Turkunova ME, Efimova OA, Glotov AS, Barbitoff YA, Nasykhova YA, Predeus AV, Polev DE, Fedyakov MA, Polyakova IV, Ivashchenko TE, Shved NY, Shabanova ES, Tiselko AV, Romanova OV, Sarana AM, Pendina AA, Scherbak SG, Musina EV, Petrovskaia-Kaminskaia AV, Lonishin LR, Ditkovskaya LV, Zhelenina LA, Tyrtova LV, Berseneva OS, Skitchenko RK, Suspsitsin EN, Bashnina EB, Baranov VS. Whole-exome sequencing in Russian children with non-type 1 diabetes mellitus reveals a wide spectrum of genetic variants in MODY-related and unrelated genes. *Mol Med Rep.* 2019 Dec;20(6):4905-4914. doi: 10.3892/mmr.2019.10751.
4. Ivanoshchuk DE, Shakhtshneider EV, Rymar OD, Ovsyanikova AK, Mikhailova SV, Fishman VS, Valeev ES, Orlov PS, Voevoda MI. The Mutation Spectrum of Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY)-Associated Genes among Western Siberia Patients. *J Pers Med.* 2021 Jan 18;11(1):57. doi: 10.3390/jpm11010057.
5. Mozzillo E, Salzano G, Barbetti F, Maffei C, Lombardo F, Franzese A, Delvecchio M, Marigliano M. Survey on etiological diagnosis of diabetes in 1244 Italian diabetic children and adolescents: impact of access to genetic testing. *Diabetes Res Clin Pract.* 2015 Mar;107(3):e15-8. doi: 10.1016/j.diabres.2015.01.003.
6. Stanik J, Dusatkova P, Cinek O, Valentinova L, Huckova M, Skopkova M, Dusatkova L, Stanikova D, Pura M, Klimes I, Lebl J, Gasperikova D, Pruhova S. De novo mutations of GCK, HNF1A and HNF4A may be more frequent in MODY than previously assumed. *Diabetologia.* 2014 Mar;57(3):480-4. doi: 10.1007/s00125-013-3119-2.
7. Yorifuji T, Kurokawa K, Mamada M, Imai T, Kawai M, Nishi Y, Shishido S, Hasegawa Y, Nakahata T. Neonatal diabetes mellitus and neonatal polycystic, dysplastic kidneys: Phenotypically discordant recurrence of a mutation in the hepatocyte nuclear factor-1beta gene due to germline mosaicism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jun;89(6):2905-8. doi: 10.1210/jc.2003-031828.

8. Voevoda MI, Ivanova AA, Shakhtshneider EV, Ovsyannikova AK, Mikhailova SV, Astrakova KS, Voevoda SM, Rymar OD. Molekuliarnaia genetika MODY [Molecular genetics of maturity-onset diabetes of the young]. *Ter. Arkh.* 2016;88(4):117-124. Russian. doi: 10.17116/terarkh2016884117-124.
9. Zubkova NA, Gioeva OA, Tikhonovich YV, Petrov VM, Vasiliev IN, Timofeev AV, Tulpakov AN. Clinical and molecular genetic characteristics of MODY1-3 cases in the Russian Federation identified by NGS results. *Problems of endocrinology.* 2017;63(6): 369-378. doi: 10.14341/probl2017636369-378.
10. Kuraeva TL, Sechko EA, Zilberman LI, Ivanova ON, Mayorov AY, Koksharova EO, Peterkova VA, Dedov II. Molecular genetics and clinical variants MODY2 and MODY3 in children in Russia. *Problems of Endocrinology.* 2015;61(5):14-25. doi.org/10.14341/probl201561514-25.
11. Mokhort TV, Shepelkevich AP, Shishko EI, Mokhort EG, Dydysko YV, Shishko ON, Karlovich NV, Mashkova MA. Diabetes mellitus: modification of classification and features of diseases of various types. Minsk. BSMU Publ., 2021, 31 p. (in Russian).
12. Sechko EA, Kuraeva TL, Zilberman LI, Laptev DN, Bezlepkina OB, Peterkova VA. Non-immune diabetes mellitus in children due to heterozygous mutations in the glucokinase gene (GCK-MODY): data of 144 patients. *Diabetes Mellitus.* 2022;25(2):145-154. doi: https://doi.org/10.14341/DM1281

CHARACTERISTICS OF GCK GENE MUTATIONS AMONG CHILDREN WITH PHENOTYPICAL MANIFESTATIONS OF MONOGENIC DIABETES MELLITUS IN THE REPUBLIC OF BELARUS

D. N. Velemianchuk^{1,2}, T. V. Savitskaya^{1,2}, A. V. Solntseva²

¹*International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus*

²*Republican Scientific and Practical Center of Children's Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Republic of Belarus*

Background. Maturity onset diabetes of the young (MODY) is a monogenic disease that typically is manifests before the age of 25 and follows an autosomal dominant inheritance pattern. According to most authors, GCK-MODY (MODY2) associated with mutations in the *GCK* gene (glucokinase) is the most common subtype in childhood. Despite the well-known common subtypes of MODY, cases of monogenic diabetes mellitus (MDM) in children without molecular-genetic diagnostics remain unverified and are classified as type 1 diabetes mellitus (DM1).

Objective. To determine the causes and molecular features of mutations in the *GCK* gene in Belarusian children with symptoms of monogenic diabetes.

Materials and methods. Molecular-genetic analysis (MGA) was conducted on 23 patients with MODY phenotype, with the determination of mutations in exons 1-10 of the *GCK* gene, as well as other most commonly encountered genes responsible for the development of this condition, namely *HNF-1A*, *HNF-4A* and *HNF-1β*.

Results. In this study, the presence of mutations in the heterozygous state, characterized as pathogenic and probably pathogenic, associated with the manifestation of GCK-MODY, was detected in 9 (39,0%) probands. In 4 cases (17.4%), new, previously undescribed variants with an unclear effect on the structure and function of the protein under study were identified in the *GCK* gene.

Conclusions. Variations in the prevalence of GCK-MODY indicate that the study of monogenic diabetes in Belarusian children can begin with MODY2 testing.

Keywords: diabetes mellitus, GCK-MODY, Sanger sequencing, pathogenic mutations, children.

For citation: Velemianchuk DN, Savitskaya TV, Solntseva AV. Characteristics of gck gene mutations among children with phenotypical manifestations of monogenic diabetes mellitus in the Republic of Belarus. *Biochemistry and Molecular Biology.* 2024, vol. 3, no. 1(4). pp. 37–41 (in Russian).

Поступила 05.02.2024

ВЛИЯНИЕ АЛКОГОЛЬНОГО АБСТИНЕНТНОГО СИНДРОМА НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ НЕЙРОНОВ И МИТОХОНДРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ ПРОИЗВОДНОГО ПЛАСТОХИНОНА

*А. В. Туманов¹, А. И. Марчик¹, В. Ч. Полубок¹, О. Б. Островская²,
А. Г. Шляхтун¹, А. А. Островский¹*

¹ *Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук
Беларуси, г. Гродно, Республика Беларусь*

² *Гродненский государственный медицинский университет, г. Гродно, Республика Беларусь*

Введение. Работа посвящена изучению влияния синдрома отмены этанола на гистологические и биохимические изменения в нейронах и митохондриях различных отделов головного мозга крыс, а также возможности коррекции нарушений производным пластохинона – 10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфонием (SkQ1).

Цель исследования – провести сравнительный анализ нарушений структурно-функционального состояния нейронов и митохондрий некоторых отделов головного мозга самок крыс при алкогольном абстинентном синдроме (ААС) и изучить возможность их коррекции применением производного пластохинона.

Материалы и методы. ААС моделировали у самок крыс введением 30 % раствора этанола в течение шести суток. Методами световой и электронной микроскопии изучали структуру нейронов и митохондрий головного мозга. Митохондриальное дыхание изолированных митохондрий головного мозга регистрировали полярографически. Методом ИФА определяли концентрации Mfn1, Dnm1l и эстрадиола.

Результаты. Установлено, что в условиях ААС SkQ1 предотвращает снижение и сохраняет на контрольном уровне интенсивность дыхания митохондрий больших полушарий мозга и мозжечка крыс. Также под влиянием SkQ1 наблюдалась тенденция к уменьшению относительного количества гиперхромных нейронов теменной коры головного мозга животных с ААС. Все это свидетельствует о положительном действии SkQ1.

Заключение. Производное пластохинона SkQ1 препятствует нарушениям структурного состояния нейронов теменной коры и функционального состояния митохондрий больших полушарий и мозжечка самок крыс при ААС.

Ключевые слова: алкогольный абстинентный синдром, производные пластохинона, гиперхромные нейроны, теменная кора, ядро гиппокампа (тогда уж пиши какое именно), митохондрии.

Для цитирования: Влияние алкогольного абстинентного синдрома на структурно-функциональное состояние нейронов и митохондрий головного мозга крыс на фоне введения производного пластохинона / А. В. Туманов [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. – 2024. – Т. 3, № 1(4). – С. 42–51.

Введение

Уточнение патогенеза алкогольной зависимости, включая явление алкогольного абстинентного синдрома, остается актуальной медико-биологической и социальной проблемой в связи с многочисленными отрицательными медицинскими, социальными и экономическими последствиями, которые порождает злоупотребление алкоголем и низкой эффективностью лечения этой патологии [1, 2]. В последнее время число женщин, страдающих алкогольной зависимостью, существенно возросло. Поэтому необходимость исследования особенностей женского алкоголизма в последние годы высока как никогда.

Работа посвящена изучению влияния синдрома отмены этанола на структурное состояние нейронов и структурно-функциональное состояние митохондрий некоторых отделов головного мозга самок крыс с помощью биохимических и гистологических методов, а также возможности коррекции возникших при этом нарушений с помощью нового средства, имеющего защитное действие.

При ААС развивается окислительный стресс, поэтому в качестве средства терапии был выбран SkQ1, который является митохондриально-направленным антиоксидантом и обладает хорошей биодоступностью за счет липофильного катиона молекулы трифенилфосфония [3, 4].

Одна из главных мишеней активных форм кислорода в митохондриях – кардиолипид [5]. SkQ1 располагается в мембране митохондрий таким образом, что остаток пластохинона находится точно около C9 или C13 атомов углерода кардиолипида. Таким образом, он может быстро и эффективно гасить пероксильный радикал кардиолипида [6]. После нейтрализации активных форм кислорода, пластохиноновый остаток переходит в окисленную форму, а затем его быстро восстанавливает убихинон Q дыхательной цепи. Таким образом, окисленная форма SkQ1 может восстанавливаться дыхательной цепью митохондрий, SkQ1 существует в основном в активной форме и постоянно может инактивировать активные формы кислорода [7].

Цель исследования – провести сравнительный анализ нарушений структурно-функционального состояния нейронов и митохондрий некоторых отделов головного мозга самок крыс при алкогольном абстинентном синдроме и изучить возможность их коррекции применением производного пластохинона.

Материалы и методы исследований

Исследование выполнено на 56 крысах-самках линии Wistar весом 200–220 грамм. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к полноценному корму и воде. Все манипуляции с ними выполняли в соответствии с ТКП 125-2008 (02040) «Надлежащая лабораторная практика» [8].

Синдром отмены этанола воспроизводили по методу Majchrowicz [9] в модификации Тезикова и соавторов [10]. ААС моделировали введением 30 % раствора этанола 2 раза в день внутривентрикулярно (в/ж): 1-е сутки – 6 г/кг/за раз (полная доза), со вторых суток – от 0 до 6 г/кг/за раз в зависимости от состояния животных (обычно от 3 до 6 г/кг/за раз).

В данном исследовании участвовали следующие группы животных: группа № 1 (контроль, 10 шт.) – вводили пропиленгликоль внутримышечно (в/м); группа № 2 (ААС, 12 шт.) – проводилась оценка влияния ААС на митохондрии и нейроны головного мозга, вводили пропиленгликоль в/м и этанол в/ж; группа № 3 (ААС, 12 шт. + SkQ1) – проводилась оценка влияния SkQ1 на митохондрии и нейроны головного мозга в экспериментальной модели ААС, вводили SkQ1 растворенный в пропиленгликоле в/м и этанол в/ж; группа № 4 (ААС, 12 шт. + C₁₂TRP) – проводилась оценка влияния C₁₂TRP на митохондрии и нейроны головного мозга в экспериментальной модели ААС, вводили C₁₂TRP растворенный в пропиленгликоле в/м и эта-

нол в/ж; группа № 5 (алкогольный синдром (АС), 10 шт.) – вводили пропиленгликоль в/м и этанол в/ж. Отмену этанола за 15 часов до эвтаназии животных не проводили. Этанол последний раз вводили за час перед декапитацией.

Доза вводимых производных пластохинона 1 мкмоль/кг растворенных в физ. растворе. Вводили SkQ1 и C₁₂TRP в/м каждый день на протяжении 7 дней. Объем вводимого пропиленгликоля – 2,5 мл/кг.

Животных декапитировали через 15 ч после последнего введения этанола. Из черепа удаляли головной мозг, который разделяли на две половины по сагитальной линии у крыс первых трёх групп. При этом левую половину использовали для гистологического исследования, а правую – для биохимического. Для гистоморфологического исследования взяли материал у 4 животных из первой группы и по пять из второй и третьей.

Левую половину головного мозга двое суток фиксировали в 10 % нейтральном забуференном формалине. Затем, после промывки водой, ткань мозга обезвоживали в спиртах, просветляли в ксилоле и заливали в парафин. На ротационном микротоме Kedeer 3398 получали срезы толщиной 5 мкм, которые окрашивали смесью толуидинового синего и крезилового фиолетового [11, 12]. Используя микроскоп *Leica DM6 B*, с каждого среза делали панорамное фото (об. 20x). При изучении особенностей строения коры и гиппокампа мозга крыс были учтены соответствующие рекомендации [13].

При микроскопическом изучении срезов учитывали три вида нейронов (глиальные клетки не подсчитывали – рисунок 1): обычные нормохромные нейроны; гиперхромные нейроны; нейроны, окруженные сателлитными клетками (учитывали только те нейроны, которые контактировали не менее чем с двумя сателлитными клетками).

Для электронно-микроскопического исследования забирали образцы переднекорной коры, размером каждый около 1×1×3 мм, призматической формы, так, чтобы длинная ось призмы была перпендикулярна поверхности коры и включала все слои серого вещества, а также прилегающий к последнему тонкий слой белого вещества. Образцы фиксировали в 1 % осмиевом фиксаторе (Osmium(VIII) oxide for microscopy (Merck)) на буфере Миллонига pH 7,2 на протяжении 2 ч при 4 °C, обезвоживали и заливали в аралдит. Серии ультратонких срезов, полученные с интервалом 15 мкм, монтировали на медные сеточки, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по Reynolds [14] и изучали в электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония).

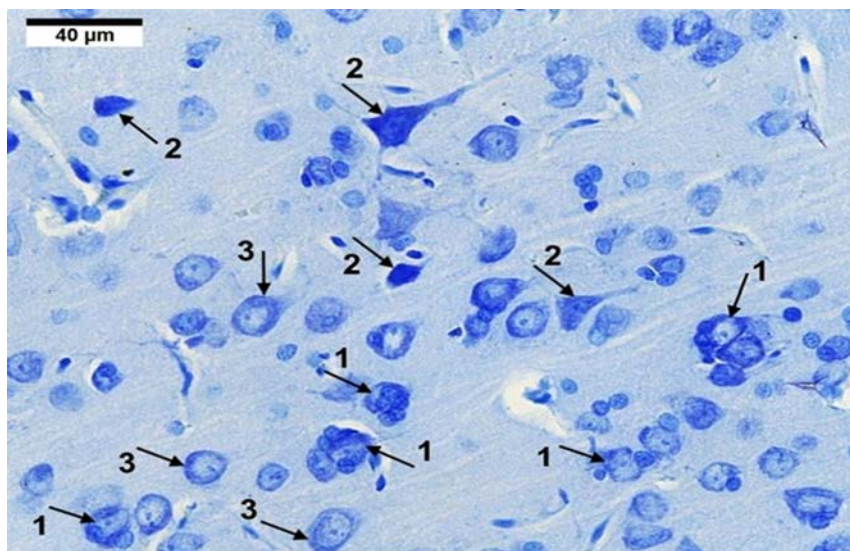


Рисунок 1 – Разнообразие нейронов в 3-5-м слоях теменной коры мозга лабораторных крыс. Стрелками обозначены: 1-нейроны, окруженные сателлитными клетками (сателлитоз); 2 – гиперхромные нейроны; 3-нормохромные нейроны, где хорошо виден тигроид (вещество Ниссля). Окраска смесью толуидинового синего и крезилового фиолетового

Figure 1 – The diversity of neurons in the 3rd-5th layers of the parietal cortex of the brain of laboratory rats. The arrows indicate: 1-neurons surrounded by satellite cells (satellite cells); 2 – hyperchromic neurons; 3-normochromic neurons, where the tigroid (the substance of the Needle) is clearly visible. The color is a mixture of toluidine blue and cresyl violet

При количественной оценке выраженности признаков реакции отмены использовали метод, предложенный Тезиковым и соавторами [10]. Для этого в течение 1 мин у каждого животного визуально регистрировали наличие признаков мышечной ригидности (напряжение хвоста, пилоэреция, скандированность движений, каталепсия, стереотипные движения), мышечной гиперактивности (тремор хвоста, конечностей, головы, общий тремор, подергивание отдельных групп мышц, встряхивание головой и туловищем, пароксизмальный стук зубов), признаков общей гиперактивности (спонтанная вокализация, спонтанные и индуцированные судороги). Данные обсчитывались количественно: за каждый из поведенческих признаков мышечной ригидности – по 10 баллов, мышечной гиперактивности – по 20 баллов и общей гиперактивности – по 30 баллов.

Определение содержания Mfn1, Dnm11 в больших полушариях головного мозга и мозжечке, а также эстрадиола в сыворотке крови крыс проводилось соответствующими наборами реагентов для иммуноферментного анализа производства FineTest (КНР) согласно инструкции производителя на планшетном мультидетекторе «Tablet Multi-Detector» (BMG, Германия).

Выделение митохондрий и митохондриальное дыхание изолированных митохондрий головного мозга регистрировали полярографически с использованием полярографа Oxytherm (Hansatech,

Великобритания) с электродом Кларка, встроенным в термостатируемую ячейку в соответствии с [15].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета статистических программ StatSoft STATISTICA 12.0. Достоверность межгрупповых различий оценивали, используя однофакторный дисперсионный анализ по Краскелу-Уоллесу. Различия между группами считали статистически значимыми, если вероятность ошибочной оценки не превышала 5 % ($p \leq 0,05$).

Результаты и их обсуждение

Данные об изменении поведенческих реакций у крыс с ААС (как без, так и с введением производного пластохинона SkQ1) в сравнении с неалкоголизированными, контрольными животными представлены в таблице 1. Сумма признаков ААС по группе, включающих сумму баллов по показателям мышечной ригидности, мышечной гиперактивности и общей гиперактивности у крыс третьей группы (ААС+SkQ1) была ниже, чем у крыс второй группы (ААС). Так же у крыс третьей группы получавших SkQ1 на фоне ААС при подаче громкого звукового стимула отсутствовало развитие манежного бега, в отличие от крыс второй группы. Следовательно, внутримышечное введение SkQ1 снижало выраженность поведенческих признаков ААС.

Таблица 1 – Выраженность поведенческих признаков ААС у крыс самок линии Wistar после 7-суточной алкогольной интоксикации через 15 часов отмены этанола, баллы

Table 1 – The severity of behavioral signs of AAS in female Wistar rats after 7-day alcohol intoxication after 15 hours of ethanol withdrawal, points

№ п/п	Показатели	Контроль (n=12)	ААС (n=12)	ААС + SkQ ₁ (n=12)
1	Мышечная ригидность	0,0	26,6±0,3	15,8±0,3
2	Мышечная гиперактивность	0,0	18,3±0,4	11,6±0,6
3	Общая гиперактивность	0,0	12,5±0,3	7,5±0,4
4	Сумма признаков ААС	0,0	57,5±10,1	35±5,3
5	Сумма признаков ААС по группе	0,0	690,0±10,1	420±9,3
6	Стимулированный манежный бег	0,0	2	0
7	Стимулированные судороги	0,0	0	0

Измерение субстрат- и АДФ-стимулированного дыхания митохондрий, а также максимальной скорости их дыхания позволило установить, что при ААС у крыс происходит снижение этих показателей в больших полушариях головного мозга на 38,3 %, 37,8 % и 38,6 %, соответственно (таблица 2). Скорость дыхания митохондрий мозжечка при ААС, оценённая по этим же показателям, также достоверно снижалась на 32,7 %, 35,2 % и 44,1 % соответственно (таблица 3).

37,8 % и 38,6 %, соответственно (таблица 2). Скорость дыхания митохондрий мозжечка при ААС, оценённая по этим же показателям, также достоверно снижалась на 32,7 %, 35,2 % и 44,1 % соответственно (таблица 3).

Таблица 2 – Интенсивность дыхания митохондрий больших полушарий головного мозга самок крыс: субстрат стимулированное, АДФ стимулированное и максимальное (с FCCP)

Table 2 – Respiration rate of the mitochondria of the cerebral hemispheres of female rats: substrate stimulated, ADP stimulated and maximum (with FCCP)

Показатель	Группа 1 Контроль	Группа 2 ААС	Группа 3 ААС+SkQ ₁	Группа 4 ААС+C ₁₂ TRP	Группа 5 АС
Субстрат нмоль О/мин/мг белка митохонд.	23,6 ± 0,50	14,6 ± 0,62 <i>p</i> ₁₋₂ <0,0001	19,1 ± 0,89 <i>p</i> ₁₋₃ =0,08 <i>p</i> ₂₋₃ =0,08	16,7 ± 0,69 <i>p</i> ₁₋₄ =0,0006	19,92 ± 0,68 <i>p</i> ₁₋₅ =0,03
АДФ нмоль О/мин/мг белка митохонд.	29,8 ± 0,47	18,6 ± 0,67 <i>p</i> ₁₋₂ <0,0001	27,2 ± 0,65 <i>p</i> ₂₋₃ =0,0020	20,62 ± 0,73 <i>p</i> ₁₋₄ =0,0001 <i>P</i> ₃₋₄ =0,02	24,07 ± 0,82 <i>p</i> ₁₋₅ =0,04
FCCP нмоль О/мин/мг белка митохонд.	33,6 ± 0,97	20,6 ± 0,82 <i>p</i> ₁₋₂ <0,0001	31, 2± 0,67 <i>p</i> ₂₋₃ =0,0009	23,17 ± 0,91 <i>p</i> ₁₋₄ =0,0003 <i>p</i> ₃₋₄ =0,01	25,89 ± 0,93 <i>p</i> ₁₋₅ =0,02

Таблица 3 – Интенсивность дыхания митохондрий мозжечка самок крыс: субстрат стимулированное, АДФ стимулированное и максимальное (с FCCP)

Table 3 – Respiration rate of cerebellar mitochondria of female rats: substrate stimulated, ADP stimulated and maximum (with FCCP)

Показатель	Группа 1 Контроль	Группа 2 ААС	Группа 3 ААС+SkQ ₁	Группа 4 ААС+C ₁₂ TRP	Группа 5 АС
Субстрат нмоль О/мин/мг белка митохонд.	23,57±0,58	15,88±0,60 <i>p</i> ₁₋₂ =0,00002	20,11±0,77	18,12±0,73 <i>p</i> ₁₋₄ =0,005	20,63±0,95 <i>p</i> ₂₋₅ =0,04
АДФ нмоль О/мин/мг белка митохонд.	29,62±1,26	19,20±0,90 <i>p</i> ₁₋₂ =0,00003	26,98±0,72 <i>p</i> ₂₋₃ =0,002	23,09±0,85 <i>p</i> ₁₋₄ =0,02	24,38±0,78
FCCP нмоль О/мин/мг белка митохонд.	38,41±1,07	21,49±1,47 <i>p</i> ₁₋₂ =0,000002	32,62±0,31 <i>p</i> ₂₋₃ =0,002	27,09±0,40 <i>p</i> ₁₋₄ =0,0001 <i>p</i> ₃₋₄ =0,05	29,84±0,25 <i>p</i> ₁₋₅ =0,02

При введении животным с ААС препарата SkQ₁ интенсивность дыхания митохондрий достоверно повышалась как в больших полушариях (на 24,0 %, 31,8 % и 33,8 %), так и в мозжечке на

21,1 %, 28,9 % и 34,1 % по сравнению с группой ААС (таблицы 2 и 3). Тогда как введение препарата сравнения C₁₂TRP при ААС достоверно не влияло на интенсивность дыхания митохондрий. В

группе АС, потребление кислорода митохондриями больших полушарий и мозжечка уменьшалось в среднем в два раза слабее в сравнении с группой ААС, что говорит об отсутствии развития синдрома отмены. Таким образом, у крыс-самок с синдромом отмены этанола, резко ухудшаются ключевые показатели дыхания митохондрий как в теменной коре, так и в мозжечке, а введение SkQ₁ статистически достоверно сдвигает большинство из них к нормальным значениям.

После внутрижелудочного введения экспериментальным животным 30 % этанола 2 раза в день в течении 7 дней и последующей его отмены содержание белков слияния (Mfn1) и деления

(Dnm11) митохондрий в ткани больших полушарий головного мозга достоверно уменьшалось на 37 % и 57,9 % (таблица 4).

Внутримышечное введение производного пластохинона SkQ1 восстанавливало содержание белков слияния и деления митохондрий до 100 % и 88,2 % от контрольных значений, соответственно, что свидетельствует о нормализации процессов пролиферации митохондрий и регуляции митохондриальной динамики. Внутримышечное введение C₁₂TPP так же оказало положительное действие, восстанавливая данные показатели у крыс с ААС до 74,1 % и 63,7 % от контрольных значений.

Таблица 4 – Содержание белков слияния и деления митохондрий в ткани больших полушарий головного мозга самок крыс при развитии ААС

Table 4 – The content of mitochondrial fusion and mitochondrial fission proteins in the tissue of the cerebral hemispheres of female rats during the development of AWS

Показатель	Группа 1 Контроль	Группа 2 ААС	Группа 3 ААС+SkQ1	Группа 4 ААС+C ₁₂ TPP
Mitofusin-1, ng/ml	n=5 0,81±0,07	n=6 0,51±0,03 <i>p</i> ₁₋₂ =0,04	n=9 0,81±0,06 <i>p</i> ₂₋₃ =0,01	n=7 0,60±0,07 <i>p</i> ₃₋₄ =0,09
Dynamin-1-like protein, pg/ml	n=8 188,4±28,3	n=6 79,2±11,47 <i>p</i> ₁₋₂ =0,03	n=11 166,2±19,53 <i>p</i> ₂₋₃ =0,07	n=6 119,9±21,00

От фазы эстрального цикла зависит множество биохимических показателей, поэтому использованные животные были рандомизированы в том числе по уровню эстрадиола, который в сыворотке крови самок крыс был практически равным во

всех группах (Таблица 5). Следовательно, использованные животные находились в одной фазе эструса и влияние эстрального цикла на исследуемые в данной работе показатели можно не учитывать.

Таблица 5 – Уровень эстрадиола в сыворотке крови самок крыс

Table 5 – Estradiol level in the blood serum of female rats

Показатель	Группа 1 Контроль	Группа 2 ААС	Группа 3 ААС+SkQ1	Группа 4 ААС+C12TPP	Группа 5 АС
	n=10	n=8	n=10	n=8	n=8
Эстрадиол, пг/мл	412,18±24,02	389,1±24,2	391,48±21,24	391,84±28,07	358,65±26,88

Гистологическое исследование не выявило качественные различия между группами подопытных животных в строении теменной коры и СА-1 ядра гиппокампа. Во всех группах крыс в этих структурах присутствовали все отмеченные выше виды нейронов. Однако их численность существенно колебалась как при сравнении животных разных групп, так и внутри одной и той же группы.

Наибольшая доля гиперхромных нейронов была у трех животных 2-й группы. Последние существенно отличались от нейронов с нормальным строением не только увеличением интенсивности окрашивания цитоплазмы, но и темно-синей окраской отростков (которые из-за

этого становились хорошо видимыми), более интенсивной окраской ядра, меньшим объемом клетки в области расположения ядра (в других исследованиях как в норме, так и после экспериментальных воздействий также выявляли гиперхромные нейроны, имевшие сходные черты [16]). Изменение строения, характерное для гиперхромных нейронов, можно объяснить тем, что у данных клеток, вероятно, утрачивалась барьерная функция наружной цитоплазматической мембраны и ядерной оболочки. Попутно клетка теряет часть воды, а рН ее протоплазмы изменяется в кислую сторону. Все отмеченное ведет к тому, что использованные

краски придают нейрону его специфический «гиперхромный» вид. Можно высказать гипотезу, что первопричиной всех отмеченных изменений является функциональная перегруженность нейронов, которому ААС мог способствовать (дополнительно смотрите обсуждение этого вопроса со ссылками на соответствующими источниками, например, [17]).

Что касается степени присутствия вещества Ниссля в цитоплазме нормохромных нейронов, то если оно и преобладало, например, у животных

второй группы (с ААС) по сравнению с первой (контроль), то незначительно.

Сравнение электронно-микроскопических данных и гистологического вида пирамидных нейронов 5-го слоя теменной коры крыс позволяет считать, что так называемое вещество Ниссля – это большее или меньшее количество структур рибонуклеотидной природы (прежде всего свободных рибосом и гранулярный эндоплазматический ретикулум), присутствующих в цитоплазме нейронов вокруг их ядер (рисунок 2).

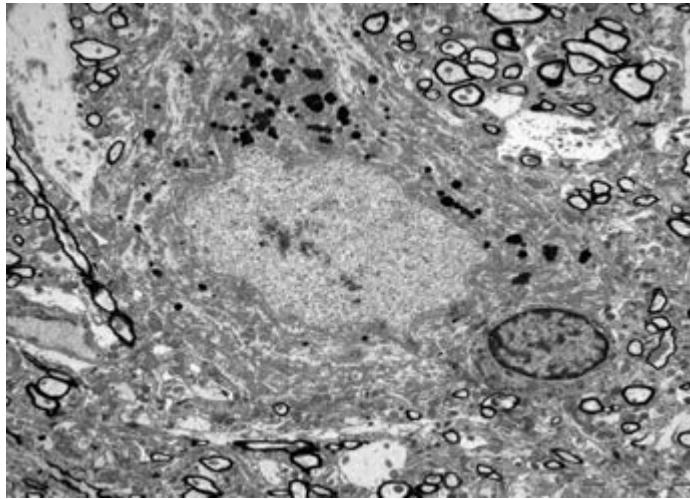


Рисунок 2 – Микрофотография пирамидного нейрона 5-го слоя переднетеменной коры большого полушария головного мозга крысы «Темный» нейрон. Справа внизу – клетка-сателлит (олигодендроцит). Животное контрольной группы. Мерный отрезок 5 мкм

Figure 2 – Micrograph of the pyramidal neuron of the 5th layer of the anterior parietal cortex of the large hemisphere of the rat brain «Dark» neuron. At the bottom right is a satellite cell (oligodendrocyte). The animal of the control group. The measuring segment is 5 microns

Основные результаты морфометрического исследования представлены в таблице 6. Хотя статистически значимых отличий между изучаемыми показателями не было выявлено, обращает на себя внимание то, что относительное количество гиперхромных нейронов как в коре, так и в ядре гиппокампа у животных с ААС (2-я группа) оказалось в разы больше, чем у животных 1-й (контрольной) и 3-й (группа с ААС + SkQ1) групп.

Отсутствие статистически значимых различий при такой разнице среднегрупповых показателей обусловлено большими колебаниями последних у различных животных внутри одной и той же группы. Так, например, в коре у трех крыс 2-й группы (из пяти) гиперхромные нейроны присутствовали в абсолютно доминирующем количестве (рисунок 3), тогда как у двух остальных их количество было существенно меньше. В таких условиях имеет право на существование гипотеза, что различие реакции животных на одинаковое воздействие обусловлено их генетическими различиями.

Был проведен корреляционный анализ морфометрического материала. Его результаты представлены на рисунке 4.

Наиболее очевидными корреляционными связями следует признать отрицательные связи между такими показателями, как относительное количество нормо- и гиперхромных нейронов в структурах мозга (связи В2-С3 и F7-G7), поскольку они обусловлены взаимозависимостью двух (из трех учтенных) доминирующих относительных показателей, Намного более интересными оказались положительные связи между относительным количеством гиперхромных нейронов в коре темени и в выбранном ядре гиппокампа (прежде всего связь между показателями С3 и G7), Это может свидетельствовать, что недельное воздействие алкоголя и состояние последующей абстиненции вызывает близкие изменения во многих популяциях нейронов мозга (в том числе тех, которые расположены в коре, и тех, что находятся глубже).

Таблица 6 – Состав нейронов в 5-м слое теменной коры и подлежащего под ней СА-1 ядра гиппокампа в головном мозге первых трёх групп крыс

Table 6 – Composition of neurons in the 5th layer of the parietal cortex and the underlying CA-1 nucleus of the hippocampus in the brain of the first three groups of rats

Показатели	Теменная кора				Ядро гиппокампа			
	Общее количество нейронов на 1 мм ² площади (шт./мм ²)	Относительное количество (в %):			Общее количество нейронов на 1 мм длины среза ядра (шт./мм)	Относительное количество (в %):		
		Нормохромные нейроны	Гиперхромные нейроны	Нейроны с сателлитозом		Нормохромные нейроны	Гиперхромные нейроны	Нейроны с сателлитозом
Контрольная группа								
M±m	879±77,2	85,9±4,56	12,2±4,79	1,93±0,47	273±19,1	97,0±0,77	2,88±0,78	0,12±0,07
Группа с ААС								
M±m	847±33,5	67,5±12,1	31,3±12,2	1,20±0,23	234±12,0	89,7±5,19	10,2±5,14	0,17±0,11
p ₁	0,6928	0,2405	0,2286	0,1803	0,1163	0,2554	0,2549	0,7045
Группа ААС ± SkQ1								
M±m	849±65,5	90,7± 2,75	7,94±2,64	1,39±0,25	225±16,3	96,3±0,28	3,56±0,32	0,15± 0,06
p ₁	0,7748	0,3746	0,4354	0,3134	0,0997	0,3744	0,4082	0,7539
p ₂	0,9779	0,0992	0,0984	0,6001	0,6792	0,2382	0,2362	0,8518

Примечание: p₁ – статистическая значимость различий между контрольной и второй группами; p₂ – между второй и третьей группами

Note: p₁ is the statistical significance of the differences between the control and the second groups; p₂ is between the second and third groups

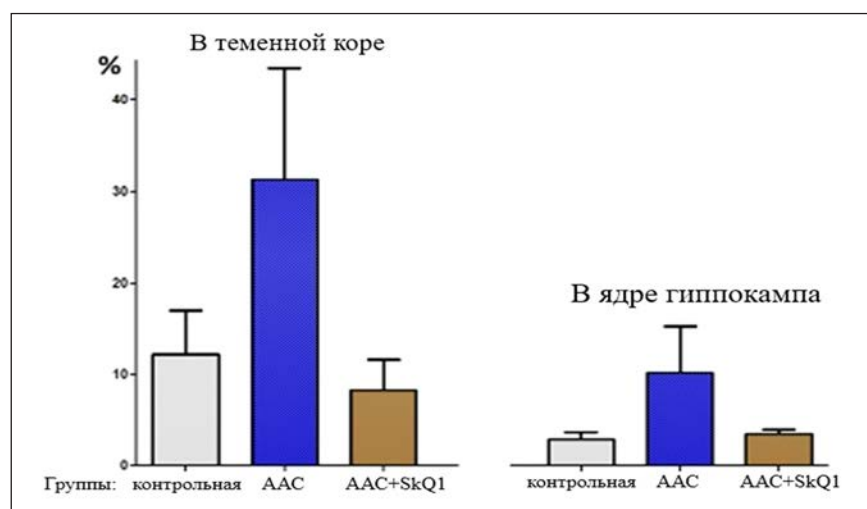


Рисунок 3 – Доля гиперхромных ядер в 3-5-м слоях теменной коры и в СА1-ядре гиппокампа, подопытных крыс

Figure 3 – The proportion of hyperchromic nuclei in the 3rd-5th layers of the parietal cortex and in the CA1 nucleus of the hippocampus of experimental rats

Неожиданным стало выявление положительной связи между плотностью расположения нейронов в коре мозга и степенью выраженности признаков сателлитоза (показатели А1 и D4), а также такой же связи между проявлениями сателлитоза в коре и ядре гиппокама (связь D4-H8). Известно, что в эмбриогенезе в мозге млекопитающих закладывается избыток нейронов, часть из которых погибает в раннем постнатальном периоде онтогенеза и фагоцитируется глиальными клетками. Возможно, что связь между степенью сателлитоза и

плотностью расположения нейронов в коре является остаточным проявлением отмеченного явления, направленного на удаление излишних нейронов.

Таким образом, на основе использования гистологического и морфометрического методов выявлено, что в условиях использованной модели ААС в исследованном участке коры мозга животных наблюдается тенденция к увеличению относительного количества гиперхромных нейронов. Это явление не наблюдалось у животных, которым на фоне ААС вводилось вещество SkQ1.

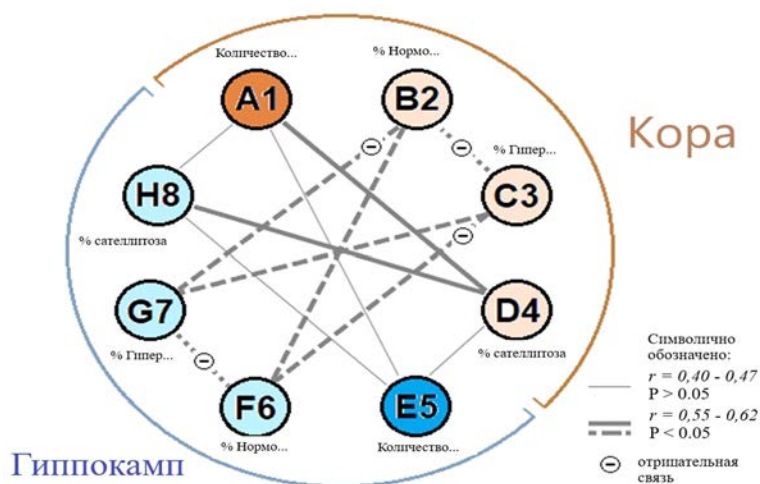


Рисунок 4 – Корреляционные связи между гистологическими показателями. Теменная кора: А1 – общее количество нейронов на 1 мм² площади, В2 – относительное количество нормохромных нейронов (в %) С3 – относительное количество гиперхромных нейронов (в %), D4 – относительное количество нейронов с сателлитозом (в %); ядро гиппокампа: Е5 – общее количество нейронов на 1 мм² площади, F6 – относительное количество нормохромных нейронов (в %), G7 – относительное количество гиперхромных нейронов (в %), H8 – относительное количество нейронов с сателлитозом (в %)

Figure 4 – Correlations between histological indicators. Parietal cortex: A1 – the total number of neurons per 1 mm² area, B2 – the relative number of normochromic neurons (in %) C3 – the relative number of hyperchromic neurons (in%), D4 – the relative number of neurons with satellite (in %); Hippocampal nucleus: E5 – the total number of neurons per 1 mm² area, F6 – the relative number of normochromic neurons (in %), G7 – the relative number of hyperchromic neurons (in%), H8 – the relative number of neurons with satellite (in %)

Заключение

В ходе проведенного исследования, направленного на оценку состояния нейронов больших полушарий мозга и мозжечка у самок крыс, которые 7 суток находились в состоянии ААС, ухудшаются показатели поведенческих реакций, показатели дыхания митохондрий как в коре больших полушарий, так и в мозжечке, наблюдается тенденция к увеличению доли гиперхромных нейронов в теменной коре и СА-1 ядре гиппокампа, Содержание белков слияния и деления митохондрий в коре больших полушарий головного мозга уменьшается.

Внутримышечное введение SkQ1 существенно снижает выраженность поведенческих откло-

нений, возникающих на фоне моделирования ААС, Использование SkQ1 также уменьшало негативное воздействие ААС на интенсивность дыхания митохондрий больших полушарий мозга и мозжечка самок крыс, а содержание белков слияния и деления митохондрий повышалось соответственно до 100 % и 88,2 % от их контрольных значений, У животных, которым на фоне ААС вводилось вещество SkQ1, тенденция к увеличению относительного количества гиперхромных нейронов утрачивалась, Уровень эстрадиола в крови данных животных не меняется во всех группах,

Благодарности

Работа выполнена в рамках НИР «Коррекция нарушений структурно-функционального состояния митохондрий головного мозга экспериментальных животных при алкогольном абстинентном синдроме с использованием производных пластохинона и комплексных средств метаболического действия» по заданию 4,1,2, «Исследовать механизмы нарушений интегративных процессов в экспериментальных моделях заболеваний человека *in vitro* и *in vivo*» ГПНИ

«Трансляционная медицина» на 2021–2025 годы (подпрограмма «Экспериментальная медицина»).

Авторы исследования выражают глубокую благодарность ведущему научному сотруднику отдела биоэнергетики научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, к.б.н. Скулачеву М.В. за предоставленные образцы SkQ₁ и C₁₂TPP, использованные в настоящей работе.

Список цитированных источников

1. Fouarge, E. Neurological consequences of alcoholism / E. Fouarge, P. Maquet // *Rev. Med. Liege*. – 2019. – Vol. 74, № 5–6. – P. 310–313.
2. Kathryn, M. R. Alcohol use disorder and depressive disorders / M. R. Kathryn, D. Roger // *Alcohol Res*. – 2019. – Vol. 40, № 1. – 8 p.
3. Protective effects of mitochondria-targeted antioxidant SkQ in aqueous and lipid membrane environments / Y. N. Antonenko [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2008. – Vol. 222, № 3. – P. 141–149.
4. Mitochondria-Targeted Antioxidants: A Step towards Disease Treatment / Q. Jiang [et al.] // *Oxidative Med. Cell. Longev*. – 2020. – Vol. 10, № 1155. – P. 1–18.
5. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of an aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and in vitro studies / Y. N. Antonenko [et al.] // *Biochemistry (Moscow)*. – 2008. – Vol. 73. – P. 1273–1287.
6. Prevention of cardiolipin oxidation and fatty acid cycling as two antioxidant mechanisms of cationic derivatives of plastoquinone (SkQs) / P. S. Vladimir [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2010. – Vol. 1797. – P. 878–889.
7. Protective effects of mitochondria-targeted antioxidant SkQ in aqueous and lipid membrane environments / Y. N. Antonenko [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2008. – Vol. 222, № 3. – P. 141–149.
8. Надлежащая лабораторная практика : ТКП 125-2008 (02040). – Минск : М-во здравоохранения Респ. Беларусь. – 2008. – 35 с.
9. Majchrowicz, E. Reversal in central nervous system function during ethanol withdrawal in humans and experimental animals / E. Majchrowicz // *Fed. Proc*. – 1981. – Vol. 40, № 7. – P. 2065–2072.
10. Значение толерантности к этанолу. тяжести синдрома отмены и возраста крыс в развитии психотоксического алкогольного повреждения сердца / Е. Б. Тезиков [и др.] // *Вопросы наркологии*. – 1991. – № 1. – С. 7–9.
11. Дубровин, И. П. Универсальный способ окрашивания воспалительных очагов и неповрежденных участков ткани мозга в вибротомных и полутонких срезах / И. П. Дубровин, С. В. Комиссарова, С. А. Турыгина // *Медико-биологические проблемы*. – 2012. – № 1. – С. 62–65.
12. A rapid method combining golgi and nissl staining to study neuronal morphology and cytoarchitecture / P. Nadia [et al.] // *J Histochem. Cytochem*. – 2008. – Vol. 56, № 6 – P. 539–550.
13. Recommended methods for brain processing and quantitative analysis in rodent developmental neurotoxicity studies / R. H. Garman [et al.] // *Toxicologic. Pathology*. – 2016. – Vol. 44, № 1. – P. 14–42.
14. Reynolds, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy / E. S. Reynolds // *J. Cell Biol*. – 1963. – Vol. 17, № 1. – P. 208–212.
15. Панов, А. В. Практическая митохондриология / А. В. Панов. – Новосибирск, 2015. – 239 с.
16. Impaired memory and evidence of histopathology in CA1 pyramidal neurons through injection of A β 1-42 peptides into the frontal cortices of rat / M. J. Eslamizade [et al.] // *Basic and Clinical Neuroscience*. – 2016. – Vol. 7, № 1. – P. 31–41.
17. Бонь, Е. И. Изменения хромотофилии цитоплазмы больших пирамидных нейронов новой коры мозга крысы в постнатальном онтогенезе / Е. И. Бонь, С. М. Зиматкин // *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*. – 2019. – Т. 18, № 1. – С. 10–15.

References

1. Fouarge E, Maquet P. [Neurological consequences of alcoholism]. *Revue Medicale de Liege*. 2019 May; 74(5-6):310-313.
2. McHugh RK, Weiss RD. Alcohol use disorder and depressive disorders. *Alcohol Res*. 2019 Jan 1;40(1):arcr.v40.1.01. doi: 10.35946/arcr.v40.1.01.
3. Antonenko YN, Roginsky VA, Pashkovskaya AA, Rokitskaya TI, Kotova EA, Zaspaa AA, Chernyak BV, Skulachev VP. Protective effects of mitochondria-targeted antioxidant SkQ in aqueous and lipid membrane environments. *J Membr Biol*. 2008 Apr;222(3):141-9. doi: 10.1007/s00232-008-9108-6.
4. Jiang Q, Yin J, Chen J, Ma X, Wu M, Liu G, Yao K, Tan B, Yin Y. Mitochondria-Targeted Antioxidants: A Step towards Disease Treatment. *Oxid Med Cell Longev*. 2020 Dec 3;2020:8837893. doi: 10.1155/2020/8837893.
5. Antonenko YN, Avetisyan AV, Bakeeva LE, Chernyak BV, Chertkov VA, Domnina LV, Ivanova OY, Izyumov DS, Khailova LS, Klishin SS, Korshunova GA, Lyamzaev KG, Muntyan MS, Nepryakhina OK, Pashkovskaya AA, Pletjushkina OY, Pustovidko AV, Roginsky VA, Rokitskaya TI, Ruuge EK, Saprunova VB, Severina II, Simonyan RA, Skulachev IV, Skulachev MV, Sumbatyan NV, Sviryaeva IV, Tashlitsky VN, Vassiliev JM, Vyssokikh MY, Yaguzhinsky LS, Zamyatnin AA Jr, Skulachev VP. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and in vitro studies. *Biochemistry (Mosc)*. 2008 Dec;73(12):1273-87. doi: 10.1134/s0006297908120018.
6. Skulachev VP, Antonenko YN, Cherepanov DA, Chernyak BV, Izyumov DS, Khailova LS, Klishin SS, Korshunova GA, Lyamzaev KG, Pletjushkina OY, Roginsky VA, Rokitskaya TI, Severin FF, Severina II, Simonyan RA, Skulachev MV, Sumbatyan NV, Sukhanova EI, Tashlitsky VN, Trendeleva TA, Vyssokikh MY, Zvyagil'skaya RA. Prevention of cardiolipin oxidation and fatty acid cycling as two antioxidant mechanisms of cationic derivatives of plastoquinone (SkQs). *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jun-Jul;1797(6-7):878-89. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.03.015.
7. Antonenko YN, Roginsky VA, Pashkovskaya AA, Rokitskaya TI, Kotova EA, Zaspaa AA, Chernyak BV, Skulachev VP. Protective effects of mitochondria-targeted antioxidant SkQ in aqueous and lipid membrane environments. *J Membr Biol*. 2008 Apr;222(3):141-9. doi: 10.1007/s00232-008-9108-6.
8. ТКП 125-2008 (02040). Good Laboratory Practice. *Minsk. Ministry of Health of the Republic of Belarus*. 2008: 35. (in Russian)
9. Majchrowicz E. Reversal in central nervous system function during ethanol withdrawal in humans and experimental animals. *Fed Proc*. 1981 May 15;40(7):2065-72.
10. Tezиков EB. The importance of ethanol tolerance, the severity of withdrawal syndrome and the age of rats in the development of post-intoxication alcohol damage to the heart. *Issues of Narcology*. 1991;1:7–9. (in Russian)
11. Dubrovin I, Komissarova S., Turygina S. A universal method for staining inflammatory foci and intact areas of brain tissue in vibratome and semitome sections. *Medical and biological problems*. 2012;1: 62–65. (in Russian)
12. Pilati N, Barker M, Panteleimonitis S, Donga R, Hamann M. A rapid method combining Golgi and Nissl staining to study neuronal morphology and cytoarchitecture. *J Histochem Cytochem*. 2008 Jun;56(6):539-50. doi: 10.1369/jhc.2008.950246. Epub 2008 Feb 18.
13. Garman RH, Li AA, Kaufmann W, Auer RN, Bolon B. Recommended Methods for Brain Processing and Quantitative Analysis in Rodent Developmental Neurotoxicity Studies.

- Toxicol Pathol.* 2016 Jan;44(1):14-42. doi: 10.1177/0192623315596858.
14. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol.* 1963 Apr;17(1):208-12. doi: 10.1083/jcb.17.1.208.
 15. Panov AV. Practical mitochondriology, chapters 2, 3, 9, 10. *Novosibirsk.* 2015:239. (in Russian)
 16. Eslamizade MJ, Madjd Z, Rasoolijazi H, Saffarzadeh F, Pirhajati V, Aligholi H, Janahmadi M, Mehdizadeh M. Impaired Memory and Evidence of Histopathology in CA1 Pyramidal Neurons through Injection of A β 1-42 Peptides into the Frontal Cortices of Rat. *Basic Clin Neurosci.* 2016 Jan;7(1):31-41.
 17. Bon Ye, Zimatkin C. Changes in the chromatophilia of the cytoplasm of large pyramidal neurons of the new rat cerebral cortex in postnatal ontogenesis. *Bulletin of the Smolensk State Medical Academy.* 2019;18(1):10–15 (in Russian).

THE EFFECT OF ALCOHOL WITHDRAWAL SYNDROME ON THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATE OF NEURONS AND MITOCHONDRIA OF THE RAT BRAIN AGAINST THE BACKGROUND OF ADMINISTRATION OF A PLASTOQUINONE DERIVATIVE

*A. V. Tumanov*¹, *A. I. Marchik*¹, *V. Ch. Polubok*¹, *A. B. Astrowskaja*², *A. H. Shlyahatun*¹,
*A. A. Astrowski*¹

¹ *Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy
of Sciences of Belarus, Grodno, Republic of Belarus*

² *Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus*

Introduction. The work is devoted to the study of the effect of ethanol withdrawal syndrome on histological and biochemical changes in neurons and mitochondria of various parts of the rat brain, as well as the possibility of correcting disorders with plastoquinone – 10-(6'-plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium (SkQ1).

The aim of the study. To conduct a comparative analysis of disorders of the structural and functional state of neurons and mitochondria of some parts of the brain of female rats with alcohol withdrawal syndrome (AWS) and to study the possibility of their correction using a plastoquinone derivative.

Materials and methods. AWS was modeled in female rats by administration of a 30% ethanol solution for six days. The structure of neurons and mitochondria of the brain was studied using light and electron microscopy. Mitochondrial respiration of isolated mitochondria of the brain was recorded polarographically. The concentrations of Mfn1, Dnm11 and estradiol were determined by the ELISA method.

Results. It was found that in conditions of AWC, SkQ1 prevents a decrease and maintains at a control level the respiratory intensity of the mitochondria of the cerebral hemispheres and cerebellum of rats. Also, under the influence of SkQ1, there was a tendency to decrease the relative number of hyperchromic neurons in the parietal cortex of animals with AWS. All this indicates the positive effect of SkQ1.

Conclusions. The plastoquinone derivative SkQ1 prevents disorders of the structural state of neurons of the parietal cortex and the functional state of the mitochondria of the cerebral hemispheres and cerebellum of female rats in AWS.

Keywords: alcohol withdrawal syndrome, plastoquinone derivatives, hyperchromic neurons, parietal cortex, hippocampal nucleus, mitochondria.

For citation: Tumanov AV, Marchik AI, Polubok VCh, Astrowskaja AB, Shlyahatun AH, Astrowski AA. The effect of alcohol withdrawal syndrome on the structural and functional state of neurons and mitochondria of the rat brain against the background of administration of a plastoquinone derivative. *Biochemistry and Molecular Biology.* 2024, vol. 3, no. 1(4). pp. 42–51 (in Russian).

Поступила 27.03.2024

УРОВНИ НОРМАЛИЗОВАННОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ IL-1 β , COL, MMP У ПАЦИЕНТОК С ЦЕРВИКАЛЬНЫМИ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫМИ ПОРАЖЕНИЯМИ КАК МАРКЕРЫ ТКАНЕВОЙ ДЕСТРУКЦИИ

С. А. Костюк, Л. Ф. Можейко, Т. В. Пинчук, О. С. Полуян

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск, Республика Беларусь

Введение. Риск развития предрака и рака шейки матки можно оценить, используя текущие результаты скрининговых тестов в комбинации с результатами прошлых скрининговых тестов и биопсии. С научной точки зрения интерес представляет оценка зависимости между степенью цервикального воспаления, клеточной деструкцией и наличием плоскоклеточного интраэпителиального поражения. Одним из перспективных направлений в поиске маркеров предрасположенности и прогноза заболевания является идентификация генетических факторов.

Цель исследования. Определить уровни нормализованной экспрессии функциональных (гены внеклеточного матрикса металлопротеиназа 2 (MMP-2) и металлопротеиназа 9 (MMP-9)) и структурных (гены компонентов матрикса коллагена 2 (Col-2) и коллагена 6 (Col-6)) генов и гена IL-1 β в биоптатах шейки матки у пациенток с цервикальными интраэпителиальными поражениями низкой степени и хроническим цервицитом, вызванным бактериями, ассоциированными с бактериальным вагинозом.

Материалы и методы. В исследование включено 24 пациентки с цервикальными интраэпителиальными поражениями низкой степени (группа 1), 24 пациентки с хроническим цервицитом, вызванным бактериями, ассоциированными с бактериальным вагинозом (группа 2), 20 пациенток группы контроля (группа 3), в биологическом материале (биоптаты шейки матки) которых проводили молекулярно-биологические исследования по определению уровней нормализованной экспрессии генов, контролирующих синтез цитокинов, коллагена, металлопротеиназ.

Результаты. Уровни нормализованной экспрессии генов MMP-2, MMP-9, COL2A1, COL6A1, IL-1 β -1 и IL-1 β -2 для группы 1 составили Me (Q25/75) 329,16 (253,25/414,33) %, 314,10 (196,21/343,26) %, 103,94 (92,34/112,78) %, 3,07 (2,31/3,86) %, 93,15 (71,34/120,54) % и 75,26 (43,43/89,87) % соответственно; для группы 2 – 109,85 (61,52/134,08) %, 65,26 (33,43/79,87) %, 50,06 (38,64/69,02) %, 8,43 (4,20/16,11) %, 48,34 (35,12/66,78) % и 49,58 (26,97/61,30) % соответственно; для группы 3 – 89,08 (58,24/122,28) %, 39,58 (16,97/66,30) %, 7,79 (5,26/13,68) %, 29,28 (20,49/39,08) %, 17,99 (10,26/23,68) % и 25,90 (14,57/39,06) % соответственно.

Заключение. Установленный молекулярно-генетический профиль ткани шейки матки, характерный для цервикальных интраэпителиальных поражений и хронического цервицита, при этом более выраженные изменения в уровни нормализованной экспрессии генетических детерминант MMP-2, MMP-9, COL2A1, COL6A1, IL-1 β -1 и IL-1 β -2 характерно для группы пациенток с цервикальными интраэпителиальными поражениями, что свидетельствует о наличии у данных пациентов активных механизмов разрушения тканевых элементов, приводящих к структурным изменениям в матриксе.

Ключевые слова: цервикальные интраэпителиальные поражения, шейка матки, цервицит, уровни нормализованной экспрессии генов, цитокины, коллаген, металлопротеиназы.

Для цитирования: Уровни нормализованной экспрессии генетических детерминант IL-1 β , Col, MMP у пациенток с цервикальными интраэпителиальными поражениями как маркеры тканевой деструкции / С. А. Костюк [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. – 2024. – Т. 3, № 1(4). – С. 52–59.

Введение

Одним из широко распространенных патологических процессов шейки матки являются ее предраковые состояния – цервикальные интраэпителиальные поражения (squamous intraepithelial lesion, SIL). Ведущая роль в развитии данного заболевания принадлежит вирусу папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР), длительная персистенция которого приводит к клеточным изменениям, характерным для предра-

ка и рака шейки матки. Однако персистирующий характер папилломавирусная инфекция приобретает лишь у 10–15 % пациенток [1]. У большинства женщин, инфицированных ВПЧ ВКР, элиминация вируса происходит самостоятельно в течение 2 лет.

Неоднозначность течения ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки требует разработки риск-ориентированного подхода к менеджменту пациентов с такой патологией. Новые мировые данные показывают, что риск развития предрака и

рака шейки матки можно оценить, используя текущие результаты скрининговых тестов в комбинации с результатами прошлых скрининговых тестов и биопсии, принимая во внимание личные факторы, такие, как возраст и иммуносупрессия [2]. В некоторых исследованиях обнаружена прямая зависимость между степенью цервикального воспаления, клеточной деструкцией и наличием плоскоклеточного интраэпителиального поражения [3].

Существует множество возбудителей, как инфекционных, так и неинфекционных, являющихся потенциальными этиологическими агентами цервицита. К ним относят возбудителей инфекций, передаваемых половым путем, условно-патогенные микроорганизмы урогенитального тракта, неинфекционные агенты, иногда – системные воспалительные процессы. Взаимосвязь между бактериями, ассоциированными с бактериальным вагинозом, дефицитом лактобактерий и цервицитом является предметом изучения многих авторов [4, 5]. Результатом проводимых исследований является вывод о том, что отсутствие лактобактерий, продуцирующих перекись водорода, влияющих на иммунный ответ и способствующих клеточной регенерации, может способствовать развитию цервицита [5, 6].

Выраженность воспалительной реакции и длительная персистенция инфекционного агента в значительной мере определяется возможностями макроорганизма противостоять воздействию на него патогенной микрофлоры. В литературе представлен ряд публикаций, посвященных изучению факторов, которые не вызывают заболевание, но ассоциированы с тяжелым течением воспалительного процесса. К таким факторам относят и генетический статус человека [7, 8, 9].

Несмотря на многочисленные исследования, не установлено достоверных маркеров, позволяющих проводить оценку предрасположенности конкретного пациента к развитию цервикальных интраэпителиальных поражений, прогнозировать вариант течения и исход заболевания. Разработка таких критериев позволит осуществлять своевременную диагностику и определять правильную стратегию ведения таких пациентов. Одним из перспективных направлений в поиске маркеров предрасположенности и прогноза заболевания является идентификация генетических факторов [10].

Развитие и совершенствование молекулярно-генетических методов анализа дали возможность активному изучению генома человека, что позволило расширить поиск генов-кандидатов, полиморфизм которых может быть связан с вероятностью возникновения, особенностями течения

и исходом заболеваний [9]. Гены, кодирующие цитокины (интерлейкины, факторы роста, интерфероны, хемокины и др.), стали первыми генами-кандидатами, изменения которых попытались связать с патогенезом воспалительных заболеваний, в том числе заболеваний шейки матки, так как продукты этих генов – цитокины – ключевое звено иммунного ответа при любых воспалительных реакциях.

IL-1 β – провоспалительный цитокин, которому принадлежит ведущая роль в процессах острого и хронического воспаления как местного, так и системного характера. Секретируется преимущественно макрофагами, а также Т-лимфоцитами, фибробластами и клетками эпителия. Под влиянием антигенов условно-патогенной и облигатно-патогенной урогенитальной микрофлоры происходит стимуляция продукции IL-1 β макрофагами. Далее посредством аутокринных механизмов он сам активирует свою выработку. IL-1 β индуцирует продукцию матриксных металлопротеиназ, тормозит синтез их ингибиторов, повышает функциональную активность макрофагов и других клеток локального иммунного ответа.

Повышение уровня IL-1 β в вагинальном секрете пациентов с хроническим цервицитом напрямую связано с тяжестью поражений, а также клиническими симптомами заболевания [11]. По мнению ряда авторов, наличие корреляции между концентрацией IL-1 β и степенью тяжести воспалительных и деструктивных процессов делает данный цитокин ценным диагностическим маркером многих патологий [12, 13, 14].

Гены матриксных металлопротеиназ – MMP-2, MMP-3, MMP-8 и MMP-9 также изучаются с целью выявления возможных генетических маркеров, ассоциированных с предрасположенностью к воспалительным заболеваниям шейки матки, поскольку матриксные металлопротеиназы относятся к семейству внеклеточных протеиназ, основными функциями которых являются участие в обмене белков соединительной ткани, развитии и ремоделировании клеточного матрикса, репарации тканей, неоангиогенезе [15, 16, 17].

В зависимости от субстратной специфичности, первичной структуры, а также различий в механизмах действия семейство MMP делится на 5 основных групп: коллагеназы (MMP-1, 8 и 13), индуцирующие деградацию коллагена I, II и III типов; стромелизины (MMP-3, 10 и 11), обеспечивающие протеолиз неколлагеновых белков (фибронектин, эластин); желатиназы (MMP-2 и 9), отвечающие за распад коллагена IV типа, который входит в состав базальной мембраны; MMP мембранного типа (MMP-14, 15, 16, 17, 24 и 25); MMP разных типов (MMP-7, 11, 12, 20) [7, 8, 9].

В настоящее время известно 27 различных типов коллагена [18]. Он является преобладающим компонентом кожи, сухожилий, костной, хрящевой ткани, стромы всех паренхиматозных органов, базальных мембран, стенок кровеносных сосудов. Различия соединительных тканей обусловлены варибельностью размеров, количеством коллагена, толщиной и длиной образующихся фибрилл, а также их ориентацией [11, 18]. Максимальную распространенность и биологическое значение имеют коллагены I–IV типов, в связи с чем их определяют как основные. В последние годы доказана детерминирующая роль коллагенов в развитии воспаления [10], иммунных реакций [10, 11] и репаративной регенерации [11]. Так как большинство заболеваний уrogenитального тракта, включая дисплазию шейки матки и цервицит, характеризуется хроническим воспалением различных структур, соединительной ткани и сосудов, нарушением иммунной регуляции, то их можно считать классической природной моделью коллагенового обмена и его нарушений.

Цель исследования. Определить уровни нормализованной экспрессии функциональных (гены внеклеточного матрикса металлопротеиназа 2 (MMP-2) и металлопротеиназа 9 (MMP-9)) и структурных (гены компонентов матрикса коллагена 2 (Col-2) и коллагена 6 (Col-6)) генов и гена IL-1 β в биоптатах шейки матки у пациенток с цервикальными интраэпителиальными поражениями низкой степени и хроническим цервицитом, вызванным бактериями, ассоциированными с бактериальным вагинозом.

Материалы и методы

Исследования проводились на базе кафедры акушерства и гинекологии и Научно-исследовательской лаборатории (НИЛ) Научно-исследовательского института (НИИ) экспериментальной и клинической медицины учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» (БГМУ).

Объектом исследования явились пациенты с патологией шейки матки. При разработке метода молекулярно-генетического анализа вариантов генетических детерминант (гены, контролирующие синтез цитокинов, коллагена, металлопротеиназ) в биоптатах шейки матки, исследования проводили с использованием биологического материала пациентов с цервикальными интраэпителиальными поражениями низкой степени (n=24) – группа 1, хроническим цервицитом, вызванным бактериями, ассоциированными с бактериальным вагинозом (n=24) – группа 2. Контрольную группу составили 20 гинекологически здоровых пациенток. Возраст пациентов группы 1 составил Me (Q25/75)

29 (21/34) лет, группы 2 – 25 (23/35) лет, группы 3 – 22 (20/28) года.

Форма информированного согласия от пациентов, включенных в исследование, одобрена Комитетом по этике ИПК и ПКЗ УО «БГМУ».

Биологическим материалом для исследования явились биоптаты шейки матки, помещенные в пробирку типа эппендорф объемом 1,5 мл, содержащую 200 мкл RNeasy Lysis Buffer (Sigma).

Выделение РНК из ткани проводили с помощью TRIzol реагента (Sigma) после предварительной гомогенизации с использованием гомогенизатора TissueLyser II (Qiagen) в течение 3 мин (частота 10/с). Выделенную РНК использовали для определения количества и степени чистоты выделения полученной нуклеиновой кислоты, а затем незамедлительно замораживали при –70 °С.

Определение концентрации РНК и степени чистоты выделенной нуклеиновой кислоты проводили спектрофотометрически (NanoDrop 1000, Thermo scientific, США) на длине волны $\lambda=230$ нм. Степень чистоты выделенной РНК оценивали по соотношениям 260/280 и 260/230. Для чистого препарата ДНК с отсутствием примесей белка и других ингибиторов значение A260/280 составляло 1,8.

После оценки качества РНК, все образцы биологического материала подвергали обратной транскрипции с использованием набора SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen), dNTP (Invitrogen) и Ribonuclease inhibitor (Invitrogen). Состав реакционной смеси: 1 мкл рандомного праймера (ОДО «Праймтех», РБ), 5 мкл выделенной РНК, 1 мкл 10 мМ смеси dNTP, 5 мкл воды (Nuclease-Free). Конечный объем реакционной смеси составил 12 мкл. Прогревали пробирку с реакционной смесью при 65 °С в течение 5 мин, а затем сразу охлаждали на льду. Смесь осаждали кратким центрифугированием и добавляли следующие компоненты: 4 мкл 5X First-Strand Buffer; 2 мкл 0,1M DTT; 1 мкл SuperScript III RT; 1 мкл Recombinant Ribonuclease Inhibitor (10 ед/мкл). Полученную смесь тщательно перемешивали, инкубировали при 25 °С в течение 5 мин, а затем при 50 °С – 50 мин. Инактивировали смесь нагреванием при 70 °С 15 мин. Полученный раствор содержал кДНК, которую использовали для постановки ПЦР в режиме реального времени.

Полученную в результате реакции обратной транскрипции кДНК использовали для проведения ПЦР в режиме реального времени с применением Quick-Load Taq 2X Master Mix (ОДО «Праймтех», РБ), специально подобранных пар праймеров и зондов для каждого гена, включая house-keeping ген с использованием термоциклера-амплификатора «Rotor-Gene-6000» («Corbett research», Австралия).

Последовательности олигонуклеотидных праймеров были следующими:

COL2A1-forward	GCTGGAGAAGAAGGCAAG;
COL2A1-reverse	CAGGTTACCATTGGCAC;
COL2A1-probe	TGCTGGTCCTGCTGGTCC;
COL6A1-forward	TCAGAATAGTGATGTGTTTCGACGTT;
COL6A1-reverse	AGCAACATGGATATGGTTTCAGAAA;
COL6A1-probe	CCTTATGCCTAGCAACATGCCAATC;
MMP2-forward	ATTCTGGAGATACAATGAGGTGAAG;
MMP2-reverse	GCACCCTTGAAGAAGTAGCTG;
MMP2-probe	TGCTGGTCCTGCTGGTCCGTCCTGC;
MMP9-forward	CAAGGGCGTCGTGGTTCC;
MMP9-reverse	CCGTCCCTGGGTGTAGAGTC;
MMP9-probe	CCTTATGCCTAGCAACAT.

Последовательности праймеров для изучения экспрессии генетических детерминант IL-1 β были подобраны следующие:

IL-1 β -1-forward	CTCCAGGGACAGGATATGGA;
IL-1 β -1-reverse	TCTTTCAACACGCAGGACAG;
IL-1 β -2-forward	CAACAAGTGGTGTCTCCATGT;
IL-1 β -2-reverse	GCCAAGGCCACAGGTAT.

Для выбора гена, который будет использоваться в качестве внутреннего контроля, провели количественный анализ и расчет коэффициента вариации для house-keeping генов человека: NAGK, GAPDH, HGUS, β -актин, HPRT1. House-keeping гены человека присутствуют во всех клетках. Для оценки концентрации house-keeping генов человека использовали плазмидный стандарт, а затем рассчитывали коэффициент вариации (CV), исходя из полученных значений концентраций house-keeping генов. Амплификацию всех проб проводили в дуплях, для расчета коэффициента вариации использовали средние значения концентраций, полученные в ходе исследования. Для генов GAPDH, HGUS, и β -актин NAGK, рассчитанные значения коэффициентов вариации находились на уровне 6,9, 10,5, 19,4 и 5,7 % соответственно. В результате анализа полученных данных в качестве внутреннего контроля был выбран ген человека HPRT1, так как именно для него было установлено самое низкое значение коэффициента вариации – 3,9 %.

В качестве референсного был выбран ген HPRT1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase human 1):

Ic-forward	AGCGGTAACCATGCGTATTT;
Ic-reverse	CACATGTGAATTTCTGGCTTG;
Ic-probe	GAAGGAACTAGGGAAAAGGCA.

Состав амплификационной смеси: 19 мкл Platinum PCR SuperMix, 1,5 мкл смеси эквивалент-

ных концентраций праймеров и зонда для одного из целевых генов (COL2A1, COL6A1, MMP-2, MMP-9), 1,5 мкл смеси эквивалентных концентраций праймеров и зонда для гена HPRT1 и 3 мкл кДНК (комплементарной ДНК).

Температурный профиль амплификации генов COL2A1, COL6A1 и HPRT1: 1 цикл: 95 °C – 15 мин; 50 циклов: 95 °C – 20 с, 58 °C – 20 с, 72 °C – 15 с; 1 цикл: 72 °C – 10 мин.

Температурный профиль амплификации генов MMP-2, MMP-9 и HPRT1: 1 цикл: 94 °C – 10 мин; 45 циклов: 94 °C – 20 с, 58 °C – 20 с, 72 °C – 20 с; 1 цикл: 72 °C – 10 мин.

Детекцию целевых генов проводили по каналу «Green», так как зонды для данных генов были мечены флуорофором FAM, а детекцию гена HPRT1 проводили по каналу «Orange», так как зонд для него был мечен флуорофором ROX.

Состав амплификационной смеси: 19 мкл Platinum PCR SuperMix, 1,5 мкл смеси эквивалентных концентраций праймеров для одного из целевых генов (IL-1 β -1, IL-1 β -2), 1,5 мкл смеси эквивалентных концентраций праймеров HPRT1, 10 мкл красителя SYBRGreen (Qiagen) и 3 мкл кДНК (комплементарной ДНК).

Температурный профиль амплификации генов IL-1 β -1, IL-1 β -2 и HPRT1: 1 цикл: 95 °C – 5 мин; 45 циклов: 95 °C – 20 с, 60 °C – 40 с.

Расчет уровней нормализованной экспрессии (УНЭ) целевых генов осуществляли по формуле:

$$\% \text{ уровня экспрессии} = 2^{-(C_t \text{ интересующего гена} - C_t \text{ гена HPRT1})} \cdot 100 \%, \quad (1)$$

где C_t – пороговый цикл (cycle threshold) [19].

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладных программ «SPSS версия 16» (SPSS Inc.). Все количественные данные имели непараметрическое распределение (проверку на нормальность проводили с использованием критерия Колмогорова-Смирнова) и представлены в виде значений медианы и квартилей (Me (Q25/75)). Для характеристики частоты изучаемых признаков использовали абсолютные показатели. Для решения задачи сравнения двух независимых групп количественных переменных применялся критерий Манна-Уитни (U-тест) с целью сравнения величин измерений признака. Критическим принят уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты. Результат выявления/отсутствия амплификации последовательности целевого гена в каждом образце считался валидным (положительным или отрицательным) при условии, что для данного образца был установлен факт успешной амплификации для гена внутреннего контроля HPRT1. В случае, если результат амплификации для гена HPRT1 был отрицательным, образец подвергался повторному анализу, начиная с этапа выделения ДНК. В ходе проведения исследований на биологическом материале пациентов ($n=28$) во всех пробах была выявлена амплификация референсного гена HPRT1.

На основании проведенных молекулярно-генетических исследований установлено, что уровни нормализованной экспрессии гена MMP-2 для группы 1 составили Me (Q25/75) 329,16 (253,25/414,33) %, для группы 2 – 109,85 (61,52/134,08) %, для группы 3 – 89,08 (58,24/122,28) %.

Установлено, что при цервикальных интраэпителиальных поражениях и хроническом цервиците в биоптатах наблюдается увеличение экспрессии гена MMP-2. При этом количественное выражение полученных данных свидетельствует о том, что наиболее высокие значения уровней нормализованной экспрессии наблюдаются у пациентов первой группы. Данный факт подтверждает имеющиеся данные о роли данной матриксной металлопротеиназы в процессе тканевой деструкции. Использование непараметрического критерия Манна-Уитни позволило выявить наличие статистически значимых различий по показателю «уровень нормализованной экспрессии гена MMP-2» между группами 1–2 ($Z=-7,580$, $p < 0,001$), 1–3 ($Z=-6,286$, $p < 0,001$). Для групп 2–3 ($Z=-1,002$, $p=0,316$) статистически значимых достоверных различий выявлено не было.

В ходе проведенных исследований определены уровни нормализованной экспрессии гена MMP-9 в биологическом материале пациентов: для группы 1 Me (Q25/75) составила 314,10

(196,21/343,26) %, для группы 2 – 65,26 (33,43/79,87) %, для группы 3 – 39,58 (16,97/66,30) %. Ген MMP-9 принимает участие в процессах воспаления, ремоделирования тканей и репарации. При этом экспрессия гена данной металлопротеиназы индуцируется провоспалительными цитокинами. Таким образом, максимальные уровни нормализованной экспрессии гена MMP-9 выявлены в ткани шейки матки пациентов с цервикальными интраэпителиальными поражениями. Увеличение экспрессии данной металлопротеиназы способствует разрушению клеточного матрикса и приводит к структурным изменениям в ткани. Использование непараметрического критерия Манна-Уитни позволило выявить наличие статистически значимых различий по показателю «уровень нормализованной экспрессии гена MMP-9» между группами 1–2 ($Z=-5,857$, $p < 0,001$), 1–3 ($Z=-6,036$, $p < 0,001$), тогда как для групп 2–3 ($Z=-1,915$, $p=0,055$) статистически значимых достоверных различий выявлено не было.

Уровни нормализованной экспрессии гена COL2A1 в биологическом материале пациентов составили: для группы 1 – Me (Q25/75) 103,94 (92,34/112,78) %, для группы 2 – 50,06 (38,64/69,02) %, группы 3 – 7,79 (5,26/13,68) %. Увеличение экспрессии гена COL2A1 в ткани шейки матки у пациентов с цервикальными интраэпителиальными поражениями и хроническим цервицитом следует рассматривать как маркер тканевой деструкции. Максимальные уровни нормализованной экспрессии указанного гена наблюдались в первой группе пациентов. В контрольной группе были получены наименьшие значения уровней нормализованной экспрессии исследуемого гена, что является косвенным подтверждающим признаком отсутствия деградации ткани. Использование непараметрического критерия Манна-Уитни позволило выявить наличие статистически значимых различий по показателю «уровень нормализованной экспрессии гена COL2A1» между всеми исследуемыми группами: 1–2 ($Z=-6,286$, $p < 0,001$), 1–3 ($Z=-7,758$, $p < 0,001$), 2–3 ($Z=-6,805$, $p < 0,001$).

Уровни нормализованной экспрессии гена COL6A1 в биологическом материале пациентов составили: для группы 1 – Me (Q25/75) 3,07 (2,31/3,86) %, для группы 2 – 8,43 (4,20/16,11) %, для группы 3 – 29,28 (20,49/39,08) %. Уровень нормализованной экспрессии гена COL6A1, который является молекулярно-генетическим маркером сохранения ткани, коррелирует с распространенностью процесса и степенью вовлеченности в патологический процесс ткани. Кроме того, низкие уровни экспрессии гена COL6A1 могут рассматриваться как следствие деградации данного коллагена при увеличении экспрессии MMP-2 и MMP-9.

Использование непараметрического критерия Манна-Уитни позволило выявить наличие статистически значимых различий по показателю «уровень нормализованной экспрессии гена COL6A1» между группами 1–2 ($Z=-7,138, p<0,001$), 1–3 ($Z=-6,286, p<0,001$), 2–3 ($Z=-5,362, p<0,001$).

Уровни нормализованной экспрессии гена IL-1 β -1 в биологическом материале пациентов составили: для группы 1 – Me (Q25/75) 93,15 (71,34/120,54) %, для группы 2 – 48,34 (35,12/66,78) %, группы 3 – 17,99 (10,26/23,68) %. Использование непараметрического критерия Манна-Уитни позволило выявить наличие статистически значимых различий по показателю «уровень нормализованной экспрессии гена IL-1 β -1» между группами 1–2 ($Z=-5,279, p<0,001$), 1–3 ($Z=-5,134, p<0,001$), 2–3 ($Z=-6,154, p<0,001$), различия между которыми были статистически достоверны. Уровни нормализованной экспрессии гена IL-1 β -2 в биологическом материале пациентов составили: для группы 1 – Me (Q25/75) 75,26 (43,43/89,87) %, для группы 2 – 49,58 (26,97/61,30) %, для группы 3 – 25,90 (14,57/39,06) %. Использование непараметрического критерия Манна-Уитни позволило выявить наличие статистически значимых различий по показателю «уровень нормализованной экспрессии гена IL-1 β -2» между группами 1–2 ($Z=-6,678, p<0,001$), тогда как для групп 1–3 ($Z=-2,764, p=0,052$), 2–3 ($Z=-1,162, p=0,074$) таких различий выявлено не было.

Заключение. Ранняя диагностика является критическим вопросом в гинекологии. Профили экспрессии генов в начальной стадии заболевания позволяют получить важную информацию о пусковых механизмах патологического процесса для разработки метода его своевременной коррекции на доклиническом уровне.

Чувствительность ПЦР-анализа при установленных оптимальных параметрах реакции зависит от процедуры пробоподготовки исследуемого биологического материала, включающей экстракцию нуклеиновых кислот, которая позволяет проводить ПЦР исследования не только в классическом биологическом материале, которым при заболеваниях урогенитального тракта являются соскобы эпителиальных клеток из цервикального канала, но также выполнять молекулярно-биологический анализ в биоптатах шейки матки. Благодаря этому происходит не только концентрирование исследуемой ДНК-матрицы, но и профилактика попадания веществ, содержащихся в отделяемом половых органов, которые имеют свойства ингибиторов ПЦР. При этом определенная специфика ингибиторов характерна для конкретных разновидностей биологического материала. Наибольшее снижение

диагностической эффективности ПЦР происходит на этапах, связанных с эффективностью лизиса клинического материала и экстракцией ДНК/РНК, с деградацией ДНК/РНК-матрицы. Низкая эффективность ПЦР может определяться образованием сложных комплексов ДНК-белок.

Для всех изучаемых нами генов были выбраны по паре праймеров с целью найти оптимальные последовательности для достижения наилучшего результата при проведении молекулярно-генетического анализа. Дизайн олигонуклеотидов, осуществленный поэтапно для каждого гена, контролирующего синтез IL-1 β , COL, MMP и последовательно для каждого выбранного гомологичного участка (с использованием бесплатного программного онлайн приложения Primer3 v. 0.4.0 и бесплатного онлайн алгоритма mfold/DNAfold) позволил оценить вероятность образования вторичных шпильчатых структур ампликона, а также вероятность стерических препятствий для связывания олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов и выбрать наиболее оптимальные варианты: олигонуклеотидный праймер-флуоресцентно-меченый зонд- олигонуклеотидный праймер. Проведено моделирование совместности внутреннего контроля и олигонуклеотидных праймеров и зондов для амплификации участков генов IL-1 β , COL, MMP в условиях мультиплексной ПЦР (две реакции в одной пробирке). В ходе проведенных исследований оптимизированы состав амплификационной смеси и условия термоденатурации для амплификации участков генов IL-1 β , COL, MMP в условиях мультиплексной ПЦР.

На основании проведенных молекулярно-генетических исследований по определению уровней нормализованной экспрессии функциональных и структурных генов в биоптатах шейки матки пациентов с цервикальными интраэпителиальными поражениями низкой степени и хроническим цервицитом, установлены следующие молекулярно-генетические характеристики: уровни экспрессии IL-1 β -1, IL-1 β -2, COL2A1, COL6A1, MMP-2, MMP-9. Установленный молекулярно-генетический профиль ткани шейки матки, характерный для цервикальных интраэпителиальных поражений и хронического цервицита, свидетельствует о наличии у данных пациентов активных механизмов разрушения тканевых элементов, приводящих к структурным изменениям в матриксе.

На сегодняшний день актуальным является поиск факторов, приводящих к более тяжелому течению заболевания. Генетические факторы, обуславливающие биологический механизм, с помощью которого у некоторых индивидуумов под воздействием инфекционного фактора проявляется более выраженный иммуновоспалительный ответ, со-

проводящийся тяжелыми воспалительными и деструктивными процессами на клеточном уровне, представляют научный и практический интерес в прогнозировании течения цервикальных поражений. Полученные данные молекулярно-гене-

тических исследований будут использованы для выполнения многофакторного статистического анализа для установления возможных взаимосвязей с анамнестическими, клиническими и инструментальными данными.

Список использованных источников

1. Kashyap, N. Risk Factors of Cervical Cancer: A Case-Control Study / N. Kashyap [et al.] // *Asia-Pacific Journal of Oncology Nursing*. – 2019. – Vol. 6, № 3. – P. 308–314.
2. Perkins, R. B. 2019 ASCCP Risk-Based Management Consensus Guidelines for Abnormal Cervical Cancer Screening Tests and Cancer Precursors / R. B. Perkins [et al.] // *J. Low Genit. Tract. Dis.* – 2020. – Vol. 24, № 2. – P. 102–131.
3. Ortiz-de la Tabla, V. Cervicitis: etiología, diagnóstico y tratamiento / V. Ortiz-de la Tabla, F. Gutiérrez // *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* – 2019. – Vol. 37, № 10. – P. 661–667.
4. Pendharkar, S. Lactobacilli and Their Probiotic Effects in the Vagina of Reproductive Age Women / S. Pendharkar [et al.] // *Microorganisms*. – 2023. – Vol. 11, № 3. – P. 636.
5. Marrazzo, J. M. Risk factors for mucopurulent cervicitis among women with bacterial vaginosis / J. M. Marrazzo [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2006. – Vol. 193. – P. 617–624.
6. Gorgos, L. M. Relationship of specific bacteria in the cervical and vaginal microbiotas with cervicitis / L. M. Gorgo [et al.] // *Sex. Transm. Dis.* – 2015. – Vol. 42. – P. 475–481.
7. Костюк, С. А. Предиктивная медицина и методы генетического тестирования / С. А. Костюк // *Медицинские новости*. – 2016. – Т. 4. – С. 11–14.
8. Костюк, С. А. Валидация молекулярно-биологических методов лабораторной диагностики / С. А. Костюк // *Медицинские новости*. – 2012. – Т. 4. – С. 16–19.
9. Бадыгина, Н. А. Организация системы контроля качества исследований методом полимеразной цепной реакции / Н. А. Бадыгина [и др.] // *Лабораторная диагностика. Восточная Европа*. – 2012. – № 1. – С. 28–38.
10. Graves, D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction / D. Graves, D. Cochran // *J. Periodontol.* – 2003. – Vol. 74, № 3. – P. 391–401.
11. Hengartner, N-E. IL-1 β inhibits human osteoblast migration / N-E. Hengartner [et al.] // *Mol. Med.* – 2013. – Vol. 19, № 1. – P. 36–42.
12. Клименко, Н. А. Продукция интерлейкинов 1 β , 2 и 10 при хронических воспалительных заболеваниях с различной локализацией патологического процесса / Н. А. Клименко, М. А. Шелест, Т. В. Горбач // *121 Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»*. – 2014. № 1. – С. 75–80.
13. Каргышева, Е. В. Особенности клинико-лабораторных показателей и гендерные отличия хронического генерализованного пародонтита у пациентов с метаболическим синдромом : дис. ... канд. мед. наук : 14.01.14 / Е. В. Каргышева. – Москва, 2018. – 152 л.
14. Саранчина, Ю. В. Оценка функционального состояния некоторых показателей иммунного ответа в патогенезе *Helicobacter pylori*-ассоциированного хронического гастрита : дис. ... канд. биол. наук : 14.03.03 / Ю. В. Саранчина. – Абакан, 2015. – 159 л.
15. Xue, M. Differential Regulation of Matrix Metalloproteinase 2 and Matrix Metalloproteinase 9 by Activated Protein C Relevance to Inflammation in Rheumatoid Arthritis / M. Xue [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2007. – Vol. 56, № 9. – P. 2864–2874.
16. Egeblad, M. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression / M. Egeblad, Z. Werb // *Nat. Rev. Cancer.* – 2002. – Vol. 2, № 3. – P. 161–174.

17. Kim, W-U. Elevated matrix metalloproteinase-9 in patients with systemic Sclerosis / W-U. Kim [et al.] // *Arthritis Res. Ther.* – 2005. – Vol. 7, № 1. – P. 71–79.
18. Huang, R. Opposing TNF- α /IL-1 β - and BMP-2-activated MAPK signaling pathways converge on Runx2 to regulate BMP-2-induced osteoblastic differentiation / R. Huang [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2014. – Vol. 5, № 4. – P. 1187.
19. Полюян, О. С. Усовершенствование метода определения уровней нормализованной экспрессии генов белков теплового шока *Chlamydia trachomatis* для оценки риска диссеминации возбудителя из урогенитального тракта / О. С. Полюян // *Лабораторная диагностика. Восточная Европа*. – 2017. – № 3. – С. 333–342.

References

1. Kashyap N, Krishnan N, Kaur S, Ghai S. Risk Factors of Cervical Cancer: A Case-Control Study. *Asia-Pacific Journal of Oncology Nursing*. 2019;6(3):308-314. doi:10.4103/apjon.apjon_73_18.
2. Perkins RB, Guido RS, Castle PE, Chelmow D, Einstein MH, Garcia F, Huh WK, Kim JJ, Moscicki AB, Nayar R, Saraiya M, Sawaya GF, Wentzensen N, Schiffman M. 2019 ASCCP Risk-Based Management Consensus Guidelines for Abnormal Cervical Cancer Screening Tests and Cancer Precursors. *J. Low Genit. Tract. Dis.* 2020;24(2):102-131. doi: 10.1097/LGT.0000000000000525.
3. Ortiz-de la Tabla V, Gutiérrez F. Cervicitis: etiología, diagnóstico y tratamiento. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2019;37(10):661-667. doi:10.1016/j.eimc.2018.12.004.
4. Pendharkar S, Skafte-Holm A, Simsek G, Haahr T. Lactobacilli and Their Probiotic Effects in the Vagina of Reproductive Age Women. *Microorganisms*. 2023 Mar 1;11(3):636. doi: 10.3390/microorganisms11030636.
5. Marrazzo JM, Wiesenfeld HC, Murray PJ, Busse B, Meyn L, Krohn M, Hillier SL. Risk factors for mucopurulent cervicitis among women with bacterial vaginosis. *J. Infect. Dis.* 2006;193:617-624. doi: 10.1086/500149.
6. Gorgos LM, Sycuro LK, Srinivasan S, Fiedler TL, Morgan MT, Balkus JE, McClelland RS, Fredricks DN, Marrazzo JM. Relationship of specific bacteria in the cervical and vaginal microbiotas with cervicitis. *Sex. Transm. Dis.* 2015;42:475-481. doi: 10.1097/OLQ.0000000000000318.
7. Kostjuk SA. Prediktivnaja medicina i metody geneticheskogo testirovanija. *Medicinskie novosti*. 2016;4:11-14 (in Russian).
8. Kostjuk SA. Validacija molekularno-biologicheskikh metodov laboratornoj diagnostiki. *Medicinskie novosti*. 2012;4:16-19 (in Russian).
9. Badygina NA, Kostjuk SA, Rudenkova TV, Polujan OS. Organizacija sistemy kontrolja kachestva issledovanij metodom polimeraznoj cepnoj reakcii. *Laboratornaja diagnostika. Vostochnaja Evropa*. [Laboratory Diagnostics. Eastern Europe]. 2012;1:28-38 (in Russian).
10. Graves D, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J. Periodontol.* 2003;74(3):391-401. doi:10.1902/jop.2003.74.3.391.
11. Hengartner NE, Fiedler J, Ignatius A, Brenner RE. IL-1 β inhibits human osteoblast migration. *Mol. Med.* 2013;19(1):36-42. doi: 10.2119/molmed.2012.00058.
12. Klivenko NA, Shelest MA, Gorbach TV. Produkcija interlejkinov 1 β , 2 i 10 pri hronicheskikh vospalitel'nyh

- zabolevanijah s razlichnoj lokalizaciej patologicheskogo processa. Chelovek i yego zdorov'ye. 2014;1:75-80 (in Russian).
13. Kartysheva EV. (2018) Osobennosti kliniko-laboratornyh pokazatelej i gendernye otlichija hronicheskogo generalizovannogo parodontita u pacientov s metabolicheskim sindromom (dissertacija na kandidata medicinskih nauk), Moskva, 152 str. (in Russian).
 14. Saranchina YuV. (2015) Ocenka funkcional'nogo sostojanija nekotoryh pokazatelej immunnogo otveta v patogeneze Helicobacter pylori-associirovannogo hronicheskogo gastrita (dissertacija na kandidata biologicheskikh nauk), Abakan, 159 str. (in Russian).
 15. Xue M, March L, Sambrook PN, Jackson CJ. Differential Regulation of Matrix Metalloproteinase 2 and Matrix Metalloproteinase 9 by Activated Protein C Relevance to Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007;56(9):2864-2874. doi: 10.1002/art.22844.
 16. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer.* 2002;2(3):161-174. doi: 10.1038/nrc745.
 17. Kim W-U, Min S-Y, Cho M-L, Hong K-H, Shin Y-J, Park S-H, Cho C-S. Elevated matrix metalloproteinase-9 in patients with systemic Sclerosis. *Arthritis Res. Ther.* 2005;7(1):71-79. doi: 10.1186/ar1454.
 18. Huang R, Yuan Y, Tu J, Zou G-M, Li Q. Opposing TNF- α /IL-1 β - and BMP-2-activated MAPK signaling pathways converge on Runx2 to regulate BMP-2-induced osteoblastic differentiation. *Cell Death Dis.* 2014;5(4):1187. doi: 10.1038/cddis.2014.101.
 19. Polujan OS. Uovershenstvovanie metoda opredelenija urovnej normalizovannoj jekspressii genov belkov teplovogo shoka Chlamydia trachomatis dlja ocenki riska disseminacii vozbuditelja iz urogenital'nogo trakt. *Laboratornaja diagnostika. Vostochnaja Evropa.* [Laboratory Diagnostics. Eastern Europe]. 2017;3:333-342 (in Russian).

LEVELS OF NORMALIZED EXPRESSION OF GENETIC DETERMINANTS IL-1B, COL, MMP IN PATIENTS WITH CERVICAL INTRAEPITHELIAL LESIONS AS MARKERS OF TISSUE DESTRUCTURE

*S. A. Kostiuk, L. F. Mozheiko, T. V. Pinchuk, O. S. Poluyan
Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

Background. The risk of developing precancer and cervical cancer can be estimated using current screening test results in combination with past screening test and biopsy results. From a scientific point of view, it is of interest to evaluate the relationship between the degree of cervical inflammation, cellular destruction and the presence of squamous intraepithelial lesions. One of the promising directions in the search for markers of predisposition and prognosis of the disease is the identification of genetic factors.

Objective. To determine the levels of normalized expression of functional (extracellular matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and metalloproteinase 9 (MMP-9) genes) and structural (genes of collagen 2 (Col-2) and collagen 6 (Col-6) matrix components) genes and gene IL-1 β in cervical biopsies from patients with low-grade cervical intraepithelial lesions and chronic cervicitis caused by bacteria associated with bacterial vaginosis.

Materials and methods. The study included 24 patients with low-grade cervical intraepithelial lesions (group 1), 24 patients with chronic cervicitis caused by bacteria associated with bacterial vaginosis (group 2), 20 patients of the control group (group 3), in biological material (cervical biopsy) of which molecular biological studies were carried out to determine the levels of normalized expression of genes that control the synthesis of cytokines, collagen, and metalloproteinases.

Results. The normalized expression levels of MMP-2, MMP-9, COL2A1, COL6A1, IL-1 β -1 and IL-1 β -2 genes for group 1 were Me (Q25/75) 329.16 (253.25/414.33) %, 314.10 (196.21/343.26) %, 103.94 (92.34/112.78) %, 3.07 (2.31/3.86) %, 93.15 (71.34 /120.54) % and 75.26 (43.43/89.87) %, respectively; for group 2 – 109.85 (61.52/134.08) %, 65.26 (33.43/79.87) %, 50.06 (38.64/69.02) %, 8.43 (4.20/16.11) %, 48.34 (35.12/66.78) % and 49.58 (26.97/61.30) %, respectively; for group 3 – 89.08 (58.24/122.28) %, 39.58 (16.97/66.30) %, 7.79 (5.26/13.68) %, 29.28 (20.49/39.08) %, 17.99 (10.26/23.68) % and 25.90 (14.57/39.06) %, respectively.

Conclusions. Established molecular genetic profile of cervical tissue characteristic of cervical intraepithelial lesions and chronic cervicitis, with more pronounced changes in the levels of normalized expression of genetic determinants MMP-2, MMP-9, COL2A1, COL6A1, IL-1 β -1 and IL-1 β -2 is typical for a group of patients with cervical intraepithelial lesions, which indicates the presence in these patients of active mechanisms of destruction of tissue elements, leading to structural changes in the matrix.

Keywords: cervical intraepithelial lesions, cervix, cervicitis, levels of normalized gene expression, cytokines, collagen, metalloproteinases.

For citation: Kostiuk SA, Mozheiko LF, Pinchuk TV, Poluyan OS. Levels of normalized expression of genetic determinants IL-1 β , Col, MMP in patients with cervical intraepithelial lesions as markers of tissue destructure. *Biochemistry and Molecular Biology.* 2024, vol. 3, no. 1(4). pp. 52–59 (in Russian).

Поступила 09.04.2024

АНАЛИЗ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОФИЛЕЙ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ ДЛЯ ОБОСНОВАНИЯ ВЫБОРА МОДЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗМОВ

А. А. Чиркин¹, О. М. Балаева-Тихомирова¹, Е. И. Кацнельсон¹, Е. М. Дорошенко²

¹*Витебский государственный университет имени П. М. Машерова,
г. Витебск, Республика Беларусь*

²*Гродненский государственный медицинский университет,
г. Гродно, Республика Беларусь*

Введение. Протеиногенные аминокислоты служат для синтеза пептидов и белков, а непротеиногенные участвуют в уникальном клеточном метаболизме различных живых организмов. В связи с этим свободные аминокислоты могут относиться к критериям отбора модельных организмов для биохимических исследований.

Цель исследования – оценить возможность использования спектров свободных аминокислот для обоснования выбора модельных организмов на этапе доклинических исследований.

Материал и методы. Спектры свободных аминокислот определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в тканях и биологических жидкостях организмов.

Результаты. В сыворотке крови крысы содержится в 2,13 раза, а в гемолимфе прудовика в 9,64 раза меньше протеиногенных аминокислот по сравнению с сывороткой крови человека. Содержание свободных протеиногенных аминокислот в гемолимфе куколок шелкопряда превышает суммарное количество таких аминокислот в сыворотке крови человека в 26,5 раза. По сравнению с сывороткой крови человека найдено меньшее содержание непротеиногенных аминокислот в сыворотке крови крысы в 2,64 раза, а в гемолимфе прудовиков в 16,7 раза.

Заключение. Сравнительный анализ спектров незаменимых и заменимых аминокислот позволяет дополнить критерии отбора живых объектов в качестве модельных организмов.

Ключевые слова: протеиногенные аминокислоты, непротеиногенные аминокислоты, крысы, моллюски, дубовый шелкопряд, лекарственные растения.

Для цитирования: Анализ метаболических профилей свободных аминокислот для обоснования выбора модельных организмов / А. А. Чиркин [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. – 2024. – Т. 3, № 1(4). – С. 60–66.

Введение

Сотрудничество биохимиков Гродно и Витебска по исследованию обмена аминокислот возникло в конце XX века в рамках деятельности научной школы профессора Л. И. Нефедова «Биохимия аминокислот и разработка способов их практического применения в качестве универсальных регуляторов метаболизма и лекарственно-профилактических средств» [1, 2]. Исследования аминокислотных спектров тканей растений и животных в первой четверти XXI века осуществлялись на базах лабораторий, руководимых профессором В. М. Шейбаком и доцентом Е. М. Дорошенко. Основным направлением работы был анализ молекулярно-структурной гомологии протеолитических ферментов человека и модельных организмов [4, 5].

Цель статьи – оценить возможность использования спектров свободных аминокислот представителей биоты Белорусского Поозерья для обоснования

их использования в качестве модельных организмов на этапе доклинических исследований и как источников биологически активных соединений.

Хорошо известно, что свободные аминокислоты, образующиеся в результате деградации клеточных или пищевых белков, а также в реакциях промежуточного метаболизма, дезаминируются с образованием NH_4^+ и углеродного скелета. NH_4^+ входит в цикл мочевины, а углеродный скелет может участвовать в метаболических путях для генерации АТФ, глюкозы и жирных кислот. Глутамат действует как донор и акцептор азота и является центральной аминокислотой, обеспечивающей перенос азота между аминокислотами. Тирозин играет роль предшественника норадреналина, адреналина, дофамина и меланина. Метионин предоставляет метильную группу для многих метилтрансфераз, регулирующих эпигенетические процессы. Цистеин, глутамат и глицин образуют ан-

тиоксидант глутатион. Синтазы оксида азота используют аргинин для образования оксида азота (NO). Глицин и глутамат могут служить нейротрансмиттерами. Глутамат также способен генерировать другой аминокислотный нейромедиатор, γ -аминомасляную кислоту (ГАМК), которая не участвует в синтезе белка. Триптофан используется в качестве предшественника для выработки нейромедиатора серотонина, который необходим также для выработки мелатонина [5]. Аминокислоты рассматриваются как структурные элементы белков и пептидов, а также как необходимые факторы нормального роста, дифференцировки и функционирования клеток. Нарушения метаболизма аминокислот связаны с рядом патологических состояний, включая метаболические, сердечно-сосудистые, иммунные заболевания и рак [6].

Катаболизм аминокислот является важным элементом метаболического контроля различных биологических процессов. Механизмы, участвующие в регуляции катаболизма аминокислот, включают вклад кишечной микробиоты в окисление аминокислот и образование метаболитов в кишечнике, молекулярные механизмы транскрипционного контроля и роль специфических микроРНК, участвующих в регуляции распада аминокислот. Кроме того, молекулы, полученные в результате катаболизма аминокислот, играют роль в контроле обмена веществ, поскольку они используются в эпигенетической регуляции многих генов [7]. Все вышеизложенное указывает на целесообразность исследований спектров свободных аминокислот при отборе модельных организмов для биомедицинских исследований.

Материал и методы

Спектр свободных аминокислот определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сыворотке крови человека (20 образцов), сыворотке крови лабораторных белых крыс (9 образцов), бесклеточной гемолимфе легочного пресноводного моллюска прудовика обыкновенного (*Lymnaea stagnalis* L.) – 9 образцов, районированного в Витебской области насекомого китайского дубового шелкопряда (*Antheraea pernyi*) – 9 образцов в периоде диапаузы, а также в экстрактах наземных частях растений эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea*) и родиолы розовой (*Rhodiola rosea*) – по 8 образцов [8–10].

Навески тканей гомогенизировали в соотношении 1:10 (масса/объем) в среде, содержащей 0,2 М раствор хлорной кислоты, 40 мг/л ЭДТА, 40 мг/л $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, а также 0,2 мМ норвалина (внутренний стандарт). Определение свободных аминокислот и их дериватов проводили в полученных экстрактах методом обращеннофазной хроматографии с пред-

колоночной дериватизацией *o*-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой и детектированием по флуоресценции (338/445 нм). В работе использовали сорбент Zorbax Eclipse PlusC₁₈ с размером частиц 3,5 мкм, размеры колонки 2,1×150 мм, с предколонкой 2,1×12,5 мм, заполненной таким же сорбентом с размером частиц 5 мкм. При всех определениях использовался прибор ВЭЖХ Agilent 1200. Прием данных и обработка хроматограмм проводились с помощью программы Agilent Open Lab CDSC.01.05 с ручной коррекцией базовой линии, в режиме расчета по внутреннему стандарту с использованием одноуровневой калибровки [9].

Работа выполнена в соответствии с принципами экспериментальной биоэтики.

Статистическую обработку цифрового материала проводили с использованием методов параметрической и непараметрической статистики. В таблицах приведены результаты в виде $M \pm m$ (среднее \pm средняя ошибка), поскольку сравниваемые вариационные ряды значений не выходили за пределы нормального распределения.

В статье используются следующие сокращенные наименования аминокислот: CA – цистеиновая кислота, PSer – O-фосфосерин, CSA – цистеинсульфиновая кислота, Asp – аспарагиновая кислота, GSH – глутатион, HCA – гомоцистеиновая кислота, Glu – глутаминовая кислота, Asn – аспарагин, Ser – серин, aAAA – альфа-аминоадипиновая кислота, Gln – глутамин, His – гистидин, 3MHis – 3-метилгистидин, Gly – глицин, PEA – фосфотаноламин, Thr – треонин, 1MHis – 1-метилгистидин, Ctr – цитруллин, Arg – аргинин, Ans – ансерин, bAla – бета-аланин, Car – карнозин, HpTau – гипотаурин, Ala – аланин, Tau – таурин, bABA – бета-аминоизомасляная кислота, GABA – гама-аминомасляная кислота, Tyr – тирозин, aABA – альфа-аминомасляная кислота, EA – этаноламин, Val – валин, Met – метионин, Ctn – цистатионин, Trp – триптофан, Phe – фенилаланин, Ile – изолейцин, Leu – лейцин, HLys – гидроксизин, Orn – орнитин, Lys – лизин.

Результаты и их обсуждение

В таблице 1 представлены данные о содержании свободных протеиногенных аминокислот в биологических жидкостях исследуемых животных и экстрактах растений. Установлено, что в сыворотке крови крысы содержится в 2,13 раза меньше свободных протеиногенных аминокислот (АК) по сравнению с сывороткой человека, а в гемолимфе прудовика обыкновенного таких аминокислот меньше в 9,64 раза по сравнению с гемолимфой крыс. Крысы остаются оптимальным модельным

организмом для оценки механизмов обезвреживания аммиака в организме человека, поскольку содержание глутамин и аланина занимают первые позиции в сыворотке крови, как человека, так и крысы. Эти транспортные формы аммиака выполняют две основные функции. Глутамин является донором амидной группы для биосинтеза пуриновых азотистых оснований, карбамоилфосфата, глюкозамина и др., а также для конечного обезвреживания аммиака в почках в виде аммонийных солей. Аланин транспортирует аммиак в виде аминной группы в печень, где используется для синтеза мочевины, а оставшийся углеродный скелет служит для образования глюкозы в реакции глюконеогенеза. У прудовиков обыкновенных концентрация глутамин находится на 14 позиции, а аланина – на третьей позиции. По всей видимости, это связано с тем, что у этих животных относительно хорошо развит гепатопанкреас, но в меньшей степени система выделения и концентрирования водорастворимых выделяемых веществ. В близких относительных концентрациях у всех трех видов животных находятся глицин, треонин, валин, лейцин, лизин.

Поскольку в гемолимфе прудовиков обыкновенных представлены все определяемые данным методом протеиногенные аминокислоты, можно отнести этих животных к модельным организмам. Для иллюстрации этого положения были оценены важнейшие показатели, используемые при анализе аминокислотных спектров бесклеточных транспортных жидкостей организма. У человека, крысы (сыворотка крови) и у прудовиков (гемолимфа) были получены следующие результаты:

- незаменимые аминокислоты, мкмоль/л – 2418, 727, 90;
- заменимые аминокислоты, мкмоль/л – 2745, 1653, 166;
- отношение заменимые АК/незаменимые АК – 1,14, 2,27, 1,84;

- количество аминокислот с разветвленной углеродной цепью (АРУЦ), мкмоль/л – 681, 252, 26,4;
- количество ароматических АК, мкмоль/л – 484, 172, 7,23;
- индекс Фишера (сумма АРУЦ/тирозин+фенилаланин) – 2,56, 2,32, 6,23;
- отношение аргинин/цитруллин – 3,38, 0,99, 1,79;
- отношение глутамат/глутамин – 0,23, 0,32, 32,0.

Из данных таблицы 1 также следует, что в жидком содержимом куколок дубового шелкопряда (далее гемолимфа) не обнаружены аргинин, триптофан и аспарагин, а в экстрактах растений – гистидин, аргинин, тирозин, триптофан, лизин, аспарагин. В экстрактах родиолы розовой не выявлены метионин и глутамин. Следует, однако, отметить, что для всех вышеуказанных соединений ограничением являлось хроматографическое разрешение от интерферирующих пиков, а не чувствительность, т. е. их концентрации не являлись экстремально низкими, а лишь не поддающимися оценке с приемлемой точностью. Содержание свободных протеиногенных аминокислот в гемолимфе куколок шелкопряда превышает суммарное количество таких аминокислот у человека в 26,5 раза, в экстрактах эхинацеи – в 13,2 раза и в экстрактах родиолы розовой – в 17,7 раза. Завершая обсуждение данных таблицы 1, следует отметить, что у человека, крысы и моллюска последовательно уменьшается количество свободных протеиногенных аминокислот, что коррелирует с содержанием других циркулирующих мономерных молекул, например, глюкозы [8]. В экстрактах растений содержание свободных протеиногенных аминокислот высокое, поскольку быстрое увеличение надземной части требует интенсивного образования структурных и функциональных белков, обеспечивающих рост и иные связанные с белками функции.

Таблица 1 – Содержание свободных протеиногенных аминокислот в сыворотке крови человека и крысы, в гемолимфе прудовика обыкновенного и китайского дубового шелкопряда, в надземных частях эхинацеи пурпурной и родиолы розовой (мкмоль/л)

Table 1 – Content of free proteinogenic amino acids in human and rat blood serum, in the hemolymph of the common pond snail and Chinese oak moth, and in the aerial parts of *Echinacea purpurea* and *Rhodiolarosea* (μmol/l)

Аминокислота	Человек	Крыса	Прудовик	Шелкопряд	Эхинацея	Родиола розовая
	сыворотка	сыворотка	гемолимфа	гемолимфа	экстракты	
Asp	76,76±2,39	14,95±0,88	10,59±2,60	4700±561	15700	16200
Glu	234,7±5,78	140,8±3,02	65,68±22,86	899±81	11200	17200
Ser	143,9±4,55	183,1±5,53	16,88±6,78	13130±1711	2000	5970
His	277,0±7,98	57,9±1,25	0,75±0,12	10260±367	–	–
Gly	261,6±8,00	140,9±12,88	30,31±4,76	17150±907	4430	11700
Thr	300,0±14,67	111,5±7,70	32,40±10,3	10280±272	2200	4220
Arg	130,5±6,99	76,98±3,256	0,638±0,31	–	–	–

Аминокислота	Человек	Крыса	Прудовик	Шелкопряд	Эхинацея	Родиола розовая
	сыворотка	сыворотка	гемолимфа	гемолимфа	экстракты	
Ala	749,9±30,76	634,0±18,69	37,79±12,00	18330±2601	14900	10300
Tyr	145,5±6,96	61,34±6,63	1,043±0,43	2530±230	–	–
Val	364,0±14,75	106,86±2,30	14,22±5,73	8162±193	6850	6440
Met	43,69±2,69	24,13±1,02	1,32±0,67	672±83	100	–
Trp	217,9±8,77	63,04±7,86	2,99±1,19	–	–	–
Phe	120,6±3,56	47,52±0,98	3,20±2,10	1043±70	1810	1370
Ile	108,5±5,38	51,52±1,56	7,46±3,35	4337±145	2350	2760
Leu	208,6±9,65	91,81±3,01	4,74±2,52	4763±133	1800	3550
Lys	647,2±33,91	93,75±23,03	22,63±9,99	8659±586	–	–
Asn	110,0±2,89	42,73±1,55	1,67±0,13	–	–	–
Gln	1023,1±31,86	434,9±12,5	2,05±0,85	19070±1886	3570	–

В таблице 2 представлены данные о содержании непротеиногенных аминокислот в сыворотке крови человека и крысы в сравнении с гемолимфой куколок шелкопряда.

Таблица 2 – Сравнительная характеристика содержания свободных непротеиногенных аминокислот в сыворотке крови человека, крысы и в гемолимфе прудовика обыкновенного (мкмоль/л)

Table 2 – Comparative characteristics of the content of free non-proteinogenic amino acids in the blood serum of humans, rats, and in the hemolymph of the common pond snail (μmol/l)

Соединение	Человек	Крыса	Прудовик
CA	2,51±0,16	0,23±0,03 ¹	0,47±0,25 ¹
PSer	3,14±0,36	0,36±0,06 ¹	0,25±0,07 ¹
CSA	2,01±0,15	0,30±0,04 ¹	0,96±0,35 ¹
GSH	4,36±0,31	1,11±0,05 ¹	0,85±0,19 ¹
HCA	0,38±0,04	0,06±0,01 ¹	0,38±0,14 ²
aAAA	0,65±0,08	0,29±0,02 ¹	0,58±0,25
3MHis	11,10±2,33	3,58±0,13 ¹	0,11±0,06
PEA	9,69±0,77	5,49±0,78	0,21±0,10 ^{1,2}
1MHis	12,40±0,53	1,27±0,06	0,28±0,06 ²
Ctr	38,65±1,92	77,41±2,76 ¹	0,36±0,12 ²
bAla	10,17±1,04	0,89±0,04 ¹	0,56±0,06 ²
HpTau	19,9±1,38	0,77±0,07 ¹	0,19±0,03 ^{1,2}
Tau	196,3±6,13	117,7±6,68 ¹	0,96±0,16 ^{1,2}
bABA	1,29±0,12	0,05±0,004 ¹	0,29±0,09 ^{1,2}
GABA	2,39±0,16	0,99±0,25 ¹	2,15±0,83
aABA	25,11±1,82	4,77±1,03 ¹	1,07±0,36 ^{1,2}
EA	14,74±0,43	8,25±0,37 ¹	3,58±0,55 ^{1,2}
Ctn	2,93±0,38	1,87±0,09 ¹	5,24±1,81
HLys	11,54±0,96	3,17±0,19 ¹	1,18±0,10 ^{1,2}
Orn	317,6±13,06	26,4±1,50 ¹	21,6±9,45 ¹

Примечание: ¹ – $p < 0,05$ при сравнении с данными для человека; ² – $p < 0,05$ при сравнении данных у крысы и прудовика обыкновенного

Note: ¹ – $p < 0.05$ when compared with human data; ² – $p < 0.05$ when comparing data from rats and common pond snails

По сравнению с сывороткой крови человека, в сыворотке крови крысы обнаружено в 2,64 раза, а в гемолимфе прудовиков в 16,7 раза меньшее содержание непротеиногенных аминокислот. Кроме того, в гемолимфе дубового шелкопряда были выявлены непротеиногенные аминокислоты и их производные цитруллин, бета-аланин, таурин, этаноламин и орнитин в количествах 2152±141, 511±29, 976±112, 227±16 и 44±4 мкмоль/л, соот-

ветственно. В экстрактах эхинацеи выявлен этаноламин (890 мкмоль/л), а родиолы розовой – бета-аланин (1110 мкмоль/л).

Обращает на себя внимание близкие значения концентраций 7 непротеиногенных аминокислот у трех видов животных организмов (орнитин, таурин, этаноламин, альфа-аминомасляная кислота, цитруллин, гидроксизин и цистатионин). Орнитин играет важную роль в биосинтезе мочевины и

аргинина. Таурин является антиоксидантом, стабилизатором клеточных мембран, регулирует передачу сигналов ионами кальция и поддерживает объем жидкости в клетках (вносит вклад в осморегуляцию). Этанолламин образуется при декарбоксилации серина. Его превращения связаны либо с синтезом фосфатидилэтаноламина (кефалина), либо с превращением в холин. Альфа-аминомасляная кислота – непотеиногенная аминокислота, продукт транссульфирования гомоцистеина, которая в организме человека участвует в биосинтезе офтальмовой кислоты. Цитруллин служит ключевым промежуточным звеном в цикле мочевины, пути, с помощью которого млекопитающие выделяют аммиак, превращая его в мочевину. Цитруллин также производится как побочный продукт ферментативного производства оксида азота из аминокислоты аргинина, катализируемого

синтазой оксида азота. Гидроксизин – нестандартная аминокислота, входящая в состав белка коллагена и некоторых гликопротеинов. Цистатионин – важное промежуточное вещество в биосинтезе и метаболизме серосодержащих аминокислот. У млекопитающих участвует в биосинтезе цистеина из метионина и серина, у растений и бактерий – в биосинтезе метионина из цистеина и гомо-серина.

Из этого краткого анализа можно сделать вывод о возможности использования крыс и прудовиков в качестве модельных организмов для исследования непотеиногенных эффектов аминокислот.

В таблице 3 представлен сравнительный анализ содержания незаменимых и заменимых аминокислот в печени крыс и гепатопанкреасе представителя легочных пресноводных моллюсков – прудовика обыкновенного.

Таблица 3 – Сравнительная характеристика содержания свободных аминокислот в печени крысы и гепатопанкреасе прудовика обыкновенного

Table 3 – Comparative characteristics of the content of free amino acids in the rat liver and the hepatopancreas of the common pond snail

Аминокислоты	Печень крысы	Гепато-панкреас прудовика	Характер различия	Аминокислоты	Печень крысы	Гепато-панкреас прудовика	Характер различия
Протеиногенные аминокислоты				Непротеиногенные аминокислоты и родственные соединения			
Asp	1025±35	1375±419	1,34 н/д	PSer	11,9±1,20	2,96±0,74	4,02 ↓
Glu	3076±179	11343±2476	3,69 ↑	CSA	7,04±0,78	36,30±4,97	5,15 ↑
Ser	1491±301	4512±1337	3,03 ↑	GSH	13665±814	89,55±13,46	152 ↓
His	903,4±36,1	1610±577	1,78 ↑	HCA	84,42±4,52	2,60±0,56	32,5 ↓
Gly	2317±81,3	14629±1464	6,31 ↑	PEA	957,5±161,2	38,69±6,36	24,7 ↓
Thr	983,5±165,2	8005±517	9,16 ↑	IMHis	2,63±0,70	23,77±9,11	9,04 ↑
Arg	33,78±2,42	1189±607	35,2 ↑	Ctr	78,45±5,27	1229,1±728,2	15,7 ↑
Ala	1707±187	30847±2214	18,1 ↑	Ans	4,09±0,79	138,3±39,01	33,8 ↑
Tyr	268,3±22,7	3949±1442	14,7 ↑	bAla	111,8±13,5	1027,8±337	9,19 ↑
Val	386,2±28,5	10812±869	28,0 ↑	Car	17,86±3,93	28,45±6,27	1,59 н/д
Met	68,75±9,79	1314±200	19,1 ↑	Tau	7712,1±804	264,4±46,3	29,2 ↓
Trp	122,0±5,35	503,6±184	4,13 н/д	bABA	7,69±0,70	524,6±202,7	68,2 ↑
Phe	165,9±14,69	1328±522	6,59 н/д	GABA	26,08±4,91	833,3±384	31,9 ↑
Ile	201,5±16,33	6683±495	33,2 ↑	aABA	29,36±1,35	144,0±37,75	4,90 ↑
Leu	393,5±33,38	65434±2383	166 ↑	EA	73,16±8,28	928,4±277,3	12,7 ↑
Lys	626,6±48,17	2888±813	4,61 ↑	Ctn	10,02±1,96	82,06±17,11	8,19 ↑
Asn	139,0±8,94	30,75±6,73	4,52 ↓	HLys	37,73±8,63	98,07±31,31	2,60 ↑
Gln	5824±196	558,7±310	10,4 ↓	Orn	460,7±28,24	3600,3±724,9	7,81 ↑

Примечание: н/д – нет статистически достоверных отличий; в графе «характер отличий» цифра означает во сколько раз отличается концентрация аминокислоты в гепатопанкреасе моллюска от таковой в печени крысы, стрелками показана направленность изменений концентраций аминокислот в гепатопанкреасе по сравнению с печенью

Note: n/d – no statistically significant differences; in the “character of differences” column, the number means how many times does the amino acid concentration in the hepatopancreas of a mollusk differ from that in rat liver; the arrows indicate the direction of changes in the concentration of amino acids in the hepatopancreas compared to the liver

Из данных таблицы 3 следует, что среди протеиногенных аминокислот содержание аспарагиновой кислоты, триптофана и фенилаланина в сравниваемых органах было сходным. В гепатопанкре-

асе моллюсков концентрация 13 протеиногенных аминокислот оказалась выше и только двух аминокислот (глутамин и аспарагин) ниже, чем в печени крыс. Из 18 непотеиногенных аминокислот и

родственных соединений в гепатопанкреасе моллюсков концентрация карнозина статистически не отличалась от его концентрации в печени крыс, содержание 12 аминокислот было выше, и 5 аминокислот – ниже по сравнению с их содержанием в печени крыс. Поскольку в печени крыс и гепатопанкреасе прудовиков обычных выявлены качественно одинаковые наборы протеиногенных и непротеиногенных аминокислот, этих животных можно рассматривать как модельных организмов для изучения обмена аминокислот на этапе доклинических исследований. Количественные изменения спектра аминокислот, связанные с увеличением их содержания в гепатопанкреасе более примитивных животных, открывают возможности исследования синтеза пептидов и белков в условиях избытка эндогенных предшественников – свободных аминокислот. Наличие как типичных протеиногенных аминокислот высших млекопитающих, так и аминокислот непротеиногенного типа и их производных, к кото-

рым относятся 1-метилгистидин, 3-метилгистидин, цитруллин, ансерин, карнозин, орнитин и другие, позволяет рассматривать легочных пресноводных моллюсков, выращенных в виде аква-культуры, как потенциальных источников биологически активных компонентов питания, наподобие препаратов, типа «Моллюскам», полученных из тканей морских гидробионтов [11].

Заключение

На основании сравнительного анализа спектров незаменимых и заменимых, а также непротеиногенных аминокислот и их производных, группы модельных организмов можно дополнить прудовиком обыкновенным и китайским дубовым шелкопрядом.

Исследование выполнено в рамках НИР «Оценка состояния водных экосистем Белорусского Поозерья в условиях изменения климата и техногенного воздействия» (№ ГР 20210475, 2021–2025).

Список использованных источников

1. Нефедов, Л. И. Аминокислоты и их производные в патогенезе и лечении поражений печени / Л. И. Нефёдов, Н. Д. Маслакова, В. М. Цыркунов, А. А. Чиркин [и др.] // *Вестні АН Беларусі. Сер. хім. навук*, 1997, № 2. – С. 39–48.
2. Чиркин, А. А. Влияние способа экстрагирования на спектр аминокислот сухого экстракта травы солянки холмовой / А. А. Чиркин, Е. О. Данченко, Е. М. Дорошенко [и др.] // *Вестник фармации*. – 2000. – № 3–4. – С. 25–29.
3. Чиркин, А. А. Отбор модельных организмов для биомедицинских исследований посредством изучения молекулярно-структурной гомологии протеолитических ферментов / А. А. Чиркин, О. М. Балаева-Тихомирова, И. О. Семенов [и др.] // *Новости медико-биологических наук*. – 2022. – Т. 22, № 3. – С. 214–218.
4. Молекулярно-структурная гомология протеолитических ферментов: монография / А. А. Чиркин, О. М. Балаева-Тихомирова. – Чебоксары: Издательский дом «Среда», 2022 – 124 с.
5. Chandel, N. S. Amino acid metabolism / N. S. Chandel // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. – 2021. – Vol. 13(4). – Article 040584. doi: 10.1101/cshperspect.a040584.
6. Ling, Z. N. Amino acid metabolism in health and disease / Z. N. Ling [et al.] // *Sig Transduct Target Ther*. – 2023. – Vol. 8. – Article 345. doi: 10.1038/s41392-023-01569-3.
7. Torres, N. Amino Acid Catabolism: An Overlooked Area of Metabolism / N. Torres [et al.] // *Nutrients*. – 2023. – Vol. 15. – Article 3378. doi: 10.3390/nu15153378.
8. Биологическая активность продуктов гистоллиза: теория и практика / А. Чиркин, Е. Коваленко, Т. Толкачева. – Saarbrücken: LAMBERT Academic Publishing, 2012. – 154 с.
9. Дорошенко, Е. М. Исследование спектра свободных аминокислот сыворотки крови и печени методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / Е. М. Дорошенко, О. М. Балаева-Тихомирова // *Вестник ВДУ*. – 2023. – № 4 (121). – С. 48–54.
10. Шейбак, В. М. Свободные аминокислоты печени после внутрижелудочного введения животным инфезола 40 /

В. М. Шейбак [и др.] // *Hepatology and Gastroenterology*. – 2017. – № 2. – С. 158–163.

11. Давидович, В. В. Аминокислоты двухстворчатых моллюсков: биологическая роль и применение в качестве БАД / В. В. Давидович, Т. Н. Пивненко // *Известия ТИИРО*. – 2001. – Том 129. – С. 146–153.

References

1. Nefedov LI, Maslakova ND, Tsyrcunov VM, Chirkin AA [i dr.]. Aminokisloty i ikh proizvodnyye v patogeneze i porazhenii pecheni. *Vestny AN Belarusi. Ser. khim. Nauk*. 1997;2:39-48.
2. Chirkin AA, Danchenko EO, Doroshenko EM [i dr.]. Issledovaniye vykhoda ekstragirovaniya po spektru aminokislot sukhogo ekstrakta travy solyanki kholmovoy. *Vestnik farmatsii*. 2000;3-4:25-29.
3. Chirkin AA, Balaeva-Tikhomirova OM, Semenov IO [i dr.]. Otbor odel'nykh organizmov dlya biomeditsinskikh issledovaniy putem izucheniya molekulyarno-strukturnoy gomologii proteoliticheskikh fermentov. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk*. 2022; 22(3): 214-218.
4. Chirkin AA, Balaeva-Tikhomirova OM. Molekulyarno-strukturnaya gomologiya proteoliticheskikh fermentov: monografiya. *Cheboksary: Izdatel'skiy dom «Sreda»*. 2022: 124 s.
5. Chandel NS. Amino acid metabolism. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2021;13(4): 040584. doi: 10.1101/cshperspect.a040584.
6. Ling ZN, Jiang YF, Ru JN, Lu JH, Ding B, Wu J. Amino acid metabolism in health and disease. *Signal Transduct Target Ther*. 2023 Sep 13;8(1):345. doi: 10.1038/s41392-023-01569-3.
7. Torres N, Tobón-Cornejo S, Velazquez-Villegas LA, Noriega LG, Alemán-Escondrillas G, Tovar AR. Amino Acid Catabolism: an overlooked area of metabolism. *Nutrients*. 2023 Jul 29;15(15):3378. doi: 10.3390/nu15153378.
8. Chirkin A, Kovalenko E, Tolkacheva T. Biologicheskaya aktivnost' produktov gistoliza: teoriya i praktika. *Saarbrücken: Akademicheskoye izdatel'stvo LAMBERT*. 2012;154 s.
9. Doroshenko EM, Balaeva-Tikhomirova OM. Issledovaniye vozdeystviya aminokislot syvorotki krovi i pecheni metodom vysokoeffektivnoy zhidkostnoy khromatografii. *Vesnik VDU*. 2023;4(121):48-54.

10. Sheybak VM [i dr.]. Svobodnyye aminokisloty pecheni posle vnutrizheludochnogo vvedeniya zhivotnomu infezola 40. *Gepatologiya i gastroenterologiya*. 2017;2:158-163.
11. Davidovich VV, Pivnenko TN. Aminokisloty dvukhstvorchatykh mollyuskov: biologicheskaya rol' i primeneniye v kachestve. *Izvestiya TINRO*. 2001;129:146-153.

ANALYSIS OF METABOLIC PROFILES OF FREE AMINO ACIDS FOR JUSTIFICATION FOR CHOICE OF MODEL ORGANISMS

A. A. Chirkin¹, O. M. Balaeva-Tikhomirova¹, E. I. Katsnelson¹, E. M. Doroshenko²

¹Vitebsk State P.M.Masherov University, Vitebsk, Republic of Belarus

²Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

Background. Proteinogenic amino acids serve for the synthesis of specific peptides and proteins, while non-proteinogenic amino acids participate in the unique cellular metabolism of various living organisms. In this regard, free amino acids may be considered criteria for the selection of model organisms for biochemical studies.

Objective. The purpose of the study is to evaluate the possibility of using the spectra of free amino acids to substantiate model organisms at the stage of preclinical studies.

Materials and methods. The spectra of free amino acids were determined by high-performance liquid chromatography in the tissues of organisms and in biological fluids.

Results. Rat blood serum contains 2.13 times, and pond snail hemolymph— 9.64 times less proteinogenic amino acids compared to human blood serum. The content of free proteinogenic amino acids in the hemolymph of silkworm pupae exceeds the total amount of such amino acids in human blood serum 26.5 times. Compared to human blood serum, the content of non-proteinogenic amino acids was found to be 2.64 times lower in rat blood serum, and 16.7 times lower in the hemolymph of pond snails.

Conclusions. Comparative analysis of the spectra of essential and non-essential amino acids allows us to supplement the criteria for selecting living objects as model organisms.

Keywords: proteinogenic amino acids, non-proteinogenic amino acids, rats, common pond snail, oak silkworm, medicinal plants.

For citation: Chirkin AA, Balaeva-Tikhomirova OM, Katsnelson EI, Doroshenko EM. Analysis of metabolic profiles of free amino acids for justification for choice of model organisms. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2024, vol. 3, no. 1(4). pp. 60–66 (in Russian).

Поступила 09.04.2024

РОЛЬ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В РАЗВИТИИ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

Г. Н. Семенкова¹, И. Э. Адзерихо¹, Т. Э. Владимирская¹, Н. В. Амаэзбери²,
А. М. Устемчук¹, А. В. Жилкевич¹, А. В. Богданова,³ Т. А. Кулагова³

¹Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск, Республика Беларусь

²Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

³НИИ ядерных проблем Белорусского государственного университета,
г. Минск, Республика Беларусь

Введение. Легочная артериальная гипертензия (ЛАГ) – терминальное заболевание, характеризующееся тяжелым ремоделированием легочных сосудов, приводящим к повышению сосудистого сопротивления и артериального давления в легочной артерии, а в конечном итоге к правожелудочковой сердечной недостаточности и смерти. Развитие ЛАГ сопровождается воспалением, одной из причин которого может быть индуцирование оксидативного стресса активированными нейтрофилами.

Цель исследования: установить роль оксидативного стресса в развитии воспаления в динамике экспериментальной ЛАГ.

Материалы и методы. ЛАГ индуцировали монокроталином (МКТ) у белых беспородные крыс-самцов в течение 8 недель.

Результаты. По результатам анализа ИЛ-1, ИЛ-6 и ИЛ-10 в ткани и крови крыс с ЛАГ через 4 нед. после индуцирования патологии регистрируется острая фаза воспаления; с 4 по 8 нед. – цитокиновый профиль изменяется в сторону уменьшения про- и увеличения противовоспалительных цитокинов. На более поздних стадиях ЛАГ наблюдается активация нейтрофилов, что выражается в усилении процессов секреторной дегрануляции, повышенной секрецией миелопероксидазы во внеклеточную среду и продукцией НОС1. При прогрессировании ЛАГ у животных происходит стимуляция нейтрофилов к формированию нейтрофильных внеклеточных ловушек.

Заключение. Активированные нейтрофилы вносят существенный вклад в развитие воспаления в МКТ-индуцированной ЛАГ.

Ключевые слова: Легочная артериальная гипертензия, цитокины, воспаление, нейтрофилы, оксидативный стресс, миелопероксидаза, нейтрофильные внеклеточные ловушки

Для цитирования: Роль оксидативного стресса в развитии воспаления при легочной артериальной гипертензии / Г. Н. Семенкова [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. – 2024. – Т. 3, № 1(4). – С. 67–73.

Введение

Легочная артериальная гипертензия (ЛАГ) относится к терминальным заболеваниям, характеризующимся тяжелым ремоделированием легочных сосудов, приводящим к повышению сосудистого сопротивления и артериального давления в легочной артерии, а в конечном итоге к правожелудочковой сердечной недостаточности и смерти [1, 2]. В настоящее время принято считать, что основными механизмами сосудистого ремоделирования являются эндотелиальная дисфункция, гиперплазия гладкомышечных клеток, воспаление и иммунный ответ [3].

Известно, что при ЛАГ наблюдается изменение иммунитета и развитие в легочной ткани воспалительного процесса, о чём свидетельствует инфильтрация легочной ткани макрофагами, нейтрофила-

ми, Т- и В-лимфоцитами, увеличение цитокинов и факторов роста в ремоделированных сосудах, наличие циркулирующих хемокинов и цитокинов. Это подтверждает взаимосвязь воспалительного процесса с ремоделированием легочных сосудов при ЛАГ и приводит к прогрессирующей плексиформной артериопатии [4]. Однако детальные механизмы развития воспаления при этой патологии не установлены. Не определён также вклад индукторов оксидативного стресса в этот процесс. Следует отметить, что понимание роли воспаления в патогенезе ЛАГ необходимо для выявления терапевтического окна и соответствующих мишеней для эффективного лечения этого заболевания.

Цель нашей работы – установить роль оксидативного стресса в развитии воспаления в динамике экспериментальной ЛАГ.

Материалы и методы

В работе использовали декстран, гистопак-1077, люминол, питательную среду RPMI-1640, Triton X-100, *Micrococcus lysodeikticus*, пероксид водорода, монокроталин (МКТ), форбол-12-мири-стат-13-ацетат (ФМА) RPMI-1640, NERES (Sigma, США), 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (Carl Roth+Co KG, Германия), МСВ (моноклоробиман), Phalloidin-iFluor 532 Reagent, антитела к ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-1 β , MMP-9; RPMI (Thermo Fischer, США) (Thermo Fisher Scientific, США), коммерческие наборы реагентов для определения ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-1 β в сыворотке крови (FineTest Китай), специфический краситель для ДНК SYTOX Green (Invitrogen, США), компоненты для приготовления фосфатного буферного раствора (ФБР) и сбалансированного буферного солевого раствора Эрла (СБСРЭ) (Анализ X, Беларусь).

Исследования проводили на 30 взрослых белых беспородных крысах самцах массой 250–300 г в соответствии с принципами биоэтики с соблюдением требований Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (<https://bioethics.belmapo.by/research-ethics.html>).

Для создания ЛАГ использовали 8 недельную МКТ-модель [5]. Крыс рандомизировали (n=10 в группе) на получивших инъекции МКТ в дозе 60 мг/кг массы тела или физиологический раствор (контрольная группа, К). Животных выводили из эксперимента через 4 и 8 недель (группы I и II, соответственно) после инъекции смеси растворов фентанила и дроперидола (в соответствии со стандартами GLP). Развитие ЛАГ подтверждали гистопатологическими, морфометрическими, мульти-спиральным компьютерным томографическим исследованиями.

Для гистопатологического исследования у крыс забирали ткань правого легкого. Из готовых парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 3 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином для обзорной микроскопии. Иммуногистохимическое окрашивание проводили в соответствии с протоколами производителя, использовали антитела к ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-1 β . Количественную оценку экспрессии биомаркеров выполняли с использованием алгоритма “positive pixel count” и программы для морфометрии Aperio Image Scope 12.3.3 (Leica, Германия).

В сыворотке крови крыс методом количественного твердофазного иммуноферментного анализа типа «сэндвич» определяли содержание уровней ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-1 β , как описано в инструкции к наборам. Измерения проводили с помощью спектрофотометра Ф300 (Витязь, Беларусь).

Плазму получали центрифугированием цельной крови в течение 15 мин при 3000 об/мин. Для получения сыворотки свернувшуюся кровь центрифугировали при 2500 об/мин в течение 15–20 мин.

Нейтрофилы выделяли из гепаринизированной периферической крови здоровых и больных ЛАГ животных в градиенте плотности гистопак-1077 по стандартной методике [6]. Клетки суспензировали в СБСРЭ (рН 7,2). Содержание нейтрофилов в суспензии составляло не менее 96 %.

Секреторную дегрануляцию нейтрофилов определяли по выходу лизоцима из клеток [7]. Суспензию нейтрофилов (2 млн/мл) помещали в стеклянные цилиндрические кюветы с плоским дном и инкубировали 30 мин при 37 °С. После этого образцы центрифугировали 10 мин 1500 об/мин. Активность лизоцима в супернатанте определяли по скорости лизиса клеточных стенок бактерий *Micrococcus lysodeikticus* спектрофотометрическим методом ($\lambda=450$ нм) на спектрофлуориметре CM 2203 (Солар, Беларусь). Результаты представлены в процентах от общей активности фермента, высвобождающегося из нейтрофилов после обработки 10 % раствором Triton X-100.

Генерацию активных форм кислорода и хлора (АФКХ) секретированной из нейтрофилов миелопероксидазой (МПО) регистрировали методом люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ) на биохемилуминометре БХЛ-1 (Минск, Беларусь). Активность секретируемой из нейтрофилов МПО оценивали по интенсивности ХЛ, измеренной в течение 10 мин в системе, содержащей 1 мл СБСРЭ (рН 5,2), 10 мкМ H₂O₂, 25 мкМ люминола и 200 мкл внеклеточной жидкости, полученной после центрифугирования суспензии нейтрофилов (1·10⁶ клеток/мл) [8]. Нейтрофилы предварительно стимулировали адгезией к поверхности стекла в течение 30 мин при 37 °С. Активность секретированной МПО ($\Sigma\text{секр.}/\Sigma\text{общ.}\times 100$ %) оценивали как отношение активности МПО (интегральная интенсивность ХЛ) во внеклеточной среде стимулированных адгезией клеток ($\Sigma\text{секр.}$) к общей активности МПО в 200 мкл лизата клеток ($\Sigma\text{общ.}$). Лизат нейтрофилов для оценки общей активности МПО получали добавлением 10 % Triton X-100.

Пероксидазную активность МПО в плазме крови оценивали методом спектрофотометрии $\lambda=650$ нм) на спектрофлуориметре CM2203 (Солар, Беларусь) по скорости окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) пероксидом водорода в присутствии МПО [9]. Реакцию инициировали внесением 0,3 ммоль/л раствора H₂O₂. Пероксидазную активность МПО выражали в мкмоль/л ТМБ/ (мин·мл), используя $\epsilon_{(650)}=3,9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Уровень восстановленного глутатиона (GSH) в сыворотке здоровых и больных животных определяли с помощью флуоресцентного зонда монохлоробимана (МСВ, $\lambda_{ex}=390$ нм, $\lambda_{em}=480$ нм). Сыворотку разбавляли Перес-буфером (рН 7,4) в соотношении 1:3. Полученные образцы инкубировали с 10 мкМ МСВ в течение 30 мин при 37 °С и регистрировали флуоресценцию в течение 5 мин. Результаты представлены как отношение уровня GSH в сыворотке больных животных к уровню GSH в контрольных образцах (сыворотка здоровых животных) [10].

Для исследования формирования внеклеточных ловушек свежевыделенные нейтрофилы в RPMI высаживали в чашки со стеклянным дном (Ibidi, Германия) в концентрации 300 000 кл/мл, вносили ФМА в концентрации 0,1 мкМ и культивировали 2 ч при их адгезии к поверхности стекол. После этого к клеткам добавляли 5 мкМ специфического красителя для ДНК SYTOX Green и инкубировали 10 мин. Нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ) визуализировали в режиме реального времени с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti2 (Nikon, Япония) при LED возбуждении 470 нм. Анализировали от 60 до 80 изображений размером 290×290 мкм и проводили подсчет НВЛ. Данные выражали как среднее число НВЛ в одном микроскопическом поле.

Статистический анализ данных проводился с помощью программы Origin, version 8.5.1 (OriginLab Corp.). Результаты исследования динамики уровня цитокинов в крови и в ткани легкого крыс представлены в виде $Me (Q_1, Q_3)$, где Me – медиана, Q_1, Q_3 – нижний и верхний квартили со-

ответственно. Сравнение количественных показателей между группами проводилось с помощью критерия Манна-Уитни. Остальные результаты представлены в виде $M \pm \sigma$, где M – среднее значение, σ – стандартное отклонение. Сравнение количественных показателей между группами проводилось с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) и теста Даннета. Все различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Крысы с ЛАГ были разделены на две группы в зависимости от продолжительности наблюдения за прогрессированием заболевания: I (4 нед.), II (8 нед.). Патогистологическая картина легких при ЛАГ, индуцированной МКТ, через 4 нед. эксперимента характеризуется выраженными изменениями в легочных артериолах, включающими мускуляризацию артериол, гипертрофию меди, гипертрофию интимы, периваскулярный отек и лимфоцитарную инфильтрацию. Через 8 нед. эксперимента изменяются легочные артерии и вены: наблюдается концентрический фиброз интимы, атрофия меди, плексиформная артериопатия. В легочной ткани обнаруживаются очаги фиброза.

Иммуноферментный анализ выявил скачкообразный рост уровня провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β и ИЛ-6 в сыворотке крови через 4 нед. после введения МКТ. Затем (через 8 нед.) наблюдается снижение концентрации этих цитокинов. В то же время, концентрация противовоспалительного цитокина ИЛ-10 через 4 нед. с момента начала эксперимента уменьшается, а через 8 нед. – увеличивается по сравнению с контролем.

Таблица 1 – Динамика уровня цитокинов в крови крыс с индуцированной МКТ ЛАГ ($Me(25;75)$)

Table 1 – Dynamics of cytokine levels in the blood of rats with MCT-induced PAH ($Me(25;75)$)

Биомаркеры	Группы			<i>p</i>
	Контроль (n=10)	I (4 нед.) (n=10)	II (8 нед.) (n=10)	
	1	2	3	
ИЛ-1 β , пг/мл	1,64 (1,01;8,5)	4,80 (2,9;7,11)	0,05 (0,0;2,23)	$p_{1-2} < 0,05$ $p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$
ИЛ-6, пг/мл	0,01 (0,01;0,03)	30,3 (16,64-42,1)	5,8 (2,94;12,8)	$p_{1-2} < 0,05$ $p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$
ИЛ-10, пг/мл	44,91 (30,01;52,4)	25,32 (12,5;36,24)	263,21 (90,34;300,24)	$p_{1-2} < 0,05$ $p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$

Динамика экспрессии про- и противовоспалительных цитокинов в ткани легкого крыс с ЛАГ представлена в таблице 2. Экспрессия ИЛ-1 β практически не изменяется на всей протяженности эксперимента. Наблюдается значительное увеличение экспрессии ИЛ-6 через 4 нед. после

инъекции МКТ, а через 8 нед. этот показатель снижается до контрольных значений. В то же время экспрессия ИЛ-10 статистически значимо, по сравнению со здоровыми животными, повышается через 4 и 8 нед. после индуцирования ЛАГ.

Анализ цитокинового профиля крови животных свидетельствует о развитии воспалительного процесса в динамике ЛАГ, и достижении острой фазы к 4 нед. ЛАГ. Результаты гистологического

исследования показывают активацию противовоспалительного ИЛ-10 на всех сроках эксперимента, связанную с запуском механизмов компенсации воспаления.

Таблица 2 – Динамика экспрессии цитокинов в ткани легкого крыс с индуцированной МКТ ЛАГ (Ме(25;75))

Table 2 – Dynamics of cytokine expression in the lung tissue of rats with MCT-induced PAN (Me(25;75))

Биомаркеры	Группы			p
	Контроль (n=10)	I (4 нед.) (n=10)	II (8 нед.) (n=10)	
	1	2	3	
ИЛ-1 β , %	0,1 (0,04; 0,06)	0,12 (0,10;0,13)	0,08 (0,05;0,11)	$p_{1-2}<0,05$ $p_{2-3}<0,05$
ИЛ-6, %	4,25 (3,26;6,64)	6,05 (4,98; 8,69)	4,99 (3,93;6,22)	$p_{1-2}<0,05$ $p_{1-3}<0,05$
ИЛ-10, %	2,32 (1,48;4,53)	7,44 (2,99; 9,28)	9,68 (7,70;12,39)	$p_{1-2}<0,05$ $p_{1-3}<0,05$ $p_{2-3}<0,05$

Известно, что провоспалительные цитокины преактивируют нейтрофилы и принимают участие в миграции лейкоцитов в очаг воспаления, где эти клетки с помощью АФКХ и ряда ферментов утилизируют чужеродные объекты и повреждённые структуры организма, индуцируют образование НВЛ [11, 12]. ИЛ-10 регулирует продукцию АФКХ нейтрофилами [13]. Гиперпродукция АФКХ может приводить к формированию оксидативного стресса.

Мы проанализировали возможность участия нейтрофилов в формировании оксидативного стресса в динамике этого заболевания. Известно, что при стимуляции нейтрофилов к фагоцитозу усиливается секреторная дегрануляция, из клеток высвобождаются гидролитические ферменты и МПО, в результате функционирования которой образуется сильный окислитель и основной деструктор жизненно важных молекул и тканей организма – хлорноватистая кислота [14]. Как показано на рисунке 1, а, из нейтрофилов крыс с ЛАГ через 4 и 8 нед. после введения МКТ секретируется в 2 раза больше лизоцима, чем из клеток здоровых животных. Продукция НОС1 секретированной МПО (рисунок 1, б) увеличивается по сравнению с контролем в 1,4 и 2,2 раза для животных I и II групп. Подобным образом повышается пероксидазная активность МПО в плазме крови (рисунок 1, в): увеличивается в 1,2 раза через 4 нед. и в 1,5 раз через 8 нед. эксперимента. При этом через 8 нед. эксперимента в 1,6 раз снижается антиоксидантная активность сыворотки крови крыс, что подтверждается изменением уровня восстановленного глутатиона в этой биожидкости (рисунок 1, г). Всё это показывает, что с четвёртой по восьмую неделю после инъекции МКТ праймированные нейтрофилы усиленно секретируют из кле-

ток МПО, которая продуцирует хлорноватистую кислоту – основной индуктор оксидативного стресса в организме.

НОС1 является сильным окислителем и галогенирующим агентом, повреждающим все типы жизненно важных молекул, что приводит к цитодеструкции и разрушению тканей. Участвуя в реакциях неспецифического иммунитета, нейтрофилы придерживаются трёх основных стратегий обеспечения иммунной функции – преактивация и фагоцитоз, секреторная дегрануляция, высвобождение НВЛ. НВЛ представляют собой крупные внеклеточные сетеподобные структуры, выбрасываемые нейтрофилами, состоящие из цитозольных и гранулярных белков, которые собраны на каркасе из деконденсированного хроматина. Основными компонентами НВЛ являются: ДНК, гистоны, сериновая протеаза, эластаза, МПО, актин и др. [15]. Эти структуры улавливают и нейтрализуют бактерии, грибы, вирусы и паразитов. Однако неконтролируемое формирование НВЛ участвует в патогенезе аутоиммунных, сердечно-сосудистых, легочных и онкологических заболеваний.

На рисунке 2 представлены микрофотографии адгезирующих нейтрофилов при стимуляции ФМА. Видно, что при культивировании ФМА-стимулированных нейтрофилов в течение 2 ч единичные клетки формируют НВЛ. У здоровых крыс зарегистрировано $1,3 \pm 0,8$ НВЛ в одном поле. Для животных группы 4 нед. число НВЛ в одном поле составило $2,0 \pm 0,2$, а для крыс группы 8 нед. $2,9 \pm 0,7$. Это свидетельствует об увеличении числа НВЛ у больных животных в 1,5 (4 нед.) и 2,2 (8 нед.) раза по сравнению с контрольной группой. Следовательно, при прогрессировании ЛАГ у животных происходит стимуляция нейтрофилов к формированию НВЛ.

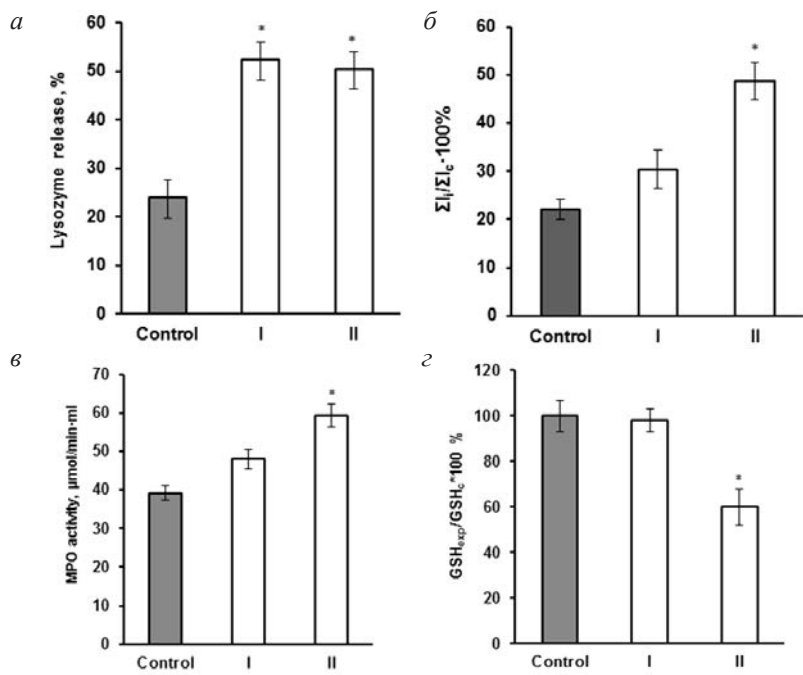


Рисунок 1 – Секреторная дегрануляция нейтрофилов (а); генерация активных форм кислорода и хлора ($\Sigma I_{секр} \cdot 100 \% / \Sigma I_{общ}$) секретированной из нейтрофилов миелопероксидазой (б); пероксидазная активность миелопероксидазы в плазме крови (в); уровень восстановленного глутатиона в сыворотке (г) здоровых (Control) и больных животных через 4 (I) и 8 (II) недель после инъекции монокроталина, * $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Figure 1 – Secretory degranulation of neutrophils (a); reactive oxygen and chlorine species generation ($\Sigma I_{sec} \cdot 100 \% / \Sigma I_{total}$) by myeloperoxidase secreted from neutrophils (б); peroxidase activity of myeloperoxidase in blood plasma (в); reduced glutathione level in the serum (г) of healthy (Control) and sick animals 4 (I) and 8 (II) weeks after monocrotaline injection, * $p < 0.05$ compared to control

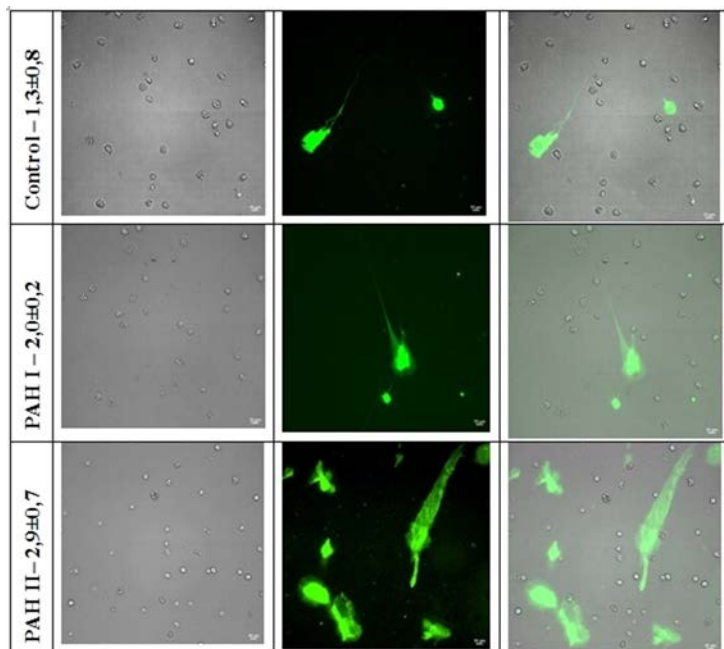


Рисунок 2 – Сформированные нейтрофильные внеклеточные ловушки в образцах нейтрофилов здоровых и больных ЛАГ крыс после стимуляции клеток ФМА в течение 2 ч. Флуоресцентная микроскопия – визуализация внеклеточных ловушек с использованием SYTOX Green. (Цифрами представлено среднее число нейтрофильных внеклеточных ловушек на одно изображение. Масштаб 10 μm)

Figure 2 – Formed neutrophil extracellular traps in neutrophil samples from healthy and PAH rats after cells stimulation with PMA for 2 hours. Fluorescence microscopy – visualization of extracellular traps using SYTOX Green. (The numbers represent is the average number of neutrophil extracellular traps per image. Scale 10 μm)

Заключение

На основании полученных результатов в динамике развития ЛАГ можно предположить следующих участников этого патологического процесса. На начальном этапе заболевания увеличивается уровень провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β и ИЛ-6 в сыворотке крови. В процессе дальнейшего развития ЛАГ запускается активация противовоспалительного цитокина ИЛ-10. Эти интерлейкины участвуют в стимуляции нейтрофилов и нейтрофил-опосредо-

ванного воспаления. Нами выявлено, что при прогрессировании ЛАГ происходит праймирование нейтрофилов и усиление их функционального ответа: повышение генерации АФКХ, секреции и активности в плазме МПО, снижение уровня глутатиона в крови, формирование НВЛ. Все это приводит к оксидативному стрессу на поздних стадиях патологии. Эти факторы указывают на важную роль нейтрофилов при ЛАГ и, возможно, могут служить биомаркерами прогрессирования заболевания.

Список цитированных источников

1. Rabinovitch, M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension / M. Rabinovitch // *J. Clin. Invest.* – 2012. – Vol. 122 (12). – P. 4306–4313.
2. Dushani, A. Emerging epigenetic targets and their molecular impact on vascular remodeling in pulmonary hypertension / A. Dushani [et al.] // *Cells.* – 2024. – Vol. 13(3): 244.
3. van der Feen, D.E. Pulmonary arterial hypertension in congenital heart disease: translational opportunities to study the reversibility of pulmonary vascular disease / E. Diederik [et al.] // *European Heart Journal.* – 2017. – T. 38. – P. 2034–2040.
4. El Chami, H. Immune and inflammatory mechanisms in pulmonary arterial hypertension / H. El Chami, P. M. Hassoun // *Prog. Cardiovasc. Dis.* – 2012. Vol. – 55(2). – P. 218–228.
5. Adzericho, I. E. Morphological features in dynamics of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in vivo / I. E. Adzericho, O. N. Jacevich, T. E. Vladimirskaia, D. L. Mihnevich, // *Pathol. Physiol. Exp. Med.* – 2020. – Vol. 2 – P. 60–66.
6. Böyum, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages / A. Böyum // *Scand. J. Immunol.* – 1976. – Vol. 5. – P. 9–15.
7. Shugar, D. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme / D. Shugar // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1952. – Vol. 8. – P. 302–309.
8. Kavalenka, A. I. Effects of hydrogen peroxide on neutrophil ability to generate reactive oxygen and chlorine species and to secrete myeloperoxidase in vitro / A. I. Kavalenka, G. N. Semenkova, S. N. Cherenkevich // *Cell Tissue Biol.* – 2007. – Vol. 1(6). – 551–559.
9. Pulli, B. Measuring Myeloperoxidase Activity in Biological Samples / B. Pulli [et al.] // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8(7): e67976.
10. Kamencic, H. Monochlorobimane fluorometric method to measure tissue glutathione / H. Kamencic, A. Lyon, P. G. Paterson, B. H. Juurlink // *Anal. Biochem.* – 2000. – Vol. 286. – P. 35–37.
11. Florentin, J. Interleukin-6 mediates neutrophil mobilization from bone marrow in pulmonary hypertension / J. Florentin, J. Zhao, Y. Y. Tai // *Cell Mol. Immunol.* – 2021. – Vol. 18. – P. 374–384.
12. Keshari, R. S. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition / R. S. Keshari [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7(10):e48111.
13. Dang, P. M. Anti-inflammatory effect of interleukin-10 on human neutrophil respiratory burst involves inhibition of GM-CSF-induced p47PHOX phosphorylation through a decrease in ERK1/2 activity / P. M. Dang [et al.] // *FASEB J.* – 2006. – Vol. 20(9). – P. 1504–1506.

14. Dupré-Crochet, S. ROS production in phagocytes: why, when, and where? / S. Dupré-Crochet, M. Erard, O. Nüße // *J. Leukoc. Biol.* – 2013. – Vol. 94(4). – P. 657–670.
15. Hidalgo, A. Neutrophil extracellular traps: from physiology to pathology/ A. Hidalgo // *Cardiovasc Res.* – 2021. – Vol. 2021:cvab329.

References

1. Rabinovitch M. Molecular Pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest.* 2012 Dec 3;122(12):4306–4313. doi:10.1172/JCI60658.
2. Dushani A, Ranasinghe CU, Parinda TM, Tennakoon B, Schwarz AM. Emerging epigenetic targets and their molecular impact on vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Cells.* 2024 Jan 28;13(3):244. doi:10.3390/cells13030244.
3. van der Feen DE, Bartelds B, de Boer RA, Berger RMF. Pulmonary arterial hypertension in congenital heart disease: translational opportunities to study the reversibility of pulmonary vascular disease. *European Heart Journal.* 2017 Jan 16;38:2034–2040. doi: 10.1093/eurheartj/ehx034.
4. El Chami H, Hassoun PM. Immune and inflammatory mechanisms in pulmonary arterial hypertension. *Prog. Cardiovasc Dis.* 2012 Sept;55(2): 218–228. doi: 10.1016/j.pcad.2012.07.006.
5. Adzericho IE, Jacevich ON, Vladimirskaia TE, Mihnevich DL. Morphological features in dynamics of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in vivo. *Pathol. Physiol. Exp. Med.* 2020;2:60-66.
6. Böyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol.* 1976 Jun; 5:9-15.
7. Shugar D. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochim Biophys Acta.* 1952;8:302–309. doi: 10.1016/0006-3002(52)90045-0.
8. Kavalenka AI, Semenkova GN, Cherenkevich SN. Effects of hydrogen peroxide on neutrophil ability to generate reactive oxygen and chlorine species and to secrete myeloperoxidase in vitro. *Cell Tissue Biol.* 2007 Dec;1:551–559. doi: 10.1134/S1990519X07060120.
9. Pulli B, Ali M, Forghani R, Schob S, Hsieh KLC, Wojtkiewicz G, Linnoila JJ, Chen JW. Measuring myeloperoxidase activity in biological samples // *PLoS ONE.* 2013 Jul 5;8(7):e67976. doi: 10.1371/journal.pone.0067976.
10. Kamencic H, Lyon A, Paterson PG, Juurlink BH. Monochlorobimane fluorometric method to measure tissue glutathione. *Anal Biochem.* 2000 Nov 1;286: 35–37. doi: 10.1006/abio.2000.4765.
11. Florentin J, Zhao J, Tai YY. Interleukin-6 mediates neutrophil mobilization from bone marrow in pulmonary hypertension. *Cell Mol Immunol.* 2021 Jan 8;18:374–384. doi: 10.1038/s41423-020-00608-1.

12. Keshari RS, Jyoti A, Dubey M, Kothari N, Kohli M, Bogra J, Barthwal MK, Dikshit M. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition. *PLoS One*. 2012 Oct 26;7(10):e48111. doi: 10.1371/journal.pone.0048111.
13. Dang PM, Elbim C, Marie JC, Chiandotto M, Gougerot-Pocidallo MA, El-Benna J. Anti-inflammatory effect of interleukin-10 on human neutrophil respiratory burst involves inhibition of GM-CSF-induced p47PHOX phosphorylation through a decrease in ERK1/2 activity. *FASEB J*. 2006 Jul;20(9):1504-6. doi: 10.1096/fj.05-5395fje.
14. Dupré-Crochet S, Erard M, Nüße O. ROS production in phagocytes: why, when, and where? *J Leukoc Biol*. 2013 Apr 19;94(4):657-670. doi: 10.1189/jlb.1012544.
15. Hidalgo A, Libby P, Soehnlein O, Aramburu IV, Papayannopoulos V, Silvestre-Roig C. Neutrophil extracellular traps: from physiology to pathology. *Cardiovasc Res*. 2021 Oct 21;2021:cvab329. doi: 10.1093/cvr/cvab329.

ROLE OF OXIDATIVE STRESS IN THE INFLAMMATION DEVELOPMENT IN PULMONARY ARTERIAL HYPERTENSION

*G. N. Semenkova¹, I. E. Adzerikho¹, T. E. Vladimirskaia¹, N. V. Amaegberi²
A. M. Ustiamchuk¹, A. V. Zhilkevich¹, A. V. Bahdanava³, T. A. Kulahava³*

¹*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

²*Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus*

³*Research Institute for Nuclear Problems of Belarusian State University,
Minsk, Republic of Belarus*

Background. Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a terminal disease characterized by severe pulmonary vascular remodeling, leading to increased vascular resistance and pulmonary artery blood pressure, and ultimately to right ventricular heart failure and death. The development of PAH is accompanied by inflammation, one of the reasons for which may be the oxidative stress induction by activated neutrophils.

Objective: to establish the role of oxidative stress in the development of inflammation in the dynamics of experimental PAH.

Materials and methods. PAH was induced by monocrotaline (MCT) in white outbred male rats for 8 weeks.

Results. According to the analysis results of IL-1, IL-6 and IL-10 in the tissue and blood of rats with PAH, an acute phase of inflammation is recorded 4 weeks after the pathology induction; from 4 to 8 weeks. – the cytokine profile changes towards a decrease in pro- and an increase in anti-inflammatory cytokines. At later stages of PAH, neutrophils activation is observed, which is expressed in increased secretory degranulation processes, elevated secretion of myeloperoxidase into the extracellular environment and HOCl production. As PAH progresses in animals, neutrophils are stimulated to form neutrophil extracellular traps.

Conclusions. Activated neutrophils make a significant contribution to the development of inflammation in MCT-induced PAH.

Keywords: pulmonary arterial hypertension, cytokines, inflammation, neutrophils, oxidative stress, myeloperoxidase, neutrophil extracellular traps.

For citation: Semenkova GN, Adzerikho IE, Vladimirskaia TE, Amaegberi NV, Ustiamchuk AM, Zhilkevich AV, Bahdanava AV, Kulahava TA. Role of oxidative stress in the inflammation development in pulmonary arterial hypertension. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2024, vol. 3, no. 1(4). pp. 67–73 (in Russian).

Поступила 15.04.2024

ВЛИЯНИЕ КОМПОЗИЦИИ (ЛИПОВАЯ КИСЛОТА, ТИАМИН, ТИРОЗИН) НА УРОВНИ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В КРОВИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИАБЕТЕ

В. Ч. Полубок¹, Е. М. Дорошенко², В. В. Виноградов¹, Л. И. Надольник¹

¹Институт биохимии биологически активных соединений
Национальной академии наук Беларуси, г. Гродно, Республика Беларусь

²Гродненский государственный медицинский университет,
г. Гродно, Республика Беларусь

Введение. Механизмы развития диабета включают метаболические нарушения функции различных систем организма. Учитывая важную роль аминокислот (АК) в регуляции углеводного обмена, представляет интерес изучение влияния антидиабетической композиции (липовая кислота, тиамин, тирозин (ЛКТТ)) на уровни свободных АК у крыс при диабете.

Цель исследования: оценить влияние композиции липовая кислота, тиамин, тирозин на уровни свободных аминокислот в сыворотке крови крыс при экспериментальном диабете.

Материалы и методы. Диабет моделировали у самок и самцов крыс введением стрептозотоцина (СТЗ) в дозе 40 мг/кг на фоне высокожировой диеты (ВЖД). Концентрации свободных АК в сыворотке крови определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Результаты. Употребление ВЖД у крыс изменяет содержание АК по сравнению с контролем у самок и самцов. У самцов, в отличие от самок, не выявлено различий в уровне АК при развитии диабета по сравнению с ВЖД. Дискриминантный анализ показал, что у самок опытных групп отличия от интактного контроля определяются более высокими уровнями аланина, глутамата, бета-аланина и тирозина, более низкими – цистеата, цитруллина, аспартата, метионина и гипотаурина. Введение композиции ЛКТТ нормализовало уровень глюкозы и пул АК крови у самок, у самцов эффекты были незначительными.

Заключение. Композиция на основе липовой кислоты (ЛКТТ) обладает выраженным корректирующим эффектом на уровни АК и глюкозы у самок при диабете на фоне ВЖД, у самцов эффекты менее выражены.

Ключевые слова: экспериментальный диабет, высокожировая диета, свободные аминокислоты, липовая кислота, тиамин, тирозин.

Для цитирования: Влияние композиции (липовая кислота, тиамин, тирозин) на уровни свободных аминокислот в крови крыс при экспериментальном диабете / В. Ч. Полубок [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. – 2024. – Т. 3, № 1(4). – С. 74–82.

Введение

Повышение уровня заболеваемости диабетом (наиболее значимо диабетом 2 типа) в различных регионах мира свидетельствует об актуальности изучения механизмов развития метаболических нарушений, связанных с инсулинорезистентностью, а также разработки эффективных средств для профилактики и коррекции нарушений углеводного и липидного метаболизма.

Разработано оригинальное средство для коррекции нарушений метаболизма при диабете на основе липовой кислоты, тиамина и тирозина (ЛКТТ). Липовая кислота и тиамин широко используются для профилактики и лечения диабета, получено достаточное количество доказательств их положительных эффектов при нарушении углеводного обмена. Липовая кислота усиливает действие инсулина, улучшая усвоение глюкозы клет-

ками и стимулируя процессы сохранения гликогена в мышцах и стабильного уровня глюкозы крови [1, 2].

Препараты тиамина могут считаться одним из наиболее важных компонентов лечения диабетической невропатии, тиаминпирофосфат выступает в роли кофермента в процессах энергетического обмена и способствует оптимальной утилизации глюкозы, что может объяснять нейропротективный эффект тиамина [3].

Данные относительно применения тирозина при диабете отсутствуют, тем не менее, в исследованиях, проведенных ранее, установлено, что при развитии диабета у крыс возможно снижение обеспеченности организма тиреоидными гормонами, что с высокой степенью достоверности коррелирует с показателями нарушений метаболизма глюкозы [4].

Цель исследования – оценить влияние композиции «липоевая кислота, тиамин и тирозин» на уровни свободных аминокислот в сыворотке крови крыс при экспериментальном диабете.

Материалы и методы

Исследования выполнены на самках и самцах крыс линии Вистар, которые на протяжении всего эксперимента содержались в стандартных условиях вивария. Все манипуляции с животными выполнялись согласно ТКП 125-2008 (02040) «Надлежащая лабораторная практика». На протяжении 18 недель животные опытных групп употребляли ВЖД. После 12 недель употребления ВЖД им вводился стрептозотцин (СТЗ) в дозе 40 мг/кг (на фоне введения СТЗ (в течение 2 суток) животные получали 5 % раствор глюкозы в качестве единственного источника питья, гибель животных не наблюдалась). Тестируемая композиция (ЛКТТ) вводилась внутривентрикулярно в дозе 250 мг/кг на протяжении 4 недель. Группы: интактный контроль (ИК), ВЖД, ВЖД+СТЗ, ВЖД+СТЗ+ЛКТТ. Уровень глюкозы в сыворотке крыс оценивался энзиматическим глюкозооксидазным методом (наборы ООО «Арвитмедикл»). Определение свободных аминокислот и их дериватов проводили в хлорнокислых экстрактах сыворотки крови методом обращенно-фазной хроматографии с предколонной дериватизацией о-фталевым альдегидом

и 3-меркаптопропионовой кислотой и детектированием по флуоресценции (338/445 нм) [5].

Статистический анализ. Отклонение распределения значений показателя в выборке от нормального оценивали с помощью критерия Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Для анализа различий трех и более групп проводился дисперсионный анализ с апостериорным сравнением по критерию Тьюки. Для проверки достоверности изменений при сравнении трех и более групп применяли тест Краскелла-Уоллиса. Данные представлены как среднее по выборке, усеченной на 5 % [95 % – доверительные интервалы]. 95 % доверительные интервалы получены методом бутстрепа (R=5000). Для выявления значимости вклада отдельных показателей в комплексную характеристику пула свободных АК в группах использовали дискриминантный анализ.

Результаты и их обсуждение

У самок в группе ВЖД+СТЗ концентрация глюкозы повышалась более чем в 2 раза по сравнению с группой контроль и ВЖД (таблица 1). Введение композиции ЛКТТ снизило данный показатель в 1,86 раза; у самцов, в тех же условиях, выявлены несколько другие эффекты: уровень глюкозы, повышенный в 2,39 раза в группе ВЖД+СТЗ, не изменялся на фоне введения ЛКТТ в течение 4 недель.

Таблица 1 – Концентрация глюкозы в сыворотке крови самцов и самок крыс контрольной и опытных групп

Table 1 – Glucose concentration in the blood serum of male and female rats of the control and experimental groups

Показатель	Интактный контроль, n=9	ВЖД, n=10	ВЖД+СТЗ, n=7	ВЖД+СТЗ+ЛКТТ, n=9
Глюкоза, самки, ммоль/л	5,61 [5,22;5,97]	6,31 [5,87;6,70]	12,85*† [8,06;19,69]	6,89 † [5,97;7,56]
Глюкоза, самцы, ммоль/л	5,73 [5,34;6,13]	7,11 [6,13;9,62]	13,70* [10,53;16,67]	14,98 *† [10,11;19,63]

Примечание: здесь и в других таблицах: * – $p < 0,05$ по отношению к ИК, † $p < 0,05$ – по отношению к ВЖД, ‡ – $p < 0,05$ по отношению к группе ВЖД+СТЗ

Note: here and in other tables: * – $p < 0.05$ in relation to the intact control, † $p < 0.05$ – in relation to the group of animals receiving a high-fat diet, ‡ – $p < 0.05$ in relation to the group of animals receiving a high-fat diet and streptozotocin

Результаты определения концентрации свободных АК в крови контрольных и опытных животных представлены в таблице 2. Показано, что концентрации заменимых, незаменимых аминокислот, ароматических, гликогенных, кетогенных, АРУЦ (аминокислоты с разветвленной углеводородной цепью) изменялась в крови самок при употреблении ВЖД. Можно отметить следующие достоверные изменения в фонде АК сыворотки крови самок крыс: повышение уровней глутамина (1,36 раза), метионина (2,08 раза) и ГАМК (1,79 раза); снижение уровня аргинина (1,59 раза),

лизина (1,20 раза), альфа-аминоадипиновой кислоты (2,12 раза), бета-аланина (1,69 раза), гипотаурина (1,93 раза), таурина (1,21 раза), тирозина (1,26 раза), фенилаланина (1,31 раза) и АРУЦ (Val – в 1,13 раза, Leu – в 1,26 раза, Ile – в 1,22 раза).

Таким образом, пул АК сыворотки крови крыс на фоне ВЖД обеднялся за счет АРУЦ, ароматических аминокислот, а также продуктов превращений серосодержащих АК. Обеднение пула происходило в первую очередь за счет незаменимых аминокислот, что может быть связано с усиленным использованием АК как гликогенных субстратов

при употреблении ВЖД, но отмечено также снижение и уровней кетогенных аминокислот – лейцина и лизина.

В группе ВЖД+СТЗ (диабет) у самок на фоне повышенного уровня глюкозы отмечено снижение уровня фосфосерина (1,57 раза) и повышение уровня серина (1,27 раза) по отношению к контролю, сохранялся сниженный уровень тирозина (1,31 раза), имело место повышение уровня цитруллина (1,26 раза) по отношению к контролю и ВЖД; повышение уровней аргинина (1,50 раза), альфа-аминоадипиновой кислоты (1,73 раза), бета-аланина (1,37 раза), валина (1,11 раза), фенилаланина (1,2 раза) и лейцина (1,15 раза), но снижение концентрации метионина (1,87 раза) по отношению к ВЖД. По отношению к группе ВЖД в группе ВЖД+СТЗ у самок крыс выявлены достоверные отличия в уровне АК. В группе ВЖД+СТЗ различия в уровнях АК по сравнению с контролем по абсолютным значениям были минимальными, но не наблюдалось снижения уровней АРУЦ и изменений в показателях пула серосодержащих АК. Повышение уровня ряда АК по отношению к группе ВЖД может быть связано с метаболическими нарушениями, обусловленными развитием гипергликемии и дислипидемии. Показано, что АРУЦ и ароматические АК (тирозин и фенилаланин) могут иметь значительную связь с развитием диабета. Это подчеркивают потенциальную важность изучения профилей АК в оценке риска диабета [6].

В группе ВЖД+СТЗ+ЛКТТ выявлены изменения в уровне АК по сравнению с группой ВЖД: снижался уровень 3-метилгистидина (1,23 раза), аргинина (1,30 раза), бета-аланина (1,27 раза). Сниженные на фоне ВЖД уровни метионина, АРУЦ и фенилаланина при введении композиции

ЛКТТ повышались до контрольных значений и были повышены по отношению к группе ВЖД. Таким образом, введение композиции ЛКТТ устраняет некоторые эффекты ВЖД, хотя сохранялось снижение уровней основных АК (аргинина и лизина).

По отношению к группе ВЖД+СТЗ у самок группы ВЖД+СТЗ+ЛКТТ имеется ряд различий уровня свободных АК: рост уровня фосфосерина (1,87 раза), треонина (1,29 раза), глутамата (1,32 раза), снижение уровня цитруллина (1,14 раза), альфа-аминомасляная кислота (2,55 раза). Вводимая композиция ЛКТТ оказывала значительный корректирующий эффект на уровни АК по отношению к группе ВЖД+СТЗ. При введении композиции ЛКТТ выявлено повышение уровней цистеата (1,55 раза), глутамата (1,17 раза), глутамина (1,42 раза), серина (1,54 раза), треонина (1,30 раза), снижение – лизина (1,28 раза), аргинина (1,22 раза), таурина (1,24 раза) и, в наибольшей степени – альфа-аминомасляной кислоты (3,49 раза) по отношению к группе контроля. Последнее соединение может рассматриваться как продукт транссульфурирования гомоцистеина. Следует отметить, что уровень цистатионина в этой группе был достоверно ниже, чем в группе ВЖД, что может свидетельствовать о торможении процессов транссульфурирования. Кроме этого, по отношению к ВЖД в этой группе повышался уровень цистинсульфината, что, наряду со снижением уровня таурина, может свидетельствовать о торможении заключительных реакций превращений серосодержащих аминокислот по цистеиноксидазному пути. Результаты, представленные в таблице 3, свидетельствуют о том, что развитие диабета изменяет соотношение серосодержащих соединений в сыроворотке крови самок крыс.

Таблица 2 – Влияние композиции ЛКТТ на пул свободных АК и производных в сыворотке крови контрольных и опытных групп самок крыс, мкмоль/л

Table 2 – Effect of the LAT T composition on the pool of free AA and their derivatives in the blood serum of control and experimental groups of female rats, μmol/l

	Интактный контроль, n=9	ВЖД, n=10	ВЖД+СТЗ, n=7	ВЖД+СТЗ +ЛКТТ, n=9
CA	0,66 [0,57;0,76]	0,74 [0,55;0,93]	0,93 [0,69;1,28]	1,02* [0,73;1,34]
PSer	0,73 [0,53;0,91]	0,50 [0,33;0,72]	0,45*[0,36;0,57]	0,84‡ [0,57;1,21]
CSA	0,60 [0,42;0,96]	1,12 [0,76;1,49]	0,68 [0,33;1,39]	0,60† [0,47;0,75]
Asp	135,3 [112,4;161,3]	92,56 [78,19;128,78]	117,52 [106,4;142,1]	129,03 [105,6;160,7]
GSH	12,86 [11,57;14,61]	13,81 [12,2;15,73]	5,05*† [3,16;7,72]	14,16‡ [12,75;15,96]
HCA	0,25 [0,15;0,36]	0,41 [0,2;0,74]	0,32 [0,21;0,41]	0,45 [0,29;0,63]
Glu	503,4 [453,4;544,3]	429,2 [386,0;488,6]	445,54 [392,4;520,3]	590,6*†‡ [557;625,7]
Asn	62,16 [53,68;69,26]	58,44 [51,05;64,61]	59 [46,33;69,98]	54,37 [44,82;63,55]
Ser	471,17[443,9;500,]	549,42 [482,4;648,0]	604,44*[516,7;695,]	645,08* [608,;685,1]
aAAA	1,65 [1,28;2,12]	0,76* [0,61;1,02]	1,37† [0,96;1,8]	1,52† [1,19;2]

	Интактный контроль, n=9	ВЖД, n=10	ВЖД+СТЗ, n=7	ВЖД+СТЗ+ЛКТТ, n=9
Gln	907,47 [823,5;997,5]	1246,8* [1110;1334]	1083,61 [784,7;1308,5]	1292,64* [1083,3;1497,3]
His	72,72 [67,28;76]	68,3 [63,94;72,63]	68,77 [63,55;74,23]	71,27 [67,5;76,77]
3MHis	9,37 [8,29;10,38]	8,94 [8,12;10,13]	9,11 [7,61;10,39]	7,37*† [6,34;8,33]
Hse	0,61 [0,48;0,78]	0,51 [0,39;0,67]	0,67 [0,48;0,99]	0,52 [0,39;0,65]
Gly	404,2 [359,7;438,3]	383,01 [346,7;429,4]	365,16 [319,6;410,5]	413,73 [351,2;475,4]
PEA	2,79 [1,41;5,04]	2,01 [1,53;2,55]	1,8 [1,3;2,23]	2,01 [1,77;2,32]
Thr	704,1 [616,0;807,2]	805,7 [658,5;901,3]	707,0 [566,4;816,]	913,9*‡ [813,4;1028,1]
1MHis	1,99 [1,59;2,5]	1,83 [1,33;2,3]	1,96 [1,4;2,78]	1,46* [1,18;1,74]
Ctr	125,3 [111,2;137,1]	135,51 [125,2;144,2]	155,3*† [143,8;175]	135,85‡ [125;146,3]
Arg	146,32 [293;343,5]	198,53* [182;218,7]	297,28† [271,;335,2]	254,82*† [227,;301,]
Ans	7,91 [6,24;9,34]	9,85 [7,73;11,93]	6,75† [5,35;8,04]	8,89‡ [7,73;10,03]
bAla	5,40 [4,58;7,25]	3,33* [3,05;3,64]	4,57† [3,8;5,27]	4,23† [3,65;4,83]
Car	1,99 [1,47;2,78]	1,02* [0,66;1,67]	1,48 [0,98;1,96]	1,51 [1,2;1,86]
HpTau	0,80 [0,59;1,18]	0,42* [0,28;0,59]	0,89 [0,45;1,48]	0,66 [0,42;0,9]
Ala	890,9 [829,1;944,3]	925,2 [788,7;1038,7]	890,5 [672,6;1078,4]	926,3 [832,8;1009,7]
Tau	319,0 [291,6;352,5]	265,7* [257,1;273,5]	272,87 [246,2;306,5]	259,95* [232,;284,7]
ADMA	18,01 [14,74;22,99]	22,48 [18,21;27,36]	14,66† [13,52;16,38]	17,32 [14,61;20,39]
SDMA	0,29 [0,26;0,32]	0,30 [0,26;0,34]	0,36 [0,28;0,44]	0,33 [0,27;0,38]
bABA	0,22 [0,17;0,3]	0,28 [0,17;0,46]	0,28 [0,18;0,53]	0,31 [0,22;0,46]
GABA	0,80 [0,51;1,15]	1,42* [1,13;1,87]	1,70 [0,9;2,64]	1,01 [0,66;1,41]
Tyr	110,34 [99,5;120,9]	86,83* [75,1;100,74]	83,65* [72,42;97,96]	84,35* [76,76;92,1]
aABA	64,32 [45,83;81,71]	45,10 [36,87;51,11]	46,14 [38,74;55,55]	18,09*†‡ [14,3;22,5]
EA	26,69 [25,33;27,85]	25,38 [23,63;27,03]	25,62 [24,01;27,05]	23,26* [22,01;24,9]
Val	332,8 [311,8;356,2]	295,4* [278,7;310,7]	327,3† [302,9;350,7]	330,08† [306,;356,9]
Met	22,72 [17,4;28,34]	47,95* [40,77;53,47]	25,24† [17,55;33,78]	22,31† [16,85;26,53]
Ctn	1,15 [0,84;1,6]	1,39 [0,96;1,81]	1,12 [0,58;2,03]	0,85† [0,62;1,09]
Trp	277,8 [233,2;316,2]	256,06 [211,8;300,0]	278,72 [232,8;319,9]	260,82 [244,4;277,6]
Phe	123,9 [111,4;136,1]	94,63* [91,2;98,8]	113,6† [107,8;121,7]	112,8† [102,9;129,1]
Ile	170,5 [155,8;188,6]	139,28* [129,152,5]	158,36 [148,4;176,5]	162,3† [146,1;178,8]
Leu	304,2 [277,1;333,7]	241,3* [228,3;253,8]	277,9† [264,4;297,6]	279,82 [246,5;333,5]
HLys	8,93 [7,76;9,75]	8,53 [6,88;10,68]	9,79 [7,87;11,82]	10,54 [9,03;12,14]
Orn	94,86 [81,7;115,1]	98,73 [89,5;109,3]	87,71 [80,9;94,32]	93,52 [79,14;106,51]
Lys	1395,29 [1246;1544,	1165,26* [1030;1294]	1388,84 [1101,9;1767]	1071,42* [959,2;1238]

Примечание: Перечень обозначений АК и их производных: CA – цистеиновая кислота, PSer – фосфосерин, CSA – цистеин-сульфиновая кислота, Asp – аспарагиновая кислота, GSH – глутатион, HCA – гомоцистеиновая кислота, Glu – глутаминовая кислота, Asn – аспарагин, Ser – серин, aAAA – альфа-аминоадипиновая кислота, Gln – глутамин, His – гистидин, 3MHis – 3-метилгистидин, Hse – гомосерин, Gly – глицин, PEA – фосфоэтанолламин, Thr – треонин, 1MHis – 1-метилгистидин, Ctr – цитруллин, Arg – аргинин, Ans – ансерин, bAla – бета-аланин, Car – карнозин, HpTau – гипотаурин, Ala – аланин, Tau – таурин, ADMA – асимметричный диметиларгинин, SDMA – симметричный диметиларгинин, bABA – бета-аминоизомасляная кислота, GABA – гамма-аминомасляная кислота, Tyr – тирозин, aABA – альфа-аминомасляная кислота, EA – этаноламин, al – валин, Met – метионин, Ctn – цистатионин, Trp – триптофан, Phe – фенилаланин, Ile – изолейцин, Leu – лейцин, HLys – гидроксизин, Orn – орнитин, Lys – лизин

Note: List of symbols for amino acids and their derivatives: CA – cysteic acid, PSer – phosphoserine, CSA – cysteine sulfinic acid, Asp – aspartic acid, GSH – glutathione, HCA – homocysteine acid, Glu – glutamic acid, Asn – asparagine, Ser – serine, aAAA – alpha-aminoadipic acid, Gln – glutamine, His – histidine, 3MHis – 3-methylhistidine, Hse – homoserine, Gly – glycine, PEA – phosphoethanolamine, Thr – threonine, 1MHis – 1-methylhistidine, Ctr – citrulline, Arg – arginine, Ans – anserine, bAla – beta-alanine, Car – carnosine, HpTau – hypotaurine, Ala – alanine, Tau – taurine, ADMA – asymmetric dimethylarginine, SDMA – symmetric dimethylarginine, bABA – beta-aminoisobutyric acid, GABA – gamma-aminobutyric acid, Tyr – tyrosine, aABA – alpha-aminobutyric acid, EA – ethanolamine, al – valine, Met – methionine, Ctn – cystathionine, Trp – tryptophan, Phe – phenylalanine, Ile – isoleucine, Leu – leucine, HLys – hydroxylysine, Orn – ornithine, Lys – lysine

Таблица 3 – Влияние композиции ЛКТТ на соотношения серосодержащих соединений в сыворотке крови самок крыс

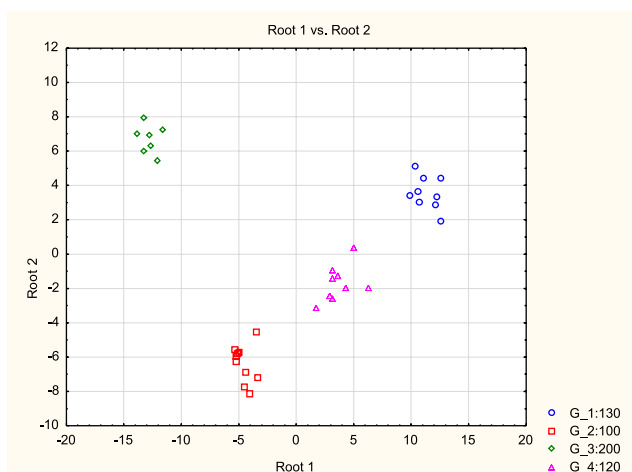
Table 3 – Effect of LATT composition on the ratio of sulfur-containing compounds in the blood serum of female rats

Показатель	Интактный контроль, n=9	ВЖД, n=10	ВЖД+СТЗ, n=7	ВЖД+СТЗ+ЛКТТ, n=9
Met/CA	37,31 [24,86;50,28]	77,41 [52,88;117,93]	30,66† [18,25;48,5]	26,75† [15,81;40,05]
CA/CSA	1,28 [0,91;1,63]	0,73 [0,52;1,06]	1,95† [1,17;2,63]	1,86† [1,29;2,41]
CA/GSH	0,05 [0,04;0,06]	0,05 [0,04;0,07]	0,26† [0,14;0,42]	0,07 [0,05;0,1]
HpTau/CSA	1,68 [0,89;2,91]	0,46* [0,26;0,71]	1,78 [0,83;2,7]	1,11 [0,72;1,5]
Tau/HpTau	424,55 [331,11;520,61]	820,72 [530,28;1214,46]	590,54 [242,83;1408,5]	578,74 [309,91;1027,02]
Tau/CA	502,24 [425,47;577,46]	420,39 [307,43;644,27]	329,13 [232,27;479,06]	295,02* [217,5;378,67]

Композиция ЛКТТ, вводимая самкам группы ВЖД+СТЗ+ЛКТТ, обладает существенным корректирующим эффектом по отношению к группе ВЖД+СТЗ, а также к группе ВЖД, при этом достигается полностью корректная классификация всех четырех групп (рисунок). Первая дискриминантная функция (корень 1) описывает 71 % полной дисперсии выборки, корни 1 и 2 – 94 %. По корню 1 различаются все группы, причем величина этого корня в контроле наибольшая, в группе ВЖД+СТЗ – наименьшая. Эффекты композиции

ЛКТТ в отношении этого корня близки к нормализующим. Корень 2 описывает различия контрольной группы и группы ВЖД+СТЗ, с одной стороны, и ВЖД – с другой. Эффект вводимого комплекса в отношении корня 2 также можно считать корректирующим. Нужно отметить, что группа ВЖД+СТЗ+ЛКТТ по этому корню отличается от контроля в сторону, противоположную группе ВЖД+СТЗ, что свидетельствует о корректирующем эффекте при диабете, вектор коррекции направлен в сторону контрольной группы.

а



б

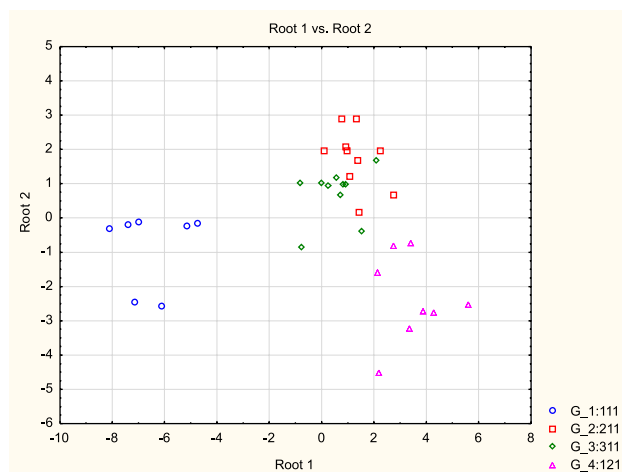


Рисунок – Расположение реализаций на плоскости двух главных компонент (корней дискриминантных функций) при анализе пула свободных аминокислот и их производных у самок (а) и самцов (б) крыс при ВЖД, моделировании диабета на её фоне и коррекции; (интактный контроль – G_1: (синий), ВЖД – G_2: (красный), ВЖД+СТЗ – G_3: (зеленый), ВЖД+СТЗ+ЛКТТ – G_4: (малиновый))

Figure – Location of realizations on the plane of two roots of discriminant functions: female (а) and male (б) rats kept on a HFD, modeling of diabetes and its correction G_1: (intact control, blue), G_2: (HFD, red), G_3: (HFT+STZ, green), G_4: (HFD+STZ+LATT, magenta)

Положительную связь с корнем 1, описывающим отличия всех групп от интактного контроля, имеют уровни аланина, глутамата, бета-аланина и тирозина, отрицательную – уровни цистеата, цитруллина, аспартата, метионина и гипотаурина.

Следовательно, названные АК (аланин, глутамат, бета-аланин и тирозин) вносят наибольший вклад в нормализацию показателей уровня АК по отношению к значениям контрольной группы, в нарушение метаболизма АК – цистеат, цитруллин, ас-

партат, метионин и гипотаурин определяют в наибольшей степени отличия опытных групп от контрольных значений. Более высокие уровни последних соединений могут быть связаны с эффектами ВЖД и диабета (ВЖД+СТЗ), более низкие – наблюдаются в интактном контроле. С корнем 2, по которому наибольшее различие наблюдалось между группами ВЖД+СТЗ и ВЖД, положительная связь имела у цитруллина, бета-аланина, таурина и гипотаурина, отрицательная – у глутамина, метионина и аспартата. Более высокие уровни этих соединений свойственны для

ВЖД. По обоим корням группа ВЖД+СТЗ+ЛКТТ была наиболее близка к интактному контролю, эти данные подтверждают нормализующие эффекты разработанной композиции в отношении метаболизма свободных АК при экспериментальном диабете у крыс. Величина лямбда Уилкса 0,00005 свидетельствует о высокой дискриминации групп ($p < 0,0001$).

Наиболее информативные показатели по величинам F-констант Фишера – уровни метионина, цитруллина, цистеата, глутамата, а также гипотаурина.

Таблица 4 – Влияние композиции ЛКТТ на пул свободных АК и производных в сыворотке крови контрольных и опытных групп самцов крыс, мкмоль/л

Table 4 – Effect of the LCTT composition on the pool of free AA, and derivatives in the blood serum of control and experimental groups of male rats, $\mu\text{mol/l}$

АК	Интактный контроль, n=7	ВЖД, n=10	ВЖД+СТЗ, n=10	ВЖД+СТЗ+ЛКТТ, n=8
CA	0,56 [0,37;0,78]	0,91 [0,66;1,18]	0,85 [0,65;1,06]	0,79 [0,57;1,07]
PSer	0,6 [0,36;0,81]	0,53 [0,38;0,66]	0,72 [0,47;1]	0,56 [0,45;0,71]
CSA	0,67 [0,44;0,89]	1,06 [0,76;1,41]	0,6 [0,36;1,05]	0,98 [0,66;1,4]
Asp	180,87 [137,7;220,1]	153,72 [122,8;187,6]	169,67 [127,9;216,1]	155,39 [131,7;185,3]
GSH	14,28 [12,99;15,85]	16,13 [14,78;17,39]	14,8 [12,04;17,62]	13,31 [11,9;14,7] †
HCA	0,23 [0,13;0,39]	0,25 [0,17;0,4]	0,17 [0,1;0,19]	0,2 [0,12;0,27]
Glu	520,82 [391,9;669,8]	475,36 [400,5;551,1]	507,26 [412,9;604,9]	482,67 [440,9;528,4]
Asn	46,81 [31,2;65,16]	40,92 [31,82;49,6]	38,4 [25,01;52,64]	48,42 [37,91;55,53]
Ser	683,17 [547,2;825,1]	510,27 [396,9;665,5]	560,83 [443,3;695,8]	619,97 [507,3;742,2]
aAAA	2,16 [1,48;2,82]	1,52 [1,18;1,81]	2,11 [1,68;2,82]	1,17 [0,87;1,55] *‡
Gln	963,01 [784,1;1135,3]	904,44 [707,8;1105,1]	853,96 [658,4;1061,7]	1044,46 [741,1;1337,7]
His	66,62 [60,56;72,41]	62,72 [58,36;67,52]	63,26 [58,31;69,78]	67,81 [62,98;72,61]
3MHis	20,16 [15,6;22,5]	14,53 [11,1;18,6]	15,96 [13,6;18,5]	11,48 [9,4;14,4] *‡
Hse	0,67 [0,51;0,83]	0,45 [0,3;0,63]	0,76 [0,54;1] †	0,61 [0,39;0,89]
Gly	499,07[415,42;573,9]	446 [377,68;525,88]	525,09 [472;580,12]	510,23[434,4;582,89]
PEA	1,97 [1,24;2,83]	1,63 [1,12;2,19]	1,85 [1,5;2,11]	2,13 [1,63;2,59]
Thr	782,52 [614,52;920,72]	463,66 [355,05;617,48] *	467,83 [362,85;599,63] *	447,68 [390,16;526,67] *
1MHis	3,54 [2,58;4,57]	2,39 [1,74;3,46]	3,04 [2,59;3,66]	1,78 [1,43;2,15] *‡
Ctr	119,11 [101,7;143,3]	132,17 [116,8;150,4]	138,68 [125,3;154,2]	121 [109,19;132,06]
Arg	287,45 [247,8;326,7]	250,25 [222,1;276,7]	278,12 [231,3;327,6]	246,8 [201,1;285,2]
Ans	9,81 [8,33;11,32]	12,49 [10,42;14,28]	14,11 [12,1;16,3] *	14,29 [12,64;16,01]*
bAla	5,39 [4,67;6,19]	4,25 [3,63;4,9] *	4,92 [4,33;5,46]	4,5 [3,97;5,03]
Car	1,67 [1;2,35]	1,23 [0,68;1,84]	1,35 [1,04;1,65]	2,09 [1,37;2,78]
HpTau	0,73 [0,42;1,12]	0,55 [0,38;0,78]	0,64 [0,31;1,01]	0,58 [0,42;0,77]
Ala	1159,7 [983,;1310,8]	755,8 [652,7;878,8]*	849,6 [723,0;1006] *	832,2 [651,5;1027] *
Tau	261,81 [206,8;309,9]	269,39 [237,5;307,3]	294,4 [269,5;323,8]	287,31 [258,2;312,4]
ADMA	31,32 [17,17;44,9]	36,28 [30,82;41,75]	39,76 [30,21;51,43]	39,52 [34,35;44,3]
SDMA	0,35 [0,28;0,45]	0,36 [0,29;0,43]	0,36 [0,28;0,47]	0,37 [0,24;0,67]
bABA	0,3 [0,19;0,49]	0,28 [0,24;0,32]	0,25 [0,19;0,31]	0,26 [0,18;0,34]
GABA	1,8 [1,07;3,44]	1,73 [1,02;2,7]	1,48 [1,05;1,98]	2,79 [1,3;4,51]
Tyr	125,58 [116,8;134,2]	97,49 [86,3;109,2] *	95,93 [84,4;114,1] *	101,14 [93,4;112,2]*
aABA	34,25 [20,24;49,49]	30,74 [23,82;39,12]	30,63 [23,4;43,38]	26,17 [18,86;33,11]
EA	29,83 [27,36;32,13]	26,33 [23,89;29,33]	28,89 [26,98;32,62]	29,84 [26,23;33,99]
Val	358,64 [334,9;377,8]	333,28 [285,2;372,4]	335,29 [293,6;363,2]	320,52 [265,3;384,3]

АК	Интактный контроль, n=7	ВЖД, n=10	ВЖД+СТЗ, n=10	ВЖД+СТЗ+ЛКТТ, n=8
Met	39,8 [29,9;47,47]	31,1 [21,95;41,01]	28,46 [20,61;37,58]	39,09 [32,01;48,41]
Ctn	2,03 [1,65;2,46]	1,59 [1,22;1,96]	1,23 [0,77;1,69] *	0,86 [0,53;1,33] *†
Trp	230,93 [214,8;245]	164,4 [133,7;191,5]*	170,5 [143,2;201,2]*	169,6 [149,2;191,8]*
Phe	141,99 [136,1;148,3]	114,79 [100,5;130]*	123,78 [106,4;141,7]	129,07 [115,1;141,8]
Ile	206,12 [189,2;224,5]	197,95 [164,7;227,6]	201,42 [170,9;225,7]	189,82 [151,2;233,2]
Leu	324,82 [303,5;347,8]	286,38 [246,3;322,3]	301,84 [262,5;334,6]	307,13 [250,9;358,9]
HLys	11,65 [8,29;15,04]	9,7 [8,36;11,21]	9,28 [7,42;11,36]	6,51 [5,58;7,75] *†‡
Orn	183,1 [136,41;246,4]	140,93 [118,3;160,1]	188,68 [143,9;240,8]	176,8 [158,4;194,9]†
Lys	1423,28 [1236,9;1587,7]	966,89 [822,4;1154,3] *	1097,67 [946,4;1248,8] *	893,6 [851,1;933,1]*‡

У самцов на фоне употребления ВЖД в сыворотке крови снижалось содержание треонина (1,69 раза), аланина (1,53 раза), бета-аланина (1,27 раза), триптофана (1,40 раза), фенилаланина (1,24 раза), тирозина (1,29 раза), лизина (1,47 раза) – таблица 4. Эффекты ВЖД на показатели пула АК в сыворотке крови самцов были менее выражены, но сходны по направленности как у самок. Не наблюдалось снижения уровней АРУЦ и значимых изменений уровней серосодержащих соединений. В группе ВЖД+СТЗ у самцов все изменения, вызванные ВЖД, по отношению к интактному контролю сохранялись. Ни по одному показателю группа ВЖД+СТЗ не отличалась от ВЖД, за исключением снижения уровня бета-аланина. Это значительно отличает эффекты группы самцов от самок, где при развитии диабета выявлены значительные изменения в уровне АК по сравнению с группой ВЖД.

После введения композиции ЛКТТ (группа ВЖД+СТЗ+ЛКТТ) сохраняется снижение уровней альфа-аминоадипиновой кислоты, аланина, цистатионина, 1- и 3-метилгистидинов, тирозина, триптофана и лизина по отношению к контролю. По отношению к группе ВЖД снижался уровень цистатионина и повышался – орнитина (1,25 раза), другие достоверные различия отсутствовали. Наконец, по отношению к группе ВЖД+СТЗ снижались уровни метилгистидинов, альфа-аминоадипиновой кислоты (1,8 раза) и лизина (1,23 раза). Таким образом, отчетливым эффектом композиции является снижение уровня лизина и торможение его превращений, а также снижение уровней метилированных гистидинов, содержание которых может отражать деградацию миофибриллярных белков.

Как и у самок, на плоскости двух главных компонент (корней дискриминантных функций) наиболее отчетливо отделялась группа интактного контроля и группа ВЖД, группа ВЖД+СТЗ+ЛКТТ отличалась от интактного контроля в основ-

ном по корню 1, причем это различие было более выраженным, чем с группой ВЖД (рисунок). Хотя различия абсолютных значений исследуемых показателей в группах ВЖД+СТЗ и ВЖД практически отсутствовали, эти группы различались по величине корня 2, причем по величине этого корня они отличались от контроля в противоположные стороны. С величиной корня 1 наиболее высокую степень корреляции имеют уровни серина, треонина, 3-метилгистидина и альфа-аминоадипиновой кислоты, а также изолейцина. Отрицательная связь этого корня имела место с уровнями глицина и гистидина. Эффекты группы ВЖД+СТЗ по отношению к ВЖД описывает корень 2, с которым положительно коррелируют уровни глицина и валина, отрицательно – уровни изолейцина, серина и 3-метилгистидина. Однако, значимость этих различий, по-видимому, невысока, так как корень 1 описывает более 98 % полной дисперсии выборки. Это согласуется с отсутствием достоверных различий показателей группы ВЖД+СТЗ и ВЖД.

При анализе эффектов коррекции метаболических нарушений (группа ВЖД+СТЗ+ЛКТТ) видно, что классификация групп полностью корректна при исключении следующих переменных: гомоцистеата, гомосерина, фосфоэтанолamina, ансерина, карнозина, асимметричного диметиларгинина (ADMA), симметричного диметиларгинина (SDMA), гипотаурина, цистатионина и оксализина. При этом на плоскости двух главных компонент (корень 1 и корень 2) частично перекрываются группы ВЖД и группа ВЖД+СТЗ, однако они четко различались по корню 3.

Заключение

Представляет интерес дальнейший анализ практической значимости полученных результатов; тем не менее, можно отметить хороший корригирующий эффект разработанной витаминно-аминокислотной композиции у самок и менее зна-

чимый у самцов. Предполагаем, что это может быть связано с более значительными метаболическими нарушениями липидного обмена у самцов

на фоне ВЖД, и выявленными в этих условиях особенностями изменений или отсутствия изменений метаболизма АК.

Список цитированных источников

1. Effect of α -lipoic acid and exercise training on cardiovascular disease risk in obesity with impaired glucose tolerance / A. M. McNeilly [et al.] // *Lipids Health Dis.* – 2011. – Vol. 10. – P. 217.
2. Lipoic acid synthase (LASy): a novel role in inflammation, mitochondrial function, and insulin resistance / I. Padmalayam [et al.] // *Diabetes.* – 2009. – Vol. 58, № 3. – P. 600–608.
3. Rabbani, N. Emerging role of thiamine therapy for prevention and treatment of early-stage diabetic nephropathy / N. Rabbani, P. J. Thornalley // *Diabetes Obes. Metab.* – 2011. – Vol. 13, № 7. – P. 577–583.
4. Нарушение механизмов нейрогормональной регуляции на фоне высокожировой диеты и диабета 2-го типа у самцов и самок крыс / Л. И. Надольник, В. Ч. Полубок, С. В. Лупачик, В. В. Виноградов // *Биохимия и молекулярная биология*, 2022. – Т. 1, № 1 – С 16–23.
5. Дорошенко, Е. М. Структура пула свободных аминокислот и их производных плазмы крови у пациентов с ишемической болезнью сердца и проявлениями хронической сердечной недостаточности / Е. М. Дорошенко, В. А. Снежицкий, В. В. Лелевич // *Журнал Гродненского государственного медицинского университета.* – 2017. – Т. 15, № 5. – С. 551–556.
6. Elevated plasma levels of 3-Hydroxyisobutyric acid are associated with incident Type 2 diabetes / A. Mardinoglu [et al.] // *EBioMedicine.* – 2018. – Vol. 27. – P. 151–155.

References

1. McNeilly AM, Davison GW, Murphy MH, Nadeem N, Trinick T, Duly E, Novials A, McEneny J. Effect of α -lipoic acid and exercise training on cardiovascular disease risk in

- obesity with impaired glucose tolerance. *Lipids Health Dis.* 2011 Nov 22;10:217. doi: 10.1186/1476-511X-10-217.
2. Padmalayam I, Hasham S, Saxena U, Pillarisetti S. Lipoic acid synthase (LASy): a novel role in inflammation, mitochondrial function, and insulin resistance. *Diabetes.* 2009 Mar;58(3):600–608. doi: 10.2337/db08-0473.
3. Rabbani N, Thornalley PJ. Emerging role of thiamine therapy for prevention and treatment of early-stage diabetic nephropathy. *Diabetes ObesMetab.* 2011 Jul;13(7):577–583. doi: 10.1111/j.1463-1326.2011.01384.x.
4. Nadolnik L.I., Polubok V.Ch., Lupachik S.V., Vinogradov V.V. Narushenie mehanizmov neuro-hormonalnoj regulyazii na fone vysokozurovoj diety I diabetu 2 tipa u samzov I samok krys. [*Disruption of the mechanisms of neurohormonal regulation against the background of a high-fat diet and type 2 diabetes in male and female rats*] *Biochimiya I molekularnaya biologiya.* [*Biochemistry and molecular biology*] 2022; 1(1): 16–23. (in Russian).
5. Doroshchenko E.M., Sneyzkiy V.A., Lelevich V.V. Structura puła svobodnykh aminokislot i ich proizvodnykh plazmy krovi u pazientov s ishemicheskoy boleznju serdca I proyavleniyami hronicheskoy serdechnoy nedostatochnosti. [*Structure of the pool of free amino acids and their derivatives in blood plasma in patients with coronary heart disease and manifestations of chronic heart failure*]. *Zhurnal Grodnenskogo gosy-dorstvennogo medizinskogo universiteta.* [*Journal of Grodno State Medical University*] 2017; 15(5): 551–556 (in Russian).
6. Mardinoglu A, Gogg S, Lotta LA, Stančáková A, Nerstedt A, Boren J, Blüher M, Ferrannini E, Langenberg C, Wareham NJ, Laakso M, Smith U. Elevated Plasma Levels of 3-Hydroxyisobutyric Acid Are Associated with Incident Type 2 Diabetes. *EBioMedicine.* 2018 Jan;27:151–155. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.12.008.

EFFECT OF LIPOIC ACID, THIAMINE AND TYROSINE COMPOSITION ON THE LEVELS OF FREE AMINO ACIDS IN BLOOD OF RATS WITH EXPERIMENTAL DIABETES

V. Ch. Polubok¹, E. M. Doroshenko², V. V. Vinogradov¹, L. I. Nadolnik¹

¹*Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Republic of Belarus*

²*Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus*

Introduction. The mechanisms of development of diabetes include metabolic dysfunction of various body systems. Considering the important role of amino acids (AAs) in regulation of carbohydrate metabolism, it was of interest to study the effect of an antidiabetic composition containing lipoic acid, thiamine and tyrosine (LATT) on the levels of free AAs in diabetic rats.

Objective: to assess the effect of the composition of lipoic acid, thiamine and tyrosine on the levels of free amino acids in the blood serum of rats with experimental diabetes.

Materials and methods. Diabetes was simulated by administering streptozotocin (STZ) (40 mg/kg) to female and male rats maintained on a high-fat diet (HFD). The concentration of free AAs in blood serum was determined by high-performance liquid chromatography.

Results. The HFD administration to rats changed the AA content both in females and males as compared to the control group. As opposed to HFD, males, in contrast to females, showed no differences in the levels of AAs during the progress of diabetes. A discriminant analysis demonstrated that the differences from the intact control found in experimental female rats were characterized by higher levels of alanine, glutamate, beta-alanine and

tyrosine, and lower levels of cysteate, citrulline, aspartate, methionine and hypotaurine. The application of the LATT composition normalized the glucose level and blood AA pool in females, but these effects were insignificant in males.

Conclusions. The lipoic acids-containing composition acids (LATT) had a pronounced corrective effect on the levels of AAs and glucose in diabetic female rats maintained on a high-fat diet, the effects being less pronounced in males

Keywords: experimental diabetes, high-fat diet, free amino acids, lipoic acid, thiamine, tyrosine.

For citation: Polubok VCh, Doroshenko EM, Vinogradov VV, Nadolnik LI. Effect of lipoic acid, thiamine and tyrosine composition on the levels of free amino acids in blood of rats with experimental diabetes. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2024, vol. 3, no. 1(4). pp. 74–82 (in Russian).

Поступила 15.04.2024

ПОЛНОТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ПЕЧЕНИ КРЫС, ПОЛУЧАЮЩИХ КОМПЛЕКС L-КАРНИТИНА И РЕСВЕРАТРОЛА

Н. В. Трусов, В. А. Шипелин, И. В. Гмошинский

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи,
г. Москва, Россия

Введение. Ресвератрол (Рес) и l-карнитин (L-Кар) рассматриваются в качестве биологически-активных веществ пищи, рекомендуемых для использования в диетотерапии ожирения и связанных с ним алиментарно-зависимых заболеваний.

Цель исследования. Целью исследования было изучение влияния комплекса Рес и L-Кар на экспрессию генов в печени крыс.

Материалы и методы. Крысы самцы линии Вистар получали в течение 9 нед. контрольный рацион (КР) или высокоуглеводно-высокожировой рацион (ВУВЖР) или такие же рационы с добавкой комплекса Рес и L-Кар (РК) в дозах 25 и 300 (низкая доза, РКн) или 50 и 600 мг/кг массы тела (высокая доза, РКв). Полнотранскриптомное профилирование ткани печени проводили с применением ДНК-микрочипа, содержащего последовательности 30584 генов крысы. Полученные данные подвергали биоинформатическому анализу в среде «R».

Результаты. Значимая дифференциальная экспрессия (ДЭ) выявлена для 757 генов (2,4 % от общего количества) у крыс, получавших ВУВЖР; для 296 (1,0 %) и 303 генов (1,0 %) при потреблении РКн и РКв в составе КР и для 243 (0,79 %), и 179 (0,58 %) генов при потреблении РКр и РКв в составе ВУВЖР. ДЭ генов, совместно ответивших на РКн и РКв, достоверно положительно коррелировали, тогда как корреляция между ДЭ генов, ответивших на потребление ВУВЖР и на РК в составе ВУВЖР, была отрицательной, что указывает на корректирующее действие БАД. При всех видах рационов выявлены изменения в 4 метаболических путях (KEGGs): Drug metabolism - cytochrome P450, Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450; Retinol metabolism и Steroid hormone biosynthesis.

Заключение. Результаты указывают на эффективность комбинации Рес и L-Кар в диетотерапии алиментарно-зависимых заболеваний в комплексе с базовой терапией (редуцированные по калорийности диеты, дозированная физическая нагрузка).

Ключевые слова: транскриптом, печень, экспрессия генов, крысы, ожирение, ресвератрол, l-карнитин.

Для цитирования: Полнотранскриптомный анализ печени крыс, получающих комплекс L-карнитина и ресвератрола / Н. В. Трусов, В. А. Шипелин, И. В. Гмошинский // Биохимия и молекулярная биология. – 2024. – Т. 3, № 1(4). – С. 83–88.

Введение

Транс-ресвератрол и L-карнитин рассматриваются в качестве перспективных биологически активных веществ (БАВ) для включения в специализированные диетические лечебные продукты и БАД к пище, применяемые в диетотерапии ожирения, метаболического синдрома, сахарного диабета 2-го типа и атеросклероза [1, 2]. Потребление большими такими продуктами позволяет повысить интенсивность обменных катаболических процессов, способствует резорбции жировых депо, снижению уровня липидемии и гликемии, уменьшению влечения к сладкой, высококалорийной пище, что, в совокупности, улучшает переносимость больными основного диетического лечения и повышает стойкость его результатов [3, 4]. Обоснование совместного использования указан-

ных БАВ в питании требует учета их взаимодействия в процессах модуляции экспрессии генов, отвечающих за липидный и углеводно-энергетический обмен, циркадные ритмы и пищевое поведение, для чего необходимо проведение доклинических исследований *in vivo* на биологических моделях.

Целью настоящего исследования явилось изучение в эксперименте на крысах влияния потребления комплексной БАД, содержащей транс-ресвератрол и L-карнитин, на транскриптом (совокупный профиль экспрессии генов) в клетках печени и установление эффекторных звеньев метаболизма, являющихся мишенями воздействия этого продукта, у животных в норме и на фоне диет-индуцированного ожирения.

Материалы и методы

В эксперименте использовали 6 групп по 6 самцов крыс аутбредной линии Wistar, полученных в возрасте 8 недель из питомника филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России». Работу с животными выполняли в соответствии с международными рекомендациями [5]. Дизайн эксперимента был одобрен Комитетом по этике ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» (протокол № 4 от 20.04.2017).

В начале эксперимента средняя масса тела (м.т.) в группах достоверно не различалась ($p > 0,1$; ANOVA), составляя, соответственно, 178 ± 3 ; 178 ± 2 ; 178 ± 4 ; 180 ± 3 ; 181 ± 3 и 182 ± 9 г ($M \pm m$). После 1-недельного карантина крысы группы 1 (контрольной) получали контрольный полусинтетический сбалансированный рацион (далее – КР) по ГОСТ Р 70355-2022 и очищенную обратным осмосом питьевую воду, группы 2 – КР и комплексную добавку Рес+1-Кар (далее – РК) в расчетной дозе по двум компонентам 25 и 300 мг/кг м.т.*сут соответственно (низкая доза добавки, далее – РКн), группы 3 – КР и РК в расчетной дозах 50 и 600 мг/кг м.т. соответственно (высокая доза добавки, далее – РКв), группы 4 – высокоуглеводный высокожировой рацион (далее – ВУВЖР) с повышенным до 30 % по массе сухих веществ содержанием жира и заменой питьевой воды на 20 % раствор фруктозы, группы 5 – ВУВЖР с РКн, группы 6 – ВУВЖР с РКв. Дозы БАВ контролировали по величине фактического ежедневного потребления корма. На 64-е сутки с начала кормления крыс выводили из эксперимента путем декапитации под эфирной анестезией. Образцы ткани печени отбирали стерильными хирургическими инструментами из нержавеющей стали, охлажденными до $+2$ °C на льду. Образцы немедленно замораживали и хранили до начала транскриптомного исследования при -80 °C.

Из каждой индивидуальной пробы печени выделяли тотальную РНК с помощью набора Agilent Total RNA Isolation Mini Kit (Agilent Technologies, США) по методике изготовителя [6]. Полнотранскриптомное профилирование печени проводили на микрочипах, входящих в состав Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies, США), по протоколу Agilent One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Low Input Quick Amp Labeling, version 6.8. [7]. Использовали микрочипы SurePrint G3 Rat Gene Expression v2 8x60K Microarray Kit (каталожный номер G4852A-074036), содержащие олигонуклеотидные последовательности длиной 60 нуклеотидов для 30584 генов крысы. Сканирование микро-

чипов выполняли на приборе SureScan Microarray Scanner производства Agilent Technologies. Величину дифференциальной экспрессии (ДЭ) выражали в виде логарифма по основанию 2 ($\log_2 FC$) возрастания или убывания флуоресценции по сравнению с контрольной группой или с группой, получавшей ВУВЖР.

Данные сканирования чипов загружали в среду «R» и проводили биоинформатический анализ с квантильной нормализацией и дальнейшим анализом ДЭ в пакете limma с дополнительными графическими пакетами ggplot2, ggrepel и gplots. Анализ метаболических путей проводили с использованием международной базы данных генов, метаболических путей и функций биологических систем Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [8]. Достоверность изменения экспрессии оценивали путём анализа логарифмов интенсивности флуоресценции, нормализованных по внутреннему контролю (Spike-In) с использованием T-теста с множественной коррекцией Benjamini–Hochberg. Расчет коэффициентов корреляции по Пирсону (r) и их достоверности (α) выполняли с использованием пакета программ SPSS 20.0.

Результаты и их обсуждение

Данные о влиянии ВУВЖР и добавки РК на интегральные, морфологические и биохимические показатели крыс, представленные в предыдущей работе [9], свидетельствовали о развитии фенотипа ожирения у крыс, получавших ВУВЖР.

Транскриптомное исследование показало, что для представленных на чипе генов дифференциальная экспрессия (ДЭ) при $|\log_2 FC| \geq 0,5$ была выявлена для 757 генов (2,4 % от общего количества) у крыс, потреблявших ВУВЖР. Потребление РКн вместе с КР соответствовало ДЭ 296 генов (1,0 %), а РКв – 303 генов (1,0 %). Если добавка РК потреблялась крысами в составе ВУВЖР, то при её низкой дозе (группа 5) ДЭ отмечалась для 243 генов (0,79 %), а при высокой (группа 6) – для 179 (0,58 %).

Как следует из данных, представленных на рисунке 1, а, из числа генов, ответивших ДЭ на потребление ВУВЖР, 85 генов ответили также на потребление РК вместе с ВУВЖР только при низкой дозе, 33 – только в высокой, 42 гена – при обеих дозах добавки. При потреблении добавки РК в составе как ВУВЖР, так и КР, только на низкую дозу добавки ответило 17, на высокую – 13 генов, а на обе дозы – 4 гена. Диаграмма Венна распределения по группам числа генов, ответивших на прием разных доз добавки вместе с тем, либо другим рационом, представлена на рисунке 1, б.

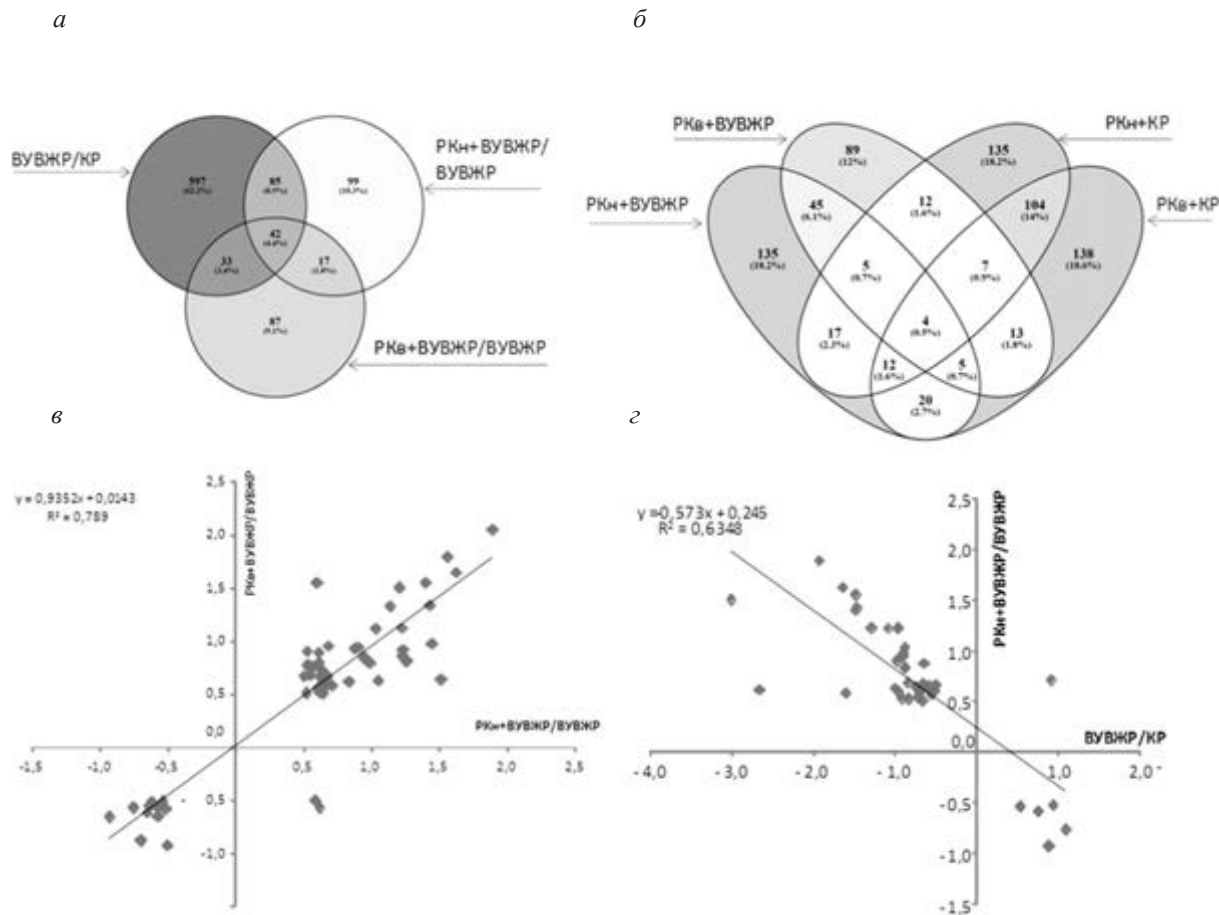


Рисунок 1 – Результаты полнотранскриптомного профилирования ткани печени крыс: *а* – диаграмма Венна распределения по числу генов, ответивших дифференциальной экспрессией на прием высокоуглеводно-высокожирового рациона двух доз комплексной добавки, содержащей транс-ресвератрол и L-карнитин; *б* – диаграмма Венна распределения по числу генов, ответивших на прием добавки в зависимости от типа основного рациона; *в* – линейная регрессия между дифференциальной экспрессией генов, ответивших на прием двух доз добавки в составе высокоуглеводно-высокожирового рациона; *г* – то же для ответа генов на высокоуглеводно-высокожировой рацион и на добавку в его составе (низкая доза)

Figure 1 – Results of full transcriptomic profiling of rat liver tissue:

a – Venn diagram of the distribution by the number of genes that responded with differential expression to the intake of a high-carbohydrate-high-fat diet of two doses of a complex supplement containing trans-resveratrol and L-carnitine; *b* – Venn diagram of the distribution of the number of genes that responded to the supplement depending on the type of main diet; *c* – linear regression between the differential expression of genes that responded to two doses of the supplement as part of a high-carbohydrate-high-fat diet; *d* – the same for the response of genes to a high-carbohydrate-high-fat diet and to an additive in its composition (low dose)

Данные корреляционного анализа, представленные на рисунке 1в, г, свидетельствуют, что для генов, ответивших ДЭ при обеих дозах РК, при потреблении вместе с ВУВЖР (рисунок 1, в), наблюдается близкая к линейной корреляция между величинами ДЭ при двух дозах добавки ($r=0,888$; $\alpha<0,001$). Аналогичная корреляция отмечается для генов, совместно ответивших на РКн и РКв на фоне потребления КР ($r=0,945$, $\alpha<0,001$). Анализ связи между величинами ДЭ генов, совместно ответивших на ВУВЖР и на РК в составе ВУВЖР, показал, что в случае РКн при этом наблюдается достоверная отрицательная корреляция (рисунок 1, г) ($r=-0,797$; $\alpha<0,001$); для РКв в составе

ВУВЖР была характерная аналогичная закономерность ($r=-0,514$; $\alpha<0,001$). Тем самым добавка РК, при её поступлении вместе с ВУВЖР, приводит к обращению или нейтрализации воздействий на транскриптом, вызываемых этим рационом.

Изменения в составе транскриптома печени крыс, вызываемые потреблением ими ВУВЖР, судя по числу ответивших генов, были значительно большими, чем обусловленные потреблением комплексной БАД. При этом перечни генов, отвечающих ДЭ на прием РК, в значительной части, не совпадали для случаев её введения в ВУВЖР и в КР.

Биоинформатический анализ позволил идентифицировать метаболические пути (KEGGs), явля-

ющиеся мишенями воздействия как ВУВЖР, так и изучаемой биологически-активной добавки РК. Результаты показывают, что потребление РК только в низкой дозе в составе КР влияет на 6 метаболических путей, только в высокой – на 4, в обеих дозах – на 7. Если добавка поступает в составе ВУВЖР, то она вносит изменения в 12 метаболических путей, если поступает в низкой дозе, 7 – в высокой, 4 – в обеих дозах. Из всего этого 4 метаболических пути: rno00982 Drug metabolism – cytochrome P450, rno00980 Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450; rno00830 Retinol metabolism и rno00140 Steroid hormone biosynthesis ответили на потребление РК в обеих дозах и при обоих рационах, а также на потребление собственно ВУВЖР по сравнению с КР. Метаболические пути rno03320 PPAR signaling pathway, rno04976 Bile secretion изменились под влиянием РК у крыс, получавших ВУВЖР, только при большой дозе добавки, а метаболический путь rno00591 Linoleic acid metabolism только при ее низкой дозе. Метаболический путь rno00380 Arachidonic acid metabolism являлся мишенью воздействия ВУВЖР и, наряду с этим, РКн, но только при потреблении в составе КР.

Более детальный анализ влияния применяемых диетических режимов на общие для них затронутые метаболические пути показал, что, в частности, в метаболическом пути rno00140 потребление ВУВЖР сопровождалось интенсификацией ряда процессов α -гидроксилирования стероидов, приводящих, в частности к образованию 20- α -hydroxypregn-20-one, 5 α -pregnane-3 α , 20 α -diol, 17 α ,20 α -dihydroxy-pregn-4-en-3-one. Противоположное действие на эти звенья оказывало потребление РКн в составе ВУВЖР. Под действием ВУВЖР наблюдалась активизация процессов глюкуронирования ряда стероидов, а прием РК менял эти эффекты на противоположные. В метаболическом пути rno00830 потребление РКв в составе ВУВЖР приводило к отмене подавления глюкуронирования all-trans-retinoate. При добавлении РКв к ВУВЖР отменяется эффект метаболического блока превращения β -каротина в all-trans-retinal. В метаболическом пути rno00980 РКв приводит к отмене подавления процесса конъюгации с глюкуроновой кислотой, наблюдавшегося под влиянием ВУВЖР. Воздействие ВУВЖР на путь превращения, катализируемый алкогольдегидрогеназой (КФ 1.1.1.1.) отменяется под действием РКн, а на путь альдегиддегидрогеназы (КФ 1.2.1.5) – под действием РКв. Аналогичные закономерности наблюдаются во влияниях РК на метаболический путь rno00982. В метаболическом пути rno00590 кормление ВУВЖР приводило к уг-

нетению образования оксипроизводных арахидоновой кислоты (липоксинов), включая 20-НЕТЕ, 5,6- 8,9-, 11,12- и 14,15-ДНЕТ.

Анализ изменений в метаболических путях (KEGGs), вызываемых ВУВЖР и РК, показал, что пути биотрансформации лекарственных препаратов и ксенобиотиков под действием системы CYP450 и конъюгирующих ферментов, метаболизма ретинола и биосинтеза стероидов являются единственными мишенями применявшихся диетических воздействий, включая как ВУВЖР, так и комплексную биологически-активную добавку. Это указывает на наличие универсальной закономерности, являющейся единой основой регуляции данных метаболических путей и состоящей в непосредственном воздействии изучаемых алиментарных факторов на регуляторные контуры ядерных транскрипционных факторов AhR, NRF2, NF- κ B, PXR/CAR, HNF4 α [10, 11]. Альтернативные пути метаболической регуляции под влиянием РК, могут быть связаны с изменениями в обмене полиненасыщенных жирных кислот, включая арахидоновую, приводящими к модификации профиля синтезируемых липоксинов (оксипроизводных), проявляющих полифункциональное действие на профили экспрессии многочисленных генов. Тот факт, что большое количество изменений в транскриптоме клеток печени, вызываемых ВУВЖР, как в отношении экспрессии отдельных генов, так и метаболических путей, обращаются после потребления комплексной БАД РК, свидетельствуют о её способности до определенной степени оказывать антиобезогенное и гиполипидемическое действие, которое также следует из результатов определения фенотипических показателей у этих же животных [9]. С другой стороны, важно отметить, что направленность изменения в профиле ДЭ генов оказывается, в значительной мере, различной у животных, получающих КР и ВУВЖР.

Заключение

Полнотранскриптомный анализ ткани печени крыс показал, что, как при анализе экспрессии отдельных генов, так и при изучении метаболических путей эффект комплексной биологически-активной добавки РК зависит, в первую очередь, от того, потребляется ли она животными с диет-индуцированным ожирением (кормление ВУВЖР) или же нормальными крысами, и, в несколько меньшей степени, от дозы добавки. Наличие отрицательной корреляции в ответе ДЭ генов на ВУВЖР и на РК в составе этого рациона указывает на наличие корректирующего действия на транскриптом. Эти закономерности указывает на то, что

использование комплекса Рес и L-Кар в диетотерапии алиментарно-зависимых заболеваний может быть эффективным в сочетании с базовой терапией, направленной на снижение жировой массы (ре-

дуцированные по калорийности диеты, дозированная физическая нагрузка) с целью улучшения ее переносимости больными и более стойкого закрепления результата лечения.

Список использованных источников

1. Modulation of tissue fatty acids by L-carnitine attenuates metabolic syndrome in diet-induced obese rats / S. K. Panchal [et al.] // *Food Funct.* – 2015. – Vol. 6, № 8. – P. 2496–2506.
2. SIRT1 Activation by resveratrol alleviates cardiac dysfunction via mitochondrial regulation in diabetic cardiomyopathy mice / S. Ma [et al.] // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2017. – Vol. 2017. – P. 4602715.
3. Natural dietary and herbal products in anti-obesity treatment / N. N. Sun, T. Y. Wu, C. F. Chau // *Molecules.* – 2016. – Vol. 21, № 10. – P. 1351.
4. Ríos-Hoyo, A. New dietary supplements for obesity: what we currently know / A. Ríos-Hoyo, G. Gutiérrez-Salmeán // *Curr. Obes. Rep.* – 2016. – Vol. 5, № 2. – P. 262–270. doi: 10.1007/s13679-016-0214-y.
5. Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes adopted on September 22, 2010.
6. Agilent Total RNA Isolation Mini Kit Protocol [Electronic resource] // Mode of access: http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/5188_2710_A1.pdf – Date of access 08 April 2024.
7. Agilent One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Low Input Quick Amp Labeling, version 6.8. [Electronic resource] // Mode of access: https://www.agilent.com/Library/packageinsert/Public/5190-2331-p_LowInput_QuickAmp_PackageInsert_C.pdf – Date of access 08 April 2024.
8. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [Electronic resource] // Mode of access: <https://www.genome.jp/kegg/> – Date of access 08 April 2024.
9. Влияние комплекса L-карнитина и ресвератрола на физиологические, биохимические и морфологические показатели крыс в норме и с алиментарным ожирением / В. А. Шипелин [и др.] // *Вопросы питания.* – 2021. – Т. 90, № 1. – С. 15–32.
10. Merrell, M. D. Drug metabolism alterations in nonalcoholic fatty liver disease / M. D. Merrell, N. J. Cherrington // *Drug Metab. Rev.* – 2011. – Vol. 43. – P. 317–334.
11. Li, X. Modulation of xenobiotic nuclear receptors in high-fat diet induced non-alcoholic fatty liver disease / X. Li, Z. Wang, J. E. Klaunig // *Toxicology.* – 2018. – Vol. 410. – P. 199–213.

References

1. Panchal SK, Poudyal H, Ward LC, Waanders J, Brown L. Modulation of tissue fatty acids by L-carnitine attenuates metabolic syndrome in diet-induced obese rats. *Food Funct.* 2015 Aug; 6(8): 2496-506.
2. Ma S, Feng J, Zhang R, Chen J, Han D, Li X, et al.. SIRT1 activation by resveratrol alleviates cardiac dysfunction via mitochondrial regulation in diabetic cardiomyopathy mice. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017: 4602715.
3. Sun NN, Wu TY, Chau CF. Natural dietary and herbal products in anti-obesity treatment. *Molecules.* 2016 Oct 11; 21(10): 1351.
4. Ríos-Hoyo A, Gutiérrez-Salmeán G. New dietary supplements for obesity: what we currently know. *Curr Obes Rep.* 2016 Jun; 5(2): 262-70.
5. Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes adopted on September 22, 2010
6. Agilent Total RNA Isolation Mini Kit Protocol. [Electronic resource]: http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/5188_2710_A1.pdf – Date of access 08 April 2024.
7. Agilent One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Low Input Quick Amp Labeling, version 6.8. [Electronic resource]: https://www.agilent.com/Library/packageinsert/Public/5190-2331-p_LowInput_QuickAmp_PackageInsert_C.pdf – Date of access 08 April 2024.
8. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). [Electronic resource]: <https://www.genome.jp/kegg/> – Date of access 08 April 2024.
9. Shipelin VA, Shumakova AA, Semin MO, Trusov NV, Balakina AS, Timonin AN, et al. Influence of the L-carnitine and resveratrol complex on physiological, biochemical and morphological indicators of normal and obese rats. *Voprosy pitanya (Problems of nutrition).* 2021 Feb; 90(1):15-32. (in Russian).
10. Merrell MD, Cherrington NJ. Drug metabolism alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Drug Metab. Rev.* 2011 Aug; 43(3):317-34.
11. Li X, Wang Z, Klaunig JE. Modulation of xenobiotic nuclear receptors in high-fat diet induced non-alcoholic fatty liver disease. *Toxicology.* 2018 Dec 1;410:199-213.

LIVER FULL TRANSCRIPTOME ANALYSIS IN RATS RECEIVING COMPLEX OF L-CARNITINE AND RESVERATROL

N. V. Trusov, V. A. Shipelin, I. V. Gmoshinski

Federal State Budgetary Scientific Institution Federal Research Center of Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow, Russia

Background. Resveratrol (Res) and l-carnitine (L-Car) are considered as biologically active food substances recommended for use in dietary therapy for obesity and related alimentary-dependent diseases.

Objective. The aim of the study was to study the effect of the Res and L-Car complex on gene expression in the liver of rats.

Materials and methods. Male Wistar rats received for 9 weeks control diet (CR) or high-fat- high-carbohydrate-diet (HFCD) or the same diets with the addition of the Res and L-Car complex (RC) at doses of 25 and 300 (low dose, RC1) or 50 and 600 mg/kg body weight (high dose, RC2). Whole transcriptome profiling of

liver tissue was performed using a DNA microarray containing the sequences of 30,584 rat genes. The obtained data was subjected to bioinformatics analysis in the “R” environment.

Results. Significant differential expression (DE) was detected for 757 genes (2.4% of the total) in rats treated with HFCD; for 296 (1.0%) and 303 genes (1.0%) when consuming RCl and RCh as part of CR and for 243 (0.79%) and 179 (0.58%) genes when consuming RCl and RCh as part of HFCD. The DE of genes that jointly responded to RCl and RCh were significantly positively correlated, while the correlation between the DE of genes that responded to the HFCD and to RC included in HFCD was negative, which indicates the corrective effect of the dietary supplement on the disturbed gene expression. With all types of diets, changes were detected in 4 metabolic pathways (KEGGs): Drug metabolism - cytochrome P450, Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450; Retinol metabolism and Steroid hormone biosynthesis.

Conclusions. The results indicate the effectiveness of the combination of Res and L-Car in the dietary therapy of nutrition-dependent diseases in combination with basic therapy (caloric-reduced diets, dosed physical activity).

Keywords: transcriptome, liver, gene expression, rats, obesity, resveratrol, l-carnitine

For citation: Trusov NV, Shipelin VA, Gmshinski IV. Liver full transcriptome analysis in rats receiving complex of L-carnitine and resveratrol. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2024, vol. 3, no. 1(4). pp. 83–88 (in Russian).

Поступила 11.04.2024

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ПОЛИМИКСИНАМ (КОЛИСТИНУ) В БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУРАХ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Ю. Л. Горбич¹, С. А. Костюк², Т. В. Руденкова²

¹ Министерство здравоохранения Республики Беларусь, г. Минск, Республика Беларусь

² УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь

Введение. *Klebsiella pneumoniae* может вызывать инфекционные процессы в организме человека, поражая различные органы и системы. Изучение механизмов, направленных на формирование устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам, является актуальной задачей современного здравоохранения.

Цель исследования – установить распространенность молекулярно-генетических маркеров устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам группы полимиксинов (колистину) в бактериальных культурах *Klebsiella pneumoniae*, полученных от пациентов с сепсисом и септическим шоком.

Материалы и методы. В бактериальных культурах *Klebsiella pneumoniae*, полученных из крови пациентов с сепсисом и септическим шоком, проводили определение молекулярно-генетических маркеров резистентности к антибактериальным лекарственным средствам группы полимиксинов (колистину). В ходе проведения исследования изучали изменения структуры гена *mgrB*, уровней нормализованной экспрессии генов *rhoP*, *rhoQ* и *pmrK*, а также проводили выявление мобильных плазмидных генетических элементов устойчивости *mcr*.

Результаты. На основании результатов проведенного исследования установлено, что гиперэкспрессия генов двухкомпонентных систем *rhoPQ* и *pmrAB* (*PhoQ* и/или *pmrK*) и изменения в структуре гена *mgrB* (инсерции или делеции) выявляются в бактериальных культурах *Klebsiella pneumoniae*, резистентных к полимиксинам (колистину). Присутствия генов семейства *mcr*, в изученных бактериальных культурах *Klebsiella pneumoniae*, не было зафиксировано.

Заключение. В ходе проведенного исследования установлены генетические маркеры, перспективные для быстрого и надежного анализа резистентности *Klebsiella pneumoniae* к полимиксинам (колистину), при принятии решения о назначении лекарственных средств в ходе этиотропной терапии у пациентов с сепсисом и септическим шоком.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, бактериальные культуры, генетические маркеры устойчивости, полимиксины (колистин), ПЦР.

Для цитирования: Идентификация молекулярно-генетических маркеров устойчивости к полимиксинам (колистину) в бактериальных культурах *Klebsiella pneumoniae* / Ю. Л. Горбич, С. А. Костюк, Т. В. Руденкова // Биохимия и молекулярная биология. – 2024. – Т. 3, № 1(4). – С. 89–95.

Введение

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) – вид условно-патогенных грамотрицательных микроорганизмов, относящихся к роду *Klebsiella*, которые могут вызывать инфекционные процессы в организме человека, поражая различные органы и системы (мочевыводящие пути, дыхательную систему, печень), а также служить этиологическим фактором сепсиса и септического шока [1].

Для лечения инфекционных процессов, обусловленных *K. pneumoniae*, применяют лекарственные средства групп аминогликозидов, карбапенемов и полимиксинов. Антибактериальные лекарственные средства группы полимиксинов (колистин) применяют в качестве препаратов «последней линии» терапии при инфицировании грамотрицательными

микроорганизмами, которые обладают множественной лекарственной резистентностью. Нефротоксичность и нейротоксичность являются тяжелыми побочными эффектами, которые наблюдаются при применении полимиксинов (колистина). Однако, колистин является центральным компонентом комбинированных антимикробных схем, которые рекомендованы для лечения тяжелых инфекций, обусловленных микроорганизмами с множественной (MDR) и экстремальной (XDR) устойчивостью. Опираясь на многолетний практический опыт применения колистина, а также учитывая новые данные о побочных и токсических эффектах, фармакокинетики и фармакодинамики, современные схемы лечения позволяют оптимизировать его использование с целью достижения максимально эффектив-

ной элиминации возбудителя при минимальных рисках для здоровья пациента со стороны побочных и токсических реакций [2].

Единственной эффективной тактикой лечения при инфицировании микроорганизмами с MDR или XDR фенотипом считается использование комбинированного подхода с назначением нескольких антибактериальных лекарственных средств, принадлежащих к различным группам. Комбинированные схемы, включающие использование карбапенемов в сочетании с колистином применяют для лечения сепсиса, обусловленного MDR и XDR штаммами *K. pneumoniae*. Несмотря на высокий уровень резистентности *K. pneumoniae* к лекарственным средствам группы карбапенемов, из-за широкого распространения генов карбапенемаз среди циркулирующих штаммов возбудителя, использование комбинированного подхода при назначении антибактериальной терапии доказало свою эффективность в клинической практике. Большую проблему представляет собой распространение штаммов *K. pneumoniae* которые наряду с устойчивостью к карбапенемам обладают и устойчивостью к полимиксинам (колистину), так как это значительно ограничивает варианты и снижает вероятность успеха противомикробной терапии [1, 2].

Лекарственные средства группы полимиксинов представляют собой амфипатические молекулы, которые в своем составе несут гидрофильные и гидрофобные фрагменты, что дает им возможность проявлять антимикробную активность. Механизм антибактериального действия полимиксинов изучен не в полной мере. Согласно общепринятой точке зрения он основан на связывании полимиксинов с липополисахаридами (ЛПС) клеточной стенки грамотрицательных микроорганизмов на начальном этапе, после чего, через ряд электростатических и гидрофобных взаимодействий, возникает дестабилизация клеточной мембраны и происходит разрушение ее структуры, в результате молекула полимиксина проникает внутрь бактериальной клетки, происходит нарушение обменных процессов и формирование осмотического дисбаланса, что в итоге вызывает гибель клетки микроорганизма [2].

У ряда микроорганизмов (*Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* и *Mycobacterium smegmatis*) был выявлен и вторичный механизм антибактериального действия полимиксинов, который заключается в ингибировании ферментов семейства никотинамидадениндинуклеотидоксидазы [1, 2].

Так как реализация противомикробного действия полимиксинов происходит посредством их взаимодействия с ЛПС, то у микроорганизмов (в том числе и у *K. pneumoniae*) основным механиз-

мом, направленным на формирование устойчивости к данным лекарственным средствам, является модификация ЛПС клеточной стенки. В основе данного процесса лежит уменьшение отрицательного заряда ЛПС, что снижает его сродство к полимиксинам (колистину). Нарушения в работе генов двухкомпонентных систем *pmgAB* и *phoPQ* или их генов-регуляторов (таких как ген *mgrB*) приводят к модификации липида А, изменяя сродство ЛПС к полимиксинам (колистину) [1, 2, 3].

Гены *phoP*, *phoQ* и *pmrK* кодируют белки двухкомпонентных систем *PhoPQ* и *pmgAB*, которые регулируют транскрипцию оперона *pmgHFJKLM*, опосредуя активацию ферментов, участвующих в модификации ЛПС, а также белков, контролирующих транспорт ионов. Ген *mgrB* выступает регулятором систем *PhoPQ* и *pmgAB*, который работает по принципу отрицательной обратной связи. Так, при инактивации гена *mgrB* (в результате изменения его структуры или делеции), происходит гиперактивация систем *PhoPQ* и *pmgAB*, что приводит к модификации ЛПС и повышению активности обменных процессов и транспорта ионов, тем самым активируя процессы адаптации микроорганизма к экстремальным условиям внешней среды [1, 3].

Впервые о выявлении плазмид-опосредованного механизма устойчивости к полимиксинам, посредством передачи гена *mcr-1* среди микроорганизмов рода *Enterobacteriaceae* в 2016 году сообщили китайские ученые. Проведенные после этого многочисленные исследования, позволили установить, что плазмидные гены *mcr* относятся к мобильным детерминантам резистентности, а их присутствие в бактериальной клетке приводит к модификации ЛПС и способствует формированию резистентности к полимиксинам (колистину). Ген *mcr-1* является наиболее распространенным вариантом данных плазмидных элементов. Механизм его действия основан на том, что он активирует синтез ферментов семейства фосфотаноламинтрансферазы, что приводит к присоединению фосфотаноламина к липиду А, модифицируя сайты связывания полимиксинов (колистина). Всего идентифицировано 10 вариантов гена *mcr* [4].

Цель работы – установить распространенность молекулярно-генетических маркеров устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам группы полимиксинов (колистину) в бактериальных культурах *Klebsiella pneumoniae*, полученных от пациентов с сепсисом и септическим шоком.

Материалы и методы

Бактериальные культуры *K. pneumoniae* были выделены из крови 351 пациента, находившихся на лечении в стационарах лечебных учреждений здравоохранения г. Минска. Возраст пациентов со-

ставил 56 (31...84) года. Среди обследованных пациентов было 209 мужчин (59,54 %) и 142 женщины (40,46 %). Включенным в исследование пациентам был установлен диагноз сепсис (n=217; 61,82 %) или септический шок (n=134; 38,18 %), вызванный карбапенем-резистентными изолятами *K. pneumoniae*.

На начальном этапе всем пациентам проводилась эмпирическая антибактериальная терапия с применением колистина (54,70 %), меропенема (31,91 %), эртапенема (22,79 %), моксифлоксацина (22,79 %), тигециклина (22,79 %), линезолида (22,79 %), ко-тримоксазола (18,23 %), имипенема (13,68 %), дорипенема (13,68 %), ванкомицина (9,12 %), цефтриаксона (9,12 %), азитромицина (4,56 %), пенициллина (4,56 %), гентамицина (4,56 %), фосфомицина (4,56 %), доксициклина (4,56 %), цiproфлоксацина (4,56 %), фурагина (4,56 %) и цефепима (4,56 %). Комбинированная антибактериальная терапия была назначена пациентам в 86,61 % случаев.

В составе этиотропной антибактериальной терапии комбинированное лечение имело место у 64,67 % пациентов. Наиболее часто назначаемыми антибактериальными лекарственными средствами были колистин (35,33%), фосфомицин (29,34 %), тигециклин (17,66 %), дорипенем (17,66 %) и эртапенем (17,66 %). Реже назначались ко-тримоксазол (11,97 %), моксифлоксацин (5,98 %), меропенем (5,98 %), ванкомицин (5,98 %), азитромицин (5,98 %), цефтриаксон (5,98 %), доксициклин (5,98 %), цiproфлоксацин (5,98 %) и цефтазидим/авибактам (5,98 %).

Бактериальные культуры *K. pneumoniae* выделяли из крови пациентов, по технологии стандартных микробиологических исследований, которые проводятся при обследовании пациентов с диагнозом «Сепсис» и/или «Септический шок». Бактериологические исследования выполнялись на базе микробиологических лабораторий УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска

и микробиологической лаборатории ГУ «Минский городской центр гигиены и эпидемиологии» с использованием автоматических бактериологических анализаторов «VITEK 2 Compact» и «VITEK VS» (bioMérieux, Франция). Для определения фенотипической чувствительности к колистину использовали метод последовательных микроразведений в бульоне Мюллера-Хинтон. Чистые культуры *K. pneumoniae* на транспортной среде доставлялась в Научно-исследовательскую лабораторию БелМАПО, где их замораживали и оставляли для хранения при температуре –18 °С.

Оценку чистоты бактериальных культур проводили с использованием автоматических микробиологических анализаторов «VITEK 2 Compact» и «VITEK VS» (bioMérieux, Франция), а также с применением метода ПЦР в режиме реального времени, для исключения присутствия микроорганизмов *Enterococcus spp.*, *Candida spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca* и *E. coli*.

Выделение РНК при исследовании бактериальных культур *K. pneumoniae* (n=351) с использованием молекулярно-биологического метода проводили с применением набора реагентов «АртРНК Магнит» (ООО «АртБиоТех», Беларусь), согласно инструкции производителя.

Определение концентрации и степени чистоты выделенной РНК проводили спектрофотометрически («NanoDrop 1000», «Thermo scientific») при длинах волн 230 и 260 нм. После оценки качества выделенной РНК, ее подвергали реакции обратной транскрипции и последующей постановке TaqMan ПЦР в режиме реального времени для амплификации целевых генов (PhoQ, PhoP, pmrK) и гена внутреннего контроля (rpsL) с использованием реагента «АртMix-RT ревертаза» (ООО «АртБиоТех», РБ), специально подобранных пар праймеров для каждого гена [5]. Последовательности праймеров представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Последовательности праймеров для определения уровней экспрессии генов PhoQ, PhoP, pmrK и rpsL *K. pneumoniae*

Table 1 – Sequences of primers for determining the expression levels of the PhoQ, PhoP, pmrK and rpsL genes of *K. pneumoniae*

Ген	Праймер	Нуклеотидная последовательность
PhoQ	Прямой (forward)	ATATGCTGGCGAGATGGGAAAACGG
	Обратный (reverse)	CCAGCCAGGGAACATCACGCT
PhoP	Прямой (forward)	ATTGAAGAGGTTGCCGCCCGC
	Обратный (reverse)	GCTTGATCGGCTGGTCATTCACC
pmrK	Прямой (forward)	CGCTGAATATGCTCGACCCAGAAG
	Обратный (reverse)	GCTGGCGGTAATCGTCTGTACG
rpsL	прямой (forward)	GCCGTACTTGGAGCGAGCCTG
	обратный (reverse)	CCGTGGCGGTCGTGTTAAAGA

Аmplification выполняли на термодиклере «Rotor-Gene-6000» («Corbett research», Австралия). Расчет процента уровня нормализованной экспрессии (% УНЭ) генов проводился по методу $\Delta\Delta Ct$ [6].

Выделение ДНК из бактериальных культур *K. pneumoniae* проводили с использованием набора реагентов «АртДНК легкий» («АртБиоТех», Беларусь). Анализ структуры гена *mgrB* осуществляли в несколько этапов. Начальную амплификацию гена выполняли с использованием специфических праймеров (forward – mgrB-EE-F – GGCTATGGCGAGGATAATGAG и reverse – mgrB-EE-R – GCTGTGATGTAAGCGTCTGGTG), мастер-микса «ArtMix Форез ДНК-полимераза» (ООО «АртБиоТех», РБ). Для амплификации использовали прибор «QuantStudio™ 3» («Thermo Fisher Scientific»). Для оценки результатов амплификации проводили анализ кривых плавления и электрофоретический анализ полученных ампликонов.

В ходе подготовки ампликонов к постановке секвенирующей ПЦР использовали набор для ферментативной очистки «ExS-Pure™» («Nimagen»). Секвенирующую ПЦР проводили с применением набора «BrilliantDye™ Terminator v3.1 Cucle Sequencing Kit» («Nimagen»). Очистку полученных фрагментов выполняли с использованием набора реагентов «iX-Pure™ Dye Terminator Cleanup Kit» («Nimagen»). Анализ фрагментов проводили с использованием генетического анализатора ABI Prism 310 («Applied biosystems»). Полученные в результате секвенирования нуклеотидные последовательности обрабатывали и сравнивали с базой нуклеотидных последовательностей GenBank (NCBI). Идентификацию встроенных в ген IS-элементов проводили на основе базы данных ISfinder.

В образцах выделенной ДНК *K. pneumoniae* проводили выявление приобретенных генов резистентности *mcr* 1-10. Для амплификации генов *mcr* использовали пары специфических праймеров (таблица 2) [7].

Амплификацию выполняли с использованием мастер-микса «ArtMix Форез ДНК-полимераза» (ООО «АртБиоТех», Беларусь). Для амплификации использовали прибор «QuantStudio™ 3» («Thermo Fisher Scientific»). Для оценки результатов амплификации дополнительно проводили анализ кривых плавления.

Оценка нормальности распределения количественных признаков проводилась графическим способом и по методу Шапиро-Уилка. Для описания частоты выявления признака приводили абсолютные (n) и относительные (%) значения. Количественные данные представляли в виде медианы

(Me) и размаха (min...max). Результаты всех этапов исследования признавались статистически достоверными, если значение ошибки 1-го рода (p) было меньше 0,05.

Таблица 2 – Последовательности праймеров для идентификации генов семейства *mcr*

Table 2 – Primer sequences for identifying genes of the *mcr* family

Название гена	Последовательность праймера
MCR-1/2/6-F	GCGTAYTCTGTGCCGTGTATG
MCR-1/2/6-R	GGTATTTGGCGGTATCGACATCA
MCR-3-F	GGTGATGATGCAAAAACGGGATA
MCR-3-R	GTCCACACGAACGAACATCA
MCR-4-F	AGGCGTTACATTGTCCCTACCT
MCR-4-R	ACGACTGGCATTCTTCGCATCT
MCR-5-F	GCCATGCTGCGGAATCTGAT
MCR-5-R	AGGGCAGCATTCTCCATTGC
MCR-7-F	ATGCCAAAGTCGTCGCCAAA
MCR-7-R	CCCCACCACCAGAAACATC
MCR-8-F	GGATGCGTGACGTTGCTATGA
MCR-8-R	GCTTTCCCCCAGCGATTCTC
MCR-9/10-F	GCAGCCATGGACCGACYTAT
MCR-9/10-R	CGATGCTCWGCCGGATAACG

Результаты и их обсуждение

В результате проведения молекулярно-генетического анализа (методом ПЦР в режиме реального времени) ДНК *K. pneumoniae* была выявлена в 348 (99,15 %) из 351 бактериальных культурах, хранившихся в лаборатории после бактериологического исследования. Эти культуры (n=348) были включены в дальнейшие исследования по выявлению молекулярно-генетических маркеров устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам группы полимиксинов (колистину).

В ходе исследования структуры гена *mgrB* в бактериальных культурах *K. pneumoniae* (n=348), с применением метода сиквенс-анализа были выявлены изменения в 138 образцах (39,66 %). С использованием методов анализа кривых плавления и электрофоретического анализа, были идентифицированы изменения структуры гена *mgrB* в 123 (35,34 %) и 107 (30,75%) образцах, соответственно. Отсутствие амплификации гена *mgrB* из-за делеции всего локуса данного гена было зафиксировано всеми методами (анализ кривых плавления, электрофоретический анализ, сиквенс-анализ) в 13,51% случаев (n=47). С применением метода сиквенс-анализа в 49 образцах (14,08%) в гене были выявлены вставки инсерционных последовательностей IS1 и IS5 (80-500 п.о.), а в 42 образцах (12,07 %) в нуклеотидной последовательности гена были зафиксированы делеции части локуса гена (таблица 3).

Таблица 3 – Результаты изучения структуры гена *mgrB* гена в бактериальных культурах *K. pneumoniae*

Table 3 – Results of the *mgrB* gene structure studying in bacterial cultures of *K. pneumoniae*

Метод анализа	Вид изменения	Количество образцов n (%)
Анализ кривых плавления	Сдвиг температуры плавления ампликонов	76 (21,84 %)
	Отсутствие амплификации специфического фрагмента	47 (13,51 %)
Электрофоретический анализ	Увеличение длины ампликона	38 (10,91 %)
	Уменьшение длины ампликона	22 (6,32 %)
	Отсутствие амплификации специфического фрагмента	47 (13,51 %)
Сиквенс-анализ	Вставка инсерционных последовательностей	49 (14,08 %)
	Делеции части локуса гена	42 (12,07 %)
	Делеция всего локуса гена	47 (13,51 %)

Частота встречаемости устойчивых к колисти-ну изолятов по результатам бактериологического исследования составила 44,44 % (n=156). Все образцы бактериальных культур, в которых были идентифицированы изменения структуры гена *mgrB* (n=138) принадлежали к колистинрезистентным изолятам, выявленным по результатам бактериологического исследования, что составило 88,46 %.

При определении уровней нормализованной экспрессии генов *PhoQ*, *PhoP*, *pmrK* для ряда образцов (n=6; 1,72 %) после этапа выделения РНК и спектрофотометрического исследования было установлено низкое содержание РНК в биологическом материале; для данных образцов на этапе анализа результатов ПЦР с обратной транскрипцией было зафиксировано отсутствие амплификации РНК гена внутреннего контроля (*rpsL* ген *K. pneumoniae*) и других исследуемых генов. Поскольку бактериальные культуры возбудителя хранились в замороженном состоянии, это могло стать причиной угнетения процессов жизнедеятельности микроорганизма и деградции РНК. При этом ДНК, выделенная из данных образцов, была пригодна как для постановки ПЦР, так и для проведения сиквенс-анализа, что объясняется более высокой стабильностью молекул ДНК. Таким образом, анализ уровней экспрессии генов *PhoQ*, *PhoP* и *pmrK* был выполнен для 342 образцов.

При анализе процента уровня нормализованной экспрессии (% УНЭ) таргентных генов *PhoQ*,

PhoP и *pmrK* в бактериальных культурах *K. pneumoniae* медиана и размах (Me (min...max)) значений составили: для гена *PhoQ* – 77,11 (1,56...869,39) %, для гена *PhoP* – 0,08 (0,00...37,83) %, для гена *pmrK* – 5,41 (0,00...153,57) %. Полученные результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Значения процента уровня нормализованной экспрессии генов *PhoQ*, *PhoP*, *pmrK* в бактериальных культурах *K. pneumoniae*

Table 4 – Percentage values of the level of the genes *PhoQ*, *PhoP*, *pmrK* normalized expression in bacterial cultures of *K. pneumoniae*

Ген	% УНЭ, %
<i>PhoQ</i>	77,11 (1,56...869,39)
<i>PhoP</i>	0,08 (0,00...37,83)
<i>pmrK</i>	5,41 (0,00...153,57)

После анализа полученных данных были выявлены образцы с гиперэкспрессией (УНЭ > 100%) гена *PhoQ* (n=149; 43,57 %) и гена *pmrK* (n=9; 2,63 %), при этом гиперэкспрессия гена *pmrK* была выявлена только в сочетании с гиперэкспрессией гена *PhoQ* (n=9). Для гена *pmrK* было зафиксировано отсутствие экспрессии в 56 проанализированных образцах (16,37 %), для гена *PhoP* отсутствие экспрессии было выявлено в 62 образцах (18,13 %). Для гена *PhoP* не было выявлено случаев гиперэкспрессии в исследованных образцах бактериальных культур *K. pneumoniae*. Полученные результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Частота выявления гиперэкспрессии и полного отсутствия экспрессии генов *PhoQ*, *pmrK* в бактериальных культурах *K. pneumoniae*

Table 5 – Frequency of the *PhoQ*, *PhoP*, *pmrK* genes overexpression and complete absence of expression detection in bacterial cultures of *K. pneumoniae*

Ген	Количество		% УНЭ, %
	n	%	
Гиперэкспрессия <i>PhoQ</i>	149	43,57	131,04 (100,70...869,39)
Гиперэкспрессия <i>pmrK</i>	9	2,63	115,67 (104,25...153,57)
Отсутствие экспрессии <i>PhoP</i>	62	18,13	0
Отсутствие экспрессии <i>pmrK</i>	56	16,37	0

Гиперэкспрессия генов PhoQ и pmrK (n=149) была выявлена только среди образцов, которые по данным бактериологического исследования были идентифицированы как устойчивые к колистину (n=156), что составило 95,51 %.

В 348 образцах ДНК, выделенной из бактериальных культур *K. pneumoniae*, в ходе исследований по выявлению генов семейства *mcr*, методом ПЦР в режиме реального времени с анализом кривых плавления, не было зафиксировано присутствия генов семейства *mcr*.

В ходе бактериологического исследования 156 культур *K. pneumoniae* были идентифицированы как резистентные к колистину. Генетические маркеры устойчивости к колистину были выявлены в 149 образцах (95,51%) колистинрезистентных бактериальных культур *K. pneumoniae*: 11 образцов – изменения только в уровне экспрессии генов (PhoQ и/или pmrK); 138 образцов – одновременное увеличение уровня нормализованной экспрессии генов (PhoQ и/или pmrK) и изменение структуры гена *mgrB*.

В тех образцах, в которых было установлено отсутствие экспрессии генов pmrK или PhoP, изменений в структуре гена *mgrB* выявлено не было, все эти изоляты по результатам бактериологического анализа были идентифицированы как чувствительные к колистину.

В бактериальных культурах *K. pneumoniae* не было выявлено присутствие генов семейства *mcr*, что позволяет сделать вывод об отсутствии плазмидопосредствованных механизмов резистентности к полимиксинам (колистину) в изученных образцах.

Заключение

Применение широкого спектра антибактериальных лекарственных средств способствует

распространению резистентных штаммов микроорганизмов. Возникновение и экспансия штаммов *K. pneumoniae* с множественной и экстремальной устойчивостью представляет серьезную проблему для общественного здоровья и здравоохранения. Разработка новых быстрых и надежных методов выявления резистентных штаммов возбудителя, позволит разработать принципы для индивидуализации лечебной тактики и усовершенствовать систему мониторинга за распространением антибиотикорезистентных штаммов.

На основании результатов проведенного исследования установлено, что гиперэкспрессия генов двухкомпонентных систем *phoPQ* и *pmrAB* (*PhoQ* и/или *pmrK*) и изменения в структуре гена *mgrB* (инсерции или делеции) выявляются в бактериальных культурах *K. pneumoniae*, резистентных к полимиксинам (колистину). Дальнейшее изучение, разработка и внедрение в лабораторную практику методов основанных на выявлении молекулярно-генетических маркеров антибиотикорезистентности, будет способствовать оптимизации и персонализации подходов к тактике выбора схем антибактериальной терапии пациентов с сепсисом и септическим шоком, а также с другими инфекционными процессами, обусловленными *K. pneumoniae*.

Практическая значимость полученных в ходе проведения исследования результатов основана на установлении генетических маркеров, перспективных для быстрого и надежного анализа резистентности *K. pneumoniae* к полимиксинам (колистину), при принятии решения о назначении лекарственных средств в ходе этиотропной терапии у пациентов с сепсисом и септическим шоком.

Список использованных источников:

1. Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., Carattoli, A. Klebsiella pneumoniae: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance / Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., Carattoli, A. // FEMS Microbiol. Rev. – 2017. – Vol. 41(3). – P. 252–275. doi: 10.1093/femsre/fux013.
2. Agents of Last Resort: An Update on Polymyxin Resistance / Q. Yang [et al.] // Infect. Dis. Clin. North. Am. – 2020. – Vol. 34, № 4. – P.723–750. doi:10.1016/j.idc.2020.08.003.
3. Cheng H. Y., Chen Y. F., Peng H. L. Molecular characterization of the PhoPQ-PmrD-PmrAB mediated pathway regulating polymyxin B resistance in Klebsiella pneumoniae CG43 / H. Y. Cheng, Y. F. Chen, H. L. Peng // J. Biomed. Sci. – 2010. – Vol. 17, № 1. – P. 60–75. doi:10.1186/1423-0127-17-60.
4. Dissemination and Mechanism for the MCR-1 Colistin Resistance / R. Gao [et al.] // PLoS Pathog. – 2016. – Vol. 12, № 11. – e1005957. doi:10.1371/journal.ppat.1005957.
5. Molecular Epidemiology of Colistin-Resistant, Carbapenemase-Producing Klebsiella pneumoniae in Serbia from 2013

to 2016 / K. Novović [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. – 2017. – Vol. 61, № 5. – P. e02550-16. doi:10.1128/AAC.02550-16.

6. Руденкова Т. В. Разработка методики определения уровня экспрессии некоторых генов семейств ABC и GST в образцах из парафин-фиксированных срезов опухолевой ткани молочной железы / Т. В. Руденкова, С. А. Костюк, Ю. Е. Демидчик, И. Ю. Третьяк // Медицинские новости. – 2014. – № 12. – С. 55–58.
7. Rapid detection and differentiation of mobile colistin resistance (*mcr-1* to *mcr-10*) genes by real-time PCR and melt-curve analysis / M. Mentasti [et al.] // J. Hosp. Infect. – 2021. – Vol. 110. – P. 148–155. doi:10.1016/j.jhin.2021.01.010.

References:

1. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. Klebsiella pneumoniae: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev. 2017;41(3):252-275. doi:10.1093/femsre/fux013.

2. Yang Q, Pogue JM, Li Z, Nation RL, Kaye KS, Li J. Agents of Last Resort: An Update on Polymyxin Resistance. *Infect Dis Clin North Am.* 2020;34(4):723-750. doi:10.1016/j.idc.2020.08.003.
3. Cheng HY, Chen YF, Peng HL. Molecular characterization of the PhoPQ-PmrD-PmrAB mediated pathway regulating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *J Biomed Sci.* 2010;17(1):60. doi:10.1186/1423-0127-17-60.
4. Gao R, Hu Y, Li Z, et al. Dissemination and Mechanism for the MCR-1 Colistin Resistance. *PLoS Pathog.* 2016;12(11):e1005957. doi:10.1371/journal.ppat.1005957.
5. Novović K, Trudić A, Brkić S, et al. Molecular Epidemiology of Colistin-Resistant, Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Serbia from 2013 to 2016. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(5):e02550-16. doi:10.1128/AAC.02550-16.
6. Rudenkova TV, Kostiuk SA, Demidchik UE, Tretiak IU. Razrabotka metodiki opredeleniya urovney ekspressii nekotorykh genov semeystv ABC i GST v obraztsakh iz parafin-fiksirovannykh srezov opukholevoy tkani molochnoy zhelezy [Procedure development for some ABC and GST family genes expression levels detection in breast cancer tissue FFPE specimens]. *Meditsinskie novosti [Medical news].* 2014;12:55-58.
7. Mentasti M, David S, Sands K, et al. Rapid detection and differentiation of mobile colistin resistance (*mcr-1* to *mcr-10*) genes by real-time PCR and melt-curve analysis. *J Hosp Infect.* 2021;110:148-155. doi:10.1016/j.jhin.2021.01.010.

IDENTIFICATION OF POLYMYXIN (COLISTIN) RESISTANCE MOLECULAR GENETIC MARKERS IN *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* BACTERIAL CULTURES

Y. L. Gorbich¹, S. A. Kostiuk², T. V. Rudenkova²

¹*Ministry of Health of the Republic of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

²*Institution of education “Belarusian state medical university”, Minsk, Republic of Belarus*

Background. *Klebsiella pneumoniae* can cause infectious processes in the human body, affecting various organs and systems. The study of mechanisms aimed at developing resistance to antibacterial drugs is an urgent task of modern healthcare

The objective of the study was to establish the prevalence of molecular genetic markers of resistance to the polymyxin group (colistin) antibacterial drugs in bacterial cultures of *Klebsiella pneumoniae* obtained from patients with sepsis and septic shock.

Materials and methods. The molecular genetic markers of resistance to antibacterial drugs of the polymyxin group (colistin) were revealed in bacterial cultures of *Klebsiella pneumoniae* obtained from the blood of patients with sepsis and septic shock. During the study, changes in the structure of the *mgrB* gene, the levels of normalized expression of the *phoP*, *phoQ*, and *pmrK* genes were studied, and *mcr* mobile plasmid genetic elements of resistance were identified.

Results. Based on the results of the study, it was found that overexpression of the genes of the two-component systems *phoPQ* and *pmrAB* (*PhoQ* and/or *pmrK*) and changes in the structure of the *mgrB* gene (insertions or deletions) are detected in *Klebsiella pneumoniae* bacterial cultures resistant to polymyxins (colistin). The presence of *mcr* family genes in the studied *Klebsiella pneumoniae* bacterial cultures was not recorded.

Conclusions. Promising genetic markers for the rapid and reliable detection of *Klebsiella pneumoniae* resistance to polymyxins (colistin) have been established; they should be used when deciding on the prescription of drugs during etiotropic therapy in patients with sepsis and septic shock.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, bacterial cultures, генетические markers of resistance, polymyxins (colistin), PCR.

For citation: Gorbich YL, Kostiuk SA, Rudenkova TV. Identification of polymyxin (colistin) resistance molecular genetic markers in *Klebsiella pneumoniae* bacterial cultures. *Biochemistry and Molecular Biology.* 2024, vol. 3, no. 1(4). pp. 89–95 (in Russian).

Поступила 09.04.2024

ИЗМЕНЕНИЯ В ГЕНАХ, УЧАСТВУЮЩИХ В ПУТЯХ Rb1 И p53, ПРИ ИНОКУЛЯЦИИ КРЫСАМ ВИРУСНОЙ ДНК И РНК

О. Е. Кузнецов¹, В. М. Цыркунов²

¹Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси, Гродно, Беларусь

²Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Введение. Изучение злокачественных новообразований, с учетом внедрения современных технологий в молекулярной биологии, не представляется полноценным без анализа роли различных вирусов в их возникновении.

Цель исследования: оценить изменения в генах, участвующих в путях Rb1 и p53 при инокуляции вирусной ДНК и РНК крысам линии Wistar.

Материал и методы. Цель реализована в экспериментальной модели на 52 взрослых самцах крыс линии Wistar путем инокуляции в брюшную полость ДНК/РНК вирусов. Мониторинг иммунологических, молекулярно-биологических и генетических показателей, отражающих состояние путей клеточного цикла, проведен после введения генетического материала вирусов.

Результаты. Установлено, что путь Rb1 нарушен посредством потери экспрессии/метиляции Rb1 и метилирования/гомозиготной делеции p16^{INK4a}, связанных с введением ДНК/РНК вирусов: HCV, HBV и VEB. Путь p53 нарушался по причине наличия мутаций p53 (30 %), либо из-за метилирования/делеции p14^{ARF} (50 %). Мутации p53 и метилирование p14^{ARF} в 40 % случаев исключали друг друга, в остальном проявлялись оба изменения (60 %).

Выводы. Изменения в клеточном цикле происходят при введении в организм животных ДНК VEB, ДНК HBV и РНК HCV. Вероятными признаками онкогенной трансформации является избыточная концентрация антиапоптотических протеинов (bcl-2) и потеря экспрессии Rb1 с метилированием промотора при контакте с вирусной ДНК/РНК, а также нарушение передачи сигналов пути p53 при наличии мутаций p53 и метилирования/делеции p14^{ARF}.

Ключевые слова: опухоль, вирус, ген, клеточный цикл, животные.

Для цитирования: Изменения в генах, участвующих в путях Rb1 и p53, при инокуляции крысам вирусной ДНК и РНК / О. Е. Кузнецов, В. М. Цыркунов // Биохимия и молекулярная биология. – 2024. – Т. 3, № 1(4). – С. 96–103.

Введение

Несмотря на установление вирусной этиологии ряда опухолей у животных и человека, доказательств прямого трансформирующего потенциала вирусов в развитии опухолевых процессов длительное время обнаружить не удавалось. Изучение злокачественных новообразований с применением современных технологий в молекулярной биологии не представляется полноценным без определения роли различных вирусов в их возникновении [1, 2].

В настоящее время в качестве онкогенных вирусов человека признаны: вирус Эпштейна-Барр (VEB), вирус гепатита В (HBV), вирус гепатита С (HCV), вирусы папиллом человека (HPV) высокого онкогенного риска, вирус Т-клеточного лейкоза человека 1-го типа (HTLV-I) и герпес-вирус, ассоциированный с саркомой Капоши (HHV-8). Последние достижения в молекулярной биологии и технологии геномного секвенирования позволили открыть новый онкогенный вирус человека – по-

лиомавирус клеток Меркеля (MCPyV), присутствующий в 80 % опухолей Меркеля, которым большинство людей заражаются до 20 лет, практически не реагируя на инфицирование [3, 4].

Характерной особенностью опухолевых заболеваний, ассоциированных с вирусами, является длительный (годы) латентный период [5, 6]. Реализация различных реакций организма происходит в первую очередь через систему протеинов клеточного цикла, направленность сдвигов которых определяется длительностью и силой действия вирусной ДНК или РНК. Хроническая вирусная инфекция создает угрозу стойкого нарушения гомеостаза с глубокими перестройками иммунологических и биохимических показателей [7, 8].

Протеины клеточного цикла Rb1 и p53 (retinoblastoma tumour-suppressor, oncogenic transcription factor) регулируются двумя отдельными белками, которые кодируются локусами генов *INK4a/ARF*. Сложная сеть сигналов связывает ак-

тивности Rb1 и p53 мониторов онкогенных стимулов для создания клеточно-автономного наблюдения за опухолью.

Протеин Rb1 ограничивает пролиферацию клеток, предупреждая переход к синтезу ДНК (S-фаза), блокируя факторы транскрипции (E2Fs) активирующих генов, которые необходимы для репликации ДНК и метаболизма нуклеотидов.

Транскрипционный фактор p53, называемый «стражем генома», выполняет функции супрессора (антионкогена) при образовании опухолей. Мутации гена-супрессора TP53 обнаруживаются в клетках около 50 % раковых опухолей человека, в которых идентифицировано почти 1000 аллелей [9]. Протеин p53 накапливается в ответ на клеточные стрессы, вызываемые повреждениями ДНК, гипоксией и активацией онкогенов. Если p53 стабилизирован и активирован, то он инициирует транскрипционную программу, запускающую или останавливающую клеточный цикл и/или гибель клетки [10].

В связи с этим важность анализа многоэтапности процессов реорганизации нормальных клеток организма, при которых нарушение гомеостатического баланса между ростом и гибелью клеток формирует опухолевые процессы, не вызывает сомнения.

Цель исследования: оценить изменения в генах, участвующих в путях Rb1 и p53 при инокуляции вирусной ДНК и РНК крысам линии Wistar.

Материалы и методы

Эксперимент проведен на 52 взрослых самцах крыс линии Wistar с начальной массой 210,1±14,9 г, находящихся на стандартном рационе питания и свободном доступе к пище и воде. Исследование одобрено Комитетом по биомедицинской этике и соответствовало правилам лабораторной практики (Международным рекомендациям по проведению биомедицинских исследований с использованием животных CIOMS, ст. XI Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации). Длительность эксперимента составили 32 недели (224 суток).

Животные были разделены на три группы. Первая (контрольная) группа состояла из интактных животных ($n=12$). Животным 2-й ($n=25$) и 3-й ($n=15$) опытных групп методом внутрибрюшинного введения 1 раз в неделю в течение 10 недель проведены инокуляции ДНК цитомегаловируса (CMV, 6 животных); вируса простого герпеса 1/2 типа (HSV 1/2, 6 животных); вируса Эпштейна-Барр (VEB, 6 животных); вируса гепатита В (HBV, 6 животных); РНК вируса гепатита С (HCV, 6 животных); микст-инокуляция ДНК CMV и VEB (5 животных), ДНК CMV и HSV1/2 (5 животных). ДНК/РНК вводилось в концентрации 32,02±28,44 мкг/мл (0,5 мл;

разведение – вода для инъекций, Борисовский ЗМП). Разведения ДНК/РНК выполнены в асептических условиях, оценка полученных концентраций выполнена при помощи спектрофотометра SPECTROstar Nano (LABTECH, Германия). Крысы контрольных групп были интактны к ДНК/РНК вирусам на протяжении всего эксперимента.

После последнего введения вирусной ДНК/РНК следовал этап инкубационного периода в 4 месяца (эквивалент 10 лет для человека). Образцы ДНК/РНК вирусов получены при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР, диагностические наборы «АмплиСенс», Россия).

На этапах эксперимента и по его окончании животных подвергали эвтаназии: декапитацию животных осуществляли на 112-е и 224-е сутки (15 животных из 2-й группы, 5 животных из контрольной группы; 10 животных из 2-й группы, 15 животных из 3-й группы, 7 животных из контрольной группы). Для анализа использовали кровь, печень и тканевый комплекс толстого кишечника животных. Образцы тканей печени (ТП) и кишечника (ТК) сохраняли до исследования в жидком азоте. Взятие крови для мониторинга иммунологических и молекулярно-биологических показателей в группах осуществляли до введения вирусной ДНК/РНК, на 112-е и 224-е сутки от начала эксперимента, из хвостовой вены животных.

Образцы крови перед исследованием обрабатывали стандартным способом: центрифугирование (центрифуга «Фенх-24М», Китай) при 3000 г в течение 10 минут. Взятие образцов крови для молекулярно-биологического исследования осуществляли с антикоагулянтом: динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА).

Объектом исследования являлись антитела к протеинам p53 и pRb1, ДНК/РНК генома вируса VEB, HBV, HCV, CMV, HSV 1/2, изменения в генах участвующих в путях Rb1 (Rb1, p16^{INK4a}) и p53 (p53, p14^{ARF}). Определение экспрессии протеина Rb1 в тканевых срезах печени выполняли при помощи метода иммуногистохимического анализа (антитела Cloud-Clone Corp., США).

Определение концентрации антител к протеинам p53 и pRb1 выполняли при помощи метода иммуноферментного анализа (ИФА) в сыворотке крови и образцах экстрактов тканей крыс (реагенты «FineTest» Wuhan Fine Biological Technology Co. Ltd, Китай) на иммуноферментном анализаторе «Mindray 96RA» (Китай).

Молекулярно-биологическое исследование выполнено на 140 образцах ДНК/РНК генома вирусов (VEB, HBV, HCV, CMV, HSV 1/2) и 10 генов, участвующих в путях Rb1 и p53. Выделение и детекция ДНК/РНК (ПЦР-анализ) проводилось согласно инструкциям (Applied Biosystems, США;

PLATINUM® Taq, GIBCO BRL, Cergy Pontoise, Франция; MagneSil Genomic, Fixed System, Promega, США; АмплиСенс, Россия). Детекция ДНК/РНК выполнена в автоматическом режиме на амплификаторе «Rotor Gene» (Германия) и анализаторе ABI PRISM™ 310 (Applied Biosystems, США) с использованием набора ABI PRISM BigDye Terminator (Perkin-Elmer Applied Biosystems). Контроль количественных и качественных характеристик ДНК/РНК – спектрофотометрический (BioPhotometer Plus, Германия).

Генетическое исследование проведено на образцах ДНК с детектированными вирусами (HSV 1/2, CMV, VEB, HCV): определяли метилирование ДНК в CpG-островках промотора гена Rb1 с помощью ПЦР, специфичной для метилирования. Модификацию бисульфитом натрия проводили с использованием набора для модификации ДНК CpGenome™ (Intergen, Великобритания) в соответствии с протоколом в модификации, предложенной Yoshihiro Edamoto и соавт. [11]. ПЦР проводили в объеме 10 мкл, содержащем ПЦР-буфер (10 mM Трис pH 8,3, 50 mM KCl), 1,5–2,0 mM MgCl₂, дНТФ (по 200 мкМ), праймеры (по 0,5 мкМ), 0,5 ЕД PLATINUM®, ДНК-полимеразы Taq, 40 нг модифицированной бисульфитом ДНК. ПЦР-амплификацию выполняли в термоциклере с денатурацией 95 °C в течение 7 мин, затем 40 циклов денатурации при 95 °C в течение 45 с, отжиг – 45 с при 60 °C (реакция метилирования и неметилирования Rb1) или при 64 °C (реакция метилирования Rb1) и удлинение в течение 45 сек при 72 °C. Считывание результата: 3 мин при 72 °C после последнего цикла. Контрольную метилированную и неметилированную ДНК обрабатывали бисульфитом. Амплифицированные продукты подвергали электрофорезу на 3 % агарозных гелях и визуализировали бромистым этидием.

ПЦР-анализ одноцепочечного конформационного полиморфизма (SSCP) и секвенирование ДНК на наличие мутаций p53 (анализ ПЦР-SSCP) выполняли в экзонах 5, 6, 7 и 8 гена p53 [13]. Праймеры для секвенирования ДНК p53: 5'-TCT GTC TCC TTC CTC TTC CTA C-3' (f) и 5'-AAC CAG CCC TGT CGT CTC TCC A-3' (r) для экзона 5; 5'-CTG GGG CTG GAG AGA CGA CA-3' (f) и 5'-GCC ACT GAC AAC CAC CCT TA-3' (r) для экзона 6; 5'-TGC CAC AGG TCT CCC CAA GG-3' (f) и 5'-GGG TCA GAG GCA AGC AGA GG-3' (r) для экзона 7; 5'-TCC TTA CTG CCT CTT GCT TC-3' (f) и 5'-TCT CCT CCA CCG CTT CTT GT-3' (r) для экзона 8. Образцы, которые демонстрировали сдвиги подвижности при анализе SSCP, анализировали секвенированием ДНК с тем же набором праймеров.

В рамках экспериментальной модели транслокации ДНК/РНК вирусов оценены изменения в генах в образцах крови животных, участвующих в путях Rb1 (Rb1, p16^{INK4a}) и p53 (p53, p14^{ARF}). Оценено метилирование/потеря экспрессии промотора Rb1, метилирование/гомозиготная делеция p16^{INK4a}, мутации p53.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием стандартного пакета прикладных статистических программ SPSS (StatSoft, Inc. STA999K347156-W). Различия между изучаемыми параметрами признавали достоверным при $p < 0,05$. Среди методов обработки использовали: среднее и среднее квадратическое отклонение; критерий Стьюдента (t), тест Манна-Уитни (U), тест Вилкоксона (Z); коэффициент корреляции Пирсона (r), Спирмена (Rs).

Результаты и их обсуждение

С увеличением сроков наблюдения фрагменты ДНК/РНК детектировались реже: РНК HCV и ДНК HBV быстрее других перестали детектироваться к 112 суткам наблюдения в крови, в ТП и ТК. Вирусная ДНК HSV 1/2 сохранялась после транслокации в крови и ткани животных до 224 суток, как и микст-персистирование ДНК CMV и VEB: в образцах крови – в 5 % случаев, в образцах тканей – в 10 % случаев.

При оценке концентрации антител к протеинам p53 и pRb1 в сыворотке крови у животных на этапе до инокуляции ДНК/РНК были установлены референтные величины: p53=3,97±3,08 нг/мл; pRb1=0,229±0,089 нг/мл. Стоит отметить, что данные значения у интактных животных не отличались на протяжении эксперимента ($p > 0,05$) и не зависели от возраста ($r=0,101$, $p=0,48$). Однако концентрации антител к p53 и pRb1 в контрольной группе животных отличались от показателей животных, которым вводилась ДНК/РНК вирусов, что доказывает влияние вирусной ДНК/РНК на клеточный цикл ($p < 10^{-5}$) [12].

Анализ корреляционных связей p53 и pRb1 показал их отсутствие в образцах животных опытных групп ($r=0,12$, $p > 0,05$), что можно объяснить наличием контроля «биохимических переключателей» и переходов между различными фазами клеточного цикла, в том числе наличие мутаций в пути p53 – переключатели поддерживают упорядоченное развитие клеточного цикла и действуют, вероятно, как контрольные точки системы биологического контроля, гарантирующие правильное завершение каждой фазы. Например, Cdk, или циклинзависимая киназа, является главным регулятором клеточного цикла и позволяет клетке переходить от G1 к S или от G2 к M путем добавле-

ния фосфата к белковым субстратам. Такие многокомпонентные (с участием множества взаимосвязанных белков) «переключатели» генерируют (вероятно, потенциально необратимые) переходы и запускают клеточные изменения [13].

При анализе результатов исследований пути Rb1 обнаружен ряд изменений: метилирование гена p16^{INK4a} в 3-х из 10 образцов (30 %, носительство ДНК HBV, VEB и РНК HCV) (таблица 1, рисунок 1).

Таблица 1 – Изменения путей Rb1, p53 после инокуляции животным ДНК/РНК вирусов

Table 1 – Changes in the Rb1 and p53 pathways after inoculation of animals with DNA/RNA viruses

ДНК / РНК	n	Путь Rb1 (изменения)			Путь p53 (изменения)			Изменения в Rb1 и p53
		p ^{16INK4a}	Мутация Rb1	Хоть одно	Мутация p53	p ^{14ARF}	Хоть одно	
HSV1/2	10	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
CMV	10	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (10%)	1 (10%)	2 (20%)
VEB	10	1 (10%)	1 (10%)	2 (20%)	1 (10%)	1 (10%)	2 (10%)	4 (40%)
HBV	10	0 (0%)	1 (10%)	1 (10%)	1 (10%)	2 (30%)	3 (30%)	4 (40%)
HCV	10	1 (10%)	1 (10%)	2 (20%)	1 (10%)	1 (20%)	2 (20%)	4 (40%)

Гомозиготная делеция гена p16^{INK4a} обнаружена в 1 случае, ассоциированной с носительством ДНК VEB, и в 1 случае – с РНК HCV. Не установлено ассоциированных с HBV-инфекцией изменений.

Мутации в генах, участвующих в путях Rb1 и p53 при инокуляции животным вирусной ДНК и

РНК, установлены после введения вирусной ДНК VEB, HBV и РНК HCV.

Метилирование промотора Rb1 в экспериментальной модели при контакте с вирусной ДНК (VEB, HBV) и РНК HCV представлено на рисунке 1.



К – 163 bp; Н – ОК; М – ПК; Н М 1 (HCV); Н М 2 (HBV); Н М 3; Н М 4 (VEB); Н М 5

Рисунок 1 – Метилирование (ПЦР промотора Rb1 в модели при контакте с вирусной ДНК/РНК): в случаях 1, 2, 4 обнаружено метилирование. К – маркер молекулярного размера; ОК – отрицательный контрольный образец, ПК – положительный контрольный образец Н — продукт реакции, амплифицированный неметилированными праймерами; М — продукт реакции, амплифицированный метилированными праймерами; NC, ОК – ДНК из контрольного образца крови животного; ПК – положительный контроль неметилированной и метилированной ДНК

Figure 1 – Methylation (PCR of the Rb1 promoter in the model upon contact with viral DNA/RNA): in cases 1, 2, 4 methylation was detected. К – molecular size marker; ОК – negative control sample, PC – positive control sample, N – reaction product amplified with unmethylated primers; M – reaction product amplified by methylated primers; NC, ОК – DNA from a control animal blood sample; PC – positive control for unmethylated and methylated DNA

Как видно на рисунке 1, метилирование промотора Rb1 установлено в 3/10 (30 %) экспериментальной модели, в частности после контакта с ДНК VEB, HBV и РНК HCV.

При сравнительной оценке экспрессии протеина Rb1 в ТП показано, что удельный вес экспрессии протеина в клетках имел наибольшую иммунореактивность в модели с введением ДНК/РНК вирусов (рисунок 2).

Удельный вес экспрессированных положительных клеток (иммунореактивность в ядрах) в модели при контакте с вирусной ДНК/РНК варьировал от 60 % до 75 %. Установлена достоверная корреляционная связь между отсутствием экспрессии

Rb1 и метилированием промотора Rb1 ($r=0,836$, $p<0,0001$).

В ранее проведенных исследованиях было отмечено, что потеря экспрессии Rb1 в значительной степени связана с метилированием промотора в аденомах гипофиза [14] и глиобластомах [15]. В нашем исследовании показано, что метилирование промотора Rb1 происходит также при контакте с вирусной ДНК/РНК, что в значительной степени связано с потерей экспрессии Rb1. Полагаем, что метилирование промотора является основным механизмом потери экспрессии Rb1 в развитии возможной опухолевой патологии.

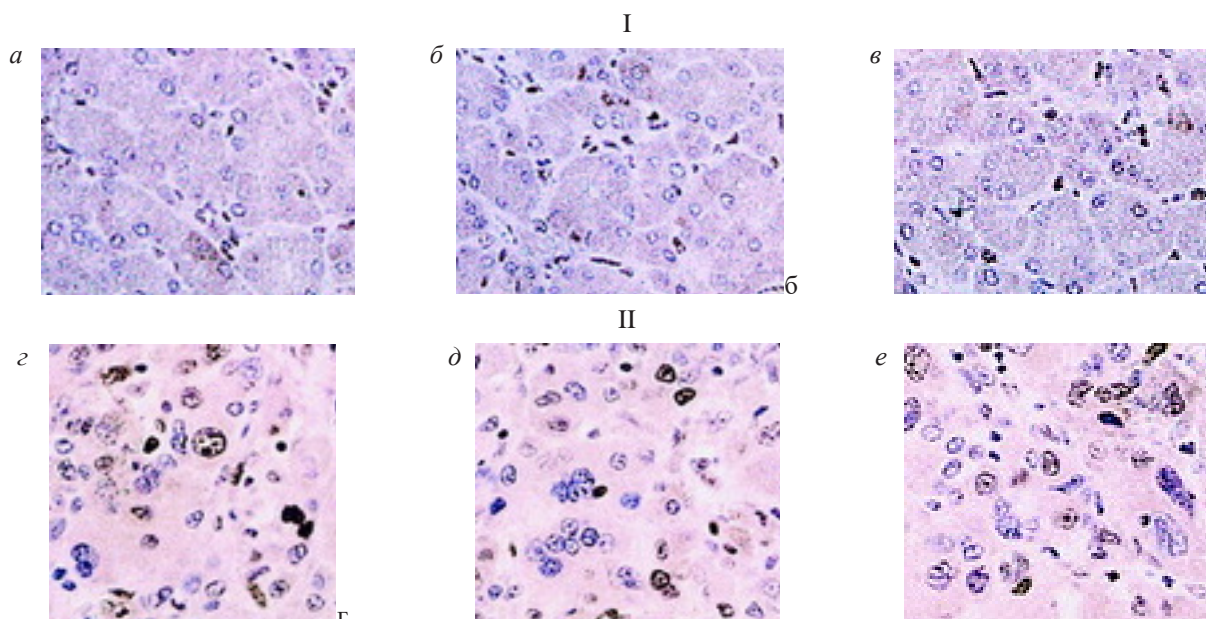


Рисунок 2 – Иммуногистохимическая оценка экспрессии протеина Rb1 в ткани печени: модель при контакте с вирусной ДНК/РНК, антитела Cloud-Clone Corp., $\times 400$: I – потеря экспрессии Rb1 в клетках (*a* – VEB, *б* – HCV, *в* – HBV), иммунореактивность эндотелиальных клетках сосудов, II – иммунореактивность в ядрах клеток (*г* – VEB, *д* – HCV, *е* – HBV)

Figure 2 – Immunohistochemical assessment of Rb1 protein expression in liver tissue: model upon contact with viral DNA/RNA, Cloud-Clone Corp. antibodies, $\times 400$: I – loss of Rb1 expression in cells (*a* – VEB, *b* – HCV, *c* – HBV), immunoreactivity in vascular endothelial cells, II – immunoreactivity in cell nuclei (*d* – VEB, *e* – HCV, *f* – HBV)

Во всех 3 образцах (контакт с ДНК VEB, HBV и РНК HCV) с метилированием промотора Rb1 отсутствовала экспрессия Rb1, и ни в одном из случаев с экспрессией Rb1 метилирование промотора Rb1 не наблюдалось, что позволяет предположить, что метилирование промотора является основным механизмом потери экспрессии Rb1 при контакте с вирусной ДНК/РНК.

Таким образом, в целом, путь Rb1 имел как минимум одно изменение ($p < 0,05$), в частности, связанное с носительством РНК HCV, ДНК HBV и ДНК VEB, и был нарушен посредством потери

экспрессии/метилования Rb1 и метилирования/гомозиготной делеции $p16^{\text{INK4a}}$, связанных с введением ДНК/РНК вирусов.

Нарушение пути p53 проанализировано в тех же образцах, в которых выполнена оценка пути Rb1. Мутации в гене *p53* обнаружены в 30 % исследуемых моделях инокуляции животным вирусной ДНК/РНК (таблица 1). Частота и тип мутаций гена *p53* не различались в моделях, ассоциированных с вирусной ДНК (VEB, HBV) и РНК (HCV), и представлены на рисунке 3.

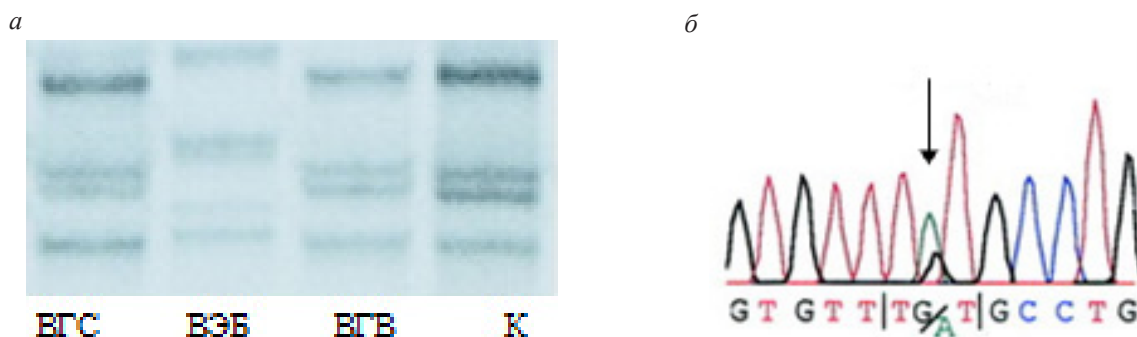


Рисунок 3 – ПЦР-анализ (*a*) и секвенирование ДНК (*б*) гена *p53*: мутация *p53* (кодирующий тринуклеотид – кодон 275, TGT→TAT, Cys→Tyr) в экспериментальной модели (ДНК HBV, ДНК VEB, РНК HCV)

Figure 3 – PCR analysis (*a*) and DNA sequencing (*b*) of the *p53* gene: *p53* mutation (encoding trinucleotide – codon 275, TGT→TAT, Cys→Tyr) in the experimental model (HBV DNA, VEB DNA, HCV RNA)

Как видно на рисунке 3, при носительстве вирусной ДНК HBV, VEB и РНК HCV обнаруживается мутация *p53*. Обнаруженная мутация *p53* в модели с инокуляцией вирусной ДНК/РНК ассоциирована с кодирующим тринуклеотидом – кодон 275, TGT→TAT, Cys→Tyr. Метилирование гена *p14^{ARF}* было обнаружено: в 1/10 (10 %) случаях ассоциированных с РНК HCV, в 2/10 (20 %) случаях ассоциированных с ДНК HBV, в 1/10 (10 %) случаев ассоциированных с ДНК CMV и в 1/10 (10 %) случаев ассоциированных с ДНК VEB. Частота метилирования гена *p14^{ARF}* в модели с РНК HCV была ниже, чем в ДНК HBV-ассоциированных процессах в 2 раза ($p=0,03$; таблица 1).

В целом, путь *p53* был нарушен по причине наличия мутаций *p53* (30 % исследуемых случаев) либо из-за метилирования/делеции *p14^{ARF}* в половине исследуемых образцов модели. Мутации *p53* и метилирование *p14^{ARF}* в 40 % случаев исключали друг друга, в остальном проявлялись оба изменения (60 %). В модели с ДНК CMV (20 %) установлено 1 изменение пути *p53*, что реже, чем в модели с ДНК HBV, ДНК VEB и РНК HCV (40 %, $p=0,03$).

Изменения пути Rb1 и *p53* были связаны в 40 % случаев с РНК HCV, ДНК HBV и ДНК VEB, в 20 % случаев – с наличием ДНК CMV и только в пути *p53*.

Таким образом, анализируя клеточный цикл, можно заключить, что протеин Rb1 контролирует переход от G1 к S-фазе клеточного цикла. Циркулирующий в организме комплекс CDK4/циклин D1 фосфорилирует белок Rb1, индуцируя, тем самым, высвобождение фактора транскрипции E2F, который активирует гены, участвующие в переходе G₁ →S [16]. Показано, что *p16^{INK4a}* связывается с CDK4, ингибирует комплекс CDK4/циклин D1 и, таким образом, ингибирует переход G₁ →S. Ген *p15^{INK4b}* и структурно высоко гомологичный *p16^{INK4a}* также связываются с CDK4, что приводит к ингибированию Rb1-опосредованного перехода G₁ →S, следовательно, нарушение пути Rb1 с последующим нарушением регуляции перехода в S-фазу может быть вызвано потерей функции *p16^{INK4a}*, амплификации CDK4, циклина D1 или потерей функции Rb1 [17]. В нашем исследовании мы обнаружили изменения пути Rb1 при контакте с вирусной ДНК/РНК за счет метилирования *p16^{INK4a}* и потери экспрессии Rb1.

Путь *p53* является важным механизмом, контролирующим фазы G₁/S клеточного цикла. После повреждения ДНК, вызванного разными причинами (в нашем исследовании – ДНК/РНК вирусов), *p53* активируется и индуцирует транскрипцию генов, таких как *p21^{Waf1/Cip1}* [18]. Кроме того, *p14^{ARF}* связывается с MDM2, что приводит к стабилиза-

ции как *p53*, так и MDM2 [19]. Следовательно, инактивация пути *p53* может быть результатом мутаций *p53*, амплификации MDM2 или потери функции *p14^{ARF}*. Показано, что путь *p53* был изменен либо за счет мутаций *p53*, либо за счет метилирования *p14^{ARF}* в 30 % случаев.

Заключение

При длительном контакте с ДНК/РНК вирусов, преимущественно ДНК VEB, ДНК HBV и РНК HCV, у экспериментальных животных формируются стойкие иммунологические и молекулярно-биологические изменения.

После введения в организм животных ДНК HBV, ДНК VEB и РНК HCV к 224 суткам наблюдения обнаруживаются мутации в генах, участвующих в путях Rb1 и *p53*, и метилирование гена *p16^{INK4a}*.

Потеря экспрессии Rb1 с метилированием промотора после контакта животных с вирусной ДНК/РНК может быть обусловлена избыточной концентрацией антиапоптотических протеинов и служить критерием ранней онкогенной трансформации.

Нарушение пути Rb1, регулирующего переход от G1 к S-фазе клеточного цикла, посредством потери экспрессии/метилирования Rb1 и метилирования/гомозиготной делеции *p16^{INK4a}*, ассоциировано с введением ДНК HBV, ДНК VEB и РНК HCV и позволяет полагать, что устранение Rb1 пути является важной частью жизни опухолевых клеток. Нарушение передачи сигналов пути *p53* зависит от наличия мутаций *p53* и метилирования/делеции *p14^{ARF}*, что является распространенным свойством опухолей.

Список использованных источников

1. DNA of Epstein-Barr virus detected in tissue of Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma / M. Nonoyama [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1973. – Vol. 70, № 11. – P. 3265–3268. doi: 10.1073/pnas.70.11.3265.
2. Butt, A.Q. Cancer and viruses: a double-edged sword / A. Q. Butt, S. M. Miggin // Proteomics. – 2012. – Vol. 12, № 13. – P. 2127–2138. doi: 10.1002/pmic.201100526.
3. Contributions of the Epstein-Barr virus EBNA1 protein to gastric carcinoma / N. Sivachandran [et al.] // J. Virol. – 2012. – Vol. 86. – P.60–68.
4. Sarid, R. Viruses and human cancer: from detection to causality / R. Sarid, S. J. Gao // Cancer Lett. – 2011. – Vol. 305. – P. 218–227.
5. Тюкавин, А. И. Опухолевый рост – современный взгляд на патогенез и фармакотерапию (лекция) / А.И. Тюкавин, С.В. Сучков // Формулы Фармации. – 2021. – Т. 3. – № 2. – С. 86–96. doi: 10.17816/phf65284.
6. Cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life years for 29 cancer groups from 2010 to 2019: a systematic analysis for the global burden of disease study 2019 (Global Burden of Disease 2019 Cancer Collaboration) // J. M. Kocarnik [et al.] // JAMA

- Oncol. – 2022. – Vol. 8. – P. 420–444. doi: 10.1001/jamaoncol.2021.6987.
7. Ge, J. Rab14 overexpression regulates gemcitabine sensitivity through regulation of Bcl-2 and mitochondrial function in pancreatic cancer / J. Ge, C. Ge. // *Virchows Arch.* – 2019. – Vol. 474. – P. 59–69. doi: 10.1007/s00428-018-2455-5.
 8. Кузнецов, О. Е. Роль протеинов NF1, p53, bcl-2, pRb в качестве диагностических маркеров при первичном раке печени на фоне носительства вирусов и мутаций генов / О. Е. Кузнецов // *Лабораторная диагностика. Восточная Европа (материалы IX Республиканского конгресса специалистов КЖД).* – 2023. – Т. 12. – № 2. – С. 103–105.
 9. Kennedy, M.C. Mutant p53: it's not all one and the same / M. C. Kennedy, S. W. Lowe // *Cell Death Differ.* – 2022. – Vol. 29. – P. 983–987. doi: 10.1038/s41418-022-00989-y.
 10. N-acetylcysteine overcomes NF1 loss-driven resistance to PI3K α inhibition in breast cancer / P. Auf der Maur [et al.] // *Cell Rep. Med.* – 2023. – Vol. 18, № 4. – P. 101–102. doi: 10.1016/j.xcrm.2023.101002.
 11. Alterations of RB1, p53 and Wnt pathways in hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C, hepatitis B and alcoholic liver cirrhosis // E. Yoshihiro [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 2003. – Vol. 106. – P. 334–341.
 12. Кузнецов, О. Е. Биохимические, иммунологические и морфологические изменения в печени и толстом кишечнике крыс после инокуляции ДНК/РНК вирусов / О. Е. Кузнецов, В. М. Цыркунов // *Гепатология и гастроэнтерология.* – 2024. – № 8. – С. 17–24.
 13. Building a cell cycle oscillator: hysteresis and bistability in the activation of Cdc2 / J. R. Pomerening [et al.] // *Nat. Cell Biol.* – 2003. – Vol. 5. – P. 346–351. doi:10.1038/ncb954.
 14. Loss of pRb expression in pituitary adenomas is associated with methylation of the RB1 CpG island / D. J. Simpson [et al.] // *Cancer Res.* – 2000. – Vol. 60. – P. 1211–1216.
 15. Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas / M. Nakamura [et al.] // *Lab. Invest.* – 2001. – Vol. 81. – P. 77–82.
 16. Buendia, M. A. Genetics of hepatocellular carcinoma / M. A. Buendia // *Semin. Cancer Biol.* – 2000. – Vol. 10. – P. 185–200.
 17. Detection of hypermethylation of the p16(INK4A) gene promoter in chronic hepatitis and cirrhosis associated with hepatitis B or C virus / H. Kaneto [et al.] // *Gut.* – 2001. – Vol. 48. – P. 372–377.
 18. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14^{ARF}, participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2 / F. J. Stott [et al.] // *EMBO J.* – 1998. – Vol. 17. – P. 5001–5014.
 18. Zhang, Y. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways / Y. Zhang, Y. Xiong, W. G. Yarbrough // *Cell.* – 1998. – Vol. 92. – P. 725–34.

References

1. Nonoyama M, Huang CH, Pagano JS, Klein G, Singh S. DNA of Epstein-Barr virus detected in tissue of Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1973 Nov;70(11):3265-8. doi: 10.1073/pnas.70.11.3265.
2. Butt AQ, Miggin SM. Cancer and viruses: a double-edged sword. *Proteomics.* 2012 Jul;12(13):2127-38. doi: 10.1002/pmic.201100526.
3. Sivachandran N, Dawson CW, Young LS, Liu FF, Middeldorp J, Frappier L. Contributions of the Epstein-Barr virus EBNA1 protein to gastric carcinoma. *J Virol.* 2012 Jan;86(1):60-8. doi: 10.1128/JVI.05623-11.
4. Sarid R, Gao SJ. Viruses and human cancer: from detection to causality. *Cancer Lett.* 2011 Jun 28;305(2):218-27. doi: 10.1016/j.canlet.2010.09.011.
5. Tyukavin, A.I., Suchkov, S.V. Opuholevyjrost – sovremennyj vzglyad na patogenez i farmakoterapiyu (lekciya). *Formuly Farmacii,* 2021; 3(2): 86–96. (Russian)doi: 10.17816/phf65284.
6. Global Burden of Disease 2019 Cancer Collaboration; Kocarnik JM, Compton K, Dean FE [et al.]. Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived with Disability, and Disability-Adjusted Life Years for 29 Cancer Groups From 2010 to 2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *JAMA Oncol.* 2022 Mar 1;8(3):420-444. doi: 10.1001/jamaoncol.2021.6987.
7. Ge J, Ge C. Rab14 overexpression regulates gemcitabine sensitivity through regulation of Bcl-2 and mitochondrial function in pancreatic cancer. *Virchows Arch.*, 2019; 474(1):59-69. doi: 10.1007/s00428-018-2455-5.
8. Kuznecov O. E. Rol' proteinov NF1, r53, bcl-2, rRb v kachestve diagnosticheskikh markerov pri pervichnom rake pecheni na fone nositel'stva virusov i mutacij genov. *Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Evropa (materialy IX Respublikanskogo kongressa specialistov KLD),* 2023; 12(2):103–105.(Russian)
9. Kennedy MC, Lowe SW. Mutant p53: it's not all one and the same. *Cell Death Differ.* 2022 May;29(5):983-987. doi: 10.1038/s41418-022-00989-y.
10. Auf der Maur P. et al. N-acetylcysteine overcomes NF1 loss-driven resistance to PI3K α inhibition in breast cancer. *Cell Rep Med.* 2023 Apr 18;4(4):101002. doi: 10.1016/j.xcrm.2023.101002.
11. Edamoto Y, Hara A, Biernat W, Terracciano L, Cathomas G, Riehle HM, Matsuda M, Fujii H, Scoazec JY, Ohgaki H. Alterations of RB1, p53 and Wnt pathways in hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C, hepatitis B and alcoholic liver cirrhosis. *Int J Cancer.* 2003 Sep 1;106(3):334-41. doi: 10.1002/ijc.11254.
12. Kuznecov, O.E., Tsyrukunov, V.M., Biohimicheskie, immunologicheskie i morfologicheskie izmeneniya v pecheni i tolstom kishechnike krysa posle inokulyacii DNK/RNK virusov. *Gepatologiya i gastroenterologiya,* 2024; 8(1):17-24. (Russian).
13. Pomerening JR, Sontag ED, Ferrell JE Jr. Building a cell cycle oscillator: hysteresis and bistability in the activation of Cdc2. *Nat Cell Biol.* 2003 Apr;5(4):346-51. doi: 10.1038/ncb954.
14. Simpson DJ, Hibberts NA, McNicol AM, Clayton RN, Farrell WE. Loss of pRb expression in pituitary adenomas is associated with methylation of the RB1 CpG island. *Cancer Res.* 2000 Mar 1;60(5):1211-6.
15. Nakamura M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. *Lab Invest.* 2001 Jan;81(1):77-82. doi: 10.1038/labinvest.3780213.
16. Buendia MA. Genetics of hepatocellular carcinoma. *Semin Cancer Biol.* 2000; 10: 185–200.
17. Kaneto H. et al. Detection of hypermethylation of the p16(INK4A) gene promoter in chronic hepatitis and cirrhosis associated with hepatitis B or C virus. *Gut.* 2001 Mar;48(3):372-7. doi: 10.1136/gut.48.3.372.
18. Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Palmero I, Ryan K, Hara E, Vousden KH, Peters G. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J.* 1998 Sep 1;17(17):5001-14. doi: 10.1093/emboj/17.17.5001.
19. Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell.* 1998 Mar 20;92(6):725-34. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81401-4.

Финансирование. Исследование проведено при финансовой поддержке Гранта Президента Республики Беларусь.

Financing. The study was performed out with financial support from the Grant of the President of the Republic of Belarus

CHANGES IN THE GENES INVOLVED IN THE RB1 AND P53 PATHWAYS WHEN INOCULATING RATS WITH VIRAL DNA AND RNA

A. E. Kuzniatsou¹, V. M. Tsyркunov²

¹*Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Belarus*

²*Grodno State Medical University, Grodno, Belarus*

Background. The study of malignant neoplasms, taking into account the introduction of modern technologies in molecular biology, does not seem complete without analyzing the role of various viruses in their occurrence.

Objective: to evaluate changes in genes involved in the Rb1 and p53 pathways upon inoculation of viral DNA and RNA in Wistar rats.

Materials and methods. The goal was realized in an experimental model on 52 adult male Wistar rats by inoculating the abdominal cavity with DNA/RNA viruses. Monitoring of immunological, molecular biological and genetic parameters reflecting the state of the cell cycle pathways was carried out after the introduction of the genetic material of the viruses.

Results. The Rb1 pathway was found to be disrupted through the loss of expression/methylation of Rb1 and methylation/homozygous deletion of p16INK4a associated with the introduction of DNA/RNA viruses and had at least one change in the Rb1 pathway ($p < 0.05$): associated with carriage of HCV RNA, with HBV DNA and with VEB DNA. The p53 pathway was disrupted due to the presence of p53 mutations (30 %) or due to p14^{ARF} methylation/deletion (50 %). p53 mutations and p14^{ARF} methylation were mutually exclusive in 40% of cases; otherwise, both changes were present (60 %).

Conclusions. Significant changes in the cell cycle occur when VEB, HBV DNA and HCV RNA are introduced into the animal body. Probable signs of oncogenic transformation are an excessive concentration of anti-apoptotic proteins (bcl-2) and the loss of Rb1 expression with promoter methylation upon contact with viral DNA/RNA, as well as impaired p53 signaling in the presence of p53 mutations and p14^{ARF} methylation/deletion.

Keywords: tumor, virus, gene, cell cycle, animals.

For citation: Kuzniatsou AE, Tsyркunov VM. Changes in the genes involved in the Rb1 and p53 pathways when inoculating rats with viral DNA and RNA. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2024, vol. 3, no. 1(4). pp. 96–103 (in Russian).

Поступила 14.03.2024

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КРЫС-САМЦОВ ВИСТАР В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ СКЛОННОСТИ К ДИЕТ-ИНДУЦИРОВАННОМУ ОЖИРЕНИЮ

Т. А. Митюкова, Е. Н. Чудиловская, А. А. Басалай, О. Е. Полулях

Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

Введение. В современной литературе рассматривается вопрос о таких фенотипических проявлениях как склонность либо резистентность к ожирению у животных одной генетической линии, что представляет большой научный и практический интерес.

Цель исследования – провести оценку физиологических и метаболических показателей, тиреоидного статуса и поведения у крыс-самцов Вистар, получавших высококалорийную диету, в зависимости от их склонности к диет-индуцированному ожирению.

Материалы и методы. Экспериментальная работа проведена на крысах-самцах Вистар. Группа контроля (n = 22) на протяжении 16 недель получала стандартную диету вивария (СтД), а опытная группа (n = 32) – высококалорийную диету (ВКД). В группе «ВКД» методом ранжирования были выделены две подгруппы – склонные (СО) и резистентные (РО) к ожирению.

Результаты. Крысы «РО» имели массу тела близкую к контролю, а крысы «СО» – максимально высокую. Накопление висцерального жира в общей группе «ВКД» и в подгруппах «СО» и «РО» было достоверно выше, чем в контроле, но преобладало у крыс «СО». Метаболические, гормональные и поведенческие характеристики животных в подгруппах «СО» и «РО» не имели резко выраженных различий.

Заключение. В большинстве случаев все метаболические, гормональные и поведенческие сдвиги были обусловлены воздействием ВКД и нарастанием массы висцерального жира независимо от массы тела.

Ключевые слова: крысы-самцы, высококалорийное питание, склонность либо резистентность к ожирению.

Для цитирования: Метаболические и физиологические характеристики крыс-самцов вистар в зависимости от их склонности к диет-индуцированному ожирению / Т. А. Митюкова, Е. Н. Чудиловская, А. А. Басалай, О. Е. Полулях // Биохимия и молекулярная биология. – 2024. – Т. 3, № 1(4). – С. 104–110.

Введение

Известно, что ожирение вызывает широкий спектр серьезных осложнений для здоровья, включая патологию печени, поджелудочной железы, сердечно-сосудистые заболевания, и целый ряд нейроэндокринных расстройств, увеличивает риск преждевременных заболеваний и даже смерти. По данным ВОЗ, основными причинами ожирения среди населения являются генетическая отягощенность и образ жизни [1]. Ожирение зачастую развивается на фоне пристрастия к избыточной и высококалорийной пище, а также на фоне снижения физической активности. Однако современные экспериментальные исследования затрагивают и другие аспекты развития ожирения. В частности, показаны фенотипические особенности у животных одной и той же генетической линии, например, у крыс линии Спрэг-Дули или Вистар, которые проявляются как склонность либо резистентность к ожирению при одинаковом свободном доступе к высококалорийной пище с сопоставимой калорийностью. Высказывается предположение, что животные, склонные к ожирению, отличаются не столько гиперфагией, сколько сниженным основ-

ным обменом и сниженным уровнем центральных норадренэргических процессов [2]. Феномен склонности либо резистентности к ожирению, безусловно, заслуживает особого внимания, поскольку он отчетливо проявляется у людей и исчерпывающего объяснения пока не находит.

Исходя из вышеизложенного, представляло интерес оценить накопление висцерального жира, являющегося главным источником адипокинов и интерлейкинов, участвующих в развитии инсулинорезистентности при ожирении [3], а также показатели метаболического синдрома, характеризующие специфические проявления ожирения. Функциональная активность щитовидной железы (ЩЖ) предположительно тоже может внести свой вклад в феномен склонности, либо резистентности к ожирению, поскольку гормоны щитовидной железы влияют на все основные метаболические пути в организме [4]. Большой интерес представляют сведения об изменениях активности нейромедиаторных систем мозга у крыс, склонных к ожирению [5, 6]. Эти нейромедиаторные системы ответственны за эмоциональный статус и двигательную активность животных, поэтому представлялось целе-

сообразным изучить некоторые поведенческие реакции крыс в условиях избыточного питания и в зависимости от склонности к ожирению.

Цель работы – провести оценку физиологических и метаболических показателей, тиреоидного статуса и поведения у крыс-самцов Вистар, получавших высококалорийную диету, в зависимости от их склонности к диет-индуцированному ожирению.

Материалы и методы

Экспериментальная работа была проведена на половозрелых крысах-самцах Вистар с соблюдением положений Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123). Крысы группы контроля ($n = 22$) на протяжении 16 недель получали стандартную диету вивария (СтД), а опытной группы ($n = 32$) – высококалорийную диету (ВКД). Модель ВКД включала стандартный рацион вивария с добавлением жиров животного происхождения (свиное сало, 45 % от суточной калорийности рациона) и углеводов (питьевая вода замещалась на 10 % раствор фруктозы) [7]. Калорийность СтД составляла в среднем 150 ккал на 1 животное в сутки, а ВКД – 230 ккал соответственно.

Оценка индивидуальной склонности к ожирению. Животные, имеющие свободный доступ к ВКД, ранжировались по методу E. D. Giles et al. [2]. Крысы с максимальной массой тела, примерно 1/3 часть животных, – расценивались, как склонные к ожирению (СО), а с минимальной массой тела, примерно 1/3, – как резистентные к ожирению (РО).

Тест на гликемическую нагрузку или глюкозотолерантный тест (ГТТ). Уровень глюкозы (ммоль/л) измеряли, используя глюкометр «Сателлит экспресс» (Россия). Первое измерение – с утра натощак, затем крысам вводили 40 % раствор глюкозы внутривенно (2 г/кг). После инъекции проводили измерения уровня глюкозы в крови через 30, 60 и 90 минут.

Неинвазивное измерение систолического артериального давления (САД) у крыс осуществлялось с использованием компьютеризированной установки PanLab (Испания) и программного обеспечения NIBPChart с предварительной адаптацией животных к измерению. Замеры повторяли трехкратно с выведением среднего значения.

Тест Порсолта (оценка депрессивности) проводился на заключительном этапе эксперимента. Продолжительность вынужденного плавания крысы в сосуде с водой составляло 6 минут. Оценивали время активного плавания, количество и длительность замираний. Наиболее показательным является длительность первого периода активного плавания.

Выведение наркотизированных животных из эксперимента осуществляли путем декапитации с последующим забором крови. Выделяли и взвешивали щитовидную железу (ЩЖ) и висцеральную жировую ткань (паранефральные и эпидидимальные жировые отложения).

Биохимические показатели: общий холестерин (ОХ), триглицериды (ТГ) и глюкозу в сыворотке крови определяли ферментативными методами на автоматическом биохимическом анализаторе BS-200 (Китай) с программным обеспечением BS-300 с использованием наборов «Диасенс» (Беларусь).

Показатели тиреоидного статуса: общий и свободный трийодтиронин (Т3 и св. Т3), общий и свободный тироксин (Т4 и св. Т4) в сыворотке крови определяли с использованием ИФА-наборов «ХЕМА» (Россия), тиреотропный гормон (ТТГ) – с использованием ИФА-наборов Fine Test (Китай). Определение активности тиреопероксидазы (ТПО) в ткани ЩЖ проводили спектрофотометрическим методом [8].

Статистическую обработку данных проводили с использованием параметрических либо непараметрических методов статистики в зависимости от нормального либо не нормального распределения величин (Statistica 10.0). Соответственно результаты выражали в виде средних величин и ошибки средней ($X \pm Sx$) либо в виде медиан и процентилей (Me [25; 75]). Сравнение между группами проводили с использованием t-критерия Стьюдента, либо U-критерия Манна-Уитни, достоверным считали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Оценка массы тела животных в конце 16-недельного эксперимента показала, что у крыс группы «ВКД» наблюдается тенденция к нарастанию массы тела по сравнению с контрольными животными, однако, этот показатель имеет большой разброс индивидуальных значений (рисунок 1). После ранжирования крыс группы «ВКД» по массе тела [2] были выделены подгруппы «СО» ($n=10$) и «РО» ($n=10$). Крысы «РО» имели массу тела, сопоставимую с контролем, а подгруппы «СО» имели значительно более высокую массу тела (рисунок 1).

У крыс группы «ВКД» отмечалось значимое нарастание массы висцерального жира по сравнению с контролем. При этом у животных «СО» отмечено значимое увеличение массы висцерального жира по сравнению с контрольной группой и подгруппой «РО». Интересно, что достоверное увеличение массы висцеральной жировой ткани по сравнению с контролем было обнаружено, как у крыс «СО», так и «РО» (таблица 1).

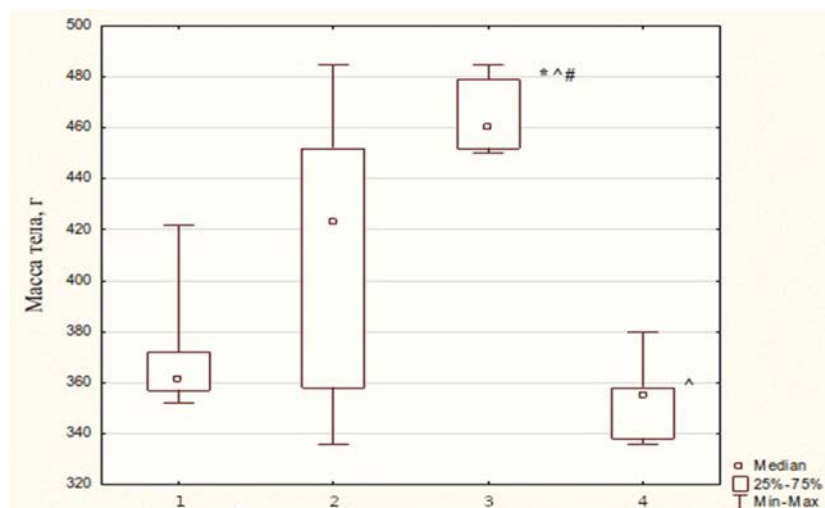


Рисунок 1 – Масса тела крыс-самцов по окончании эксперимента: 1 – группа «СтД», 2 – группа «ВКД», 3 – подгруппа «СО», 4 – подгруппа «РО». Статистически значимые различия при $p < 0,05$: * – от группы «СтД», ^ – от группы «ВКД», # – от подгруппы «РО»

Figure 1 – Body weight of male rats at the end of the experiment: 1 – “StD” group, 2 – “HCD” group, 3 – “PO” subgroup, 4 – “RO” subgroup. Statistically significant differences at $p < 0.05$: * – from the “StD” group, ^ – from the “HCD” group, # – from the “RO” subgroup

Таблица 1 – Масса висцеральной жировой ткани у экспериментальных крыс

Table 1 – Mass of visceral adipose tissue in experimental rats

Показатель	Группы			
	СтД (n = 22)	ВКД (n = 32)	ВКД	
			СО (n = 10)	РО (n = 10)
Масса висцеральной жировой ткани, г	5,63 [4,81; 6,28]	22,09 [17,08; 25,35] *	25,42 [25,06; 33,97] *#	17,08 [13,76; 18,15] *

Примечание: статистически значимые различия при $p < 0,05$: * – от группы «СтД», # – от подгруппы «РО»

Note: Statistically significant differences at $p < 0.05$: * – from the “StD” group, # – from the “RO” subgroup

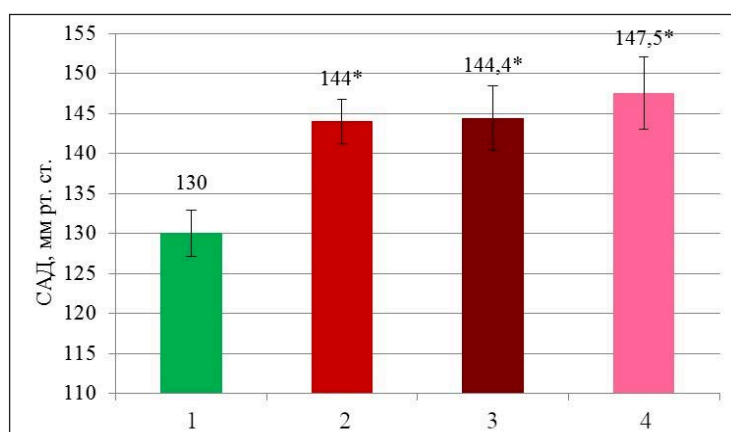


Рисунок 2 – Систолическое артериальное давление у крыс-самцов: 1 – группа «СтД», 2 – группа «ВКД», 3 – подгруппа «СО», 4 – подгруппа «РО». Статистически значимые различия при $p < 0,05$: * – от группы «СтД»

Figure 2 – Systolic blood pressure in male rats: 1 – «StD» group, 2 – «HCD» group, 3 – «PO» subgroup, 4 – «RO» subgroup. Statistically significant differences at $p < 0.05$: * – from the «StD» group

Оценка систолического артериального давления (САД) показала, что у животных, получавших ВКД, независимо от склонности либо резистентности к ожирению, этот показатель достоверно повышен по сравнению с группой контроля (рисунок 2).

Далее было проведено определение ОХ, ТГ и глюкозы в сыворотке крови крыс (таблица 2). Определение ОХ в сыворотке крови крыс не выявило значимых отличий между группами «СтД» и «ВКД». Показано существенное увеличение уровней ТГ в сыворотке крови у крыс группы «ВКД», включая как «СО», так и «РО» по сравнению с контролем. Значимое повышение уровня глюкозы было отмечено у крыс группы «ВКД» и подгруппы «РО» по сравнению с уровнем контроля.

Таблица 2 – Биохимические показатели крови у экспериментальных крыс

Table 2 – Blood biochemical parameters in experimental rats

Показатель	Группы			
	СтД (n = 22)	ВКД (n = 32)	ВКД	
			СО (n = 10)	РО (n = 10)
ОХ, ммоль/л	1,50 [1,20; 1,60]	1,60 [1,50; 1,70]	1,70 [1,40; 1,70]	1,60 [1,60; 1,70]
ТГ, ммоль/л	0,57 [0,42; 0,70]	0,89 [0,77; 1,13] *	1,03 [0,77; 1,13] *	0,82 [0,75; 0,83] *
Глюкоза, ммоль/л	5,20 [4,80; 6,10]	7,10 [6,30; 7,30] *	7,00 [6,70; 7,20]	7,10 [6,30; 7,30] *

Примечание: статистически значимые различия при $p < 0,05$: * – от группы «СтД»

Note: Statistically significant differences at $p < 0.05$: * – from the “StD” group

Результаты глюкозотолерантного теста представлены на рисунке 3. Через 30 и 60 мин после инъекции глюкозы ее содержание в крови у крыс контрольной группы повышалось в 2,2 и 1,6 раз соответственно, а через 90 мин проявлялась тенденцию к снижению. Максимальное повышение уровня глюкозы через 30 минут наблюдалось у крыс «СО», превышая в 1,73 раза значения в группе «СтД» на этом интервале времени. У крыс группы «ВКД» и подгруппы «РО» повышение уровня глюкозы в крови через 30 мин также носило выраженный характер и превышало значения «СтД» в 1,63 и 1,65 раза соответственно. По истечении 60 мин у животных группы «ВКД» и подгруппы «СО» уровень глюкозы в крови оставался достоверно выше, чем в группе «СтД», причем наиболее высокий уровень отмечался у крыс «СО» – 11,3 ммоль/л. Через 90 минут уровень глюкозы в крови крыс был достоверно увеличен как в группе «ВКД», так и в подгруппах «СО» и «РО» относительно контроля. Полученные данные демонстрируют, что у всех крыс группы ВКД было выявлено сопоставимое нарушение толерантности к глюкозе.

В таблице 3 представлены показатели тиреоидного статуса у крыс экспериментальных групп. Содержание общего Т4 значимо нарастало при высококалорийном питании вне зависимости от склонности к ожирению. Аналогичные сдвиги Т3 наблюдались в группах «ВКД» и «СО». Что касается свободных фракций гормонов, то их содержание в сыворотке крови не отличалось от контроля.

Определение уровня ТТГ продемонстрировало его достоверное нарастание в группах «ВКД» и «РО». Повышение

уровня ТТГ и функциональной активности щитовидной железы (ЩЖ) при высококалорийном питании и ожирении согласуется с литературными данными [9]. Известно, что лептин взаимодействует с рецепторами аркуатного и паравентрикулярного ядер гипоталамуса и стимулирует выработку тиротропинрелизинг гормона (ТРГ), в результате чего активируется ось гипоталамус-гипофиз-ЩЖ при ожирении. Усиленный выброс тиреоидных гормонов в кровь, по-видимому, носит адаптивный характер, направленный на активацию основного обмена при повышенной калорийности питания.

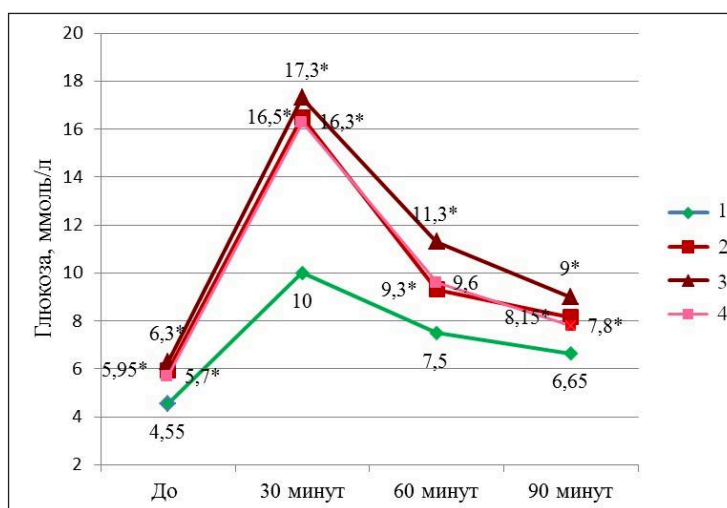


Рисунок 3 – Динамика срединного уровня (медиана) глюкозы в крови у крыс при проведении глюкозотолерантного теста: 1 – группа «СтД», 2 – группа «ВКД», 3 – подгруппа «СО», 4 – подгруппа «РО». Статистически значимые различия при $p < 0,05$: * – от группы «СтД»

Figure 3 – Dynamics of the median level of blood glucose in rats during the glucose tolerance test: 1 – “StD” group, 2 – “HCD” group, 3 – “PO” subgroup, 4 – “RO” subgroup. Statistically significant differences at $p < 0.05$: * – from the “StD” group

Неожиданными были данные, констатирующие существенное снижение активности ТПО в группе животных, получавших ВКД (таблица 3). Эти результаты можно объяснить с точки зрения феномена липотоксичности и окислительного стресса. Ранее нами было показано значимое нарастание содержания триглицеридов и МДА в ткани ЩЖ

[10]. Данные литературы также свидетельствуют о том, что в ЩЖ крыс, получавших свиное сало, наблюдается повышение содержания триглицеридов и существенное снижение уровня белков, связанных с синтезом тиреоидных гормонов – ТТФ-1 (тиреоидный фактор транскрипции) и NIS (sodium iodide symporter – транспортер ионов Na^+/I^-) [11].

Таблица 3 – Показатели тиреоидного статуса у экспериментальных крыс

Table 3 – Parameters of thyroid status in experimental rats

Показатель	Группы			
	СтД (n = 22)	ВКД (n = 32)	ВКД	
			СО (n = 10)	РО (n = 10)
Свободный Т3, пкмоль/л	5,60 [5,20; 5,70]	5,70 [5,10; 6,00]	6,00 [5,10; 6,20]	5,60 [5,10; 5,70]
Свободный Т4, пкмоль/л	19,70 [19,40; 24,90]	22,00 [19,50; 23,90]	20,40 [19,50; 22,30]	22,30 [21,60; 23,90]
Общий Т3, нг/мл	0,83 [0,81; 0,95]	1,34 [1,22; 1,57] *	1,44 [1,33; 1,57] *	1,40 [1,16; 1,61]
Общий Т4, нмоль/л	55,50 [47,60; 68,30]	80,80 [70,20; 90,30] *	81,50 [70,20; 82,00] *	86,00 [79,90; 90,30] *
ТТГ, нг/мл	5,97 [4,99; 11,33]	12,37 [10,85; 14,64] *	11,50 [8,74; 13,05]	10,85 [10,85; 13,49] *
ТПО, МЕ/мг белка	0,69 [0,31; 0,82]	0,40 [0,22; 0,49] *	0,37 [0,30; 0,43]	0,49 [0,44; 0,53]

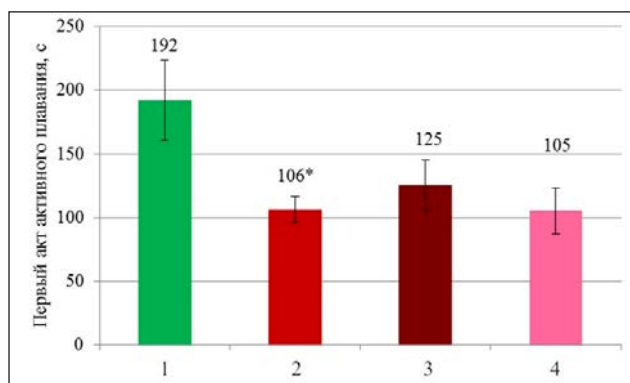
Примечание: статистически значимые различия при $p < 0,05$: * – от группы «СтД»

Note: Statistically significant differences at $p < 0.05$: * – from the “StD” group

Результаты теста Порсолта (тест на депрессивность) показали, что у крыс группы «ВКД» наблюдается достоверное сокращение первого акта ак-

тивного плавания и увеличение времени замираний по отношению к группе контроля (рисунки 4 а, 4 б).

а



б

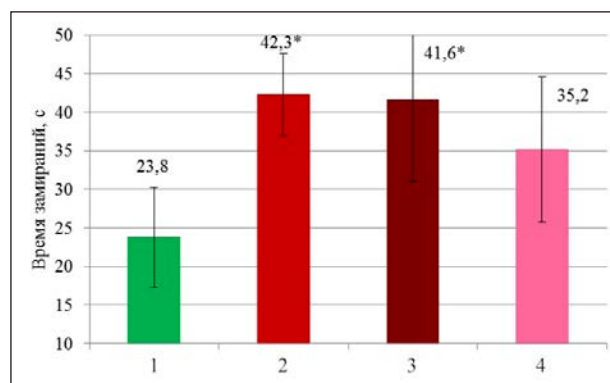


Рисунок 4 – Результаты теста Порсолта:

а – длительность первого акта активного плавания, б – время замираний: 1 – группа «СтД», 2 – группа «ВКД», 3 – подгруппа «СО», 4 – подгруппа «РО». Статистически значимые различия при $p < 0,05$: * – от группы «СтД»

Figure 4 – Porsolt test results:

а – duration of the first act of active swimming, б – freezing time: 1 – “StD” group, 2 – “HCD” group, 3 – “PO” subgroup, 4 – “RO” subgroup. Statistically significant differences at $p < 0.05$: * – from the “StD” group

В свою очередь, у подгруппы крыс «СО» наблюдалось достоверное увеличение времени замираний по сравнению с контрольными животными,

тогда как у крыс «РО», время замираний не отличалось от группы «СтД». Полученные данные указывают на повышение депрессивности у живот-

ных общей группы ВКД, а также на максимальную выраженность депрессивности у животных, склонных к ожирению.

Заключение

Результаты проведенных исследований подтверждают, что крысы-самцы Вистар, получавшие ВКД, отличаются по склонности либо резистентности к ожирению. Это позволяет их ранжировать на подгруппы по массе тела («СО» и «РО»). Накопление висцеральной жировой ткани больше выражено в подгруппе «СО», чем «РО», хотя у крыс обеих подгрупп данный показатель значительно отличается от контроля.

Повышение САД по сравнению с контролем было практически одинаково выражено в общей группе «ВКД» и в подгруппах крыс «СО» и «РО».

Определение биохимических показателей крови выявило достоверное нарастание уровней триглицеридов у крыс, получавших высококалорийное питание, независимо от склонности либо резистентности к ожирению. Содержание глюкозы повышалось в группах «ВКД» и «РО». Результаты глюкозотолерантного теста подтвердили, что на

фоне ВКД у крыс развивается нарушение толерантности к глюкозе, не зависящее от степени нарастания массы тела.

Определение уровня ТТГ продемонстрировало его достоверное нарастание в группах «ВКД» и «РО». Содержание общего Т4 достоверно нарастало при высококалорийном питании вне зависимости от склонности к ожирению, содержание общего Т3 повышалось в общей группе «ВКД» и «СО». Значимое снижение активности ТПО было выявлено только в общей группе животных, получавших ВКД.

Результаты теста Порсолта указывают на наличие депрессивности у животных общей группы «ВКД», а также у склонных к ожирению животных этой группы. У крыс, резистентных к ожирению, эти поведенческие проявления были выражены слабее.

Очевидно, что выявленные сдвиги обусловлены воздействием избыточного высококалорийного питания. Определяющее значение имело значимое нарастание массы висцерального жира у всех животных, получавших высококалорийное питание.

Список цитированных источников

1. Prevalence of obesity among adults obesity [Electronic resource] // World Health Organization. – Mode of access: http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight_obesity/adults/en/. – Date of access: 22.02.2024.
2. Modeling diet-induced obesity with obesity-prone rats: implications for studies in females / E. D. Giles [et al.] // *Front. Nutr.* – 2016. – Vol. 3. – P. 50–60.
3. Adipokines: linking metabolic syndrome, the immune system, and arthritic diseases / V. Francisco [et al.] // *Biochemical Pharmacology.* – 2019. – Vol. 165. – P. 196–206.
4. Pucci, E. Thyroid and lipid metabolism / E. Pucci, L. Chiovato, A. Pinchera // *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* – 2000. – P. 109–112.
5. Catecholaminergic projections into an interconnected forebrain network control the sensitivity of male rats to diet-induced obesity / S. J. Lee [et al.] // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2018. – Vol. 314. – P. 811–823.
6. Li, A-J. Activation of catecholamine neurons in the ventral medulla reduces CCK-induced hypophagia and c-Fos activation in dorsal medullary catecholamine neurons / A-J. Li, Q. Wang, S. Ritter // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2018. – Vol. 315. – P. 442–452.
7. Experimental models of metabolic syndrome in rats / S. Gancheva [et al.] // *Scripta Scientifica Medica.* – 2015. – Vol. 47, № 2. – P. 14–21.
8. Митюкова, Т. А. Определение активности тиреопероксидазы в ткани щитовидной железы (экспериментальное исследование) / Т. А. Митюкова, Е. Н. Чудиловская, А. С. Мигалевич // *Лабораторная диагностика. Восточная Европа.* – 2020. – Т. 9, № 3. – С. 285–293.
9. Mechanisms in endocrinology: the crosstalk between thyroid gland and adipose tissue: signal integration in health and disease / F. Santini [et al.] // *European Journal of Endocrinology.* – 2014. – Vol. 171, no. 4. – P. R137–R152.

10. Морфологические и функциональные характеристики щитовидной железы при диет-индуцированном ожирении и его коррекции у крыс самцов Вистар / Т. А. Митюкова [и др.] // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* – 2023. – Т. 67, № 4. – С. 47–55.
11. Dietary high-fat lard intake induces thyroid dysfunction and abnormal morphology in rats / S. Shao [et al.] // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2014. – Vol. 35. – P. 1411–1420.

References

1. Prevalence of obesity among adults obesity [Electronic resource]. World Health Organization [cited 2024 February 22]. Available from: http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight_obesity/adults/en/.
2. Giles ED, Jackman MR, MacLean PS. Modeling diet-induced obesity with obesity-prone rats: implications for studies in females. *Frontiers in Nutrition.* 2016 Nov 24;3:50-60. doi: 10.3389/fnut.2016.00050.
3. Francisco V, Ruiz-Fernández C, Pino J, Mera A, González-Gay MA, Gómez R, Lago F, Mobasher A, Gualillo O. Adipokines: linking metabolic syndrome, the immune system, and arthritic diseases. *Biochemical pharmacology.* 2019 Jun 6;165:196-206. doi: 10.1016/j.bcp.2019.03.030.
4. Pucci E, Chiovato L, Pinchera A. Thyroid and lipid metabolism. *International Journal of Obesity.* 2000 Jul 24;24(2):109-112. doi:10.1038/sj.ijo.0801292.
5. Lee SJ, Jokiaho AJ, Sanchez-Watts G, Watts AG. Catecholaminergic projections into an interconnected forebrain network control the sensitivity of male rats to diet-induced obesity. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 2018 Jun 04;314(6):811-823. doi:10.1152/ajpregu.00423.2017.
6. Li AJ, Wang Q, Ritter S. Activation of catecholamine neurons in the ventral medulla reduces CCK-induced hypophagia and c-Fos activation in dorsal medullary catecholamine neurons. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and*

- Comparative Physiology. 2018 Aug 23;315(3):442-452. doi:10.1152/ajpregu.00107.2018.
7. Gancheva S, Zhelyazkova-Savova M, Galunska B, Chervenkov T. Experimental models of metabolic syndrome in rats. *Scripta Scientifica Medica*. 2015 May 28;47(2):14-21. doi:10.14748/ssm.v47i2.1145.
 8. Mityukova TA, Chudilovskaya EN, Mihalevich AS. Opre-delenie aktivnosti tireoperoksidazy v tkani shchitovidnoi zhelezy (ehksperimental'noe issledovanie) [Determination of Thyroid Peroxidase Activity in the Thyroid Tissue of Rats (Experimental Study)]. *Laboratornaya diagnostika Vostochnaya Evropa* [Laboratory Diagnostics Easter Europe]. 2020;9(3):285-293.
 9. Santini F, Marzullo P, Rotondi M, Ceccarini G, Pagano L, Ippolito S, Chiovato L, Biondi B. Mechanisms in endocrinology: the crosstalk between thyroid gland and adipose tissue: signal integration in health and disease. *European journal of endocrinology*. 2014 Oct 01;171(4):137-152. doi:10.1530/EJE-14-0067.
 10. Mityukova TA, Kuznetsova TE, Basalai AA, Chudilovskaya EN, Poluliakh OE, Shcherbakov YaV, Khrustaleva TA Morfologicheskie i funktsional'nye kharakteristiki shchitovidnoi zhelezy pri diet-indutsirovannom ozhireнии i ego korrektsii u krysov samtsov Vistar [Morphological and functional characteristics of the thyroid gland in diet-induced obesity and its correction in male wistar rats]. *Patologicheskaya fiziologiya i ehksperimental'naya terapiya* [Pathological physiology and experimental therapy]. 2023 Dec 27;67(4):47-55. doi:10.25557/0031-2991.2023.04.47-55.
 11. Shao S-S, Zhao Y-F, Song Y-F, Xu C, Yang J-M, Xuan S-M, Yan H-L, Yu C-X, Zhao M, Xu J, Zhao J-J. Dietary high-fat lard intake induces thyroid dysfunction and abnormal morphology in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2014 Sep 29;35(11):1411-1420. doi:10.1038/aps.2014.82.

METABOLIC AND PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF MALE WISTAR RATS DEPENDING ON THEIR SUSCEPTIBILITY TO DIET-INDUCED OBESITY

T. A. Mityukova, K. N. Chudilovskaya, A. A. Basalai, O. Y. Poluliakh
Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus

Introduction. Modern literature addresses the issue of such phenotypic manifestations as susceptibility or resistance to obesity in animals of the same genetic line, which is of great scientific and practical interest.

The aim of the study was to evaluate indicators of metabolic syndrome, thyroid status and behavior in male Wistar rats fed a high-calorie diet, depending on their tendency to obesity.

Materials and methods. Experimental work was carried out on male Wistar rats. The control group (n = 22) received a standard vivarium diet (StD) for 16 weeks, and the experimental group (n = 32) received a high-calorie diet (HCD). In the HCD group, two subgroups, prone (PO) and resistant (RO) to obesity, were identified by ranking method.

Results. The “RO” rats had body weight close to the control, and the “PO” rats had the highest possible body weight. Visceral fat accumulation in the total “HCD” group and in the “PO” and “RO” subgroups was significantly higher than in the control, but prevailed in the “PO” rats. Metabolic, hormonal and behavioral characteristics of animals in subgroups “PO” and “RO” did not have sharply pronounced differences.

Conclusions. In most cases, all metabolic, hormonal, and behavioral shifts were due to the effects of HCD and the increase in visceral fat mass, regardless of body weight.

Keywords: male rats, high-calorie diet, susceptibility or resistance to obesity.

For citation: Mityukova TA, Chudilovskaya KN, Basalai AA, Poluliakh OY. Metabolic and physiological characteristics of male wistar rats depending on their susceptibility to diet-induced obesity. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2024, vol. 3, no. 1(4). pp. 104–110 (in Russian).

Поступила 12.04.2024

ОПТИМИЗАЦИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МАРКЕРОВ В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМЕ И ПЛОСКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОВЕДЕННОГО ЛЕЧЕНИЯ

*А. Д. Таганович¹, Н. Н. Ковганко¹, А. В. Колб¹, Е. А. Хотько¹,
О. В. Готько², В. И. Прохорова²*

¹*Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск, Республика Беларусь*

²*Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии
им. Н.Н. Александрова, Минская область, Республика Беларусь*

Введение. Имеется необходимость поиска маркеров, способных дать информацию о наличии рецидива опухоли у каждого конкретного пациента как можно раньше после лечения.

Цель исследования – изучить возможность использования биомаркеров в крови, информирующих о развитии рецидива у пациентов с аденокарциномой легкого (АК) и плоскоклеточным раком легкого (ПКРЛ).

Материалы и методы. В исследовании участвовало 222 пациента (140 мужчин и 82 женщины), у которых впервые диагностирована АК или ПКРЛ I-IIIВ стадии. В образцах крови, полученных до лечения, через 3 недели, 3 и 6 месяцев после лечения определяли концентрацию клеток лейкоцитарного ряда, содержащих рецепторы CXCR1, CXCR2 и CD44v6, плотность их расположения в мембране клетки. В сыроворотке крови определяли концентрацию CYFRA 21-1 и антигена плоскоклеточной карциномы SCC. Диагностическую эффективность определяли, используя метод ROC-анализа.

Результаты. Созданы единые регрессионные уравнения для определения вероятности рецидива после лечения для пациентов с I-IIIВ стадиями АК и для пациентов с I-IIIВ стадиями ПКРЛ. Они демонстрируют работоспособность в определении вероятности рецидива опухоли у пациентов с АК I-IIIВ и с ПКРЛ I-IIIВ стадий по разнице значений в течение 6 месяцев наблюдения после проведенного лечения.

Заключение. Результаты исследования позволяют рекомендовать созданные модели для определения вероятности рецидива у пациентов с АК, ПКРЛ или НМРЛ после проведенного лечения в сроки до проведения первой компьютерной томографии.

Ключевые слова: аденокарцинома, плоскоклеточный рак легкого, CYFRA 21-1, SCC, CXCR1, CXCR2, CD44v6, рецидив, биомаркеры.

Для цитирования: Оптимизация использования маркеров в крови пациентов при аденокарциноме и плоскоклеточном раке легкого для оценки эффективности проведенного лечения / А. Д. Таганович [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. – 2024. – Т. 3, № 1(4). – С. 111–119.

Введение

В настоящее время рак легкого занимает второе место по частоте вновь выявленных случаев злокачественных образований, и первое – по смертности среди всех онкологических заболеваний [1]. Наиболее распространенным типом является немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), который составляет около 85 % всех случаев. Гистологически НМРЛ может быть аденокарциномой (АК) – 50 %, плоскоклеточным раком легкого (ПКРЛ) – 47 %, крупноклеточным раком или смешанной формой – около 3 % [2]. Данные патологии, несмотря на гистологическое сходство, различаются. Так, периферическая локализация опухолевого процесса в большей степени характерна

для АК. ПКРЛ обычно развивается в центральных участках легкого [1]. Более, чем в 70 % случаев развитие АК ассоциировано с наличием мутаций в гене рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) и киназы анапластической лимфомы (CD246). Полиморфизмы генов, ассоциированных с развитием ПКРЛ, не идентифицированы [3]. В отличие от АК, ПКРЛ чаще развивается у курящих [1].

Несмотря на предпринимаемые усилия у части пациентов с I-IIIВ стадиями АК и ПКРЛ развиваются рецидивы опухоли и большей частью, уже в первый год после операции. Чем раньше обнаруживается рецидив, тем более эффективно противораковое лечение. Поэтому в настоящее время не

теряет актуальности поиск эффективных критериев предсказания вероятности или наличия рецидива [1–3]. Биохимические критерии пока не находят практического применения, поскольку они большей частью неспецифичны и не обладают достаточной чувствительностью. Однако попытки обнаружить новые биомаркеры продолжают предприниматься.

Нами ранее было установлено, что биохимические показатели в крови при комбинированном их определении в качестве биомаркеров дескрипторов опухоли отличаются при АК и ПКРЛ [4]. Отличие между этими гистологическими подтипами НМРЛ имело место и при разработке прогностических моделей развития рецидива после проведенного лечения, которые основывались на измерении уровня цитокинов и их рецепторов в клетках крови только до начала лечения.

В дальнейшем были предложены показатели в крови, измеряя уровень которых в динамике после проведенного лечения, возможно обоснованно предполагать развитие рецидива у пациентов отдельно с ранними и поздними стадиями АК и ПКРЛ [5–8]. Для пациентов с I–II стадиями АК в их число вошли фрагмент 19 цитокератина CYFRA 21-1, плотность расположения рецептора CXCR1, которая пропорциональна средней интенсивности флюоресценции (MFI) на гранулоцитах, и доля лимфоцитов в общей популяции этих клеток в крови, экспрессирующих рецептор CXCR2 (CXCR2, %, лимфоциты) [5]. Для пациентов с III стадией АК в набор показателей вошли CYFRA 21-1, доля лимфоцитов в общей популяции этих клеток в крови, экспрессирующих рецептор CXCR1 (CXCR1, %, лимфоциты), и отношение абсолютных значений концентрации эозинофилов к концентрации моноцитов (Э/М) [6].

В группах пациентов с ранними стадиями ПКРЛ в число маркеров для диагностики рецидива вошли концентрация SCC в сыворотке крови, доля лимфоцитов, экспрессирующих рецептор CXCR2, и доля моноцитов, экспрессирующих рецептор CD44v6 в общей популяции лимфоцитов и моноцитов крови, соответственно [7]. Уровень CYFRA 21-1, доля лимфоцитов, экспрессирующих рецептор CXCR1 (CXCR1, %, лимфоциты), доля моноцитов, экспрессирующих рецептор CXCR2 (CXCR2, %, моноциты), в общих популяциях этих клеток в крови оказались в наибольшей степени связаны с риском рецидива опухоли для пациентов с III стадией ПКРЛ [8].

Целью настоящего исследования стало изучить возможность использования единых маркеров (независимо от стадии) для оценки эффективности проведенного лечения у пациентов с АК

или ПКРЛ и проверить уникальность разработанных моделей для этих гистологических подтипов НМРЛ.

Материалы и методы

В исследовании участвовало 222 пациента (140 мужчин и 82 женщины), поступивших в стационар ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова» в период 2021–2022 гг., у которых впервые диагностирована АК и ПКРЛ I–III стадии (согласно классификации TNM) [1]. Возраст пациентов составил 57,3 [41,5; 75,8] лет (указаны медиана и интерквартильный размах). В группе пациентов с АК было 117 пациентов (79 мужчин и 38 женщин). В группе пациентов с ПКРЛ было 105 пациентов (61 мужчина и 44 женщины). У всех пациентов было проведена хирургическая резекция опухоли (объем оперативного вмешательства – R0). У пациентов с T1N2M0, T2N2M0, T3N1M0, T3N2M0 до оперативного вмешательства дополнительно проводились 4 курса адьювантной полихимиотерапии, включающих комбинацию винорельбина (В) – 25–30 мг/м² и цисплатина (Ц) – 80 мг/м². У пациентов с T4N0M0, T4N1M0, T4N2M0 до оперативного вмешательства проводилось 2 курса неoadьювантной полихимиотерапии, состоящих из комбинации В+Ц, затем выполнялась хирургическая резекция опухоли с последующим назначением 2 курсов адьювантной полихимиотерапии, состоящих из комбинации В+Ц.

Все испытуемые дали письменное добровольное согласие на участие в исследовании. Проведение исследования было одобрено решением Комитета по биомедицинской этике учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» (протокол № 2 от 10.04.2021).

Уровень показателей измеряли до начала лечения и через 3 недели, 3 и 6 месяцев после окончания лечения соответственно. Сведения о развитии рецидива в течение 1 года после лечения у обследованных пациентов получены на основании данных Канцер-регистра РБ (РНПЦ онкологии и медицинской радиологии МЗ РБ). Рецидивы развились у 12 пациентов с I стадией (АК – 8, ПКРЛ – 4), у 19 – со II стадией (АК – 11, ПКРЛ – 8) и у 32 – с III стадией (АК – 16, ПКРЛ – 16). Кровь из локтевой вены собирали натощак в вакутайнер с ЭДТА-К2 в качестве антикоагулянта.

В образцах крови определяли концентрацию эозинофилов и моноцитов на гематологическом анализаторе Sysmex XE-5000 (Sysmex Group, Япония). Для получения сыворотки кровь собирали в пробирку с тромбином и разделительным

гелем. В сыворотке крови определяли концентрацию CYFRA 21-1 и антигена плоскоклеточной карциномы SCC на автоматическом анализаторе Cobas e411 (Roche Diagnostics GmbH, Германия), использующем принцип электрохемилюминесценции с помощью реагентов Elecsys CYFRA и Elecsys SCC соответственно. Концентрацию рецепторов CXCR1 и CXCR2 в клетках лейкоцитарного ряда и плотность их расположения в мембране клетки определяли, используя проточный цитофлуориметр Navios (Beckman Coulter, США) и реагенты CD181(CXCR1)-PE/Cy5 (BioLegend, США) и CD182(CXCR2)-PE (BioLegend, США).

Комбинированная модель 1 (формула 1) для диагностики рецидива у пациентов с I-II стадиями АК включала результат расчета регрессионного уравнения (A) на основе определения в сыворотке крови до оперативного лечения концентрации антигена CYFRA 21-1 в нг/мл (X1); интенсивности флуоресценции рецептора CXCR1 в гранулоцитах (X2) и относительного количества (%) лимфоцитов, содержащих рецептор CXCR2 (X3) [5]:

$$A = \frac{\exp(-0,317 + 0,512 \cdot X1 + 0,631 \cdot X2 + 0,815 \cdot X3)}{1 + \exp(-0,317 + 0,512 \cdot X1 + 0,631 \cdot X2 + 0,815 \cdot X3)}$$

Формула 1. Регрессионное уравнение для прогнозирования вероятности рецидива у пациентов с АК I-II стадий

Комбинированная модель 2 (формула 2) для диагностики рецидива у пациентов с IIIA,B стадиями АК включала результат расчета регрессионного уравнения (B) на основе определения концентрации антигена CYFRA 21-1 в сыворотке крови, нг/мл (X1); относительного количества (%) лимфоцитов, содержащих рецептор CXCR1 (X2) и отношения эозинофильных лейкоцитов к моноцитам (X3) [6]:

$$B = \frac{\exp(-14,022 + 0,539 \cdot X1 + 1,294 \cdot X2 + 12,035 \cdot X3)}{1 + \exp(-14,022 + 0,539 \cdot X1 + 1,294 \cdot X2 + 12,035 \cdot X3)}$$

Формула 2. Регрессионное уравнение для прогнозирования вероятности рецидива у пациентов с АК IIIA-IIIВ стадий

Комбинированная модель 3 (формула 3) для прогнозирования вероятности развития рецидива у пациентов с I-II стадиями ПКРЛ включала результат расчета регрессионного уравнения (C) на основе определения концентрации антигена SCC в сыворотке крови (X1); доли лимфоцитов с

CXCR2 (X2) и моноцитов с CD44v6 (X3) в популяциях этих клеток крови [7]:

$$C = \frac{\exp(-0,492 + 0,306 \cdot X1 + 0,759 \cdot X2 + 0,917 \cdot X3)}{1 + \exp(-0,492 + 0,306 \cdot X1 + 0,759 \cdot X2 + 0,917 \cdot X3)}$$

Формула 3. Регрессионное уравнение для прогнозирования вероятности рецидива у пациентов с ПКРЛ I-II стадий

Комбинированная модель 4 (формула 4) для прогнозирования вероятности развития рецидива включала в себя результат регрессионного уравнения (D) определения трех показателей: концентрации антигена CYFRA 21-1 в сыворотке крови (X1); относительное количество (%) рецептора CXCR1 в лимфоцитах (X2); относительное количество (%) рецептора CXCR2 в моноцитах (X3) [8]:

$$D = \frac{\exp(-5,315 + 0,116 \cdot X1 + 1,901 \cdot X2 + 0,279 \cdot X3)}{1 + \exp(-5,315 + 0,116 \cdot X1 + 1,901 \cdot X2 + 0,279 \cdot X3)}$$

Формула 4. Регрессионное уравнение для прогнозирования вероятности рецидива у пациентов с ПКРЛ IIIA,B стадий

Оценку интегральной диагностической информативности расчета разницы результатов регрессионных уравнений (3 недели – 3 месяца, 3 – 6 месяцев, 3 недели – 6 месяцев) проводили с помощью метода построения характеристических ROC-кривых с последующим вычислением площади под ROC-кривой (AUC). О диагностической ценности анализируемых показателей судили на основании расчета диагностической чувствительности (ДЧ), диагностической специфичности (ДС), предсказательной ценности положительного (ПЦПР) и отрицательного результатов (ПЦОР) и диагностической эффективности (ДЭ) теста [9]. Расчеты выполнены в программном комплексе MedCalc (MedCalc Software Ltd., Бельгия). При всех видах статистического анализа критическое значение уровня значимости принимали как равное 5%.

Результаты и их обсуждение

Вышеназванные пять показателей, которые вошли в формулы 1 и 2 (см. материалы и методы), были вовлечены в комбинированную модель 5 (формула 5). Она основывается на уравнении логистической регрессии, значения которого позволили бы рассчитывать вероятность развития рецидива у пациентов с АК, независимо от стадии, после проведенного лечения (формула 5).

$$E = \frac{\exp(-12,735 + 0,527 \cdot X1 + 0,312 \cdot X2 + 0,237 \cdot X3 + 0,217 \cdot X4 + 0,311 \cdot X5)}{1 + \exp(-12,735 + 0,527 \cdot X1 + 0,312 \cdot X2 + 0,237 \cdot X3 + 0,217 \cdot X4 + 0,311 \cdot X5)}$$

Формула 5. Единое регрессионное уравнение для прогнозирования вероятности рецидива у пациентов с АК I-IIIВ стадий, где $X1$ – концентрация CYFRA 21-1 (нг/мл); $X2$ – CXCR1, %, лимфоциты; $X3$ – CXCR1, MFI, гранулоциты; $X4$ – CXCR2, %, лимфоциты; $X5$ – эозинофилы/моноциты.

У пациентов с I-II стадиями АК самую высокую диагностическую эффективность имеет определение рецидива опухоли с помощью разницы результатов расчета регрессионного уравнения 1 через 3 недели и через 3 месяца после лечения – 81,3 %. В интервале 3–6 месяцев она уже составляет 90,6 %, а для периода 3 недели–6 месяцев – 95,3 % (таблица 1А). Несколько меньшую эффективность имеет использование единого регрессионного уравнения 5 у пациентов с ранними стадиями АК через 3 недели и через 3 месяца после лечения – 93,8 % (таблица 1В). Его использование у пациентов с IIIА,В стадиями АК в аналогичный период наблюдения имело эффек-

тивность от 75,5 до 94,3 % (в зависимости от срока забора крови) (таблица 1Г). В то же время, модель 2, созданная для IIIА,В стадий, в такие же сроки забора крови демонстрирует диагностическую эффективность 77,4 – 96,2 % (таблица 1Б). Эти данные показывают, что объединенная модель, независимо от стадий АК, имеет диагностическую эффективность, сопоставимую с эффективностью использования созданных уравнений отдельно, для ранних и поздних стадий АК. Высокая диагностическая ценность определения достигается в равной степени, за счет сравнительно высокой диагностической чувствительности и специфичности.

Таблица 1 – Диагностическая информативность расчета разницы результатов уравнения (формулы 1, 2, 5) в различные интервалы времени после лечения пациентов с АК для определения рецидива опухоли

Table 1 – Diagnostic information content of calculating the difference in the results of the equation (formulas 1, 2, 5) at various time intervals after treatment of patients with AK to determine tumor recurrence

Сроки забора крови	ПЗ	ДЧ	ДС	ПЦПР	ПЦОР	AUC	ДЭ
А. Уравнение 1 (I-II стадии)							
3 недели – 3 месяца	0,047	84,2	80,0	64,0	92,3	0,796	81,3
3 – 6 месяцев	0,096	89,5	91,1	81,0	95,3	0,861	90,6
3 недели – 6 месяцев	0,141	94,7	95,6	90,0	97,7	0,917	95,3
Б. Уравнение 2 (IIIА,В стадии)							
3 недели – 3 месяца	0,061	75,0	78,4	60,0	87,9	0,741	77,4
3 – 6 месяцев	0,117	81,3	91,9	81,3	91,9	0,852	88,7
3 недели – 6 месяцев	0,178	93,8	97,3	93,8	97,3	0,923	96,2
В. Уравнение 5 (I-II стадии)							
3 недели – 3 месяца	0,063	84,2	77,8	61,5	92,1	0,731	79,7
3 – 6 месяцев	0,127	89,5	88,9	77,3	95,2	0,842	89,1
3 недели – 6 месяцев	0,190	94,7	93,3	85,7	97,7	0,893	93,8
Г. Уравнение 5 (IIIА,В стадии)							
3 недели – 3 месяца	0,063	75,0	75,7	57,1	87,5	0,718	75,5
3 – 6 месяцев	0,127	75,0	91,9	80,0	89,5	0,799	86,8
3 недели – 6 месяцев	0,190	87,5	97,3	93,3	94,7	0,905	94,3
Д. Уравнение 5 (I-IIIВ стадии)							
3 недели – 3 месяца	0,063	77,1	78,0	60,0	88,9	0,746	77,8
3 – 6 месяцев	0,127	88,6	89,0	77,5	94,8	0,858	88,9
3 недели – 6 месяцев	0,190	97,1	92,7	85,0	98,7	0,897	94,0

Примечание: ПЗ – пороговое значение; ДЧ, ДС, ДЭ – диагностическая чувствительность, специфичность и эффективность соответственно; ПЦПР и ПЦОР – прогностическая ценность положительного и отрицательного результата, соответственно

Note: PV – threshold value; DC, DS, DE – diagnostic sensitivity, specificity and efficiency, respectively; PCPR and PCOR – predictive value of positive and negative results, respectively

Для ПКРЛ все вышеназванные шесть показателей, которые вошли в формулы 3 и 4 (см. ма-

териалы и методы), были вовлечены в единое уравнение логистической регрессии, значения

которого характеризуют вероятность развития рецидива у пациентов с ПКРЛ, независимо от стадии, после проведенного лечения (формула 6).

$$F = \frac{\exp(-3,171 + 0,837 \cdot X1 + 0,631 \cdot X2 + 0,527 \cdot X3 + 0,409 \cdot X4 + 0,608 \cdot X5 + 0,597 \cdot X6)}{1 + \exp(-3,171 + 0,837 \cdot X1 + 0,631 \cdot X2 + 0,527 \cdot X3 + 0,409 \cdot X4 + 0,608 \cdot X5 + 0,597 \cdot X6)}$$

Формула 6. Единое регрессионное уравнение для прогнозирования вероятности рецидива у пациентов с ПКРЛ I-IIIВ стадий, где $X1$ – концентрация SCC (нг/мл); $X2$ – концентрация CYFRA 21-1 (нг/мл); $X3$ – CXCR1, %, лимфоциты; $X4$ – CXCR2, %, лимфоциты; $X5$ – CXCR2, %, моноциты; $X6$ – CD44v6, %, моноциты.

При I-II стадиях ПКРЛ самую высокую диагностическую эффективность имеет определение рецидива опухоли с помощью разницы результатов расчета регрессионного уравнения 3 через 3 недели и через 3 месяца после лечения – 84,2 %. В интервале 3–6 месяцев она уже составляет 91,2 %, а для периода 3 недели–6 месяцев – 96,5 % (таблица 2А). Несколько меньшую эффективность имеет использование единого регрессионного уравнения 6 у пациентов с ранними стадиями ПКРЛ – 93,0 % (таблица 2В). Его использование у пациентов с IIIА,В стадиями ПКРЛ в аналогичный пери-

од наблюдения имело эффективность от 79,2 до 93,8 % (в зависимости от срока забора крови) (таблица 2Г). В то же время, модель 4, созданная для IIIА,В стадий, в такие же сроки забора крови демонстрирует диагностическую эффективность 83,3–95,8 % (таблица 2Б). Эти данные показывают, что, как и в случае АК, объединенная модель, независимо от стадий ПКРЛ, показывает диагностическую эффективность, сопоставимую с эффективностью использования созданных уравнений отдельно, для ранних и поздних стадий ПКРЛ.

Таблица 2 – Диагностическая информативность расчета разницы результатов регрессионных уравнений (формулы 3, 4, 6) в различные интервалы времени после лечения пациентов с ПКРЛ для обнаружения рецидива опухоли

Table 2 – Diagnostic information content of calculating the difference in the results of regression equations (formulas 3, 4, 6) at various time intervals after treatment of patients with SCLC to detect tumor recurrence

Сроки забора крови	ПЗ	ДЧ	ДС	ПЦПР	ПЦОР	AUC	ДЭ
А. Уравнение 3 (I-II стадии)							
3 недели – 3 месяца	0,085	83,3	84,4	58,8	95,0	0,799	84,2
3 – 6 месяцев	0,119	91,7	91,1	73,3	97,6	0,866	91,2
3 недели – 6 месяцев	0,195	100,0	95,6	85,7	100,0	0,928	96,5
Б. Уравнение 4 (IIIА,В стадии)							
3 недели – 3 месяца	0,060	82,4	83,9	73,7	89,7	0,811	83,3
3 – 6 месяцев	0,132	94,1	90,3	84,2	96,6	0,892	91,7
3 недели – 6 месяцев	0,190	100,0	93,5	89,5	100,0	0,933	95,8
В. Уравнение 6 (I-II стадии)							
3 недели – 3 месяца	0,088	75,0	84,4	56,3	92,7	0,761	82,5
3 – 6 месяцев	0,126	83,3	91,1	71,4	95,3	0,832	89,5
3 недели – 6 месяцев	0,214	91,7	93,3	78,6	97,7	0,887	93,0
Г. Уравнение 6 только (IIIА,В стадии)							
3 недели – 3 месяца	0,088	76,5	80,6	68,4	86,2	0,732	79,2
3 – 6 месяцев	0,126	82,4	87,1	77,8	90,0	0,816	85,4
3 недели – 6 месяцев	0,214	94,1	93,5	88,9	96,7	0,893	93,8
Д. Уравнение 6 для (I-IIIВ стадии)							
3 недели – 3 месяца	0,088	89,7	76,3	59,1	95,1	0,752	80,0
3 – 6 месяцев	0,126	93,1	85,5	71,1	97,0	0,834	87,6
3 недели – 6 месяцев	0,214	96,6	92,1	82,4	98,6	0,891	93,3

Полученные нами ранее данные относительно уровня 5 биомаркеров в крови пациентов с АК и 6 маркеров – в крови пациентов с ПКРЛ были использованы для расчета разницы их значений в фиксированных временных интервалах 3 недели

– 3 месяца, 3-6 месяцев и 3 недели – 6 месяцев. Данный прием наглядно продемонстрировал прирост значений показателей, который увеличивался во времени наблюдения, который был характерен только для пациентов с диагностированным реци-

дивом. Результаты анализа пропорциональных рисков Кокса показали существенную связь прироста уровня анализируемых показателей в каждом из временных интервалов с развитием рецидивов после проведенного лечения [5–8]. Диагностическая ценность измерения прироста была гораздо выше значений чувствительности и специфичности определения абсолютных значений показателей, которые были получены не только нами, но и другими исследователями [10–17]. Поэтому именно прирост во времени результатов расчета регрессионного уравнения через 3 недели, 3 и 6 месяцев после окончания лечения был вовлечен в оценку диагностической ценности исследуемых показателей для обнаружения рецидива у пациента.

Чтобы убедиться в уникальности созданных объединенных моделей для определения вероятности рецидива опухоли у пациентов с АК и ПКРЛ после проведенного лечения мы сопоставили показатели диагностической ценности использования регрессионного уравнения 5 (для АК) у пациентов с ПКРЛ, а уравнения 6 (для ПКРЛ) – у пациентов с АК. Диагностическая эффективность

согласно уравнению 5 для прогнозирования рецидива у пациентов с ПКРЛ составила 69,5% при заборе крови через 3 недели и через 3 месяца после окончания лечения, а при расчете регрессионного уравнения 6 у пациентов с АК в этот же период времени она составила 68,4 %. Максимальная эффективность прогнозирования рецидива для пациентов с АК наблюдается при обследовании через 3 недели и через 6 месяцев после лечения – 83,3 % (таблица 3Б), а для пациентов с ПКРЛ – 85,6 % (таблица 3А). Эти результаты значительно ниже тех, которые получены в результате использования уравнения 5 для пациентов с АК и уравнения 6 – для пациентов с ПКРЛ.

Немаловажное значение для суждения об уникальности созданных моделей и в прикладном аспекте имеет оценка их диагностической ценности в диагностике рецидива опухоли у пациентов НМРЛ независимо от гистологического подтипа. Максимальные значения диагностической эффективности составили 87,6 % для регрессионного уравнения 5 (таблица 3В) и 86,0 % для регрессионного уравнения 6 (таблица 3Г).

Таблица 3 – Диагностическая информативность расчета разницы результатов регрессионных уравнений (формулы 5, 6) в различные интервалы времени после лечения пациентов с АК, ПКРЛ и АК+ПКРЛ для определения рецидива опухоли

Table 3 – Diagnostic information content of calculating the difference in the results of regression equations (formulas 5, 6) at various time intervals after treatment of patients with AK, SCLC and AK+SCRL to determine tumor relapse

Сроки забора крови	ПЗ	ДЧ	ДС	ПЦПР	ПЦОР	AUC	ДЭ
А. Уравнение 5 (I-IIIВ стадии ПКРЛ)							
3 недели – 3 месяца	0,063	79,3	65,8	46,9	89,3	0,651	69,5
3 – 6 месяцев	0,127	86,2	75,0	56,8	93,4	0,752	78,1
3 недели – 6 месяцев	0,190	92,2	82,9	68,6	96,3	0,818	85,6
Б. Уравнение 6 (I-IIIВ стадии АК)							
3 недели – 3 месяца	0,088	60,0	72,0	47,7	80,8	0,642	68,4
3 – 6 месяцев	0,126	71,4	81,7	62,5	87,0	0,756	78,6
3 недели – 6 месяцев	0,214	82,9	87,8	74,4	92,3	0,843	83,3
В. Уравнение 5 (I-IIIВ стадий АК+ПКРЛ)							
3 недели – 3 месяца	0,063	79,7	71,5	53,1	89,7	0,693	73,9
3 – 6 месяцев	0,127	89,1	77,8	62,0	94,6	0,781	81,1
3 недели – 6 месяцев	0,190	89,7	86,8	72,2	95,7	0,843	87,6
Г. Уравнение 6 (I-IIIВ стадии АК+ПКРЛ)							
3 недели – 3 месяца	0,088	78,1	73,4	54,3	89,2	0,705	74,8
3 – 6 месяцев	0,126	87,5	79,1	62,9	94,0	0,789	81,5
3 недели – 6 месяцев	0,214	90,6	84,2	69,9	95,7	0,827	86,0

Заключение

На основе определения в крови уровня CYFRA 21-1, плотности расположения рецептора CXCR1 на гранулоцитах, доли лимфоцитов в общей популяции этих клеток в крови, экспрессирующих рецептор CXCR1 и CXCR2, отношения эозинофилов/моноциты у пациентов с АК и concentra-

ции SCC и CYFRA 21-1 в сыворотке крови, доли лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы CXCR1,2 в общей популяции этих клеток крови, доли моноцитов, экспрессирующих рецептор CD44v6 и CXCR2 в общей популяции этих клеток крови у пациентов с ПКРЛ созданы объединенные модели. Они демонстрируют работоспособ-

ность в определении вероятности рецидива опухоли у пациентов с АК I-IIIВ и с ПКРЛ I-IIIВ стадий по разнице значений в течение 6 месяцев наблюдения после проведенного лечения. Модели информативны и их диагностическая эффективность максимальна, когда разница значений регрессионных уравнений оценивается через 3 недели и через 6 месяцев после окончания лечения. Она весьма существенна и в том случае, если оценка проводится в более ранний период

(через 3 недели и через 3 месяца). Наиболее высокая информативность наблюдается, когда уравнение рассчитывается для гистологического подтипа, для которого оно было создано. Результаты того и другого уравнения позволяют их использовать в объединенной группе пациентов с НМРЛ. В этом случае диагностическая эффективность определения вероятности рецидива, в зависимости от временного интервала исследований составляет от 73,9 до 83,6 %.

Список использованных источников

1. Cancer statistics, 2023. / R. L. Siegel [et al] // *CA Cancer J. Clin.* – 2023. – Vol. 73, № 1. – P. 17–48.
2. A proposal to reflect survival difference and modify the staging system for lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma: based on the machine learning / M. Li [et al] // *Front. Oncol.* – 2019 – Vol. 9. – P. 771.
3. Chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer with a focus on squamous cell carcinoma / K. Kuribayashi [et al] // *J. Cancer Res. Ther.* – 2016. – Vol. 12, № 2. – P. 528–34.
4. Диагностические модели немелкоклеточного рака легкого на основе определения цитокинов и их рецепторов в крови / А. Д. Таганович [и др.] // *Весті Нац. акад. нав. Беларусі. Сер. мед. нав.* – 2021. – Т. 18, № 4. – С. 445–455.
5. Значимость определения уровня CYFRA 21-1, рецепторов CXCR1 и CXCR2 в крови для прогнозирования рецидива аденокарциномы легкого (I–II стадии) / А. Д. Таганович [и др.] // *Лаб. диагн. Вост. Евр.* – 2023. – Т. 12, № 1. – С. 91–104.
6. Предсказание рецидива аденокарциномы легкого после проведенного лечения у пациентов с III стадией заболевания на основании результатов сочетанного определения уровня CYFRA 21-1 и клеточного состава крови / А. Д. Таганович [и др.] // *Лаб. диагн. Вост. Евр.* – 2023. – Т. 12, № 2. – С. 210–224.
7. Prognostic evaluation of relapse based on squamous cell carcinoma antigen, CXCR2, and CD44V6 blood levels in patients with Stage I–II squamous cell lung cancer / A. D. Tahanovich [et al.] // *Global Transl. Med.* – 2023. – Vol. 2, № 4. – P. 2209.
8. Оценка вероятности развития рецидива после хирургического удаления опухоли у пациентов с III стадией плоскоклеточного рака легкого / Н. Н. Ковганко [и др.] // *Медицинский университет: современные взгляды и новые подходы: Сб. мат. респ. научно-практ. конф. с межд. уч., посв. 65-летию Гродненского гос. мед. унив. Гродно, 28–29 сентября 2023 г.* – С. 223–224.
9. Harrell, F. E. Jr. Regression modeling strategies with applications to linear models, logistic regression, and survival analysis. New York, NY, Springer Verlag, 2001. 475 p.
10. Relevance of circulating biomarkers for the therapy monitoring and follow-up investigations in patients with non-small cell lung cancer / V. Barak [et al] // *Cancer Biomark.* – 2010. – Vol. 6, № 3-4. – P. 191–196.
11. Monitoring cytokeratin fragment 19 (CYFRA 21-1) serum levels for early prediction of recurrence of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma in the lung after surgical resection / J. J. Yeh [et al] // *Lung.* – 2002. – Vol. 180, № 5. – P. 273–279.
12. High preoperative and postoperative levels of carcinoembryonic antigen and CYFRA 21-1 indicate poor prognosis in patients with pathological Stage I nonsmall cell lung cancer /

- X. Duan [et al] // *Indian J. Cancer.* – 2015. – Vol. 52, Suppl 3. – E158–163.
13. Preoperative CYFRA 21-1 levels as a prognostic factor in stage I non-small cell lung cancer / H. Suzuki [et al] // *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* – 2007. – Vol. 32, № 4. – P. 648–652.
14. Preoperative CYFRA 21-1 and CEA as prognostic factors in patients with stage I non-small cell lung cancer / T. Hanagiri [et al] // *Lung Cancer.* – 2011. – Vol. 74. – P. 112–117.
15. Muley, T. CYFRA 21-1 and CEA Are Independent Prognostic Factors in 153 Operated Stage I NSCLC Patients / T. Muley, H. Dienemann, W. Ebert // *Anticancer Res.* – 2004. – Vol. 24. – P. 1953–1956.
16. Potential for the blood-based biomarkers cytokeratin 19 fragment (CYFRA 21-1) and human epididymal protein 4 (HE4) to detect recurrence during monitoring after surgical resection of adenocarcinoma of the lung / T. Muley [et al] // *Lung Cancer.* 2019. – Vol. 130. – P. 194–200.
17. Decreased levels of serum cytokeratin 19 fragment CYFRA 21-1 predict objective response to chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer / L. Pang [et al] // *Exp. Ther. Med.* – 2013. – Vol. 6, № 2. – P. 355–360.

References

1. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin.* 2023;73(1):17-48. doi: 10.3322/caac.21763.
2. Li M, Zhan C, Sui X, Jiang W, Shi Y, Yang X, Feng M, Wang J, Wang Q. A Proposal to Reflect Survival Difference and Modify the Staging System for Lung Adenocarcinoma and Squamous Cell Carcinoma: Based on the Machine Learning. *Front Oncol.* 2019;9:771. doi: 10.3389/fonc.2019.00771.
3. Kuribayashi K, Funaguchi N, Nakano T. Chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer with a focus on squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Ther.* 2016;12(2):528-34. doi: 10.4103/0973-1482.174185.
4. Tahanovich AD, Kauhanka MM, Prokhorova VI, Derzhavets LA, Kolb AV, Murashko DI. Diagnosticheskiye modeli nemelkokkлетochnogo raka legkogo na osnove opredeleniya tsitokinov i ikh retseptorov v krovi [Diagnostic models of non-small cell lung cancer based on the determination of cytokines and their receptors in the blood] // *Vestsi Natsyynal'nay akademii navuk Belarusi. Ser. med. nav. [News of the National Academy of Sciences of Belarus. Med. sciences].* 2021;18(4):445-455.
5. Tahanovich AD, Kauhanka NN, Kolb AV, Prinkova TY., Khotko EA, Gotko OV, Tsarik AA. Znachimost' opredeleniya urovnya CYFRA 21-1, retseptorov CXCR1 i CXCR2 v krovi dlya prognozirovaniya retsidiva adenokartsinomy legkogo (I–II stadii) [The significance of determining the level of CYFRA 21-1, CXCR1 and CXCR2 receptors in the blood for predicting relapse of lung adenocarcinoma (stages I–II)]. *Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Yevropa [Laboratory diagnostics. Eastern Europe].* 2023;12(1):91-104. doi: 10.34883/PI.2023.12.1.006.

6. Tahanovich AD, Kauhanka NN, Barabanova YM, Got'ko OV, Tsarik AA. Predskazaniye retsivida adenokartsinomy legkogo posle provedennogo lecheniya u patsiyentov s III stadiyey zabolevaniya na osnovanii rezul'tatov sochetannogo opredeleniya urovnya CYFRA 21-1 i kletoch-nogo sostava krovi [Prediction of relapse of lung adenocarcinoma after treatment in patients with stage III disease based on the results of a combined determination of CYFRA 21-1 levels and blood cellular composition]. *Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Yevropa [Laboratory diagnostics. Eastern Europe]*. 2023;12(2): 210-224. doi: 10.34883/Pl.2023.12.2.006.
7. Tahanovich AD, Kauhanka MM, Rutkovskaya ZA, Khotko EA, Gotko OV, Prokhorova VI. Prognostic evaluation of relapse based on squamous cell carcinoma antigen, CXCR2, and CD44V6 blood levels in patients with Stage I–II squamous cell lung cancer. *Global Transl Med*. 2023;2(4):2209. doi: <https://doi.org/10.36922/gtm.2209>.
8. Kauhanka MM., Tahanovich AD, Bronitsky SK, Turuta YD, Gotko OV, Tsarik AA. Otsenka veroyatnosti razvitiya retsivida posle khirurgicheskogo udaleniya opukholi u patsiyentov s III stadiyey ploskokletochnogo raka legkogo [Assessment of the likelihood of relapse after surgical tumor removal in patients with stage III squamous cell lung cancer]. Meditsinskiy universitet: sovremennyye vzglyady i novyye podkhody: Sbornik materialov respublikanskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiyem, posvyashchennoy 65-letiyu Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta [Medical University: modern views and new approaches: Collection of materials of the republican scientific and practical conference with international participation, dedicated to the 65th anniversary of the Grodno State Medical University]. Grodno, September 28–29, 2023:223-224.
9. Harrell FE Jr. Regression modeling strategies with applications to linear models, logistic regression, and survival analysis. New York, NY, Springer Verlag, 2001. 475 p.
10. Barak V, Holdenrieder S, Nisman B, Stieber P. Relevance of circulating biomarkers for the therapy monitoring and follow-up investigations in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Biomark*. 2010;6(3-4):191-6. doi: 10.3233/CBM-2009-0129.
11. Yeh JJ, Liu FY, Hsu WH, Wang JJ, Ho ST, Kao A. Monitoring cytokeratin fragment 19 (CYFRA 21-1) serum levels for early prediction of recurrence of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma in the lung after surgical resection. *Lung*. 2002;180(5):273-9, doi: 10.1007/s004080000101.
12. Duan X, Cui Y, Li H, Shi G, Wu B, Liu M, et al. High preoperative and postoperative levels of carcinoembryonic antigen and CYFRA 21-1 indicate poor prognosis in patients with pathological Stage I nonsmall cell lung cancer. *Indian J Cancer*. 2015;52 Suppl 3:E158-163, doi: 10.4103/0019-509X.186564.
13. Suzuki H, Ishikawa S, Satoh H, Ishikawa H, Sakai M, Yamamoto T. Preoperative CYFRA 21-1 levels as a prognostic factor in stage I non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2007;32(4):648-52, doi: 10.1016/j.ejcts.2007.06.032.
14. Hanagiri T, Sugaya M, Takenaka M, Oka S, Baba T, Shigematsu Y, et al, Preoperative CYFRA 21-1 and CEA as prognostic factors in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2011;74:112-117, doi: 10.1016/j.lungcan.2011.02.001.
15. Muley T, Dienemann H, Ebert W. CYFRA 21-1 and CEA Are Independent Prognostic Factors in 153 Operated Stage I NS-CLC Patients. *Anticancer Res*. 2004; 24:1953–1956.
16. Muley T, He Y, Rolny V, Wehnl B, Escherich A, Warth A, et al. Potential for the blood-based biomarkers cytokeratin 19 fragment (CYFRA 21-1) and human epididymal protein 4 (HE4) to detect recurrence during monitoring after surgical resection of adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer*. 2019;130:194-200. doi: 10.1016/j.lungcan.2019.02.017.
17. Pang L, Wang J, Jiang Y, Chen L. Decreased levels of serum cytokeratin 19 fragment CYFRA 21-1 predict objective response to chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer. *Exp Ther Med*. 2013;6(2):355-360. doi: 10.3892/etm.2013.1171.

OPTIMIZATION OF THE USE OF MARKERS IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH ADENOCARCINOMA AND SQUAMOUS CELL LUNG CANCER TO EVALUATE THE EFFECTIVENESS OF TREATMENT

*D. Tahanovich¹, M. M. Kauhanka¹, A. V. Kolb¹, E. A. Khotko¹,
O.V. Gotko², V. I. Prokhorova²*

¹ *Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

² *National Center of oncology and medical radiology, Minsk, Republic of Belarus*

Introduction. There is a need to search for markers that can provide information about the presence of tumor relapse in each individual patient as early as possible after treatment.

Purpose of the study. To study the possibility of using blood biomarkers that could inform about the development of relapse in patients with lung adenocarcinoma (AC) and squamous cell lung carcinoma (SCLC).

Materials and methods. The study involved 222 patients (140 men and 82 women) who were newly diagnosed with AK or stage I–IIIB SCLC. In blood samples obtained before treatment, 3 weeks, 3 and 6 months after treatment, the concentration of leukocyte cells containing the CXCR1, CXCR2 and CD44v6 receptors, and the density of their location in the cell membrane, serum concentrations of CYFRA 21-1 and squamous cell carcinoma antigen SCC were measured. Diagnostic performance was determined using ROC analysis method.

Results. Unified regression equations were created to determine the probability of relapse after treatment for patients with stages I–IIIB of AK and for patients with stages I–IIIB of SCLC. They demonstrate efficiency in

determining the probability of tumor recurrence in patients with AK I-IIIB and with SCLC stages I-IIIB by the difference in values in 3 weeks, 3 and 6 months after treatment.

Conclusions. The results of the study allow to recommend the created models for determining the probability of relapse in patients with AC, SCLC or NSCLC after treatment before the first computed tomography.

Keywords: adenocarcinoma, squamous cell lung carcinoma, CYFRA 21-1, SCC, CXCR1, CXCR2, CD44v6, relapse, biomarkers.

For citation: Tahanovich D, Kauhanka MM, Kolb AV, EA Khotko, Gotko OV, Prokhorova VI. Optimization of the use of markers in the blood of patients with adenocarcinoma and squamous cell lung cancer to evaluate the effectiveness of treatment. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2024, vol. 3, no. 1(4). pp. 111–119 (in Russian).

Поступила 29.03.2024

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ ПЕПТИДНЫХ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ И ИХ РЕЦЕПТОРОВ ПРИ ПСОРИАЗЕ, АССОЦИИРОВАННОМ С ПСИХИЧЕСКИМИ РАССТРОЙСТВАМИ

Е. Б. Маркевич, Д. Ф. Хворик, Э. П. Станько

*Гродненский государственный медицинский университет,
г. Гродно, Республика Беларусь*

Введение. Псориаз – распространенный хронический эритематозно-сквамозный дерматоз, характеризующийся нарушением регуляции иммунной системы и проявляющийся не только поражением кожи, но и изменениями в других органах и системах органов. Ассоциация различных инфекционных и неинфекционных заболеваний с хроническим дерматозом характеризуется взаимно отягощающим течением сочетанной патологии, связанным с риском возникновения аутоиммунных процессов. Роль нейропептидов в функционировании иммунной системы заключается в передаче неврологических импульсов от афферентных нервных волокон к сигналам, которые могут быть считаны иммунокомпетентными клетками, и это явление потенциально может усугубить воспалительную реакцию.

Цель исследования – оценить содержание пептидных нейромедиаторов и их рецепторов в сыворотке крови пациентов с различными клиническими формами псориаза, ассоциированного с психическими расстройствами.

Материалы и методы. Основными методами обследования 150 пациентов с псориазом были клинико-дерматологический, клинико-лабораторный, психопатологический.

Результаты. Психические расстройства в 38,1 % случаев были представлены расстройствами личности и другими тревожными расстройствами (F41 МКБ-10). При оценке степени тяжести псориаза у пациентов с сочетанной патологией были достоверно выше как индексы PASI и DLQA, так и уровни нейропептидов SP и CNTF по сравнению с группой пациентов с псориазом ($p < 0,05$).

Заключение. Полученные в ходе исследования данные могут свидетельствовать о роли некоторых нейромедиаторов и их рецепторов в патогенезе псориаза и тревожно-депрессивных расстройств. Дальнейшее изучение данных показателей может улучшить диагностические возможности и оптимизировать методы лечения данной сочетанной патологии.

Ключевые слова: псориаз, тревожно-депрессивные расстройства, нейромедиаторы.

Для цитирования: Диагностическая ценность пептидных нейромедиаторов и их рецепторов при псориазе, ассоциированном с психическими расстройствами / Е. Б. Маркевич, Д. Ф. Хворик, Э. П. Станько // Биохимия и молекулярная биология. – 2024. – Т. 3, № 1(4). – С. 120–127.

Введение

Псориаз – распространенное хроническое эритематозно-сквамозное заболевание кожи, характеризующееся в большинстве случаев зудом, является результатом неконтролируемой пролиферации кератиноцитов, а его патогенез включает нарушение регуляции иммунной системы. Дерматоз проявляется не только поражением кожи, но также связан с другими сопутствующими заболеваниями. Системные проявления псориаза включают псориатический артрит мелких и крупных суставов, сердечно-сосудистые заболевания, диабет, некоторые злокачественные новообразования, ожирение, а также психические расстройства [1, 2].

В структуре психической патологии у пациентов, страдающих псориазом, на долю депрессии приходится 60–80 %, расстройств личности – 40–60 %, тревожных расстройств – до 30 %. К отличительным личностным чертам пациентов с пси-

риазом можно отнести неустойчивое эмоциональное состояние, повышенную тревожность, ипохондрию и мнительность, конфликтность, что приводит к значительной психологической дезадаптации и нарушениям межличностных отношений, а впоследствии и к определенной социальной изоляции. У них достаточно часто встречаются психосоциальные проблемы, такие, как стыд, гнев, беспокойство, трудности в повседневной деятельности и общественной жизни, а высокая частота коморбидной депрессии характеризуется плохой приверженностью к лечению, отрицательным терапевтическим ответом и худшими результатами проводимой терапии.

Роль нейропептидов в регуляции данных клеток иммунной системы заключается в передаче неврологических импульсов от афферентных нервных волокон к сигналам, которые могут быть считаны иммунокомпетентными клетками, и это

явление потенциально может усугубить воспалительную реакцию [3]. Ниже представлены основные пептидные нейромедиаторы, играющие ведущую роль в патогенезе псориаза и сочетанной с ним патологией.

Амфирегулин (AREG) – это нейропептид, который кодирует наиболее распространенный лиганд рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) в кератиноцитах. Имеются данные, указывающие на способность AREG влиять на дифференцировку клеток и опосредовать воспалительные процессы в данных клетках [4].

Субстанция P (SP) – это широко распространенный в афферентных чувствительных волокнах нейропептид, принадлежащий к семейству такикининов. Она передает ощущение боли и зуда от периферии к центральной нервной системе. Ее эффекты опосредуются через 2 основных рецептора, в результате чего происходит высвобождение множественных сигнальных каскадов, которые включают дегрануляцию тучных клеток и высвобождение провоспалительных медиаторов, что приводит к нейрогенному воспалению и зуду [4].

Пептид, связанный с геном кальцитонина (CGRP) локализуется по всей периферической и центральной нервной системе. Он вырабатывается преимущественно в сенсорных нервных волокнах вместе с таким нейропептидом, как SP, а также в центральной нервной системе. Также известна экспрессия CGRP другими клетками, включая клетки Лангерганса, эпителиальные клетки, кератиноциты, фибробласты, Т- и В-лимфоциты, а также моноциты. CGRP и SP являются двумя основными провоспалительными нейропептидами, высвобождаемыми из нервных окончаний: SP действует на NK1-рецепторы, опосредуя повышение проницаемости микрососудов, а CGRP является мощным сосудорасширяющим средством, способствующим возникновению инфильтрации и местной воспалительной реакции [5].

Цилиарный нейротрофный фактор (CNTF) принадлежит к семейству интерлейкинов-6 и экспрессируется преимущественно глиальными клетками центральной и периферической нервной систем [6]. CNTF играет важную роль в регуляции нейронального развития, нейропротекции и может влиять на когнитивные процессы. Однако физиологическое значение CNTF, циркулирующего в крови, до настоящего времени до конца не выяснено. Имеются данные о достоверно повышенном содержании CNTF в крови пациентов с депрессией, возникновение которой сопровождается нарушением проницаемости гематоэнцефалического барьера. Содержание CNTF в сыворотке крови при различной патологии остается малоизученным. Считается, что CNTF у здоровых лиц не определя-

ется. Согласно некоторым данным, CNTF демонстрировал индукцию холинэргических свойств в адренэргических симпатических мотонейронах. Данное влияние включало экспрессию ацетилхолина в качестве нейромедиатора и синтез SP в качестве ацетилхолин-ассоциированного нейропептида [7, 8].

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), как наиболее изученный рецептор тирозинкиназы, является фундаментальным модулятором клеточной пролиферации, дифференцировки, миграции и воспаления в эпидермисе. Активация EGFR, дальнейшая повышенная экспрессия, а также взаимодействие его лигандов с интрлейкином-17A, может приводить к развитию псориаза. Ингибирование экспрессии и активации EGFR является мощной стратегией противодействия прогрессированию псориаза. Однако всестороннее понимание сети регуляции EGFR и его лигандов, а также нижестоящих сигнальных путей, участвующих в псориазе, до сих пор не достигнуто и требует дальнейших исследований [9, 10].

Таким образом, роль нейропептидов и их рецепторов в патогенезе псориаза остается недостаточно изученной – не определена их роль в развитии воспалительной реакции кожи, зуда, а также до конца не ясным остается их взаимодействие с другими факторами, влияющими на возникновение и течение сочетанной с псориазом патологией.

Цель исследования – оценить содержание пептидных нейромедиаторов и их рецепторов в сыворотке крови пациентов с различными клиническими формами псориаза, ассоциированного с психическими расстройствами.

Материалы и методы

Предметом клинического изучения явилась выборка из числа пациентов, находившихся на стационарном лечении в дерматологическом отделении ГУЗ «Гродненский областной клинический кожно-венерологический диспансер». Общую выборку составили 150 пациентов, разделенных на 2 группы: 1-я группа – пациенты с псориазом (n=70); 2-я группа – пациенты с псориазом, ассоциированным с психическими расстройствами (n=80). В качестве контроля (3-я группа) использовалась сыворотка крови практически здоровых лиц без клинико-anamnestических признаков псориаза и психических расстройств (n=10).

Все испытуемые дали письменное добровольное согласие на участие в исследовании. Проведение исследования было одобрено решением Комитета по биомедицинской этике учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет».

Основными методами были клиничко-дерматологический, клиничко-лабораторный, психопатологический, экспериментально-психологический. Для клинической диагностики псориаза определяли «псориагическую триаду», устанавливали стадию заболевания, проводили осмотр ногтей пластин, волосистой части головы, слизистых оболочек, производили подсчет индекса распространенности и тяжести течения псориаза (PASI) и дерматологического индекса качества жизни (DLQI).

Оценка психического статуса проводилась клиничко-психопатологическим методом в соответствии с принятыми в психиатрии критериями. Диагноз психических расстройств был выставлен на основании диагностических критериев МКБ-10. Экспериментально-психологический метод включал использование Госпитальной шкалы тревоги и депрессии (HADS) для скрининга тревожных и депрессивных расстройств.

Количественное определение нейропептидов и нейтрофинов (SP, CNTF, CGRP, EGFR, AREG) в сыворотке крови проводилось методом ИФА с использованием стандартных наборов Human SP (Substance P) ELISA, Human CNTF (Ciliary neurotrophic factor) ELISA, Human CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide) ELISA, Human EGFR (Epidermal growth factor receptor) ELISA, Human AREG (Amphiregulin) ELISA в соответствии с инструкцией производителя на автоматическом анализаторе «Sunrise» TECAN (Австрия).

Статистический анализ проведен с использованием стандартного статистического пакета прикладного программного обеспечения STATISTICA 10,0 (SN AXAR207F394425FA-Q). Для сравнения независимых переменных был использован тест Kruskal-Wallis и медианный. Количественные данные представлены в виде медиан и межквартильного размаха (между 25 и 75 квартилями). Оценка достоверности различий между переменными, в случаях с количеством групп больше двух, были сделаны с использованием теста Kruskal-Wallis (множественные сравнения p величин). Связь между переменными оценивали с помощью метода ранговой корреляции Спирмена. Различия (корреляционные связи) считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Среди 70 пациентов 1-й группы, 46 составили лица мужского и 24 – женского пола. Их возраст варьировал от 18 до 60 лет, медиана – 40,5 [32,0; 49,0] лет. Продолжительность псориаза составила от 1 недели до 44 лет (медиана – 10,0 [3,0; 20,0] лет). Частота обострений кожного процесса указывалась от 1 до 4 раз в год.

Среди 80 пациентов 2-й группы, страдающих псориазом, ассоциированным с психическими расстройствами, 52 составили лица мужского и 28 – женского пола, в возрасте от 18 до 60 лет, медиана – 41 [26; 52] год. Продолжительность дерматоза в данной группе варьировала от 3 месяцев до 45 лет (медиана – 11,5 [5; 20] лет), а частота обострений составляла от 1 до 4 раз в год.

Среди пациентов 1-й группы отягощенная наследственность установлена у 24, 2-й – у 30 обследованных. При анализе возможных триггерных факторов дебюта псориаза установлено, что у 68,6 % респондентов 1-й и 67,5 % 2-й группы – наблюдался психологический стресс, у 22,9 % пациентов 1-ой и 18,7 % 2-й группы – факторы не были установлены, а 4,3 % обследуемых 1-й и 7,5 % 2-ой группы – указывали на предшествующую инфекционную сенсибилизацию. Среди триггерных агентов, приведших к очередному обострению кожного процесса в группе пациентов с псориазом, на первом месте был психологический стресс (50,0 %), на втором – затруднение в установлении причины (25,7 %), на третьем – предшествующая инфекционная сенсибилизация (20,0 %). Что касается пациентов с псориазом, ассоциированным с психическими расстройствами, психологический стресс так же доминировал у 52,5 % обследуемых, далее указывалась предшествующая инфекционная сенсибилизация (21,3 %), а 16,3% респондентов затруднялись в установлении причины.

При оценке частоты проявления отдельных кожных симптомов дерматоза установлено, что у пациентов 1-й группы преобладали: симптом Пильнова – у 70 (100 %), зуд кожи – у 45 (64,3 %), «псориагическая триада» – у 48 (68,6 %) обследованных, «дежурные бляшки» – у 45 (64,3 %), эксфолиации – у 43 (61,4 %), поражение себорейных зон – у 32 (45,7 %), волосистой части головы – у 30 (42,9 %) и т.д. Среди симптомов поражения ногтей пластин в данной группе чаще встречались паронихии – у 37 (52,9 %), онихолизис – у 34 (48,6 %) и симптом Готтрона – у 31 (38,8 %) пациентов.

У пациентов 2-й группы чаще верифицировались: симптом Пильнова – у 80 (100 %), зуд кожи – у 65 (81,3 %), эксфолиации – у 64 (80,0 %), «псориагическая триада» – у 61 (76,3 %), «дежурные бляшки» – у 60 (75,0 %), поражение себорейных зон – у 50 (62,5 %), поражение волосистой части головы – у 48 (60,0 %) и т. д. Поражения ногтей пластин у лиц с сочетанной патологией характеризовались: паронихиями – у 47 (58,8 %), симптомом Готтрона – у 31 (38,8 %) и онихолизисом – у 30 (37,5 %) пациентов. Проведение сравнительного анализа отдельных кожных симптомов

показало, что при сочетанном варианте псориаза и психических расстройств установлена достоверно большая частота встречаемости зуда кожи ($p<0,05$), болезненности в области высыпаний ($p<0,05$), парестезий кожи ($p<0,05$), поражения себорейных зон ($p<0,05$), поражения волосистой части головы ($p<0,05$), симптома Кебнера ($p<0,05$), выраженного шелушения волосистой части головы ($p<0,05$), жжения в области высыпаний ($p<0,01$), поражения ладоней и подошв ($p<0,01$), эскориаций ($p<0,01$), симптома Пильнова ($p<0,001$), чем при дерматозе на фоне отсутствия психических расстройств.

Среди клинических форм дерматоза, у 46 (65,7 %) пациентов 1-й и 52 (65,0 %) 2-й группы диагностирован вульгарный псориаз; соответственно, у 20 (28,6 %) и 19 (23,8 %) – экссудативный; соответственно, у 4 (5,7 %) и 9 (11,2 %) – псориаз эритродермия. По сезонности заболевания у 49 (70,0 %) пациентов 1-й группы преобладала недифференцированная форма заболевания, на втором месте – зимняя у 11 (15,7 %), на третьем – летняя у 10 (14,3 %). У 43 (53,7 %) пациентов 2-й группы так же превалировала не-

дифференцированная форма заболевания, зимняя – у 21 (26,3 %), летняя – у 16 (20,0 %).

При оценке степени тяжести псориаза, индекс PASI у пациентов 1-й группы был достоверно ниже по сравнению со 2-й (соответственно, медиана – 26,9 [19,8; 33,6] и 31,3 [24,6; 36,7] баллов) ($p<0,05$). В то же время значения индекса PASI соответствовали средней степени тяжести дерматоза у 66 (94,3 %) пациентов 1-й и 71 (88,7 %) пациентов 2-й группы.

При анализе результатов анкетирования по степени влияния дерматоза на качество жизни пациентов также установлено, что значение индекса DLQI у пациентов 2-й группы достоверно выше, чем у пациентов 1-й группы и, в свою очередь, составило 12,5 [8,0; 15,0] и 14,0 [8,0; 21,0] баллов соответственно ($p<0,05$). Из них 44 (62,9 %) пациента с псориазом и 36 (45,0 %) с сочетанной патологией отметили очень сильное влияние заболевания на качество их жизни, в то время, как 6 (8,6 %) и 21 (26,3 %) респондентов 1-й и 2-й групп, соответственно указали на «чрезвычайно сильное» влияние дерматоза на качество жизни (таблица 1).

Таблица 1 – Клинико-anamnestическая характеристика обследуемых пациентов

Table 1 – Clinical and anamnestic characteristics of the examined patients

Показатель	Количество пациентов			
	абс.		%	
	1-я группа (n=70)	2-я группа (n=80)	1-я группа (n=70)	2-я группа (n=80)
Клиническая форма псориаза				
Вульгарный	46	52	65,7	65,0
Экссудативный	20	19	28,6	23,7
Эритродермия	4	9	5,7	11,3
Сезонность псориаза				
Зимняя	11	21	15,7	26,3
Летняя	10	16	14,3	20,0
Недифференцированная	49	43	70,0	53,7
Наследственность				
Отягощена	24	30	34,3	37,5
Не отягощена	46	50	65,7	62,5
PASI, баллы				
Средняя (PASI – 10-50)	66	71	94,3	88,7
Тяжелая (PASI – 50-70)	4	9	5,7	11,3
DLQI, баллы				
0–1 – кожное заболевание не влияет на качество жизни	1	2	1,4	2,5
2–5 – заболевание оказывает незначительное влияние на качество жизни	7	6	10,0	7,5
6–10 – заболевание оказывает умеренное влияние на качество жизни	12	15	17,1	18,7
11–20 – заболевание оказывает очень сильное влияние на качество жизни	44	36	62,9	45,0
21–30 – заболевание оказывает чрезвычайно сильное влияние на качество жизни	6	21	8,6	26,3

Анализ наследственной отягощенности психическими заболеваниями показал, что никто из об-

следованных в обеих группах и их родственников в прошлом не обращался к врачу-психиатру-нар-

кологу или психотерапевту и не проходил лечение адаптационных, тревожно-депрессивных или фобических расстройств.

Оценка психического состояния пациентов с использованием шкалы HADS позволила установить значительную представленность тревожных и депрессивных переживаний у пациентов с псориазом. Так, субклинически выраженный уровень тревоги и депрессии установлены у 17,5 % и 11,3 % обследуемых соответственно. Клинически выраженный уровень тревоги и депрессии зарегистри-

рованы у 40,0 % и 31,2 % пациентов с дерматозом, соответственно.

Психические расстройства, спровоцированные хроническим дерматозом, были установлены у 38,1 % пациентов, представленные различными типами нозогенных реакций и ипохондрического развития личности. Диагностическими категориями согласно МКБ-10 в 40 % случаев были «Другие тревожные расстройства», в 37,5 % случаев – «Реакция на тяжелый стресс и нарушения адаптации» и в 22,5 % – «Соматоформные расстройства» (таблица 2).

Таблица 2 – Структура и частота (абс. и %) психических расстройств у пациентов с псориазом (n=80)

Table 2 – Structure and frequency (abs. and %) of mental disorders in patients with psoriasis (n=80)

Диагноз по МКБ-10	Частота (абс. и %)	
	абс.	%
F41.1 Генерализованное тревожное расстройство	8	10,0
F41.2 Смешанное тревожное и депрессивное расстройство	12	15,0
F41.3 Другие смешанные тревожные расстройства	12	15,0
F43.20 Кратковременная депрессивная реакция, обусловленная расстройством адаптации	6	7,5
F43.22 Смешанная тревожная и депрессивная реакция, обусловленная расстройством адаптации	24	30,0
F45.2 Ипохондрическое расстройство	13	16,25
F45.38 Соматоформная дисфункция вегетативной нервной системы (других органов и систем)	2	2,5
F45.1 Недифференцированное соматоформное расстройство	3	3,75
Всего	80	100,0

Расчет коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r) в группе пациентов с тревожными расстройствами показал наличие статистически значимой прямой корреляционной связи между значениями возраста и длительностью болезни (r=0,47), а также между длительностью болезни и индексом PASI (r=0,32). В группе пациентов, страдающих соматоформными расстройствами, статистически значимая прямая корреляционная связь была выяв-

лена между значениями возраста и длительностью болезни (r=0,55), а также длительностью болезни и индексом PASI (r=0,45). В группе пациентов с расстройством адаптации статистически значимых прямых корреляционных связей выявлено не было.

Следующим этапом исследования было количественное определение некоторых нейропептидов и нейтрофинов в сыворотке крови пациентов 3-х групп (таблица 3).

Таблица 3 – Количественное содержание нейропептидов и нейтрофинов в сыворотке крови обследуемых пациентов

Table 3 – Quantitative content of neuropeptides and neutrophins in blood serum of the examined patients

Показатель, единицы измерения	Группа, медиана, 25 и 75% процентиля			Достоверность различий при сравнении между группами		
	1-я (n=70)	2-я (n=80)	3-я (n=10)	p 1 и 2	p 1 и 3	p 2 и 3
AREG, pg/ml	40,6 (30,1;53,3)	38,3 (26,7;50,8)	21,0 (21,0;34,1)	>0,05	<0,05	>0,05
CGRP, pg/ml	43,7 (24,2;67,0)	48,2 (28,5;95,7)	62,1 (45,2;73,2)	>0,05	>0,05	>0,05
SP, pg/ml	117,0 (100,4;129,0)	127,6 (103,3;185,1)	110,0 (107,0;111,6)	<0,05	>0,05	>0,05
CNTF, pg/ml	1111,5 (458,0;1484,0)	1466,3 (1311,5;1683,2)	210,1 (159,0;315,0)	<0,01	<0,01	<0,01
EGFR, ng/ml	17,0 (15,3;20,6)	17,3 (14,8;20,0)	16,5 (13,0;17,3)	>0,05	>0,05	>0,05

Максимальный уровень AREG в сыворотке крови установлен у пациентов 1-й группы, при

этом он был достоверно выше, чем у лиц 3-й группы (p<0,05). Однако, у пациентов 2-ой группы име-

ло место быть наибольшее содержание SP, CNTF и EGFR. В частности, уровень SP в сыворотке крови был достоверно выше по сравнению с 1-й группой, уровень CNTF в сыворотке крови был достоверно выше как по сравнению с 1-й, так и 3-й группой пациентов ($p < 0,05$). Достоверных различий по содержанию CGRP среди обследуемых групп не было установлено ($p > 0,05$).

При расчете коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r) у пациентов 1-й группы были выявлены следующие статистически значимые прямые корреляционные связи между: индексом PASI и длительностью заболевания ($r=0,56$); зудом кожи и значениями индекса DLQI ($r=0,44$), значениями возраста и длительностью заболевания ($r=0,38$), уровнем содержания нейропептидов AREG и SP ($r=0,37$), SP и CNTF ($r=0,35$), AREG и CNTF ($r=0,34$), зудом кожи и CGRP ($r=0,34$), уровнем содержания нейропептидов CGRP и EGFR ($r=0,27$); значения возраста отрицательно коррелировали с показателем CGRP ($r=-0,25$).

При расчете коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r) у пациентов 2-й группы были выявлены следующие статистически значимые прямые корреляционные связи между: значениями возраста и длительностью заболевания ($r=0,52$), значениями индекса PASI и уровнем содержания нейропептидов AREG и SP ($r=0,56$ и $r=0,50$) соответственно; клинической формой и индексом PASI ($r=0,48$) и уровнем содержания нейропептидов AREG и SP ($r=0,36$ и $r=0,3$) соответственно; уровнем содержания нейропептидов AREG и SP и AREG и CNTF ($r=0,29$ и $r=0,24$) соответственно, индексом PASI и зудом кожи и индексом PASI и длительностью заболевания ($r=0,27$ и $r=0,26$), а также между значениями возраста отрицательно коррелировали с показателем CNTF ($r=-0,22$).

Заключение

Псориагическая болезнь представляет собой серьезную проблему, связанную с ее ассоциацией с другими инфекционными и неинфекционными заболеваниями, взаимно осложняющими течение и исходы сочетанной патологии, повышающими риск развития аутоиммунных процессов с выраженными

функциональными и морфологическими изменениями органов и систем организма, резко снижающими качество жизни пациентов, приводящими к психической и социальной дезадаптации, стойкой утрате трудоспособности, обуславливая не только медицинскую, но и социальную значимость проблемы.

В выборке пациентов с психическими расстройствами, спровоцированными хроническим дерматозом, выявлены нозогенные смешанные тревожно-депрессивные реакции с социофобическими включениями и ипохондрическое расстройство личности с преобладанием психотравмирующих факторов в дебюте и очередном обострении кожного процесса. Выделены стрессогенные (тяжесть клинических проявлений, локализация высыпаний, выраженность субъективных симптомов, характер течения псориаза) факторы, влияющие на формирование психических расстройств у пациентов с хроническим дерматозом.

Психические расстройства, ассоциированные с псориазом, оказывают отягощающее влияние на течение хронического дерматоза, выражающееся в достоверно большей частоте встречаемости зуда кожи, болезненности в области высыпаний, парестезий кожи, поражения себорейных зон, поражения волосистой части головы, симптома Кебнера, выраженного шелушения волосистой части головы, жжения в области высыпаний, поражения ладоней и подошв, эксфолиаций, симптома Пильнова, индексов PASI и DLQI, чем при дерматозе на фоне отсутствия психических расстройств.

У пациентов 2-й группы количественное содержание в сыворотке крови SP достоверно выше по сравнению с 1-й группой пациентов, а уровень CNTF достоверно выше по сравнению с 1-й и 3-й группами пациентов, что может свидетельствовать о возможной патогенетической роли нейропептидов и их рецепторов при данной сочетанной патологии и требует дальнейшего изучения. Учитывая возможность терапевтического воздействия на уровень продукции нейропептидов, полученные данные об их роли в патогенезе псориаза и его коморбидной патологии позволят разработать персонализированный подход к терапии с учетом тяжести заболевания и сочетанной патологии.

Благодарности

Настоящее исследование выполнено при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований в рамках конкурса проектов «Наука – 2023» «Роль нейромедиаторов воспаления и зуда в патогенезе псориаза, ассоциированного с психическими расстройствами» № госрегистрации 20231273.

Acknowledgements

This study was carried out with the financial support of the Belarusian Republican Foundation for Basic Research within the framework of the project competition «Science - 2023» «The role of neurotransmitters of inflammation and itching in the pathogenesis of psoriasis associated with mental disorders» state registration No. 20231273.

- Singh, R. The cytokine mediated molecular pathophysiology of psoriasis and its clinical implications / R. Singh [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22, № 23. – P. 12793 – doi: 10.3390/ijms222312793.
- Rendon, A. Psoriasis pathogenesis and treatment / A. Rendon, K. Schäkel // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20, № 6. – P. 1475. – doi: 10.3390/ijms20061475.
- Marek-Jozefowicz, L. Molecular mechanisms of neurogenic inflammation of the skin / L. Marek-Jozefowicz [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – Vol. 24, № 5. – P. 5001. – doi: 10.3390/ijms24055001.
- Mehta, D. Immunoregulatory effects of neuropeptides on endothelial cells: relevance to dermatological disorders / D. Mehta, R. D. Granstein // *Dermatology.* – 2019. – Vol. 235, № 3. – P. 175–186. – doi: 10.1159/000496538.
- Kim, Y. J. Roles of calcitonin gene-related peptide in the skin, and other physiological and pathophysiological functions / Y. J. Kim, R. D. Granstein // *Brain Behav. Immun. Health.* – 2021. – Vol. 18. – P. 100361. – doi: 10.1016/j.bbih.2021.100361.
- Маркевич, Е. Б. Роль некоторых нейропептидов и нейтрофинов в патогенезе псориаза, ассоциированного с психическими расстройствами / Е.Б. Маркевич, Д. Ф. Хворик, Э. П. Станько, А. В. Брынина, В. Р. Шулика // *Дерматовенерология. Косметология.* – 2024. – Т. 10, № 1. – С. 86–99. – doi: 10.34883/PI.2024.10.1.016.
- Guo, H. The roles of ciliary neurotrophic factor - from neuronutrition to energy metabolism / H. Guo, P. Chen // *Protein Pept Lett.* – 2022. – Vol. 29, № 10. – P. 815–828. – doi: 10.2174/0929866529666220905105800.
- Узбеков, М. Г. Эндогенная интоксикация и ее роль в патогенетических механизмах психических расстройств / М. Г. Узбеков // *Социальная и клиническая психиатрия.* – 2019. – Т. 29. – № 4. – С. 14–20.
- Dai, X. EGFR ligands synergistically increase IL-17A-induced expression of psoriasis signature genes in human keratinocytes via IκBζ and Bcl3 / X. Dai [et al.] // *Eur. J. Immunol.* – 2022. – Vol. 52, № 6. – P. 994–1005. – doi: 10.1002/eji.202149706.
- Yaojia Cheng, Y. X. Aberrant expression of the UPF1 RNA surveillance gene disturbs keratinocyte homeostasis by stabilizing AREG / Y. X. Yaojia Cheng [et al.] // *Int. J. Mol. Med.* – 2020. – Vol. 45, № 4. – P. 1163–1175. – doi: 10.3892/ijmm.2020.4487.
- Singh R, Koppu S, Perche PO, Feldman SR. The cytokine mediated molecular pathophysiology of psoriasis and its clinical implications. *Int J Mol Sci.* 2021;22(23):12793. doi: 10.3390/ijms222312793.
- Rendon A, Schäkel K. Psoriasis Pathogenesis and Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(6):1475. doi: 10.3390/ijms20061475.
- Marek-Jozefowicz L, Nedoszytko B, Grochocka M, Żmijewski MA, Czajkowski R, Cubala WJ, Slominski AT. Molecular Mechanisms of Neurogenic Inflammation of the Skin. *Int J Mol Sci.* 2023;24(5):5001. doi: 10.3390/ijms24055001.
- Mehta D, Granstein RD. Immunoregulatory effects of neuropeptides on endothelial cells: relevance to dermatological disorders. *Dermatology.* 2019;235(3):175-186. doi:10.1159/000496538.
- Kim YJ, Granstein RD. Roles of calcitonin gene-related peptide in the skin, and other physiological and pathophysiological functions. *Brain Behav Immun Health.* 2021;18:100361. doi: 10.1016/j.bbih.2021.100361.
- Markevich E, Khvorik D, Stanko E, Brynina A, Shulika V. Rol nekotoryh nejropeptidov i nejtrofinov v patogeneze psoriaza, asociirovannogo s psihicheskimi rasstrojstvami [The Role of Some Neuropeptides and Neutrophins in the Pathogenesis of Psoriasis Associated with Mental Disorders]. *Dermatovenerologija. Kosmetologija* [Dermatovenerology Cosmetology]. 2024;10(1):86-99. https://doi.org/10.34883/PI.2024.10.1.016. (in Russian).
- Guo H, Chen P, Luo R, Zhang Y, Xu X, Gou X. The Roles of Ciliary Neurotrophic Factor - from Neuronutrition to Energy Metabolism. *Protein Pept Lett.* 2022;29(10):815-828. doi: 10.2174/0929866529666220905105800.
- Uzbekov MG. Jendogennaja intoksikacija i ee rol v patogeneticheskix mehanizmah psihicheskix rasstrojstv. *Socialnaja i klinicheskaja psixiatrija.* 2019;29(4):14-20. (in Russian).
- Dai X, Murakami M, Shirashi K, Muto J, Tohyama M, Mori H, Utsunomiya R, Sayama K. EGFR ligands synergistically increase IL-17A-induced expression of psoriasis signature genes in human keratinocytes via IκBζ and Bcl3. *Eur J Immunol.* 2022;52(6):994-1005. doi: 10.1002/eji.202149706.
- Yaojia Cheng YX, Lu Q, Shi N, Zhou Q, Rong J, Li L, Wang L, Liu C. Aberrant expression of the UPF1 RNA surveillance gene disturbs keratinocyte homeostasis by stabilizing AREG. *Int J Mol Med.* 2020;45(4):1163-1175. doi: 10.3892/ijmm.2020.4487.

DIAGNOSTIC VALUE OF PEPTIDE NEUROMEDIATORS AND THEIR RECEPTORS IN PSORIASIS ASSOCIATED WITH MENTAL DISORDERS

E. B. Markevich, D. F. Khvorik, E. P. Stanko

Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

Background. Psoriasis is a common chronic erythematous-squamous dermatosis, characterized by dysregulation of the immune system and manifested not only by skin lesions, but also by changes in other organs and organ systems. The association of various infectious and non-infectious diseases with chronic dermatosis is characterized by a mutually aggravating course of the combined pathology associated with the risk of autoimmune processes. The role of neuropeptides in the functioning of the immune system is to transmit neurological impulses from afferent nerve fibers to signals that can be read by immune cells, a phenomenon that can potentially exacerbate the inflammatory response.

Objective. To assess the content of peptide neurotransmitters and their receptors in the blood serum of patients with psoriasis associated with mental disorders.

Materials and methods. The main methods of examining 150 patients with psoriasis were clinical-dermatological, clinical-laboratory, and psychopathological.

Results. Mental disorders in 38.1% of cases were represented by personality disorders and other anxiety disorders (F41 ICD-10). When assessing the severity of psoriasis, patients with combined pathology had significantly higher PASI and DLQA indices, as well as levels of neuropeptides SP and CNTF compared to the group of patients with psoriasis ($p < 0.05$).

Conclusions. The data obtained during the study may indicate the role of some neurotransmitters and their receptors in the pathogenesis of psoriasis and anxiety-depressive disorders. Further study of these indicators can improve diagnostic capabilities and optimize treatment methods for this combined pathology.

Keywords: psoriasis, anxiety-depressive disorders, neurotransmitters

For citation: Markevich EB, Khvorik DF, Stanko EP. Diagnostic value of peptide neuromediators and their receptors in psoriasis associated with mental disorders. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2024, vol. 3, no. 1(4). pp. 120–127 (in Russian).

Поступила 14.03.2024

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ РАСТИТЕЛЬНОГО ЭКСТРАКТА *BUXUS SEMPERVIRENS L.*

Джаббар Мустафа Салех

Институт биохимии биологически активных соединений
Национальной академии наук Беларуси, г. Гродно, Республика Беларусь

Введение. Химический состав растения самшит (*Buxus sempervirens L.*) и возможные его терапевтические и профилактические эффекты изучены недостаточно.

Цель исследования – оценить химический состав экстракта растительного *Buxus sempervirens L.* с использованием метода хромато-масс-спектрометрии.

Материалы и методы. Исследован растительный экстракт самшита (*Buxus sempervirens L.*). В работе применялся метод хроматографического анализа (Agilent 7820A, США – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием, идентификация – NIST11, Viley 14, пользовательская библиотека масс-спектров. Идентификация и количественное определение содержания соединений проведено при условиях: ввод пробы с делением потока (1:10), колонка ZB-5MS (30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм), температура инжектора 280 °С, газ-носитель – гелий, скорость газа через колонку 29 мл/мин.

Результаты. Анализ химического состава экстракта показал, что среднее количество детектируемых биологически активных веществ в составе исследуемого экстракта составило 118,3±11,1. Особенностью химического состава самшита является отсутствие кремнийорганических соединений, гликозидов, гетероциклических форм азота и серы. Можно сделать вывод, что н-гексан и хлороформ извлекают органические вещества из самшита, в основном, компоненты эфирного масла с широкой гаммой алкенов, моно-, би-, три- и тетрациклических углеводов, гуанидинов, небольшим набором стероидов, кислот.

Заключение. Получена информация о полном химическом составе экстракта самшита (*Buxus sempervirens L.*). Обогащенность экстракта углеводородами, алкинами, гуанидинами, сложными эфирами и спиртами, карбоновыми кислотами, простыми углеводами, стеринами и спиртами определяет специфичность и направленность фармакологического действия экстракта самшита в широком спектре антимикробной активности и возможной разработки препаратов для лечения ран.

Ключевые слова: самшит, состав, хроматографический анализ.

Для цитирования. Химический состав растительного экстракта *Buxus sempervirens L.* / Джаббар Мустафа Салех // Биохимия и молекулярная биология. – 2024. – Т. 3, № 1(4). – С. 128–135.

Введение

Самшит вечнозелёный (*Buxus sempervirens L.*) – один из самых древних кустарников. Самшит произрастает в Западной и Южной Европе, северо-западной Африке и Передней Азии. В Западной Европе в культуру введен еще в античное время. В районах Беларуси разводят главным образом в качестве декоративного кустарника в садах и парках. Очень теневынослив и теплолюбив, в природе обитает на слабокислых почвах. Единственная в мире, самшитовая роща расположена на Черноморском побережье Кавказа, на склоне горы Большой Ахун. Кроме того, уникальным природным памятником является тиссо-самшитовая роща близ Хосты – почти сплошной массив самшита площадью 300 га, объявленная в 1930 году заповедной (входит в состав Кавказского государственного заповедника) [1].

Еще древние врачи отметили, что самшит вечнозеленый имеет множество полезных свойств. Из самшита готовили специальные обереги от злых

сил, приписывали ему свойство отгонять ночные кошмары. В античные времена самшит применялся в качестве лекарственного растения, как средство против кашля, желудочно-кишечных болезней, а также лихорадок, например, малярии. В настоящее время самшит используется в народной медицине, он обладает гипотензивным, мочегонным, потогонным, антисептическим эффектом, антибактериальным, болеутоляющим, жаропонижающим, желчегонным действием [2].

Химический состав растения и возможные терапевтические и профилактические эффекты изучены недостаточно [3, 4, 5].

В работах Кароматова И. Д. [и др.] описано исследование *Buxus sempervirens L.*, собранного в регионах Узбекистана. Во всех собранных растениях были идентифицированы более 10 соединений. Все надземные части растения содержат алкалоиды (0,36 %) – буксин, парабуксин, буксидин, буксазин и др. [3, 6]. В листьях и древесине самшита определены красящие вещества, смолы. Листья

самшита содержат также ситостерол, стигмастерол, циклоартенол, люпеол, германикол, β -амирин [7]. Запах самшита обусловлен 4-меркапто-4-метилпентан-2-оном. В семенах и в корнях растения обнаружены жирные масла, тритерпеновые алкалоиды [8] и стероидный алкалоид буксамиол Е [9].

Таким образом, анализируя данные литературы по исследованию *Buxus sempervirens* L., следует отметить, что не все возможные компоненты описаны и изучены.

Цель исследования: оценить химический состав растительного экстракта *Buxus sempervirens* L. с использованием метода хромато-масс-спектрометрии.

Материалы и методы

Для анализа использован экстракт *Buxus sempervirens* L. (произрастающий в Беларуси, северо-западный регион) на основе 96 % этанола ($n = 50$). Стандартизованной композицией экстракта считали «чистый» экстракт растения самшита (96 % этанол, без разбавления).

Собранное сырье изучаемых растений высушивали методом воздушной сушки и измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито диаметром отверстия 2 мм, после чего определенное количество порошка подвергли экстракции в аппарате Сокслета. В качестве экстрагента использовали воду очищенную и этанол (концентрация 96 %). Навеску сырья заливали растворителем в соотношении сырье – экстрагент 1:10 и экстрагировали в течение 24 часов при температуре 37 °С [10]. Отделяли полученный экстракт от сырья путем фильтрования. Стандартизация композиции экстракта – «чистый» (без разбавления, цвет – зелено-желтый; запах – «дубовый» / «медовый»).

В работе использован метод хроматографического анализа (газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием, идентифика-

ция – NIST11, Wiley 14, пользовательская библиотека масс-спектров): Agilent 7820A, США. Идентификация и количественное определение содержания соединений проводились при следующих условиях хроматографирования: ввод пробы с делением потока (1:10), колонка ZB-5MS (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм), температура инжектора 280 °С, газ-носитель – гелий, скорость газа через колонку 29 мл/мин. Регистрация аналитических сигналов проводилась при следующих параметрах масс-спектрометра: температура переходной линии и источника ионов 280 и 250 °С, соответственно, электронная ионизация (ЭИ), диапазон регистрируемых масс от 50 до 500 Да [11].

Статистическая обработка данных проводилась с использованием стандартного пакета прикладных статистических программ «Statistic» (уровень достоверности статистических показателей $p < 0,05$): использованы стандартные методы описательной статистики и корреляционного анализа. Для сравнения групп по выраженности количественных признаков использовали критерии непараметрического анализа.

Результаты и их обсуждение

Количество веществ в экстракте самшита (*Buxus sempervirens* L.), обнаруженных с помощью масс-хроматографии, составило 125 (таблица 1).

Хроматограмма хлороформного экстракта представлена на рисунке 1.

Как видно, на протяжении всего времени хроматографического анализа детектировались химические компоненты и их производные.

Как видно, среднее количество детектируемых биологически активных веществ составило $118,3 \pm 11,1$. Количество анализируемых биологически активных веществ и их производных в пробах колебалось от 36 до 102 (среднее количество $69,00 \pm 16,14$; $p = 0,01$).

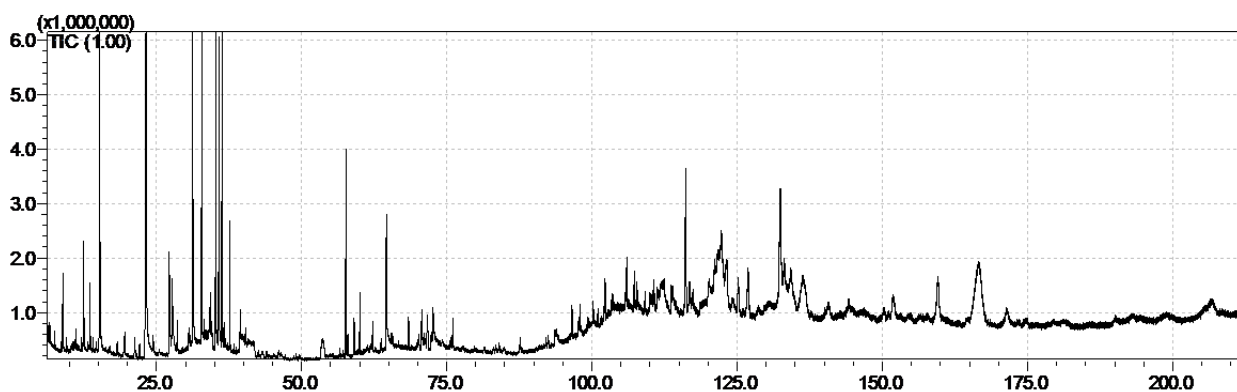


Рисунок 1 – Хроматограмма экстракта Самшита (*Buxus sempervirens* L.)

Figure 1 – Chromatogram of Boxwood extract (*Buxus sempervirens* L.)

Таблица 1 – Химический состав растительного экстракта Самшит (*Buxus sempervirens* L.)Table 1 – Chemical composition of the plant extract Boxwood (*Buxus sempervirens* L.)

RT	Width	Height	Area	Score	Peak	Cpd	Name
6,616	0,106	654923	1105124	87,6	75	5	Acetamide, TMS derivative
6,711	0,102	359904	868016	56,11	151	6	Phenol, tert.-butyldimethylsilyl ether
7,777	0,077	222868	384929	77,68	43	56	Guanidine, N,N-dimethyl-
7,945	0,099	55861	169482	64,4	73	58	2-Oxopentanoic acid, TMS derivative
8,376	0,119	432219	863623	92,66	58	10	Acetamide, N,N-diethyl-
9,059	0,053	18561	34942	62,84	75	59	L-Proline, TMS derivative
9,125	0,071	13835	30215	71,76	75	60	L-(+)-Lactic acid, trimethylsilyl ether
9,735	0,111	197848	455880	74,27	73	65	Lactic Acid, 2TMS derivative
10,02	0,063	137323	208552	90,29	147	68	Glycolic acid, 2TMS derivative
10,257	0,05	16566	23291	76,94	147	70	2-Propenoic acid, 2-[(trimethylsilyloxy)-, trimethylsilyl ester
10,564	0,073	38315	82076	68,14	116	73	Acetamide, TMS derivative
11,28	0,099	14446	33203	65,1	75	76	alpha.-Ketoisovaleric acid, TMS derivative
11,353	0,058	14446	22610	70,26	75	77	Hydracrylic acid, 2TMS derivative
11,565	0,048	28110	41502	70,65	73	79	Mercaptoethanol, 2TMS derivative
11,656	0,056	10560	16510	66,92	75	80	2-Pentamethylsilyloxypropane
11,725	0,056	28359	44558	72,77	75	81	Propanoic acid, 3-(trimethylsilyl)-, ethyl ester
11,864	0,084	278524	473112	53,72	73	82	Atenolol, 4TMS derivative
11,93	0,073	9685	29303	65,69	73	83	N-Formylglycine, TMS derivative
12,196	0,066	37260	69518	68,05	73	86	Glyoxylic acid, di-TMS
12,47	0,053	36128	55799	64,07	73	88	2-Oxopentanoic acid, TMS derivative
12,686	0,052	59227	85399	64,75	73	91	n-Butylamine, 2TMS derivative
12,927	0,055	69950	101821	71,52	73	94	Pentitol, 1,3-dideoxy-tris-O-(trimethylsilyl)-
13,04	0,051	35367	53956	88,82	147	95	4-Hydroxybutanoic acid, 2TMS derivative
13,164	0,065	129497	199203	91,68	179	97	Benzoic Acid, TMS derivative
13,256	0,04	12246	13494	54,91	75	98	N-(2-Hydroxy-1-phenylethyl)-benzenesulfonamide, 2TMS derivative
13,303	0,067	53484	84226	67,08	73	99	.alpha.-l-Galactofuranoside, methyl 6-deoxy-2,3,5-tris-O-(trimethylsilyl)-
13,416	0,066	9699	22535	73,8	75	100	2-Pentamethylsilyloxybutane
13,621	0,046	9122	13382	66,4	75	102	2-Pentamethylsilyloxypropane
13,723	0,099	157525	260743	76,04	177	103	1-Dimethylvinylsilyloxy-3-methylbenzene
14,037	0,059	47449	72872	71,62	73	104	3-Butenoic acid, 3-(trimethylsilyloxy)-, trimethylsilyl ester
14,099	0,055	40109	63937	63,5	73	105	Propylene glycol, 2TMS derivative
14,169	0,029	6578	4590	73,93	73	106	1,2,3-Butanetriol, 3TMS derivative
14,355	0,109	1005101	1636956	75,76	183	15	4-Imidazoleacetic acid, tert-butyldimethylsilyl ester
14,782	0,037	14052	19410	65,46	75	110	1,6-Hexanediol, 2TMS derivative
14,826	0,06	114513	176376	89,92	73	111	Glyceric acid, 3TMS derivative
14,957	0,095	20657	51937	71,89	73	112	2-Butenedioic acid, (Z)-, 2TMS derivative
14,99	0,068	19865	35128	69,23	73	113	2-Cyclopropylethanol, TMS derivative
15,195	0,055	26354	40388	59,07	58	115	alpha.-Ketoisovaleric acid, TMS derivative
15,45	0,066	46441	76005	66,16	73	116	Succinic anhydride, O,O'-bis(trimethylsilyl)-
15,494	0,053	49227	79371	75,4	73	117	Erythrono-1,4-lactone, (E)-, 2TMS derivative
15,666	0,062	42841	71755	62,79	73	118	3-Methylene-1,4-bis(trimethylsilyloxy) butane
15,881	0,051	29384	46003	69,13	73	120	Hydroquinone, 2TMS derivative
16,177	0,037	7797	9622	69,85	73	124	2-Methyl-1,3-propanediol, 2TMS derivative
16,426	0,07	30608	57131	71,43	73	127	Erythrono-1,4-lactone, 2TMS derivative
16,517	0,101	366860	770505	65,7	172	16	N-Methyl-L-leucine, 2TMS derivative
16,601	0,044	9726	13938	64,51	58	129	.alpha.-Ketoisovaleric acid, TMS derivative
16,7	0,083	142763	223695	74,63	73	130	Malic acid, 4-ethyl ester, 2TMS
16,846	0,054	8494	15040	69,3	73	131	2-Butenedioic acid, (Z)-, 2TMS derivative
16,886	0,08	50611	106908	66,2	73	132	N-Acetyl-L-alanine, TBDMS derivative
17,255	0,061	85674	126575	78,58	73	137	Glycerol, 3TMS derivative
17,39	0,071	577228	896910	88,77	73	17	Malic acid, 3TMS derivative
17,485	0,082	49857	122697	71,49	58	139	Pyruvic acid, TMS derivative
17,543	0,051	11919	20968	75,45	73	140	2-Butene-1,4-diol, (E)-, 2TMS derivative
17,795	0,088	543966	912119	95,15	73	18	Erythritol, 4TMS derivative

RT	Width	Height	Area	Score	Peak	Cpd	Name
17,956	0,12	33955	98819	71,51	73	145	4-Aminobutanoic acid, 3TMS derivative
18,518	0,045	24572	34325	63,07	73	149	Mercaptoacetic acid, 2TMS derivative
18,639	0,033	34328	53794	72,75	73	151	2-Butene-1,4-diol, (E)-, 2TMS derivative
18,672	0,049	30397	48530	67,28	73	152	Malonic acid, bis(2-trimethylsilyl)ethyl ester
18,763	0,093	30670	62762	66,21	73	153	4-Pentamethyldisilanyloxyoctane
18,938	0,053	109725	180395	81,05	73	155	Methyl .beta.-Arabinofuranoside, 3TMS derivative
19,077	0,061	40404	70467	65,56	73	157	L-(+)-Threose, tris(trimethylsilyl) ether (isomer 2)
19,581	0,077	66260	134826	78,77	73	160	2,3,4,5-Tetrahydroxypentanoic acid-1,4-lactone, tris(trimethylsilyl)-
20,202	0,04	22127	34867	67,98	73	166	Deoxyribose, tris(trimethylsilyl) ether (isomer 2)
20,337	0,093	43658	118707	65,5	73	168	2-Pentenoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester
20,436	0,077	69358	146312	65,12	73	169	2-Butene-1,4-diol, (E)-, 2TMS derivative
20,615	0,051	68545	107759	82,04	73	171	Levogluconan, 3TMS derivative
20,79	0,065	162797	255571	62,28	73	174	Glutaconic acid, tris(trimethylsilyl)-(ester)
20,889	0,062	85190	143980	60,01	73	175	Butanal, 2,3,4-tris[(trimethylsilyl)oxy]-, O-methyloxime, [R-(R*,R*)]-
20,947	0,044	42168	70045	83,3	73	176	Ribitol, 5TMS derivative
21,338	0,047	27532	42423	72,82	73	181	1,2,3-Butanetriol, 3TMS derivative
21,414	0,044	30579	49479	77,61	73	182	D-(-)-Ribofuranose, tetrakis(trimethylsilyl) ether (isomer 1)
21,572	0,088	197222	434600	69,06	73	184	1,3-Dihydroxyacetone dimer, 4TMS derivative
21,703	0,112	2857236	5216953	75,94	73	20	D-(-)-Tagatofuranose, pentakis(trimethylsilyl) ether (isomer 2)
21,878	0,055	101550	167917	84,63	73	186	D-Lyxose, 4TMS derivative
21,937	0,066	187530	336027	82,43	73	187	D-Arabinopyranose, 4TMS derivative (isomer 2)
22,112	0,106	1,7E+07	34918465	86,74	73	22	D-(-)-Fructofuranose, pentakis(trimethylsilyl) ether (isomer 1)
22,207	0,08	1E+07	17944992	86,56	73	23	L-(-)-Sorbofuranose, pentakis(trimethylsilyl) ether
22,28	0,077	3377497	6082837	86,25	73	24	D-(-)-Fructopyranose, 5TMS derivative (isomer 1)
22,349	0,073	1092361	1852900	89,41	73	25	Ethyl .alpha.-D-glucofuranoside, 4TMS derivative
22,499	0,062	212304	342372	82,47	73	189	D-Xylopyranose, 4TMS derivative
22,605	0,107	2776897	6266245	89,03	73	26	D-(+)-Talofuranose, pentakis(trimethylsilyl) ether (isomer 1)
22,689	0,065	157358	307128	79,75	73	190	D-Fructose, 5TMS derivative
22,817	0,131	2112747	4007616	76,07	73	27	Quinic acid (5TMS)
23,569	0,108	342220	843280	68,1	73	194	Acrylic acid, 2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester
24,146	0,085	55047	111145	65,07	73	198	Methyl 4-O-acetyl-2,3-di-O-methyl-6-deoxy-.alpha.-D-mannopyranoside
24,555	0,197	2,3E+07	67844720	96,22	204	32	D-Mannose, 5TMS derivative
25,019	0,09	298127	640208	93,18	73	203	Palmitic Acid, TMS derivative
25,096	0,067	20310	48570	60,23	73	204	3,6-Dioxa-2,4,5,7-tetrasilaoctane, 2,2,4,4,5,5,7,7-octamethyl-
25,91	0,096	197194	485705	83,9	73	209	trans-Sinapyl alcohol, 2O-TMS
26,524	0,123	161830	470963	90,75	73	210	Myo-Inositol, 6TMS derivative
26,63	0,069	7649	17538	63,12	73	211	Octadecane-1,2-diol, 2TMS derivative
27,273	0,103	43145	126258	75,33	44	213	13-Tetradecene-11-yn-1-ol
27,433	0,167	47735	177614	69,83	73	214	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-
27,725	0,152	408316	1410346	79,96	143	33	Phytol, TMS derivative
28,576	0,117	82039	272242	74,28	73	216	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, TMS derivative
28,77	0,157	107568	446061	76,9	73	217	alpha.-Linolenic acid, TMS derivative
29,055	0,195	15977	92067	68,12	73	218	L-Rhamnose, 4TMS derivative
29,482	0,062	16515	30073	78,13	73	220	Stearic acid, TMS derivative
33,226	0,15	8556	42007	51,41	44	222	Cyclopentane, 1-isopropylidene-2-trimethylsilyl-
33,408	0,206	68573	352094	80,92	59	223	9-Octadecenamide, (Z)-
33,872	0,179	15915	94714	76,2	59	225	8-Methyl-6-nonenamide
36,319	0,157	150274	754165	80,54	73	35	Oleamide, TMS derivative
36,797	0,177	138271	695576	76,27	73	228	D-(+)-Galacturonic acid, 5TMS derivative
37,74	0,189	39872	208116	54,72	108	230	Arabinofuranose, 1,2,3,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-

RT	Width	Height	Area	Score	Peak	Cpd	Name
40,446	0,177	206498	886714	81,88	217	38	Arabinofuranose, 1,2,3,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
40,446	0,177	206498	886714	81,88	217	232	Arabinofuranose, 1,2,3,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
40,782	0,165	18458	95132	58,09	73	233	2-Aminooctanoic acid, 2TMS derivative
41,68	0,147	83045	321399	72,87	73	236	3-.alpha.-Mannobiose, octakis(trimethylsilyl) ether (isomer 2)
41,954	0,194	2430093	9808295	94,24	371	39	1-Monopalmitin, 2TMS derivative
42,721	0,121	64584	227808	64,68	73	240	Methyl .alpha.-Arabinofuranoside, 3TMS derivative
44,109	0,115	319059	923959	77,78	217	245	Arabinofuranose, 1,2,3,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
44,416	0,24	624628	3213858	77,13	73	43	3-.alpha.-Mannobiose, octakis(trimethylsilyl) ether (isomer 2)
44,832	0,254	793857	2996700	80,38	217	44	Arabinofuranose, 1,2,3,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-
45,917	0,157	2023123	6709609	91,55	73	45	Glycerol monostearate, 2TMS derivative
46,746	0,082	36673	108382	84,2	73	251	2-.alpha.-Mannobiose, octakis(trimethylsilyl) ether (isomer 2)
48,174	0,165	61356	249573	83,05	73	260	D-(+)-Cellobiose, (isomer 1), 8TMS derivative
49,711	0,109	62533	186003	55,98	57	269	alpha.-D-Glucopyranoside, methyl 2,3,4-tris-O-(trimethylsilyl)-6-octadecanoate
51,282	0,127	117927	342290	75,88	73	277	.alpha.-Tocopherol, TMS derivative
53,17	0,127	37972	119288	61,79	73	285	alpha.-D-Glucopyranoside, methyl 2,3,4-tris-O-(trimethylsilyl)-6-octadecanoate
53,955	0,118	114501	373813	61,27	73	287	Acetin, bis-1,3-trimethylsilyl ether
54,726	0,133	542744	1949760	68,32	73	51	Lupeol trimethylsilyl ether
56,504	0,292	2065797	10262748	89,71	217	52	Sucrose, 8TMS derivative
58,042	0,36	45800	528902	62,02	73	294	alpha.-D-Glucopyranoside, methyl 2,3,4-tris-O-(trimethylsilyl)-6-octadecanoate

Удельный вес идентифицированных (подтвержденных) биологически активных веществ в экстракте самшита составил от 39 % до 100 %.

Для действительных концентраций веществ, активность которых может быть описана, берутся концентрации обнаруженных биологически активных ингредиентов и их производных с уровнем обнаружения вещества 50 % и/или более.

Детальный анализ полученных композиций экстрактов с учетом стандартного подхода (обнаружение $\geq 70,0\%$) показал, что не все разработанные и протестированные экстракты имели сходный состав и отличались друг от друга (от 70,7 % до 95,4 %, $p=0,03$) (таблица 2).

Основные вещества экстракта, обладающие активным эффектом, содержали компоненты с вероятностью обнаружения 95 % и чувствительностью идентификации $>70\%$: 23 химических компонента.

Химический состав экстракта характеризуется значительным содержанием различных по структуре углеводов, составляющих 24,44 масс. % от экстракта, в которых простых углеводов – 18,75 масс. % или 76,71 (масс. % от углеводов), из которых моносахариды составили 2,04 масс. % и дисахариды – 0,85 масс. %: D-(-)-Ribofuranose, tetrakis(trimethylsilyl) ether (isomer 1), 1,3-Dihydroxyacetone dimer, D-(-)-Tagatofuranose, pentakis(trimethylsilyl) ether (isomer 2), D-Lyxose, D-Arabinopyranose (isomer 2), D-(-)-Fructofuranose, pentakis(trimethylsilyl) ether (isomer 1), L-(-)-

Sorbofuranose, pentakis(trimethylsilyl) ether, D-(-)-Fructopyranose (isomer 1), D-Xylopyranose, D-Fructose, Myo-Inositol, Arabinofuranose, 1,2,3,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl), 3-.alpha.-Mannobiose, octakis(trimethylsilyl) ether (isomer 2), 2-.alpha.-Mannobiose, octakis(trimethylsilyl) ether (isomer 2), D-(+)-Cellobiose, (isomer 1), Sucrose.

В целом, состав углеводородной фракции экстракта следующий (масс. % от углеводов): простые углеводы – 76,71, алкины – 2,43, n-алкины+изоалканы – 9,07; арены – 0,98; моноцикло-, бицикло- и трициклоалканы, алкены – 10,81. Детектируемые в составе экстракта алкины представлены 2-Butene-1,4-diol, (E)-, 4-Pentamethyldisilanyl oxuocane, Octadecane-1,2-diol и другие. H- и изоалканы имеют от (C) до (C 54) углеродных атомов. Состав спиртов характеризовался доминированием непредельных соединений: Pentitol, 1,3-didesoxytris-O-(trimethylsilyl), 1,2,3-Butanetriol, Glycerol, Erythritol, Ribitol, Methyl 4-O-acetyl-2,3-di-O-methyl-6-deoxy-.alpha.-D-mannopyranoside, trans-Sinapyl alcohol, 2O-TMS, Phytol, Glycerol monostearate. Карбоновые кислоты представлены: Glyoxylic acid, Pyruvic acid, 2-Butenedioic acid, Pyruvic acid, Mercaptoacetic acid.

Этанол экстрагирует из органического вещества самшита незначительный набор фенолов, представленных Phenol, tert.-butyldimethylsilyl ether, а также стеринов: β -, dl- α -Tocopherol. Среди стеринов преобладают: dl- α -Tocopherol –

Таблица 2 – Химический состав экстракта *Buxus sempervirens* L. (чувствительность $\geq 70,0$ %)

Table 2 – Chemical composition of the extract *Buxus sempervirens* L. (sensitivity $\geq 70,0$ %)

RT	%	Вещество, производное
7,777	77,68	Guanidine, N,N-dimethyl-
9,125	71,76	L-(+)-Lactic acid, trimethylsilyl ether
9,735	74,27	Lactic Acid, 2TMS derivative
10,02	90,29	Glycolic acid, 2TMS derivative
10,257	76,94	2-Propenoic acid, 2-[(trimethylsilyloxy)-, trimethylsilyl ester
11,353	70,26	Hydracrylic acid, 2TMS derivative
11,725	72,77	Propanoic acid, 3-(trimethylsilyl)-, ethyl ester
13,04	88,82	4-Hydroxybutanoic acid, 2TMS derivative
13,164	91,68	Benzoic Acid, TMS derivative
14,037	71,62	3-Butenoic acid, 3-(trimethylsilyloxy)-, trimethylsilyl ester
14,826	89,92	Glyceric acid, 3TMS derivative
14,957	71,89	2-Butenedioic acid, (Z)-, 2TMS derivative
16,7	74,63	Malic acid, 4-ethyl ester, 2TMS
17,255	78,58	Glycerol, 3TMS derivative
17,39	88,77	Malic acid, 3TMS derivative
17,485	71,49	Pyruvic acid, TMS derivative
17,956	71,51	4-Aminobutanoic acid, 3TMS derivative
19,581	78,77	2,3,4,5-Tetrahydropentanoic acid-1,4-lactone, tris(trimethylsilyl)-
22,112	86,74	D-(-)-Fructofuranose, pentakis(trimethylsilyl) ether (isomer 1)
22,689	79,75	D-Fructose, 5TMS derivative
22,817	76,07	Quinic acid (5TMS)
24,555	96,22	D-Mannose, 5TMS derivative
25,019	93,18	Palmitic Acid, TMS derivative

45,28 масс. %; особенно важным является наличие их в экстракте, наряду с непредельными жирными кислотами, а также спиртами 2-Охорпентаноic acid, Palmitic Acid, α -Linolenic acid, Stearic acid, защищающий данные кислоты и спирты от пероксидазного окисления в живом организме. Эту же роль играют фенолы.

Сложные эфиры составили 1,62 масс. % от экстракта: L-(+)-Lactic acid, Phenol, 2-Propenoic acid и другие.

Стоит отметить, что в составе исследуемого экстракта присутствуют производные гуанидина (Guanidine, N,N-dimethyl), действие которых обусловлено воздействием на оболочку клетки (клеточную мембрану), которая играет роль молекулярного фильтра, защищающего клетку от разрушающих токсинов [12].

Особенностью химического состава экстракта самшита является отсутствие кремнийорганических соединений, гликозидов, гетероциклических

форм азота и серы. Можно сделать вывод, что н-гексан и хлороформ в составе органического вещества самшита извлекают, в основном, компоненты эфирного масла, широкую гамму алкенов, моно-, би-, три- и тетрациклических углеводов, гуанидины, небольшой набор стероидов, кислот, с различными по составу эфирами и спиртами.

Заключение

Получена подробная информация химического состава экстракта – продукта последовательной исчерпывающей экстракции Самшит (*Buxus sempervirens* L). Обогащенность экстракта углеводородами, алкенами, гуанидинами, сложными эфирами и спиртами, карбоновыми кислотами, простыми углеводами, стеринами и спиртами, определяет специфичность и направленность фармакологического действия экстракта «Самшит» в широком спектре антимикробной активности и в возможной разработке препаратов для лечения ран.

Список цитированных источников

1. Кароматов, И. Д. Лекарственное растение Самшит / И. Д. Кароматов, С. С. Мавлонов // Электронный научный журнал «Биология и интегративная медицина». – 2018. – Т. 5, № 22. – С. 128–133.
2. Нестерович, Н. Д. Интродуцированные деревья и кустарники в Белорусской ССР / Н. Д. Нестерович // Интродуцированные древесные растения флоры Сибири, Европы, Средиземноморья, Крыма, Кавказа и Средней Азии. Издательство Академии наук Беларуси. – Минск. – 1961. – Вып. 3. – 335 с.
3. Orhan, E. I. Selective cholinesterase inhibitors from *Buxus sempervirens* L. and their molecular docking studies / E. I. Orhan, T. H. Khan, A. S. Erdem // Current computer-aided drug design. – 2011. – Vol. 7, № 4. – P. 276–286.
4. Melittis Melissophyllum – therapeutic opportunities / M. Tomulewicz, A. Kuzniatsova, A. Zakrzewska, P. Kitlas // Сборник статей международной научно-практической конференции, посвященной 50-летию Института биохимии биологического активных соединений Национальной академии наук. – Гродно. – 2021. – С. 641–646.
5. Evaluation of gamma-irradiated aromatic herbs: Chemometric study of samples submitted to extended storage periods /

- E. Pereira [et al.] // Food Research International. – 2018. – Vol. 111. – P. 272–280. doi: 10.1016/j.foodres.2018.05.051.
6. Chemical constituents of *Buxus sempervirens* – *Planta medica*. Four steroidal alkaloids from the leaves of *Buxus sempervirens* / F. Lorua [et al.] // *Phytochemistry*. – 2000. – Vol. 54, № 8. – P. 951–957.
 7. Abramson, D. Triterpenes and sterols of *Buxus sempervirens* and local variations in their levels / D. Abramson, L. J. Goad, T. W. Goodwin // *Phytochemistry*. – 1973. – Vol. 12, № 9. – P. 2211–2216.
 8. New triterpenoidal alkaloids from *Buxus sempervirens* / A. Ata [et al.] // *Z Naturforsch C. J. Biosci.* – 2002. – Vol. 57(1-2). – P. 21–22.
 9. Radunz, A. Wax esters and triglycerides as storage substances in seeds of *Buxus sempervirens*/ A. Radunz, G. H. Schmid // *European Journal of Lipid Science and Technology*. – 2000. – Vol. 102, № 12. – P. 734–738.
 10. Antioxidant activity of St. John's Wort extracts obtained with ultrasound-assisted extraction / A. Muzykiewicz [et al.] // *Pomeranian Journal of Life Sciences*. – 2019. – Vol. 65, № 4. – P. 89–93.
 11. Хадарцев А. А., Хромато-масс-спектрометрия хлороформного экстракта гуминовых кислот сапропеля азовской поймы, Краснодарского края / А. А. Хадарцев, В. В. Платонов, Л. И. Белозерова // *Вестник новых медицинских технологий*. – 2017. – Т. 2. – С. 200–203.
 12. Single-Crystal Neutron Diffraction Study on Guanidine, CN₃H₅ / PK Sawinski, [et al.] // *Crystal Growth & Design*. – 2013. – 13 (4). – P. 1730–1735.

Reference

- 1 Karomatov ID, Mavlonov SS. Iekarstvennoe rastenie Samshit. *Jelektronnyj nauchnyj zhurnal «Biologija i integrativnaja medicina»*. 2018; 5(22):128-133.
- 2 Nesterovich ND. Introducirovannye derev'ja i kustarniki v Belorusskoj SSR. Introducirovannye drevesnye rastenija flory Sibiri, Evropy, Sredizemnomor'ja, Kryma, Kavkaza i Srednej Azii. Izdatel'stvo Akademii nauk Belarusi – Minsk: 1961; 3:335.
- 3 Orhan EI, Khan TH, Erdem AS. Selective cholinesterase inhibitors from *Buxus sempervirens* L. and their molecular docking studies. *Current computer-aided drug design*. 2011; 7(4):276–286.
- 4 Tomulewicz M. Melittis *Melissophyllum* – therapeutic opportunities. [*Sbornik statej mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoj konferencii, posvyashchennoj 50-letiju Instituta biohimii biologicheskij aktivnyh soedinenij Nacional'noj akademii nauk*]. Grodno, 2021; 641-646.
- 5 Pereira E, Antonio AL, Barreira CM, Verde SC. Evaluation of gamma-irradiated aromatic herbs: Chemometric study of samples submitted to extended storage periods. *Food Res. Int*. 2018; 111:272-280.
- 6 Lorua F, Duvala D, Aumelasb A, Akeba F, Guedonc D, Guedj R. Four steroidal alkaloids from the leaves of *Buxus sempervirens*. *Phytochemistry*. 2000; 54(8):951-957. doi: 10.1016/S0031-9422(00)00036-4.
- 7 Abramson D, Goad LJ, Goodwin TW. Triterpenes and sterols of *Buxus sempervirens* and local variations in their levels. *Phytochemistry*. 1973; 12(9):2211-2216.
- 8 Ata A, Naz S, Choudhary MI, Atta-ur-Rahman, Sener B, Turkoz S. New triterpenoidal alkaloids from *Buxus sempervirens*. *Z Naturforsch C J Biosci*. 2002 Jan-Feb;57(1-2):21-8.
- 9 Radunz A, Schmid GH. Wax esters and triglycerides as storage substances in seeds of *Buxus sempervirens*. *European journal of lipid science and technology*. 2000; 102(12):734–738.
- 10 Muzykiewicz A, Florkowska K, Nowak A, Zielonka-Brzezicka J, Klimowicz A. Antioxidant activity of St. John's Wort extracts obtained with ultrasound-assisted extraction. *Pomeranian Journal of Life Sciences*. 2019; 65.(4):89–93.
- 11 Hadarcev AA, Platonov VV, Belozerova LI. Hromato-mass-spektrometrija hloroformnogo jekstrakta guminovyh kislot sapropelja azovskoj pojmy, Krasnodarskogo kraja (kratkoe soobshhenie). *Vestnik novyh medicinskih tehnologij*. 2017; 2:200–203.
- 12 Sawinski PK [et al]. Single-Crystal Neutron Diffraction Study on Guanidine, CN₃H₅. *Crystal Growth & Design*. 2013;13 (4): 1730-5.

CHEMICAL COMPOSITION OF PLANT EXTRACT *BUXUS SEMPERVIRENS* L.

Jabbar Mustafa Saleh

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

Background. The chemical composition of the Boxwood plant (*Buxus sempervirens* L) and its possible therapeutic and preventive effects have not been sufficiently studied.

Materials and methods. The plant extract of Boxwood (*Buxus sempervirens* L) was studied. The method of chromatographic analysis (Agilent 7820A, USA – gas chromatography with mass spectrometric detection, identification – NIST11, Willey 14, custom library of mass spectra) was used in this work. Identification and quantitative determination of the content of compounds was carried out under the following conditions: sample injection with flow splitting (1:10), ZB-5MS column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), injector temperature 280 °C, carrier gas – helium, gas velocity through column 29 ml/min. Statistical data processing – a package of applied statistical programs.

Results. Analysis of the obtained extract compositions (detection ≥70.0%) showed that not all developed and tested extracts had a similar composition and differed from each other (from 70.7% to 95.4%), $p = 0.03$ Average number of detected biologically active substances amounted to 118.3±11.1. A feature of the chemical composition of the Sashit extract is the absence of organosilicon compounds, glycosides, heterocyclic forms of nitrogen and sulfur. It can be concluded that n-hexane and chloroform in the composition of the organic substance Boxwood

extract mainly essential oil components, a wide range of alkenes, mono-, bi-, tri- and tetracyclic hydrocarbons, guanidines, a small set of sterols, acids, different in composition of ethers and alcohols.

Conclusions. Detailed information on the chemical composition of the extract, a product of sequential and exhaustive extraction of Boxwood (*Buxus sempervirens* L), was obtained. The enrichment of the extract with hydrocarbons, alkynes, guanidines, esters and alcohols, carboxylic acids, simple carbohydrate compounds and other sterols and alcohols determines the specificity and direction of the pharmacological action of the Boxwood extract in a wide range of antimicrobial activity and in the possible development of drugs for the treatment of wounds.

Keywords: boxwood, composition, chromatographic analysis.

For citation: Jabbar Mustafa Saleh. Chemical composition of plant extract *Buxus sempervirens* L. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2024, vol. 3, no 1(4). pp. 128–135 (in Russian).

Поступила 09.04.2024

ВЛИЯНИЕ БЕТУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ И МОДУЛЯТОРОВ КАЛЬЦИЕВОГО ОБМЕНА НА РОСТ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

*Т. И. Терпинская, Т. Л. Янченко, М. А. Рубинская, Е. Ф. Полукошко
Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси,
г. Минск, Республика Беларусь*

Введение. Согласно данным литературы цитотоксическое действие бетулиновой кислоты связано с повышением внутриклеточного уровня Ca^{2+} , что обосновывает интерес к изучению роли кальциевого баланса в ее противоопухолевом эффекте.

Цель работы – исследование роли кальциевых каналов в противоопухолевом эффекте бетулиновой кислоты и выявление соединений, проявляющих синергизм действия с бетулиновой кислотой.

Материалы и методы. Эффект исследуемых соединений на рост клеток Hela и A549 оценивали с помощью МТТ-теста.

Результаты. Бетулиновая кислота, хлорпромазин, а в еще большей степени их сочетание подавляли рост клеток. Ингибиторы каналов, управляемых кальциевыми депо, Ca^{2+} -АТФ-азы сарко-/эндоплазматического ретикулума и митохондриального $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменника не изменяли эффект хлорпромазина и бетулиновой кислоты, а ингибитор митохондриального Ca^{2+} -унипортера (рутениевый красный) усиливал действие последней.

Заключение. Активность каналов, управляемых кальциевыми депо, Ca^{2+} -АТФ-азы сарко-/эндоплазматического ретикулума и митохондриального $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменника не требуется для реализации противоопухолевого эффекта бетулиновой кислоты и хлорпромазина. Противоопухолевое действие бетулиновой кислоты, возможно, связано со снижением активности митохондриального Ca^{2+} -унипортера.

Впервые показана высокая противоопухолевая эффективность сочетания бетулиновой кислоты с хлорпромазином и рутениевым красным.

Ключевые слова: бетулиновая кислота, хлорпромазин, кальций, кальциевые каналы, рак, опухоль.

Для цитирования. Влияние бетулиновой кислоты и модуляторов кальциевого обмена на рост опухолевых клеток / Т. И. Терпинская [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. – 2024. – Т. 3, № 1(4). – С. 136–142.

Введение

Бетулиновая кислота – вещество природного происхождения, обладающее противоопухолевой активностью. Известно, что гибель клеток под действием бетулиновой кислоты связана с повышением внутриклеточного уровня ионов кальция [1, 2]. Это позволяет предполагать, что ингибирующий эффект бетулиновой кислоты в отношении опухолевых клеток может быть обусловлен ее влиянием на механизмы поддержания кальциевого баланса клетки. Вместе с тем роль кальциевых каналов и насосов, а также участие кальций-зависимых ферментов в противоопухолевом эффекте бетулиновой кислоты изучена недостаточно. Расширение знаний в этой области даст больше возможностей для поиска новых путей подавления опухолевого роста.

Цель нашей работы – исследование роли кальциевых каналов в противоопухолевом эффекте бетулиновой кислоты и выявление соединений, проявляющих синергизм действия с бетулиновой кислотой.

Материалы и методы

Материалы: бетулиновая кислота (Glentham Life Sciences), рутениевый красный (Ruthenium Red,

BLDpharm), 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (МТТ, Glentham Life Sciences), A23187 (Thermo Fisher Scientific), тапсигаргин (Cauman Chemical), хлорпромазина гидрохлорид, этиленгликоль-бис(2-аминоэтиловый эфир)-N,N,N,N-тетрауксусная кислота (ЭГТА), ITH 12575, YM-58483 (все Sigma).

Проведение экспериментов. Клетки Hela или A549 высевали в среде ДМЕМ с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и антибиотиками (гентамицин) в лунки культуральных планшетов (Corning) и помещали на 24 ч в CO_2 -инкубатор при 37 °С. Затем вносили бетулиновую кислоту (40 μM), хлорпромазина гидрохлорид (7, 14 или 28 μM), YM-58483 (1 μM), тапсигаргин (1 μM), рутениевый красный (20 μM), ITH 12575 (2 μM), ЭГТА (2 мМ). В контроль вместо указанных соединений вносили растворитель – диметилсульфоксид (ДМСО) в конечной концентрации 0,1%. Культивировали в CO_2 -инкубаторе 48 ч. В опытах с клетками Hela $n = 12$ (объединены данные двух независимых экспериментов), в опытах с клетками A549 $n = 6$.

Ингибирующий эффект исследуемых препаратов и их сочетаний оценивали с помощью МТТ-те-

ста. Для этого в ячейки планшета с клетками вносили по 10 мкл раствора 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромида (МТТ) с концентрацией 5 мг/мл, инкубировали 4 ч при 37 °С и 5% CO₂. Затем аккуратно удаляли среду, не затрагивая образовавшийся формазан, и вносили 150 мкл ДМСО. Инкубировали 15 мин при 37 °С на шейкере. После этого измеряли оптическую плотность раствора формазана при длине волны 545 нм с помощью автоматического ИФА-анализатора ChemWell (USA) при длине волны сравнения 700 нм.

Статистическая обработка. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Excel, представляли данные на графиках в виде средней и ее стандартной ошибки. Различия между сериями считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ согласно критерию Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Для исследования роли кальция в противоопухолевом эффекте бетулиновой кислоты был использован ряд ингибиторов кальциевых каналов и насосов. Это YM-58483 – селективный блокатор кальциевых каналов, управляемых кальциевыми депо. Благодаря этим каналам при истощении запасов кальция в клеточном депо эндоплазматического ретикулума происходит поступление Ca²⁺ в клетку из внеклеточного пространства. Такое поступление Ca²⁺ в клетку известно как SOCE – Store-operated Ca²⁺ entry, а каналы, отвечающие за вход в клетку кальция, как Store-operated channels – SOCs. Также использовали тапсигаргин – ингибитор Ca²⁺-АТФ-азы сарко-/эндоплазматического ретикулума (SERCA – sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase), которая обеспечивает закачку ионов кальция из цитозоля в кальциевые депо эндоплазматического ретикулума. Еще одним препаратом являлся рутениевый красный (или рутений красный), ингибирующий митохондриальный Ca²⁺-унипортер (MCU – Mitochondrial Calcium Uniporter), отвечающий за аккумуляцию кальция в митохондриях, а также ваниллоидные каналы временного рецепторного потенциала (TRPV) и рианодин-чувствительные каналы саркоплазматического ретикулума в клетках возбудимых тканей. Кроме того, в опытах применяли ИТН 12575 – ингибитор митохондриального Na⁺/Ca²⁺ обменника (mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange – mNCC), отвечающего за высвобождение кальция из митохондрий в цитозоль [3], и ЭГТА – хелатор Ca²⁺. Также был использо-

ван хлорпромазин, оказывающий на клеточном уровне целый ряд эффектов, среди которых – регулирование активности кальциевых каналов, управляемых кальциевым депо, и кальций-связывающего белка кальмодулина, участвующего в регуляции активности кальций-зависимых ферментов [4, 5].

Наши результаты показали, что бетулиновая кислота и все использованные модуляторы кальциевого обмена подавляли рост клеток Hela на 14–40 %. YM-58483, тапсигаргин и ИТН 12575 не повлияли на эффект бетулиновой кислоты. Рутениевый красный, хлорпромазин и ЭГТА усилили действие бетулиновой кислоты в 1,5, 2,4 и в 2,1 раза соответственно, однако только при совместном действии бетулиновой кислоты с хлорпромазином или с рутениевым красным ингибирующий эффект был сильнее, чем эффект препаратов по отдельности, рисунок 1.

Мощное противоопухолевое действие хлорпромазина обусловило наш интерес к его более детальному изучению. Эксперименты продемонстрировали, что эффект хлорпромазина зависел от концентрации и усиливался с ее повышением. В концентрации 7, 14 и 28 μM хлорпромазин подавлял рост клеток Hela в 1,2, 1,7 и 2,5 раза. Ана-

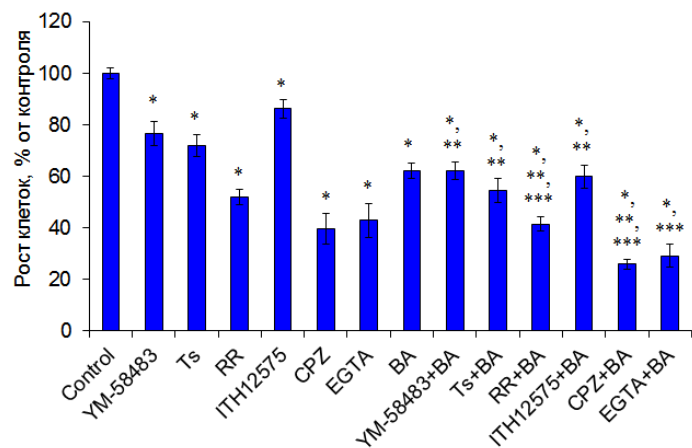


Рисунок 1 – Влияние бетулиновой кислоты (BA, 40 μM), YM-58483 (1 μM), тапсигаргина (Ts, 1 μM), рутениевого красного (RR, 20 μM), ИТН12575 (2 μM), хлорпромазина (CPZ, 28 μM), ЭГТА (EGTA, 2 mM) на рост клеток Hela; * – $p < 0,05$ при сравнении с контролем; ** – $p < 0,05$ при сравнении с эффектом ингибиторов кальциевых каналов/насосов; *** – $p < 0,05$ при сравнении с эффектом бетулиновой кислоты

Figure 1 – The effect of betulinic acid (BA, 40 μM), YM-58483 (1 μM), thapsigargin (Ts, 1 μM), ruthenium red (RR, 20 μM), EGTA (2 mM) and chlorpromazine (CPZ, 14 μM) on growth of Hela cells; * – $p < 0.05$ when compared with the control; ** – $p < 0.05$ when compared with the effect of calcium channel/pump inhibitors; *** – $p < 0.05$ when compared with the effect of betulinic acid

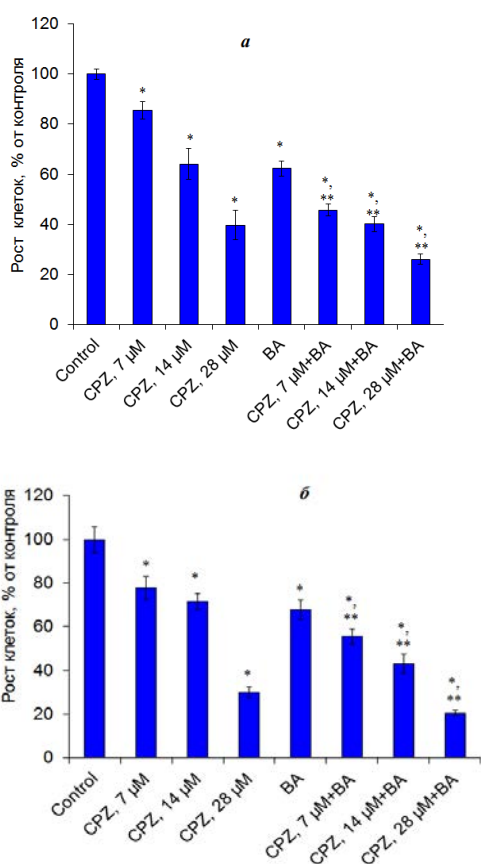


Рисунок 2 – Влияние хлорпромазина (CPZ) и бетулиновой кислоты (BA, 40 μM) на рост клеток Hela (a) и A549 (б); * – $p < 0,05$ при сравнении с контролем; ** – $p < 0,05$ при сравнении с эффектом бетулиновой кислоты

Figure 2 – Effect of chlorpromazine (CPZ) and betulinic acid (BA, 40 μM) on the growth of Hela (a) and A549 (b) cells; * – $p < 0.05$ when compared with the control; ** – $p < 0.05$ when compared with the effect of betulinic acid

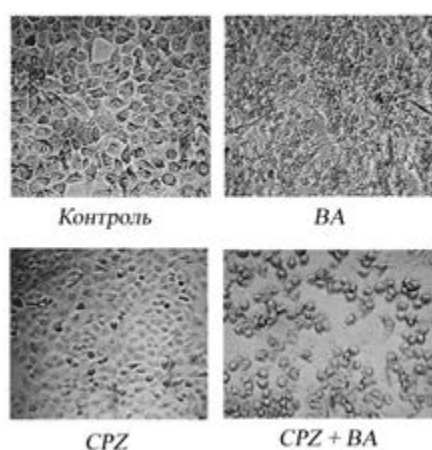


Рисунок 3 – Влияние хлорпромазина (CPZ, 14 μM) и бетулиновой кислоты (BA, 40 μM) на рост клеток Hela; световая микроскопия, 20X.

Figure 3 – Effect of chlorpromazine (CPZ, 14 μM) and betulinic acid (BA, 40 μM) on the growth of Hela cells; light microscopy, 20X.

логичный эксперимент на клетках A549 показал подавление клеточного роста при указанных дозах хлорпромазина в 1,3, 1,4 и 3,3 раза. Совместное действие бетулиновой кислоты и хлорпромазина в концентрации 7, 14 или 28 μM приводило к более выраженному подавлению роста опухолевых клеток, чем действие этих препаратов порознь: наблюдалось ингибирование роста клеток Hela – в 2,2, 2,5 и 3,9 раза, клеток A549 – в 1,8, 2,3 и 4,9 раза, рисунки 2, 3.

На модели клеток Hela мы исследовали, влияют ли ингибиторы кальциевых каналов/насосов на противоопухолевый эффект хлорпромазина. Выявлено, что YM-58483, тапсигаргин и ITN 12575 не изменили эффект хлорпромазина и его сочетания с бетулиновой кислотой, а рутениевый красный – усилил в 1,3–1,6 раза, рисунок 4. Хелатор кальция ЭГТА во всех случаях оказывал сильное ингибирующее действие на рост опухолевых клеток, рисунки 1, 4. Бетулиновая кислота вызвала тенденцию к усилению противоопухолевого эффекта ЭГТА, не достигшую статистической значимости, а хлорпромазин и его сочетание с бетулиновой кислотой не оказали дополнительного эффекта.

Согласно полученным результатам, бетулиновая кислота оказывает ингибирующий эффект на опухолевые клетки. Так как YM-58483, тапсигаргин, рутениевый красный и ITN 12575 не снижали ее действие, можно полагать, что активность каналов, управляемых кальциевыми депо, SERCA и mNCX не требуется для противоопухолевого действия бетулиновой кислоты. Активность этих каналов не требовалась и для противоопухолевого эффекта хлорпромазина, а также сочетания бетулиновой кислоты и хлорпромазина, действие которых не снижалось ни одним из указанных ингибиторов кальциевых каналов/насосов.

Отметим, что YM-58483, тапсигаргин и ITN 12575 подавляли рост опухолевых клеток, но не усиливали эффект бетулиновой кислоты, хлорпромазина и их сочетания. Одним из предположений, объясняющих этот факт, может быть то, что бетулиновая кислота и хлорпромазин оказывают действие, аналогичное (а возможно, даже более мощное) действию использованных нами известных ингибиторов, поэтому сочетание препаратов не приводит к усилению противоопухолевого эффекта. Также возможно, что бетулиновая кислота и/или хлорпромазин оказывают действие на рост клеток, не затрагивая регуляцию кальциевого баланса.

Анализ данных литературы свидетельствует, что бетулиновая кислота и структурно-сходные со-

единения способствуют повышению внутриклеточной концентрации кальция в различных типах клеток [1, 2]. Так, вызванная бетулиновой кислотой гибель клеток MDCK была обусловлена высвобождением Ca^{2+} в цитоплазму через инозитолтрифосфат-чувствительные каналы из внутриклеточных депо эндоплазматического ретикулума и поступлением из внеклеточной среды через каналы, управляемые кальциевыми депо [1]. В то же время в эритроцитах бетулиновая кислота вызывала апоптоз и поступление кальция в цитозоль из внеклеточной среды, не зависящие от канонических каналов временного рецепторного потенциала, участвующих в SOCE. Отсутствие кальция во внешней среде полностью предотвращало повышение его уровня в клетке, но не апоптоз. Полагают, что поступление кальция происходило благодаря способности бетулиновой кислоты пермеабиллизировать мембраны, а апоптоз не был связан с уровнем кальция [6]. Таким образом, по данным литературы в некоторых, хотя и не во всех клетках эффект бетулиновой кислоты может быть опосредован каналами, управляемыми кальциевым депо. Наши данные говорят о том, что цитотоксический эффект бетулиновой кислоты в отношении клеток Hela реализуется без участия таких каналов, а также без участия SERCA и mNCX. Возможно, эффект бетулиновой кислоты обусловлен ее способностью повышать проницаемость мембран. Поскольку внеклеточная концентрация кальция значительно выше, чем внутриклеточная, это может способствовать проникновению кальция в клетки по градиенту концентрации. Вместе с тем, в наших экспериментах не наблюдалось снижения противоопухолевого эффекта при совместном действии бетулиновой кислоты и хелатора кальция EGTA. Это позволяет предполагать, что внутриклеточный уровень кальция напрямую не связан с противоопухолевым эффектом бетулиновой кислоты, что согласуется с данными, представленными в [6]. Возможно, дальнейшее экспериментальное изучение способности бетулиновой кислоты функционировать в качестве кальцие-

вого ионофора улучшит наше понимание механизмов ее противоопухолевого действия и роли ионов кальция в регуляции пролиферации и жизнеспособности клеток.

В наших экспериментах рутениевый красный, ингибирующий поступление ионов кальция из цитоплазмы в митохондрии через MCU, вызывал подавление роста клеток Hela, а также усиливал ингибирующее действие бетулиновой кислоты. Эти результаты согласуются с анализом данных о критической роли митохондриального унипортера для образования и роста опухолей, представленным в [7]. В то же время рутениевый красный ингибировал апоптоз, индуцированный аспарагиназой в клетках острой лимфобластической лейкемии [8]. Вероятно, эффект рутениевого красного зависит от типа клеток и условий эксперимента.

Результаты, изложенные выше, показывают, что противоопухолевый эффект бетулиновой кислоты лучше проявлялся в условиях, когда MCU не был ингибирован: наблюдалось подавление роста клеток Hela в 1,6 раза по сравнению с контролем и в 1,3 раза – по сравнению с серией, об-

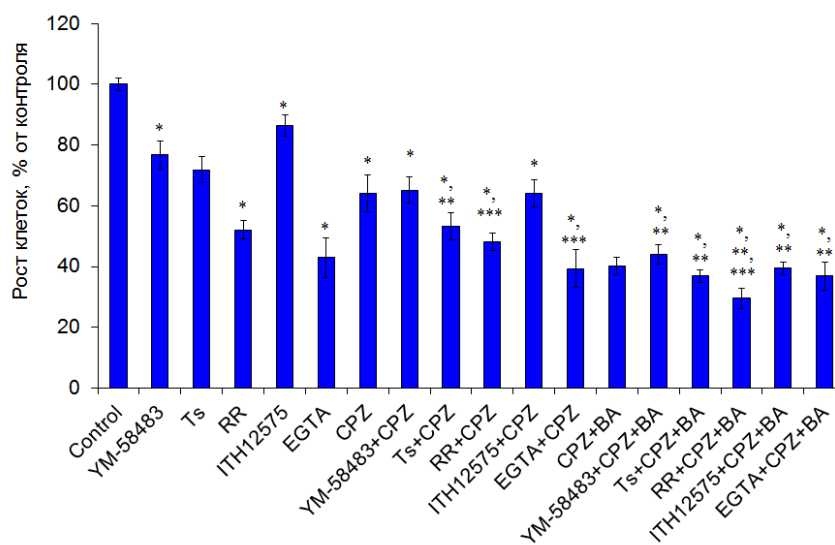


Рисунок 4 – Влияние хлорпромазина (CPZ, 14 μ M), бетулиновой кислоты (BA, 40 μ M), YM-58483 (1 μ M), тапсигаргина (Ts, 1 μ M), рутениевого красного (RR, 20 μ M), ИТН12575 (2 μ M), ЭГТА (EGTA, 2 mM) на рост клеток Hela; * – $p < 0,05$ при сравнении с контролем; ** – $p < 0,05$ при сравнении с эффектом ингибиторов кальциевых каналов/насосов; *** – $p < 0,05$ при сравнении с эффектом хлорпромазина или сочетанного применения хлорпромазина и бетулиновой кислоты

Figure 4 – Effect of chlorpromazine (CPZ, 14 μ M), betulinic acid (BA, 40 μ M), YM-58483 (1 μ M), thapsigargin (Ts, 1 μ M), ruthenium red (RR, 20 μ M), ITH12575 (2 μ M), EGTA (EGTA, 2 mM) on the growth of Hela cells; * – $p < 0.05$ when compared with the control; ** – $p < 0.05$ when compared with the effect of calcium channel/pump inhibitors; *** – $p < 0.05$ when compared with the effect of chlorpromazine or the combined use of chlorpromazine and betulinic acid

работанной рутениевым красным, рисунок 1. При совместном применении бетулиновой кислоты с рутениевым красным наблюдалось усиление противоопухолевого действия, при этом оно было ниже суммы эффектов указанных препаратов. Возможно, бетулиновая кислота, как и рутениевый красный, способствует ингибированию или снижению активности Ca^{2+} -унипортера. В пользу этого предположения свидетельствуют данные о повреждении митохондрий при действии бетулиновой кислоты [9, 10]. В число молекулярных мишеней бетулиновой кислоты могут входить и структурные элементы MCU, хотя конкретных указаний на это в доступной научной литературе не имеется.

Хлорпромазин используется в медицине как нейролептик, но имеющиеся в литературе данные свидетельствуют также о его противоопухолевых свойствах [11]. Исследования хлорпромазина как модулятора кальций-зависимых процессов и клеточных потоков кальция выявили его способность ингибировать кальмодулин – многофункциональный кальций-связывающий белок, который взаимодействует с другими белками, участвуя в регуляции выживаемости и пролиферации клеток. Показано не зависящее от кальмодулина подавление активности SERCA и индуцированное инозитолтрифосфатом высвобождение кальция из внутриклеточных депо под действием хлорпромазина [12]. Хлорпромазин способен повышать проницаемость мембран [11], однако роль повышения проницаемости в увеличении цитоплазматической концентрации кальция и клеточной гибели не ясна. Сообщают о свойствах хлорпромазина ингибировать кальциевые каналы, регулируемые кальциевыми депо [4] в макрофагах, в то же время в экспериментах на клеточной линии глиобластомы человека GBM 8401 хлорпромазин проявлял цитотоксичность, повышая концентрацию цитоплазматического кальция за счет его притока через каналы, управляемые кальциевыми депо, и высвобождения из эндоплазматического ретикулума. Хелатирование или удаление Ca^{2+} из внеклеточной среды ослабляло индуцированный хлорпромазином подъем уровня кальция и цитотоксичность [5]. В наших экспериментах хлорпромазин подавлял рост опухолевых клеток. Хелатирование кальция с помощью ЭГТА само по себе приводило к значительной клеточной гибели, вероятно, из-за

долгосрочного воздействия (48 ч). Возможно, из-за этого ЭГТА не способствовал снижению цитотоксического действия других соединений; мы полагаем, что вопрос о роли ионов кальция в клеточной гибели, индуцированной бетулиновой кислотой и хлорпромазином, требует более детальных исследований.

Тот факт, что хлорпромазин в наших опытах усилил действие бетулиновой кислоты, позволяет выдвинуть предположение о возможной протекторной роли хлорпромазин-чувствительных ферментов, для активности которых требуется кальмодулин. Поэтому ингибитор кальмодулина хлорпромазин подавляет рост клеток и усиливает действие бетулиновой кислоты. Так как нами не выявлено зависимости эффекта бетулиновой кислоты от активности SERCA и каналов, управляемых кальциевыми депо, вероятно, синергизм бетулиновой кислоты и хлорпромазина не зависит от способности последнего их регулировать.

Рутениевый красный усиливал эффект бетулиновой кислоты и ее сочетания с хлорпромазином. Комбинация этих трех препаратов оказывала наиболее выраженное противоопухолевое действие.

Заключение

Согласно нашим результатам, бетулиновая кислота, хлорпромазин, а в еще большей степени их сочетание подавляют рост клеток HeLa и A549.

На клетках HeLa показано, что ингибиторы каналов, управляемых кальциевыми депо, а также ингибиторы SERCA и mNCX не изменяют эффект бетулиновой кислоты, хлорпромазина и их сочетания. Это позволяет полагать, что активность каналов, управляемых кальциевыми депо, Ca^{2+} -АТФ-азы сарко-/эндоплазматического ретикулума и митохондриального $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменника не требуется для реализации противоопухолевого эффекта бетулиновой кислоты и хлорпромазина.

Ингибитор митохондриального Ca^{2+} -унипортера рутениевый красный и бетулиновая кислота усиливают противоопухолевый эффект друг друга, при этом эффект при совместном применении ниже суммы эффектов двух соединений. Это может свидетельствовать о том, что, возможно, бетулиновая кислота, как и рутениевый красный, способствует снижению активности Ca^{2+} унипортера.

Список цитированных источников

1. Effect of betulinic acid on intracellular-free Ca^{2+} levels in Madin Darby canine kidney cells / K. J. Chou [et al.] // Eur. J. Pharmacol. – 2000. – Vol. 408, № 2. – P. 99–106.
2. Betulinic acid induces apoptosis of HeLa cells via ROS-dependent ER stress and autophagy in vitro and in vivo / P. Chen [et al.] // J. Nat. Med. – 2024.
3. Bird, G. S. Pharmacology of Store-Operated Calcium Entry Channels / G. S. Bird, J. W. Jr. Putney // In: Kozak J. A.,

- Putney J. W. Jr., editors. Calcium Entry Channels in Non-Excitable Cells. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis. – 2018. – Ch. 16. – P. 311–324.
4. Neuroleptic Chlorpromazine Modulates Ca²⁺ Responses in Macrophages / Z. I. Krutetskaya [et al.] // Dokl. Biochem. Biophys. – 2020. – Vol. 490. – № 1. – P. 25–28.
 5. Chu, C. S. The Impact of the Antipsychotic Medication Chlorpromazine on Cytotoxicity through Ca²⁺ Signaling Pathway in Glial Cell Models / C. S. Chu, Y. S. Lin, W. Z. Liang // Neurotox. Res. – 2022. – Vol. 40, № 3. – P. 791–802.
 6. Gao, M. Mitochondrial toxin betulinic acid induces in vitro eryptosis in human red blood cells through membrane permeabilization / M. Gao, P. M. Lau, S. K. Kong // Arch. Toxicol. – 2014. – Vol. 88, № 3. – P. 755–768.
 7. D'Angelo, D. The Mitochondrial Calcium Uniporter (MCU): Molecular Identity and Role in Human Diseases / D. D'Angelo, R. Rizzuto // Biomolecules. – 2023. – Vol. 13, № 9:1304.
 8. Lee, J. K. Requirement for ER-mitochondria Ca²⁺ transfer, ROS production and mPTP formation in L-asparaginase-induced apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cells / J. K. Lee, J. L. Rosales, K.Y. Lee // Front. Cell Dev. Biol. – 2023. – Vol. 11:1124164.
 9. Betulinic acid-induced mitochondria-dependent cell death is counterbalanced by an autophagic salvage response / L. Potze [et al.] // Cell Death Dis. – 2014. – Vol. 5, № 4:e1169.
 10. Parallel damage in mitochondrial and lysosomal compartments promotes efficient cell death with autophagy: The case of the pentacyclic triterpenoids / W. K. Martins [et al.] // Sci. Rep. – 2015. – Vol. 5:12425.
 11. Kamgar-Dayhoff, P. Multifaceted effect of chlorpromazine in cancer: implications for cancer treatment / P. Kamgar-Dayhoff, T. I. Brelidze // Oncotarget. – 2021. – Vol. 14. – P. 1406–1426.
 12. Khan, S. Z. The effects of phenothiazines and other calmodulin antagonists on the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum Ca(2+) pumps / S. Z. Khan, C. L. Longland, F. Michelangeli // Biochem. Pharmacol. – 2000. – Vol. 60, № 12. – P. 1797–806.
 3. Bird GS, Putney JW Jr. Pharmacology of Store-Operated Calcium Entry Channels. In: Kozak JA, Putney JW Jr, editors. Calcium Entry Channels in Non-Excitable Cells. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2018. Chapter 16. doi:10.1201/9781315152592-16.
 4. Krutetskaya ZI, Milenina LS, Antonov VG, Nozdrachev AD. Neuroleptic Chlorpromazine Modulates Ca²⁺ Responses in Macrophages. Dokl Biochem Biophys. 2020 Jan;490(1):25-28. doi: 10.1134/S160767292001010X.
 5. Chu CS, Lin YS, Liang WZ. The Impact of the Antipsychotic Medication Chlorpromazine on Cytotoxicity through Ca²⁺ Signaling Pathway in Glial Cell Models. Neurotox Res. 2022 Jun;40(3):791-802. doi: 10.1007/s12640-022-00507-5.
 6. Gao M, Lau PM, Kong SK. Mitochondrial toxin betulinic acid induces in vitro eryptosis in human red blood cells through membrane permeabilization. Arch Toxicol. 2014 Mar;88(3):755-68. doi: 10.1007/s00204-013-1162-x.
 7. D'Angelo D, Rizzuto R. The Mitochondrial Calcium Uniporter (MCU): Molecular Identity and Role in Human Diseases. Biomolecules. 2023 Aug 25;13(9):1304. doi: 10.3390/biom13091304.
 8. Lee JK, Rosales JL, Lee KY. Requirement for ER-mitochondria Ca²⁺ transfer, ROS production and mPTP formation in L-asparaginase-induced apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cells. Front Cell Dev Biol. 2023 Feb 21;11:1124164. doi: 10.3389/fcell.2023.1124164.
 9. Potze L, Mullauer FB, Colak S, Kessler JH, Medema JP. Betulinic acid-induced mitochondria-dependent cell death is counterbalanced by an autophagic salvage response. Cell Death Dis. 2014 Apr 10;5(4):e1169. doi: 10.1038/cddis.2014.139.
 10. Martins WK, Costa ÉT, Cruz MC, Stolf BS, Miotto R, Cordeiro RM, Baptista MS. Parallel damage in mitochondrial and lysosomal compartments promotes efficient cell death with autophagy: The case of the pentacyclic triterpenoids. Sci Rep. 2015 Jul 27;5:12425. doi: 10.1038/srep12425.
 11. Kamgar-Dayhoff P, Brelidze TI. Multifaceted effect of chlorpromazine in cancer: implications for cancer treatment. Oncotarget. 2021 Jul 6;12(14):1406-1426. doi: 10.18632/oncotarget.28010.
 12. Khan SZ, Longland CL, Michelangeli F. The effects of phenothiazines and other calmodulin antagonists on the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum Ca(2+) pumps. Biochem Pharmacol. 2000 Dec 15;60(12):1797-806. doi: 10.1016/s0006-2952(00)00505-0.

References

ANTI-TUMOR EFFECT OF COMBINED APPLICATION OF BETULIC ACID AND CALCIUM CHANNEL INHIBITORS

T. I. Terpinskaya, T. L. Yanchanka, M. A. Rubinskaya, A. F. Palukoshka
Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Background. According to literature data, the cytotoxic effect of betulinic acid is associated with an increase in the intracellular level of Ca²⁺. This justifies interest in studying the role of calcium balance in the antitumor effect of betulinic acid.

Objective of this work is to study the role of calcium channels in the antitumor effect of betulinic acid and to identify compounds that exhibit synergistic action with betulinic acid.

Materials and methods. The effect of the studied compounds on the growth of HeLa and A549 cells was assessed using the MTT test.

Results. Betulinic acid, chlorpromazine, and to an even greater extent their combination, suppressed the growth of HeLa and A549 tumor cells. Inhibitors of store-operated channels, Ca^{2+} -ATPase of the sarco-/endoplasmic reticulum, and mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger did not change the effect of chlorpromazine and betulinic acid, while an inhibitor of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter (ruthenium red) enhanced the effect of the latter.

Conclusions. Activity of store-operated channels, Ca^{2+} -ATPase of the sarco-/endoplasmic reticulum and mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger is not required for the antitumor effect of betulinic acid and chlorpromazine. The antitumor effect of betulinic acid may be associated with a decrease in the activity of the mitochondrial calcium uniporter.

For the first time, the high antitumor efficiency of the combination of betulinic acid with chlorpromazine and ruthenium red was shown.

Keywords: betulinic acid, chlorpromazine, calcium, calcium channels, cancer, tumor.

For citation: Terpinskaya TI, Yanchanka TL, Rubinskaya MA, Palukoshka AF. Anti-tumor effect of combined application of betulinic acid and calcium channel inhibitors. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2024, vol. 3, no 1(4). pp. 136–142 (in Russian).

Поступила 14.03.2024

ИНГИБИРОВАНИЕ ТИАМИНОМ НИТРОВАНИЯ ТИРОЗИНА И ТИРОЗИЛЬНЫХ ОСТАТКОВ БЕЛКОВ В РЕАКЦИЯХ, КАТАЛИЗИРУЕМЫХ МЕТМИОГЛОБИНОМ В ПРИСУТСТВИИ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА И НИТРИТА

И. И. Степура¹, С. А. Агейко¹, В. И. Степура², В. Ю. Смирнов³

¹*Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси,
г. Гродно, Республика Беларусь*

²*МГЭИ им. А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета,
г. Минск, Республика Беларусь*

³*Гродненский государственный медицинский университет,
г. Гродно, Республика Беларусь*

Актуальность. Нитрование тирозильных остатков белков является одним из видов пост-трансляционной модификации, выступает в качестве маркера развития окислительного нитрозильного стресса в организме при нарушениях метаболизма и сигнальной функции монооксида азота.

Цель работы. Изучение механизма ингибирования тиаминем нитрования тирозина и тирозильных остатков белков в реакциях, катализируемых метмиоглобином в присутствии пероксида водорода и нитрита.

Методы исследования. Хроматографические (ВЭЖХ) и спектрально-флуоресцентные методы.

Результаты. После инкубации смеси тирозина с нитритом в присутствии метмиоглобина и пероксида водорода происходит нитрование тирозина с образованием 3-нитротирозина, а также образование дитирозина.

Показано, что тиамин взаимодействует с обоими компонентами реакции нитрования – диоксидом азота и тирозильным радикалом и ингибирует образование как дитирозина, так и 3-нитротирозина.

Диоксид азота восстанавливается тиаминем в нитрит, а тирозинильный свободный радикал восстанавливается тиаминем до молекулы тирозина. В свою очередь тиамин окисляется тирозильными радикалами до тиохрома в последовательно протекающих одноэлектронных реакциях.

Диоксид азота не только окисляет тиамин с образованием тиохрома, но также окисляет образовавшийся тиохром до оксодигидроксиохрома. Оксодигидроксиохром не испытывает дальнейших превращений под действием диоксида азота и в растворе основным продуктом окисления тиаминя является оксодигидроксиохром. Окисление молекул тиаминя до оксодигидроксиохрома сопровождается восстановлением 4 эквивалентов диоксида азота до нитрита.

Заключение. Показано, что тиамин и его продукт окисления – тиохром ингибируют нитрование тирозина и тирозильных остатков белков в пероксидазной реакции, катализируемой метмиоглобином в присутствии пероксида водорода и нитрита.

Ключевые слова: нитрование белков, псевдопероксидазные реакции, окислительные превращения тиаминя.

Для цитирования. Ингибирование тиаминем нитрования тирозина и тирозильных остатков белков в реакциях, катализируемых метмиоглобином в присутствии пероксида водорода и нитрита / И. И. Степура [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. – 2024. – Т. 3, № 1(4). – С. 143–154.

Введение

Нитрование тирозилов белков рассматривается как один из видов пост-трансляционной модификации [1], выступает в качестве маркера развития окислительного нитрозильного стресса в организме вследствие нарушения метаболизма и сигнальной функции монооксида азота NO [2, 3]. Нитрование сказывается на изменении величины pK_a фенольной группы тирозилов, что может приводить к нарушению процессов фолдинга полипептидных цепей и дестабилизации третичной

структуры белков [4]. Избирательное нитрование белков, даже в случае нитрования только одного тирозильного остатка, может вызвать изменение структуры макромолекулы и обуславливать активацию или, напротив, ингибирование ее функциональной активности [5, 6]. Было предложено, что при некоторых физиологических условиях нитрование тирозина соответствует всем необходимым критериям физиологически значимого сигнального процесса с регуляторной ролью при протекании клеточных процессов в норме [7].

Обнаружение 3-нитротирозина при различных патологических состояниях, а также в норме с увеличением возраста [8, 9] указывает на проявление процессов нитрования и является важным маркером продукции оксидантов при метаболизме оксида азота *in vivo* [2, 10–13]. В частности, было продемонстрировано, что пероксинитрит, токсичное соединение, образующееся в реакции между монооксидом азота и супероксиданионом [14–16], превращает свободный тирозин и тирозильные остатки белков в соответствующие нитрованные молекулы.

Позднее было показано в опытах *in vivo* и *in vitro*, что в дополнение к процессу нитрования под действием пероксинитрита существует ряд альтернативных путей нитрования тирозина и тирозильных остатков белков. Так, одним из механизмов, вызывающих нитрование свободного тирозина и тирозильных остатков белков, являются реакции, катализируемые пероксидазами в присутствии пероксида водорода и вызывающие окисление нитрита в диоксид азота [10, 17].

Важно отметить, что физико-химические факторы, например солнечный свет ультрафиолетового и видимого диапазонов, способны вызывать протекание реакций нитрования белков кожи и клеточных структур глаза. Ранее было показано, что кристаллины, основной белковый компонент хрусталика глаза, при фотооблучении в присутствии RF претерпевают структурные изменения [18], испытывают нитрование тирозильных остатков в присутствии нитрита [19].

Концентрация нитрита в жидкости глаза [20], как и в случае плазмы крови, находится на микромолярном уровне, однако известно, что, например, в плазме крови уровень нитрита может увеличиваться при хронических воспалительных процессах [21]. Показано, что нитрование метмиоглобина из сердца лошади может происходить под действием видимого света в присутствии рибофлавина и нитрита [22].

Ранее в целом ряде лабораторий показано, что пероксидазы и гемопротейны катализируют нитрование тирозина и других фенольных соединений в присутствии пероксида водорода [10, 11, 23–26]. Эти данные свидетельствуют, что нитрование тирозина и тирозильных остатков белков может происходить в организме не только под действием пероксинитрита [12–14], но также под действием гемопротейнов [23–26].

Одним из таких гемопротейнов является цитозольный белок миоглобин, который содержится в высоких концентрациях в скелетных и сердечной мышцах. Концентрация миоглобина, например, в сердце составляет величину порядка 0,2–0,3 мМ.

Как известно, миоглобин в кардиомиоцитах окисляется с образованием супероксиданионов и пероксида водорода. Схематически этот процесс аутоокисления оксимиоглобина можно представить следующими уравнениями



С другой стороны, смешивание метмиоглобина с пероксидом водорода приводит к образованию оксоферрильных форм миоглобина: $^{*}\text{Mb(IV} = \text{O)}$ (соединение I) и $\text{Mb(IV} = \text{O)}$ (соединение II), которые легко регистрируются спектрофотометрически [26].

При нормальных физиологических условиях эти аутоокислительные реакции очень медленны и протекают с низкой скоростью. Однако, если кардиомиоциты функционируют в условиях ишемии (низкое значение pH, низкое давление кислорода в тканях), то резко возрастает образование активных форм кислорода и оксоферрильных форм миоглобина [27].

Оксоферрильные формы миоглобина окисляют ряд биологически-активных соединений, катализируют нитрование тирозина. Предполагается, что образование 3-нитротирозина может происходить в процессе реперфузии сердца в отсутствие пероксинитрита [28]. При этом оксоферрильные формы миоглобина окисляют нитрит с образованием диоксида азота, который затем взаимодействует с тирозином с образованием 3-нитротирозина.

Ингибирование нитрования тирозина и тирозирование белков можно достичь за счет использования различных антиоксидантов. Одними из таких антиоксидантов, которые использовались в данной работе, являются производные тиамин. Как известно, тиамин (или витамин B1) является важнейшим незаменимым фактором питания и с момента своего открытия известен как соединение, предотвращающее развитие бери-бери [29]. Фосфорилированная форма тиамин, тиаминдифосфат (ТДФ), является коэнзимом таких важнейших ферментов энергетического метаболизма, как пируватдегидрогеназа и α -кетоглутаратдегидрогеназа. ТДФ также является кофактором транскетолазы, ключевого фермента пентозофосфатного цикла [30–32].

Кроме ТДФ в организме всегда содержится свободный тиамин и иные его фосфорные эфиры, которые выполняют также и собственные некоферментные функции, взаимодействуют с клеточными мембранами и увеличивают их стабильность [33].

Как известно, тиамин и трифосфат тиамин играют важную роль в синтезе нейромедиаторов и переда-

че нервных импульсов, способны регулировать проницаемость Na-каналов в нервной ткани [34–36].

Кроме того, тиамин не только улучшает метаболические процессы в мозгу при синдроме Вернике-Корсакова [33, 37], но и снижает повреждения клеточных структур [38], выступает в качестве антиоксиданта, например, в нервной ткани, снижая ее повреждение при окислительном стрессе [39–41].

Повреждение нервной ткани сопровождается нарушением метаболизма оксида азота, протеканием реакций нитрования тирозина с образованием 3-нитротирозина на фоне дефицита тиамина [39].

В данной работе мы показали, что в процессе нитрования тирозина, катализируемого метмиоглобином в присутствии пероксида водорода, происходит окисление тиамина с образованием тиохрома и оксидигидротиохрома. В свою очередь в опытах *in vitro* тиамин ингибирует нитрование тирозина и тирозильных остатков белков, поддерживает уровень оксидов азота, в том числе монооксида азота.

Материалы и методы исследования

Реакцию нитрования тирозина, катализируемую оксоферрильными формами миоглобина, проводили путем инкубации водных растворов содержащих микромолярные концентрации гемопroteина и различные концентрации нитрита, тирозина и тиамина в присутствии пероксида водорода. Инкубацию растворов проводили в фосфатном буфере, pH=7,0 в темноте при комнатной температуре в аэробных условиях.

Разделение смеси продуктов окислительной трансформации тиамина, полученных путем его инкубации с метмиоглобином, пероксидом водорода и нитритом, проводили методами ВЭЖХ с использованием хроматографа Agilent-1100, сорбент Zorbax-Extend-C18 (2,1×50 мм, 1,8 мкм). Регистрацию пиков тиамина и пиков продуктов окисления в хроматограмме проводили при длинах волн 280 нм, 320 нм, 340 нм и 360 нм. В качестве стандартов использовали тиамин и тиохром (TChr) фирмы Sigma (США), а так-

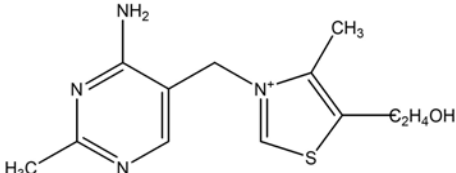
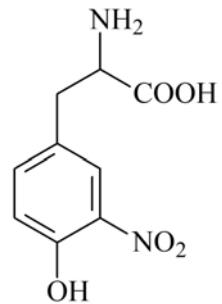
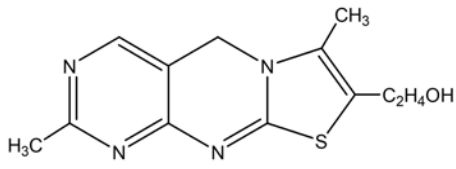
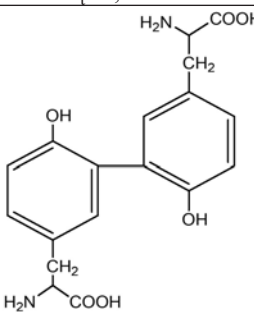
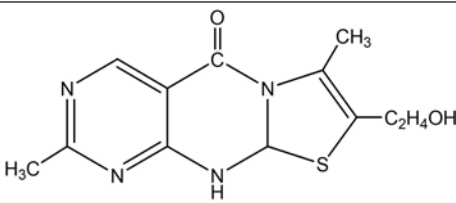
же оксидигидротиохром (ODTChr), полученный химически. Структурные формулы тиамина и его производных приведены в таблице 1.

Концентрацию веществ определяли, используя молярные коэффициенты поглощения для соответствующих длин волн. Определение дитирозина и 3-нитротирозина также производили хроматографически, измеряя поглощение при длинах волн 280 нм, 320 нм, 360 нм.

Концентрацию тиохрома определяли флуоресцентным методом (длина волны возбуждения 365 нм, длина волны флуоресценции 450 нм) [23]. В качестве стандарта использовали коммерческий тиохром фирмы Sigma (США). Измерения концентраций ферри- и оксоферрильных форм миоглобина осуществляли на спектрофотометре Cary-100 (США), измерения бифенольной флуоресценции – на спектрофлуориметре.

Таблица 1 – Структурные формулы тиамина, тирозина и продуктов их окислительной трансформации, а также время удерживания R_t для используемого типа ВЭЖХ-колонки

Table 1 – Structures of thiamine, tyrosine, and products of their oxidative transformation as well as retention time R_t of these compounds for the used HPLC column

Тиамин и продукты его окисления	Продукты окисления тирозина
 <p>Тиамин (Т) $R_t = 9,18$ мин</p>	 <p>3-нитротирозин $R_t = 9,53$ мин</p>
 <p>Тиохром (TChr) $R_t = 23,6$ мин</p>	 <p>Дитирозин $R_t = 4,66$ мин</p>
 <p>Оксидигидротиохром (ODTChr) $R_t = 26,8$ мин</p>	

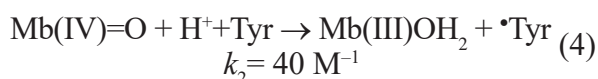
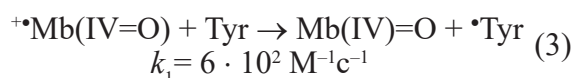
тре СМ2203 («Солар», Беларусь). Образование дитиروزина (в отсутствие в растворе тиамин) регистрировали методом абсорбционной спектроскопии, используя молярный коэффициент поглощения $\epsilon_{315} = 5000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ (рН 7,5) [42, 43], а также флуоресцентным методом (интенсивность флуоресценции измеряли при 410 нм с возбуждением при длине волны 315 нм) [42, 43].

Концентрацию 3-нитротирозина (в отсутствие в растворе тиамин) определяли спектрофотометрически [44]. В кислой среде концентрацию 3-нитротирозина определяли по поглощению при 360 нм, используя молярный коэффициент поглощения $\epsilon_{360} = 2790 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. В щелочных растворах, при рН=9,0, поглощение измеряли при 428 нм, используя значение молярного коэффициента поглощения $4200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Результаты и их обсуждение

После добавления тирозина к водному раствору, содержащему метгемоглобин и пероксид водорода, наблюдали образование дитиروزина. Максимумы поглощения тирозина и дитиروزина (депротонированная форма) лежат при 280 нм и 320 нм соответственно. Кроме того, тирозин и дитирозин обладают характерной флуоресценцией с максимумами при 305 нм и 410 нм, поэтому определение их концентрации не представляет особого труда. Нитрование тирозильных остатков макромолекулы метмиоглобина, которое происходит в процессе инкубации с нитритом и пероксидом водорода, сопровождается снижением интенсивности белковой флуоресценции (максимум флуоресценции при 340 нм), в нашем случае на 30 % в сравнении с интенсивностью флуоресценции исходного метмиоглобина. Этот результат подтверждается данными масс-спектропии о нитровании метмиоглобина в псевдопероксидазной реакции, протекающей в смеси с пероксидом водорода и нитритом [22].

Тирозин способен проникать в гемовый карман и восстанавливает оксоферрильный комплекс Fe(IV=O) в составе Mb(IV=O) в ферри-катион Fe(III) , а радикалы, локализованные на порфириновом цикле, – соответственно, до нейтральной молекулы порфирина, входящей в состав гема. В результате этих реакций молекула тирозина окисляется с образованием тирозильного радикала [25].



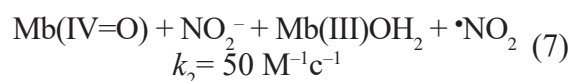
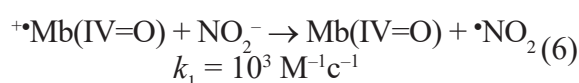
Тирозильные радикалы взаимодействуют между собой с образованием димера тирозина – дити-

розина с константой скорости дисмутации радикалов $k_6 = 4,5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ [45].

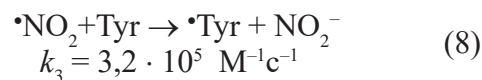


Диоксид азота, генерируемый оксоферрильными формами гемоглобина или миоглобина в присутствии нитрита, вызывает нитрование тирозильных остатков гемопротеинов, а при воздействии на свободную аминокислоту – тирозин – вызывает образование дитиروزина и 3-нитротирозина [46].

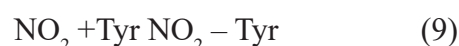
Реакция нитрования тирозина, катализируемая оксоферрильными формами гемопротеинов, представляет собой согласованный двухступенчатый механизм, включающий на первом этапе окисление молекулы тирозина до радикала тирозина (реакции 3 и 4), а молекулы нитрита до диоксида азота соответственно (реакция 6 и 7).



Причем тирозильные радикалы образуются как вследствие восстановления оксоферрильных форм гемопротеинов (соединение 1 и соединение 2) в ферри формы тирозином (реакции 3 и 4), так и вследствие взаимодействия диоксида азота с тирозином (реакция 8).



На втором этапе реакции происходит взаимодействие диоксида азота с тирозильными радикалами и образуется 3-нитротирозин.



Константа скорости этой реакции равна $k = 3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ [46]. Структурная формула 3-нитротирозина представлена в таблице 1.

Выход дитиروزина снижается при увеличении концентрации нитрита в растворе, а выход 3-нитротирозина возрастает. Хроматограмма ВЭЖХ раствора, содержащего метMb, тирозин, нитрит и пероксид водорода после инкубации, содержит кроме пика тирозина с $R_t = 3,55$ мин новый пик, принадлежащий 3-нитротирозину с $R_t = 9,53$ мин.

Результаты измерения образовавшихся продуктов трансформации тирозина после инкубации с метмиоглобином, нитритом и пероксидом водорода, приведены в таблице 2.

Показано, что после инкубации смеси тирозина с нитритом в присутствии метмиоглобина и пероксида водорода происходит образование дитиروزина, а также происходит нитрование ти-

Таблица 2 – Образование продуктов окислительной трансформации тирозина, катализируемое действием метмиоглобина и пероксида водорода в присутствии нитрита. Концентрацию тирозина определяли методом ВЭЖХ по поглощению при 280 нм, концентрацию дитирозина и 3-нитротирозина, продуктов окисления тирозина, определяли методом ВЭЖХ по поглощению при 320 нм. Исходные концентрации миоглобина 10 мкМ, тирозина и пероксида водорода 1 мМ

Table 2 – Formation of tyrosine oxidative transformation products, catalyzed by metmyoglobin and hydrogen peroxide in the presence of nitrite. Concentrations of tyrosine oxidation products were measured by HPLC using absorption at 280 nm and 320 nm. Initial concentrations were 10 μM (myoglobin) and 1 mM (tyrosine, hydrogen peroxide)

Состав раствора	Концентрация, мМ		
	Тирозин <i>R_t</i> = 3,553 мин	Дитирозин <i>R_t</i> = 4,662 мин	3-нитротирозин <i>R_t</i> = 9,530 мин
Тур	1,0		
Мб(III) + Тур + H ₂ O ₂	0,60	0,4	
Мб(III) + Тур + 0,1 мМ NO ₂ ⁻ + H ₂ O ₂	0,55	0,35	0,09
Мб(III) + Тур + 0,5 мМ NO ₂ ⁻ + H ₂ O ₂	0,4	0,22	0,35
Мб(III) + Тур + 1 мМ NO ₂ ⁻ + H ₂ O ₂	0,35	0,14	0,51

розина с образованием 3-нитротирозина (таблицы 1 и 2).

На рисунке 1 схематически представлены процессы взаимодействия диоксида азота с тирозином.

Показано, что тиамин взаимодействует с обоими компонентами реакции нитрования – диоксидом азота и тирозильным радикалом и ингибирует образование как дитирозина, так и 3-нитротирозина.

Диоксид азота восстанавливается тиамином в нитрит, а тирозильный свободный радикал восстанавливается тиамином до молекулы тирозина. В свою очередь, тиамин окисляется тирозильными радикалами до тиохрома в последовательно протекающих одноэлектронных реакциях. Образование тиохрома сопровождается снижением выхода дитирозина. Тиохром устойчив к действию тирозильных радикалов и не испытывает дальнейших превращений. Диоксид азота не только окисляет тиамин с образованием тиохрома, но также окисляет образовавшийся тиохром до оксидогидроксиохрома. На рисунке 2 приведены хроматограммы растворов, содержащих метМб, тирозин, тиамин и пероксид водорода с нитритом и без нитрита, после длительной инкубации. В отсутствие нитрита в растворе основным продуктом окисления тиамин под действием метмиоглобина, пероксида водорода и тирозина является тиохром (*R_t* = 23,6 мин). В присутствии нитрита в растворе образуется главным образом оксидогидроксиохром (*R_t* = 26,8 мин).

В растворе протекают параллельные реакции взаимодействия диоксида азота с тиамином и тиохромом, а также диоксида азота с тирозином. Причем скорость взаимодействия ди-

оксида азота с тиохромом очень высока по сравнению с скоростью взаимодействия диоксида азота с тиамином. Поэтому в растворе, содержащем метмиоглобин, пероксид водорода, нитрит, даже в присутствии высоких концентраций тиамин диоксид азота взаимодействует преимущественно с тиохромом.

Константы скоростей взаимодействия диоксида азота с тирозином и тиохромом в параллельных реакциях пропорциональны концентрациям образовавшихся продуктов окисления тирозина (3-нитротирозина) и тиохрома (или оксидогидроксиохрома) соответственно. Константа скорости реакции диоксида азота с тирозином составляет $3,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. Скорость окисления тиохрома снижалась на 50 % при концентрациях тирозина более чем на порядок превышающих концентрацию тиохрома. Это свидетельствует о том, что константа

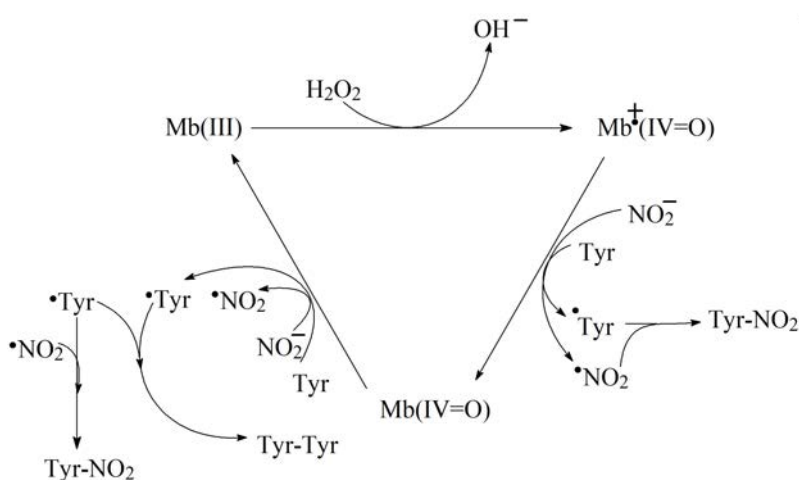


Рисунок 1 – Предполагаемая схема нитрования тирозина, катализируемая метмиоглобином, в растворах, содержащих метмиоглобин, тирозин, и пероксид водорода.

Figure 1 – Plausible scheme of metmyoglobin-catalyzed tyrosine nitration in solutions containing metmyoglobin, tyrosine, and hydrogen peroxide

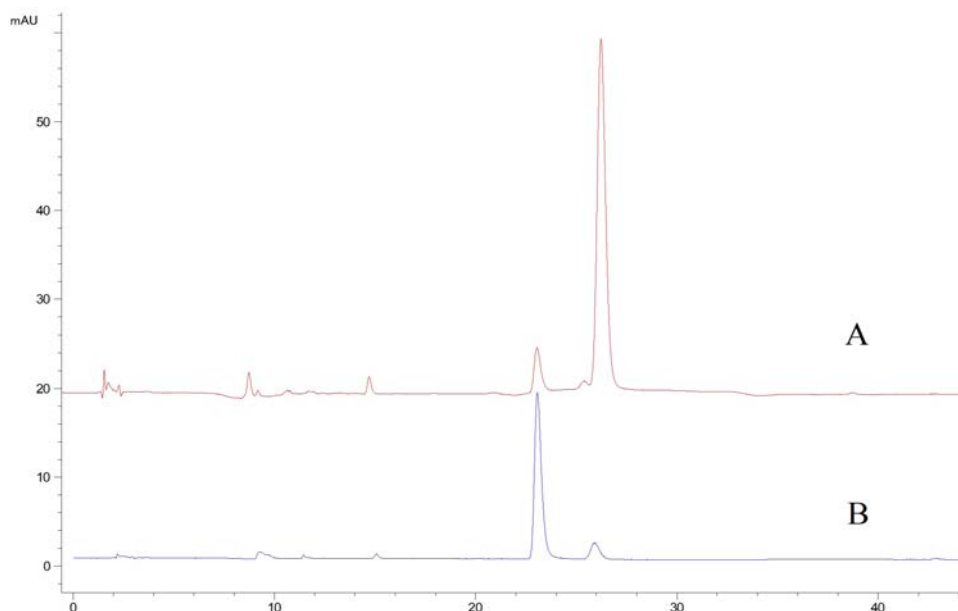


Рисунок 2 – Хроматограммы инкубационного раствора 10 мкМ метМб, 1 мМ тирозина, 1 мМ тиамин и 1 мМ пероксида водорода в присутствии 1 мМ нитрита (А) и в отсутствии нитрита (В).
 Время инкубации = 20 ч. Время удерживания (R_t) 3-нитротирозина – 9,24 мин, тиохрома – 23,6 мин, оксодигидротиохрома – 26,8 мин. Регистрация по поглощению при 360 нм

Figure 2 – Chromatograms of incubation solutions of 10 μ M metMb, 1 mM tyrosine, 1 mM thiamine, and 1 mM H_2O_2 in the presence (A) and absence (B) of 1 mM nitrite. Incubation time was 20 h.
 Retention time (R_t) of 3-nitrotyrosine – 9,24 min, thiochrome – 23.6 min, oxodihydrothiochrome – 26.8 min.
 Signal was registered by absorption at 360 nm

скорости реакции взаимодействия диоксида азота с тиохромом выше нежели константа скорости взаимодействия диоксида азота с тирозином.

Константа скорости реакции диоксида азота с тиохромом, по нашей оценке, составляет $2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Наличие оксодигидротиохрома в растворе свидетельствует о взаимодействии тиамин с диоксидом азота. Добавление таких антиоксидантов, как глутатион, аскорбиновая кислота снижали как выход тиохрома, так и выход дитирозина.

Оксодигидротиохром не испытывает дальнейших превращений под действием диоксида азота. Таким образом, после инкубации водных растворов метмиоглобина в смеси с тирозином, нитритом, тиамином и пероксидом водорода в смеси образуется 3-нитротирозин, дитирозин, тиохром и оксодигидротиохром. На рисунке 3 показано соотношение продуктов окислительной трансформации тиамин и тирозина после инкубации растворов, содержащих Mb(III) в смеси с тирозином, тиамином и NO_2^- . Причем выход 3-нитротирозина и дитирозина ингибируется в присутствии тиамин, а в растворе основным продуктом окисления тиамин является оксодигидротиохром.

Если инкубационная смесь содержит метМб, тирозин, тиамин и пероксид водорода, то в отсутствие нитрита тиамин окисляется тирозильными радикалами до тиохрома. Тиохром является ос-

новным продуктом окисления тиамин тирозильными радикалами при этих экспериментальных условиях (рисунок 4). Образование тиохрома сопровождается снижением выхода дитирозина (таблица 3).

Как известно, эндогенный NO, образующийся главным образом из аргинина под действием L-аргинин NO-синтазы, выступает как «эндогенный вазодиллятор» [47]. В физиологических условиях освобождающийся NO вызывает вазодилляцию, регулирует тонус сосудов и кровяное давление [48]. Вазодилляторное действие монооксида азота связано с активацией растворимой гуанилатциклазы в результате взаимодействия NO с гемом гуанилатциклазы с образованием cGMP. Последний активирует цепь ферментов, что приводит к выходу ионов Ca^{2+} из мышечных волокон и в конечном итоге к вазодилляции [49].

Был предложен ряд энзиматических механизмов, которые могут быть ответственны за нитрование тирозина и тирозильных остатков белков при физиологических условиях, включающие образование пероксинитрита в качестве промежуточного соединения при реакции NO и супероксид-аниона [2, 3, 50], либо при окислении нитрита NO_2^- в присутствии H_2O_2 /пероксидаз [10, 11, 24, 25, 51]. Гемсодержащие белки миоглобин (Mb) и гемоглобин (Hb) помимо своей основной функ-

Таблица 3 – Ингибирование тиамином нитрования тирозина в растворе, содержащем метмиоглобин, пероксид водорода и нитрит. Концентрации продуктов окисления тирозина и тиамин определяли методом ВЭЖХ по поглощению при 280 нм (тирозин и 3-нитротирозин), 320 нм (дитирозин), 360 нм (тиохром), 340 нм (оксодигидротиохром)

Table 3 – Inhibition of tyrosine nitration by thiamine in solution, containing metmyoglobin, hydrogen peroxide and nitrite. Concentrations of oxidation products of tyrosine and thiamine were measured by HPLC using absorption at 280 nm (tyrosine and 3-nitrotyrosine), 320 nm (dityrosine), 360 nm (thiochrome), 340 nm (oxodihydrothiochrome)

Состав раствора	Концентрация, мМ				
	Тирозин $R_t=3,55$ мин	Дитирозин $R_t=4,66$ мин	3-нитро-тирозин $R_t=9,53$ мин	TChr $R_t=23,6$ мин	ODTChr $R_t=26,8$ мин
10 мкМ Mb(III) + 1 мМ Тур + 1 мМ NO_2^- + 1 мМ H_2O_2	0,35	0,14	0,51		
10 мкМ Mb(III) + 1 мМ Тур + 1 мМ NO_2^- + 1 мМ H_2O_2 + 1 мМ тиамин	0,55	0,08	0,22	0,025	0,117
10 мкМ Mb(III) + 1 мМ Тур + 1 мМ H_2O_2	0,60	0,40			
10 мкМ Mb(III) + 1 мМ Тур + 1 мМ H_2O_2 + 1 мМ тиамин	0,80	0,19		0,085	0,005

ции способны также проявлять псевдопероксидазную активность, и их оксоферрильные формы катализируют окисление фенолов [25, 44], тиамин [23, 52], сульфидов [53] и нитрование тирозина (Тур) [25, 44, 54, 55].

В нашей работе показано, что тирозин способен проникать в гемовый карман как соединений I, так и соединений II и восстанавливает оксоферрильный комплекс Fe(IV=O) в составе соединения I Mb(IV=O) в ферри-катион Fe(III) , а радикалы, локализованные на порфириновом цикле, – до нейтральной молекулы порфирина, входящей в состав гема. В результате этих реакций в растворе обра-

зуются тирозильные радикалы молекулы тирозина и метмиоглобин. Тирозильные радикалы эффективно дисмутируют с образованием дитирозина (реакция 5). Поэтому после инкубации водных растворов метмиоглобина в смеси с тирозином и пероксидом водорода в растворе образуются дитирозин, а оксоферрильные формы восстанавливаются до ферригемоглобина. Диоксид азота образуется вследствие взаимодействия нитрита с соединением I и соединением II (рисунок 1). Если происходит инкубация метмиоглобина с нитритом, тирозином и диоксидом, то образовавшиеся молекулы диоксида азота взаимодействуют с тирозиль-

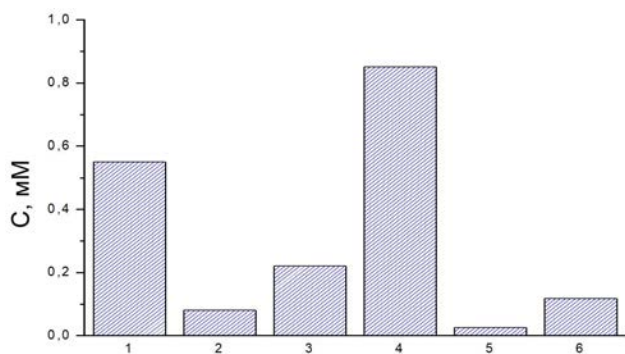


Рисунок 3 – Соотношение продуктов окислительной трансформации тиамин и тирозина после инкубации раствора, содержащего 10 мкМ Mb(III), 1 мМ тирозин, 1 мМ NO_2^- , 1 мМ тиамин и 1 мМ H_2O_2 . Время инкубации растворов 20 часов при pH=7,0 в темноте при температуре 20 °С:

1 – тирозин, 2 – дитирозин, 3 – 3-нитротирозин, 4 – тиамин, 5 – тιοхром, 6 – оксодигидротиохром

Figure 3 – Concentration of thiamine and tyrosine oxidation products after incubation of solution containing 10 μM Mb(III), 1 mM tyrosine, 1 mM NO_2^- , 1 mM thiamine and 1 mM H_2O_2 . Incubation for 20 hours at pH 7.0 in the dark at 20 °C.

1 – tyrosine, 2 – dityrosine, 3 – 3-nitrotyrosine, 4 – thiamine, 5 – thiochrome, 6 – oxodihydrothiochrome

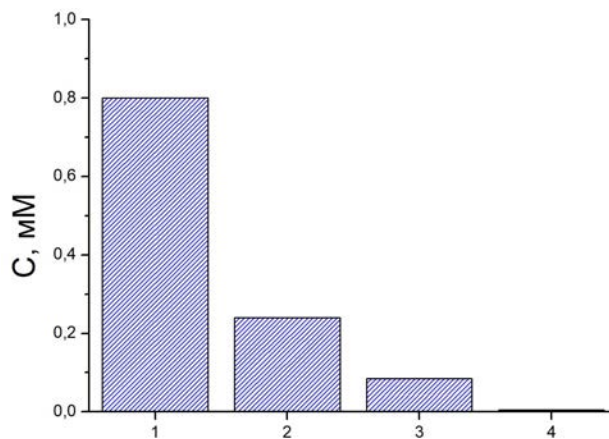


Рисунок 4 – Соотношение продуктов окислительной трансформации тиамин и тирозина после инкубации раствора, содержащего 10 мкМ Mb(III), 1 мМ тирозин, 1 мМ тиамин и 1 мМ H_2O_2 . Время инкубации растворов 20 часов, при pH=7,0 в темноте при температуре 20 °С.

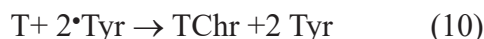
1 – тирозин, 2 – дитирозин, 3 – тιοхром, 4 – оксодигидротиохром

Figure 4 – Concentration of thiamine and tyrosine oxidation products after incubation of solution, containing 10 μM Mb(III), 1 mM tyrosine, 1 mM thiamine and 1 mM H_2O_2 . Incubation for 20 hours at pH 7.0 in the dark at 20 °C.

1 – tyrosine, 2 – dityrosine, 3 – thiochrome, 4 – oxodihydrothiochrome

ными радикалами с образованием 3-нитротирозина (таблица 3, рисунок 3). Константа скорости этой реакции равна $k = 3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [46].

Однако следует подчеркнуть, что собственно тиамин эффективно восстанавливает только тирозильные радикалы. Методом ВЭЖХ показано, что тиамин окисляется под действием тирозильных радикалов с образованием тиохрома, а тирозильные радикалы восстанавливаются до молекул тирозина



Константа скорости этой реакции равна $k \sim 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Тиохром устойчив к действию тирозильных радикалов и не испытывает дальнейших превращений. Эффективная константа скорости взаимодействия диоксида азота с тиаминном, напротив, очень низка и имеет величину порядка $k_1 \sim 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Поэтому вклад реакции взаимодействия тиаминна с диоксидом азота в образование тиохрома незначителен



В то же время диоксид азота эффективно окисляет тиохром с образованием оксидигидроксиохрома (рисунок 2).

Константа скорости реакции взаимодействия диоксида азота с тиохромом, по нашей оценке, составляет $2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Поэтому наличие оксидигидроксиохрома в растворе свидетельствует о взаимодействии тиохрома с диоксидом азота.



Мы предполагаем, что в условиях наших измерений, когда в растворе присутствуют высокие концентрации тирозина, который легко проникает в гемовый карман, взаимодействие тиохрома со свободно-радикальными центрами соединений I и II затруднено.

Тиамин практически не проникает в гемовые карманы оксоферрильных форм миоглобина. Поэтому все превращения тиаминна связанные с его взаимодействием с диоксидом азота и тирозильными радикалами происходят вне интерьера макромолекулы. Следовательно, можно заключить, что диок-

сид азота окисляет тирозин до тирозильных радикалов (которые затем образуют дитирозин), а тиохром до оксидигидроксиохрома. Молекулы диоксида азота также взаимодействуют с тирозильными радикалами с образованием 3-нитротирозина (реакция 9).

В нашей работе показано, что для эффективного ингибирования реакций нитрования тирозина нужен не только тиамин, но также и его продукт окисления – тиохром. Тиамин и продукт его окисления тиохром взаимодействуют с обоими компонентами реакции нитрования тирозильных остатков белков: со свободными радикалами, а также с диоксидом азота, и ингибируют образование как дитирозина, так и 3-нитротирозина.

Окисление молекул тиаминна до оксидигидроксиохрома сопровождается восстановлением 4 эквивалентов диоксида азота. Эквиволярная концентрация тиаминна восстанавливает 2 эквивалента диоксида азота в нитрит, а тиамин окисляется в тиохром. Эквиволярная концентрация тиохрома восстанавливает 2 эквивалента диоксида азота, а тиохром окисляется в оксидигидроксиохром. Оксидигидроксиохром не испытывает дальнейших превращений под действием диоксида азота. Таким образом, ингибируя реакции нитрования тирозина и тирозильных остатков белков, тиамин оказывает не только защитный эффект на структуру макромолекул, но и сберегающий эффект на нитрит, который является важным источником генерации NO в некоторых клеточных структурах [20].

Заключение

Показано, что тиамин и его продукт окисления – тиохром – ингибируют нитрование тирозина и тирозильных остатков белков в пероксидазной реакции, катализируемой метмиоглобином в присутствии пероксида водорода и нитрита. Ингибирование нитрования связано с взаимодействием тиаминна и тиохрома, выступающих в качестве антиоксидантов, с диоксидом азота и тирозильными радикалами. Обнаружено, что эффективная константа скорости реакции диоксида азота с тиохромом, ведущая к образованию оксидигидроксиохрома, на ~4 порядка выше, чем с тиаминном.

Благодарности

Работа выполнена в рамках задания 4.1.2 ГПНИ “Трансляционная медицина”.

Acknowledgements

The study has been funded by the State Research Program "Translational Medicine", task 4.2.1.

Список цитированных источников

1. Gianazza, E. Detecting oxidative post-translational modifications in proteins / E. Gianazza, J. Crawford, I. Miller // *Amino Acids*. – 2007. – Vol. 33. – P. 51–56.
2. Radi, R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration / R. Radi // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2004. – Vol. 101, № 12. – P. 4003–4008.
3. Radi R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine / R. Radi // *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. U S A. – 2018. – Vol. 115, №23. – P. 5839–5848.
4. Nitration of solvent-exposed tyrosine 74 on cytochrome c triggers heme iron-methionine 80 bond disruption: Nuclear magnetic resonance and optical spectroscopy studies / L. A. Abriata [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284, №1. – P. 17–26.
 5. Ischiropoulos, H. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration / H. Ischiropoulos // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – Vol. 305, №3. – P. 776–783.
 6. Protein tyrosine nitration in hydrophilic and hydrophobic environments / S. Bartsaghi [et al.] // *Amino Acids.* – 2007. – Vol. 32, №4. – P. 501–515.
 7. Yakovlev, V. A. Protein tyrosine nitration in cellular signal transduction pathways / V. A. Yakovlev, R. B. Mikkelsen // *J. Recept. Signal Transduct.* – 2010. – Vol. 30, №6. – P. 420–429.
 8. Greenacre, S. A. B. Tyrosine nitration: Localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction / S. A. B. Greenacre, H. Ischiropoulos // *Free Radical Res.* – 2001. – Vol. 34, №6. – P. 541–581.
 9. Schopfer, F. J. NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? / F. J. Schopfer, P. R. S. Baker, B. A. Freeman // *Trends Biochem. Sci.* – 2003. – Vol. 28, №12. – P. 646–654.
 10. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite: a potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity / A. Van der Vliet [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272, №12. – P. 7617–7625.
 11. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils / J. P. Eiserich [et al.] // *Nature.* – 1998. – Vol. 391, №6665. – P. 393–397.
 12. Ischiropoulos, H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species / H. Ischiropoulos // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1998. – Vol. 356, №1. – P. 1–11.
 13. Hurst, J. K. Whence nitrotyrosine? / J. K. Hurst // *J. Clin. Invest.* – 2002. – Vol. 109, №10. – P. 1287–1289.
 14. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide / W. Koppenol [et al.] // *Chem. Res. Toxicol.* – 1992. – Vol. 5, №6. – P. 834–842.
 15. Huie, R. E. The Reaction of NO With Superoxide / R. E. Huie, S. Padmaja // *Free Radic. Res. Commun.* – 1993. – Vol. 18, №4. – P. 195–199.
 16. Pryor, W. A. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide / W. A. Pryor, G. L. Squadrito // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* – 1995. – Vol. 268, №5. – P. L699–L722.
 17. A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species / M.-L. Brennan [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, №20. – P. 17415–17427.
 18. Study of the Interaction Between Triplet Riboflavin and the α -, β H- and β L-Crystallins of the Eye Lens / G. Viteri [et al.] // *Photochem. Photobiol.* – 2003. – Vol. 77, №5. – P. 535–540.
 19. Fontana, M. Formation of 3-nitrotyrosine by riboflavin photosensitized oxidation of tyrosine in the presence of nitrite / M. Fontana, C. Blarzino, L. Pecci // *Amino Acids.* – 2012. – Vol. 42, №5. – P. 1857–1865.
 20. Potential roles of nitrate and nitrite in nitric oxide metabolism in the eye / J. W. Park [et al.] // *Sci. Rep.* – 2020. – Vol. 10, №1. – P. 13166.
 21. Padgett, E. L. Evaluation of nitrite production by human monocyte-derived macrophages / E. L. Padgett, S. B. Pruet // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1992. – Vol. 186, №2. – P. 775–781.
 22. Nitration of Tyrosine and Tyrosyl Residues in Myoglobin by the Action of Visible Light in the Presence of Riboflavin and Nitrite / I. Stepuro [et al.] // *J. Appl. Spectrosc.* – 2023. – Vol. 90, №3. – P. 543–553.
 23. Oxidation of thiamine on reaction with nitrogen dioxide generated by ferric myoglobin and hemoglobin in the presence of nitrite and hydrogen peroxide / I. Stepuro [et al.] // *Biochemistry (Moscow).* – 2012. – Vol. 77, №1. – P. 41–55.
 24. Myeloperoxidase and horseradish peroxidase catalyze tyrosine nitration in proteins from nitrite and hydrogen peroxide / J. B. Sampson [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1998. – Vol. 356, №2. – P. 207–213.
 25. Herold, S. Nitrotyrosine, dityrosine, and nitrotryptophan formation from metmyoglobin, hydrogen peroxide, and nitrite / S. Herold // *Free Radical Biol. Med.* – 2004. – Vol. 36, №5. – P. 565–579.
 26. Степура И. Окисленные производные тиамин. / И. Степура, В. Степура: Lambert Academic Publishing., 2014.
 27. Shikama, K. Autoxidation of native oxymyoglobin. Kinetic analysis of the pH profile / K. Shikama, Y. Sugawara // *Eur. J. Biochem.* – 1978. – Vol. 91, №2. – P. 407–413.
 28. Gunther, M. R. Potential roles of myoglobin autoxidation in myocardial ischemia-reperfusion injury / M. R. Gunther, V. Sampath, W. S. Caughey // *Free Radical Biol. Med.* – 1999. – Vol. 26, №11–12. – P. 1388–1395.
 29. Inouye, K. Etiology and pathology of beriberi / K. Inouye, E. Katsura // *Beriberi and Thiamine.* Tokyo: Igaku Shoin Ltd. – 1965. – P. 1–28.
 30. Tanphaichitr, V. Thiamine / V. Tanphaichitr // *Handbook of Vitamins* / Eds. R. B. Rucker et al. – New York: Marcel Dekker, 2001. – P. 275–316.
 31. Lonsdale, D. A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin(e) and its derivatives / D. Lonsdale // *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* – 2006. – Vol. 3, №1. – P. 49–59.
 32. Jordan, F. Current mechanistic understanding of thiamin diphosphate-dependent enzymatic reactions / F. Jordan // *Nat. Prod. Rep.* – 2003. – Vol. 20, №2. – P. 184–201.
 33. Ba, A. Metabolic and structural role of thiamine in nervous tissues / A. Ba // *Cell. Mol. Neurobiol.* – 2008. – Vol. 28, №7. – P. 923–931.
 34. Cooper, J. R. The role of thiamine in nervous tissue / J. R. Cooper, J. H. Pincus // *Neurochem Res.* – 1979. – Vol. 4, №2. – P. 223–239.
 35. Itokawa, Y. Thiamine in nerve membranes / Y. Itokawa, R. A. Schulz, J. R. Cooper // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1972. – Vol. 266, №1. – P. 293–299.
 36. Matsuda, T. Thiamine as an integral component of brain synaptosomal membranes / T. Matsuda, J. R. Cooper // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1981. – Vol. 78, №9. – P. 5886–5889.
 37. Brown, L.A. Chronic ethanol ingestion potentiates TNF- α -mediated oxidative stress and apoptosis in rat type II cells / L.A. Brown, F.L. Harris, D.M. Guidot // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* – 2001. – Vol. 281, №2. – P. L377–386.
 38. Benfotiamine exhibits direct antioxidative capacity and prevents induction of DNA damage in vitro / U. Schmid [et al.] // *Diabetes Metab. Res. Rev.* – 2008. – Vol. 24, №5. – P. 371–377.
 39. Changes in Nitric Oxide Synthase-Containing Neurons in the Brain of Thiamine-Deficient Mice / H. Matsushita [et al.] // *Acta Histochem. Cytochem.* – 2000. – Vol. 33, №2. – P. 67–72.
 40. Gibson, G.E. Thiamine-dependent processes and treatment strategies in neurodegeneration / G.E. Gibson, J.P. Blass //

Antioxid. Redox Signal. – 2007. – Vol. 9, №10. – P. 1605–1620.

41. Gibson, G. E. Interactions of oxidative stress with thiamine homeostasis promote neurodegeneration / G.E. Gibson, H. Zhang // *Neurochem. Int.* – 2002. – Vol. 40, №6. – P. 493–504.
42. Bayse, G.S. The peroxidase-catalyzed oxidation of tyrosine / G.S. Bayse, A.W. Michaels, M. Morrison // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1972. – Vol. 284, №1 – P. 34–42.
43. Anderson, S.O. Covalent cross-links in a structural protein, resilin / S.O. Anderson // *Acta Physiol. Scand. Suppl.* – 1966. – Vol. 263. – P. 1–81.
44. Myoglobin-catalyzed tyrosine nitration: no need for peroxynitrite / K. Kilinc [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2001. – Vol. 285, №. 2. – P. 273–276.
45. Hunter, E.P.L. The effect of oxygen, antioxidants, and superoxide radical on tyrosine phenoxyl radical dimerization / E. P. L. Hunter, M. F. Desrosiers, M. G. Simic // *Free Radical Biol. Med.* – 1989. – Vol. 6, №6. – P. 581–585.
46. Reactions of nitrogen dioxide in aqueous model systems: Oxidation of tyrosine units in peptides and proteins / W. A. Prütz [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1985. – Vol. 243, №1. – P. 125–134.
47. Palmer, R.M. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine / R.M. Palmer, D. Ashton, S. Moncada // *Nature.* – 1988. – Vol. 333, №6174. – P. 664–666.
48. Ignarro, L.J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview / L. J. Ignarro, C. Napoli, J. Loscalzo // *Circul. Res.* – 2002. – Vol. 90, №1. – P. 21–28.
49. Pyriochou, A. Soluble guanylyl cyclase: more secrets revealed / A. Pyriochou, A. Papapetropoulos // *Cell. Signal.* – 2005. – Vol. 17, №4. – P. 407–413.
50. Szabó, C. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics / C. Szabó, H. Ischiropoulos, R. Radi // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2007. – Vol. 6, №8. – P. 662–680.
51. The nature of heme/iron-induced protein tyrosine nitration / K. Bian [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2003. – Vol. 100, №10. – P. 5712–5717.
52. Оксоферрильные формы миоглобина и гемоглобина в присутствии фенолсодержащих соединений катализируют окислительную трансформацию тиамина и его производных / С. Лабор [и др.] // *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук.* – 2017. №. 2. – P. 55–65.
53. Spolítak, T. Oxidative hemoglobin reactions: Applications to drug metabolism / T. Spolítak, P. F. Hollenberg, D. P. Ballou // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2016. – Vol. 600. – P. 33–46.
54. Metmyoglobin-catalyzed exogenous and endogenous tyrosine nitration by nitrite and hydrogen peroxide / S. Nicolis [et al.] // *Chemistry – A European Journal.* – 2004. – Vol. 10, №9. – P. 2281–2290.
55. Easy oxidation and nitration of human myoglobin by nitrite and hydrogen peroxide / S. Nicolis [et al.] // *Chemistry – A European Journal.* – 2006. – Vol. 12, №3. – P. 749–757.
5. Ischiropoulos H. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;305(3):776-783. doi:10.1016/S0006-291X(03)00814-3.
6. Bartesaghi S, Ferrer-Sueta G, Peluffo G, Valez V, Zhang H, Kalyanaraman B, Radi R. Protein tyrosine nitration in hydrophilic and hydrophobic environments. *Amino Acids.* 2007;32(4):501-515. doi:10.1007/s00726-006-0425-8.
7. Yakovlev VA, Mikkelsen RB. Protein tyrosine nitration in cellular signal transduction pathways. *J Recept Signal Transduct.* 2010;30(6):420-429. doi:10.3109/10799893.2010.513991.
8. Greenacre SAB, Ischiropoulos H. Tyrosine nitration: Localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Radical Res.* 2001;34(6):541-581. doi:10.1080/10715760100300471.
9. Schopfer FJ, Baker PRS, Freeman BA. NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends Biochem Sci.* 2003;28(12):646-654. doi:10.1016/j.tibs.2003.10.006.
10. Van Der Vliet A, Eiserich JP, Halliwell B, Cross CE. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite: a potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J Biol Chem.* 1997;272(12):7617-7625.
11. Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature.* 1998;391(6665):393-397.
12. Ischiropoulos H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys.* 1998;356(1):1-11.
13. Hurst JK. Whence nitrotyrosine? *The Journal of Clinical Investigation.* 2002;109(10):1287-1289. doi:10.1172/jci15816.
14. Koppenol W, Moreno J, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman J. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol.* 1992;5(6):834-842.
15. Huie RE, Padmaja S. The Reaction of NO With Superoxide. *Free Radical Research Communications.* 1993;18(4):195-199. doi:10.3109/10715769309145868.
16. Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* 1995;268(5):L699-L722.
17. Brennan M-L, Wu W, Fu X, Shen Z, Song W, Frost H, Vadseth C, Narine L, Lenkiewicz E, Borchers MT. A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J Biol Chem.* 2002;277(20):17415-17427.
18. Viteri G, Edwards AM, De la Fuente J, Silva E. Study of the Interaction Between Triplet Riboflavin and the α -, β H- and β L-Crystallins of the Eye Lens. *Photochem Photobiol.* 2003;77(5):535-540. doi: 10.1562/0031-8655(2003)0770535SOTIBT2.0.CO2.
19. Fontana M, Blarzino C, Pecci L. Formation of 3-nitrotyrosine by riboflavin photosensitized oxidation of tyrosine in the presence of nitrite. *Amino Acids.* 2012;42(5):1857-1865. doi:10.1007/s00726-011-0905-3.
20. Park JW, Pikhova B, Jenkins A, Hellinga D, Parver LM, Schechter AN. Potential roles of nitrate and nitrite in nitric oxide metabolism in the eye. *Scientific Reports.* 2020;10(1):13166.

References

1. Gianazza E, Crawford J, Miller I. Detecting oxidative post-translational modifications in proteins. *Amino Acids.* 2007;33:51-56.
2. Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *PNAS USA.* 2004;101(12):4003-4008.
3. Radi R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *PNAS USA.* 2018;115(23):5839-5848.
4. Abriata LA, Cassina A, Tortora V, Marín M, Souza JM, Castro L, Vila AJ, Radi R. Nitration of solvent-exposed tyrosine 74

- 21 Padgett EL, Pruett SB. Evaluation of nitrite production by human monocyte-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;186(2):775-781. doi:10.1016/0006-291X(92)90813-Z.
- 22 Stepuro I, Ageiko S, Stsiapura V, Yantsevich A. Nitration of Tyrosine and Tyrosyl Residues in Myoglobin by the Action of Visible Light in the Presence of Riboflavin and Nitrite. *J Appl Spectrosc.* 2023;90(3):543-553. doi:10.1007/s10812-023-01565-z.
- 23 Stepuro I, Oparin AY, Stsiapura V, Maskevich S, Titov VY. Oxidation of thiamine on reaction with nitrogen dioxide generated by ferric myoglobin and hemoglobin in the presence of nitrite and hydrogen peroxide. *Biochemistry (Moscow).* 2012;77(1):41-55.
- 24 Sampson JB, Ye Y, Rosen H, Beckman JS. Myeloperoxidase and horseradish peroxidase catalyze tyrosine nitration in proteins from nitrite and hydrogen peroxide. *Arch Biochem Biophys.* 1998;356(2):207-213.
- 25 Herold S. Nitrotyrosine, dityrosine, and nitrotryptophan formation from metmyoglobin, hydrogen peroxide, and nitrite. *Free Radical Biol Med.* 2004;36(5):565-579.
- 26 Stepuro I, Stsiapura V. Окисленные производные тиамина. Lambert Academic Publishing.; 2014.
- 27 Shikama K, Sugawara Y. Autoxidation of native oxymyoglobin. Kinetic analysis of the pH profile. *Eur J Biochem.* 1978;91(2):407-413.
- 28 Gunther MR, Sampath V, Caughey WS. Potential roles of myoglobin autoxidation in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radical Biol Med.* 1999;26(11-12):1388-1395.
- 29 Inouye K, Katsura E. Etiology and pathology of beriberi. Beriberi and Thiamine Tokyo: Igaku Shoin Ltd. 1965:1-28.
- 30 Tanphaichitr V. Thiamine. In: Handbook of Vitamins. 3rd ed. New York: Marcel Dekker; 2001. p. 275-316.
- 31 Lonsdale D. A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin(e) and its derivatives. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2006;3(1):49-59. doi:10.1093/ecam/nek009
- 32 Jordan F. Current mechanistic understanding of thiamin diphosphate-dependent enzymatic reactions. *Nat Prod Rep.* 2003;20(2):184-201.
- 33 Ba A. Metabolic and structural role of thiamine in nervous tissues. *Cell Mol Neurobiol.* 2008;28(7):923-31. doi:10.1007/s10571-008-9297-7
- 34 Cooper JR, Pincus JH. The role of thiamine in nervous tissue. *Neurochem Res.* 1979;4(2):223-39.
- 35 Itokawa Y, Schulz RA, Cooper JR. Thiamine in nerve membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1972;266(1):293-9.
- 36 Matsuda T, Cooper JR. Thiamine as an integral component of brain synaptosomal membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78(9):5886-9.
- 37 Brown LA, Harris FL, Guidot DM. Chronic ethanol ingestion potentiates TNF-alpha-mediated oxidative stress and apoptosis in rat type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;281(2):L377-86. PMID 11435212.
- 38 Schmid U, Stopper H, Heidland A, Schupp N. Benfotiamine exhibits direct antioxidative capacity and prevents induction of DNA damage in vitro. *Diabetes Metab Res Rev.* 2008;24(5):371-7. doi:10.1002/dmrr.860. PMID 18384109.
- 39 Matsushita H, Takeuchi Y, Kosaka K, Fushiki S, Kawata M, Sawada T. Changes in Nitric Oxide Synthase-Containing Neurons in the Brain of Thiamine-Deficient Mice. *Acta Histochem Cytochem.* 2000;33(2):67-72. doi:10.1267/ahc.33.67.
- 40 Gibson GE, Blass JP. Thiamine-dependent processes and treatment strategies in neurodegeneration. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2007;9(10):1605-1620.
- 41 Gibson GE, Zhang H. Interactions of oxidative stress with thiamine homeostasis promote neurodegeneration. *Neurochem Int.* 2002;40(6):493-504.
- 42 Bayse GS, Michaels AW, Morrison M. The peroxidase-catalyzed oxidation of tyrosine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology.* 1972;284(1):34-42.
- 43 Anderson SO. Covalent cross-links in a structural protein, resilin. *Acta Physiologica Scandinavica Supplementum.* 1966;263:1-81.
- 44 Kilinc K, Kilinc A, Wolf RE, Grisham MB. Myoglobin-catalyzed tyrosine nitration: no need for peroxyxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;285(2):273-276.
- 45 Hunter EPL, Desrosiers MF, Simic MG. The effect of oxygen, antioxidants, and superoxide radical on tyrosine phenoxyl radical dimerization. *Free Radical Biol Med.* 1989;6(6):581-585. doi:10.1016/0891-5849(89)90064-6.
- 46 Prütz WA, Mönig H, Butler J, Land EJ. Reactions of nitrogen dioxide in aqueous model systems: Oxidation of tyrosine units in peptides and proteins. *Arch Biochem Biophys.* 1985;243(1):125-134. doi:10.1016/0003-9861(85)90780-5.
- 47 Palmer RM, Ashton D, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988;333(6174):664-666.
- 48 Ignarro LJ, Napoli C, Loscalzo J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview. *Circul Res.* 2002;90(1):21-28.
- 49 Pyriochou A, Papapetropoulos A. Soluble guanylyl cyclase: more secrets revealed. *Cell Signal.* 2005;17(4):407-413. doi:10.1016/j.cellsig.2004.09.008.
- 50 Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2007;6(8):662-680. doi:10.1038/nrd2222.
- 51 Bian K, Gao Z, Weisbrodt N, Murad F. The nature of heme/iron-induced protein tyrosine nitration. *PNAS USA.* 2003;100(10):5712-5717.
- 52 Labar S, Stsiapura V, Stepuro I, Smirnov V. Oksoferil'nye formy mioglobina i gemoglobina v prisutstvii fenolsoderzhashchih soedinenij kataliziruyut okislitel'nyu transformaciyu tiamina i ego proizvodnyh. [*Izvestiya Nacional'noj akademii nauk Belarusi Seriya biologicheskikh nauk*]. 2017;(2):55-65. (in Russian)
- 53 Spolitat T, Hollenberg PF, Ballou DP. Oxidative hemoglobin reactions: Applications to drug metabolism. *Arch Biochem Biophys.* 2016;600:33-46.
- 54 Nicolis S, Monzani E, Roncone R, Gianelli L, Casella L. Metmyoglobin-catalyzed exogenous and endogenous tyrosine nitration by nitrite and hydrogen peroxide. *Chemistry—A European Journal.* 2004;10(9):2281-2290.
- 55 Nicolis S, Pennati A, Perani E, Monzani E, Sanangelantoni AM, Casella L. Easy oxidation and nitration of human myoglobin by nitrite and hydrogen peroxide. *Chemistry—A European Journal.* 2006;12(3):749-757.

THIAMINE INHIBITS NITRATION OF TYROSINE AND TYROSYL RESIDUES OF PROTEINS IN REACTIONS CATALYZED BY METMYOGLOBIN IN PRESENCE OF HYDROGEN PEROXIDE AND NITRITE

I. I. Stepuro¹, S. A. Aheika¹, V. I. Stsiapura², V. Y. Smirnov³

¹Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Republic of Belarus

²International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

³Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

Background. Nitration of protein tyrosyl residues is considered as a type of post-translational protein modification which may be used as a marker of oxidative nitrosyl stress in an organism during disorders of metabolism and signal function of nitric oxide.

Objective. Investigation of inhibition mechanism of tyrosine and protein tyrosyl nitration by thiamine in reactions catalyzed by metmyoglobin in the presence of hydrogen peroxide and nitrite.

Materials and methods. Chromatography (HPLC) and fluorescence spectroscopy methods.

Results. Incubation of tyrosine and nitrite mixture in the presence of metmyoglobin and hydrogen peroxide leads to nitration of tyrosine to produce 3-nitrotyrosine and dityrosine formation. It was shown that thiamine reacts with both components of the nitration reaction – nitrogen dioxide and tyrosyl radical – and inhibits the formation of dityrosine and 3-nitrotyrosine.

Thiamine reduces nitrogen dioxide to nitrite, and tyrosyl free radical to tyrosine molecule. From the other side thiamine is oxidized to thiochrome by tyrosyl radicals in sequential single-electron reactions.

Nitrogen dioxide can also oxidize thiamine to thiochrome, and the produced thiochrome can be further oxidized to oxodihydrothiochrome. Oxodihydrothiochrome did not undergo further oxidative conversions under the action of nitrogen dioxide and it was the main product of thiamine oxidation. Oxidation of one thiamine molecule to oxodihydrothiochrome is accompanied by reduction of 4 equivalents of nitrogen dioxide to nitrite.

Conclusions. It was shown that thiamine and its oxidative product thiochrome inhibited nitration of tyrosine and tyrosyl residues of proteins in peroxidase reaction catalyzed by metmyoglobin in the presence of hydrogen peroxide and nitrite.

Keywords: nitration of proteins, pseudo peroxidase reactions, oxidative conversions of thiamine.

For citation: Stepuro II, Aheika SA, Stsiapura VI, Smirnov VY. Thiamine inhibits nitration of tyrosine and tyrosyl residues of proteins in reactions catalyzed by metmyoglobin in presence of hydrogen peroxide and nitrite. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2024, vol. 3, no 1(4). pp. 143–154 (in Russian).

Поступила 15.04.2024

СОДЕРЖАНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ В ГРУДНОМ МОЛОКЕ ЖЕНЩИН, ПРОЖИВАЮЩИХ В ЗАПАДНОМ РЕГИОНЕ БЕЛАРУСИ

*Н. М. Тихон¹, С. А. Ляликов¹, М. В. Белевцев², В. Л. Зверко³,
А. Н. Купчинская², О. С. Дубовик², А. К. Никольская⁴*

¹*Гродненский государственный медицинский университет,
г. Гродно, Республика Беларусь*

²*Республиканский научно-практический центр детской онкологии,
гематологии и иммунологии, г. Минск, Республика Беларусь*

³*Гродненский областной клинический перинатальный центр,
г. Гродно, Республика Беларусь*

⁴*Городская клиническая больница скорой медицинской помощи,
г. Гродно, Республика Беларусь*

Введение. Содержание иммунных факторов в грудном молоке женщин варьирует в разных исследованиях, что, как полагают, обусловлено не только различиями в дизайне, но также обусловлено регионом проживания обследуемых женщин.

Цель исследования. Рассчитать референсные значения содержания иммунных факторов в грудном молоке через 1 и 3 месяца после родов у женщин, проживающих в западном регионе Беларуси.

Материалы и методы. В проспективное когортное исследование включено 265 женщин, проживающих в Гродненской области Беларуси. IgE, sIgA, цитокины в грудном молоке определяли методом ИФА.

Результаты. При попарном сравнении содержания изучаемых цитокинов и иммуноглобулинов в грудном молоке женщин через 1 и 3 месяца после родов отмечалось статистически значимое снижение концентрации IL-4 ($p=0,002$), IL-6 ($p=0,0001$), TSLP ($p=0,03$), TGF β_1 ($p=0,0001$), TGF β_2 ($p=0,002$) и существенное увеличение содержания IL-10 ($p=0,04$) и sIgA ($p=0,03$). Среди перечисленных цитокинов наиболее высокие концентрации и значимая динамика была отмечена для изоформ TGF β .

Заключение. Впервые представлена динамика содержания иммунных факторов в грудном молоке в первые месяцы лактации и данные референсного диапазона содержания IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-25, TSLP, TGF β_1 , TGF β_2 , IFN- γ , CCL22, CCL17, CXCL10, а также IgE и sIgA в грудном молоке через 1 и 3 месяца после родов у женщин, проживающих в западном регионе Беларуси.

Ключевые слова: грудное молоко, цитокины, иммуноглобулины, референсный диапазон.

Для цитирования. Содержание иммунологически активных компонентов в грудном молоке женщин, проживающих в западном регионе Беларуси / Н. М. Тихон [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. – 2024. – Т. 3, № 1(4). – С. 155–162.

Введение

Естественное вскармливание положительно влияет на состояние здоровья ребенка не только непосредственно в грудном возрасте, но и в отдаленном периоде. Вскармливание грудным молоком ассоциировано с меньшим риском развития инфекционных заболеваний, но что особенно важно в современных условиях, со снижением риска неинфекционных заболеваний, таких как ожирение, аутоиммунные и онкологические заболевания, сердечно-сосудистая патология. В отношении снижения риска аллергических заболеваний результаты исследований противоречивы и большинство ученых полагают, что значение имеет не только сам факт грудного вскармливания, но и состав материнского молока [1, 2].

В последнее десятилетие были достигнуты серьезные успехи в изучении состава грудного молока, которое как выяснилось, является источником не только питательных веществ, но и различных биологически активных компонентов, в том числе гормонов, ферментов, живых иммунных клеток, цитокинов, иммуноглобулинов и др. Иммунологические активные вещества секретруются в молоко эпителиальными клетками молочной железы и иммунными клетками, содержащимися в молоке, некоторые иммунные факторы попадают в молоко из крови матери [3, 4]. Комбинация биологически активных молекул в женском молоке зависит от многих факторов, что определяет принципиальную важность и эксклюзивность грудного вскармливания для каж-

дого ребенка [1, 5]. Иммуные факторы грудного молока играют значимую роль в развитии иммунной системы ребенка в постнатальном периоде, в том числе в формировании иммунологической толерантности посредством прямого воздействия на иммунную систему, воздействия на кишечный микробиом и на барьерную функцию эпителия гастроинтестинального тракта [4, 6].

В молоке обнаружены различные по своим функциям виды цитокинов: Th1-ассоциированные (IL-6, IL-8, IFN- γ , TNF α , CXCL10), Th2-ассоциированные (IL-4, IL-5, IL-13, IL-25, TSLP, CCL17, CCL22) и иммунорегуляторные (IL-10, TGF β), а также иммуноглобулины. Однако содержание этих биологически активных веществ, как оказалось, не стабильно, зависит от различных факторов и прежде всего от длительности лактационного периода [4]. Так, например, максимально высокие уровни TGF β_1 , TGF β_2 и sIgA определяются в молозиве, но в первые месяцы лактации их содержание значительно уменьшается. Концентрации других цитокинов и иммуноглобулинов по мере увеличения длительности лактационного периода изменяется по-разному. Динамика содержания цитокинов может зависеть также от состояния здоровья женщины и влияния некоторых перинатальных факторов, как например, вид родоразрешения, паритет родов, наличие акушерских осложнений [1, 4, 6, 7].

Особый интерес представляет связь иммунного профиля грудного молока женщин с географическим регионом проживания, который определяет характер питания, уровень микробной экспозиции и экологическое состояние окружающей среды. К примеру, содержание IL-10, IFN- γ , sIgA и TGF β варьировало в разных исследованиях в зависимости от страны проживания и места рождения женщины [2, 5]. Было показано, что у женщин из Великобритании содержание TGF β в грудном молоке было наиболее высоким, наиболее низким в грудном молоке матерей из Италии, промежуточные уровни были у российских женщин. В другой работе отмечалось более высокое содержание TGF β_1 у женщин из Мали, чем у матерей из Швеции [2]. При сравнении уровней sIgA в молоке у женщин в Финляндии и Германии оказалось, что наиболее низкие уровни sIgA в молоке были у немцев. В развивающихся странах с более высоким уровнем микробной экспозиции, по-видимому, биологически необходима секреция более высоких уровней TGF β_1 и IL-6 в грудном молоке из-за их участия в стимуляции синтеза защитного IgA [1].

Таким образом, содержание иммунных факторов в грудном молоке женщин варьирует в разных

исследованиях, что, как полагают, обусловлено не только различиями в дизайне (разный лактационный период, состояние здоровья женщин) и используемых лабораторных методах, но также обусловлено регионом проживания обследуемых женщин [2, 3, 4, 8, 9, 10]. Причины конфликтующих данных научных исследований продолжают изучаться и активно обсуждаются, что свидетельствует об актуальности данного направления исследований [5].

Цель исследования – рассчитать референсные значения содержания иммунных факторов в грудном молоке через 1 и 3 месяца после родов у женщин, проживающих в западном регионе Беларуси.

Материалы и методы

Для участия в исследовании были включены 265 беременных женщин, проживающих в Гродненской области Беларуси.

Критерии включения: беременные женщины (III триместр) в возрасте 18–45 лет, информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии невключения: беременность, наступившая в результате ЭКО; любая соматическая патология у женщины, способная повлиять на течение и исход беременности и требующая проведения лечебных и профилактических мероприятий.

Критерии исключения: отказ от участия в исследовании, отсутствие комплаентности, патологическое течение беременности, родоразрешение путем экстренного кесарева сечения, преждевременные роды, необходимость придерживаться элиминационных диет, признаки инфекционного заболевания в течение месяца, предшествующего родам.

Набор женщин в группы осуществлялся на базе УЗ «Гродненский областной клинический перинатальный центр» и УЗ «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи г. Гродно» (акушерско-физиологические отделения). С помощью специально разработанной анкеты у женщин, включенных в исследование, выяснялся акушерский анамнез, особенности быта семьи.

Материалом для исследования было грудное молоко полученное через 1 и 3 месяца после рождения ребенка. При наличии острого инфекционного заболевания забор биологического материала проводился не ранее, чем через 2 недели после завершения инфекционного эпизода. Женщины были подробно инструктированы о способе сбора образцов грудного молока. Грудное молоко сцеживали в стерильные пластиковые контейнеры, которые оставляли в холодильнике

при диапазоне температуры от +4 °С до +8 °С. В течение последующих 4–6 часов пробы доставляли в лабораторию, где их хранили при температуре –70 °С. После размораживания образцы центрифугировали при 1500×g в течение 15 мин при +4 °С, чтобы разделить жировой и водный слой. Липидный слой удаляли, для иммуноферментного анализа использовали сыворотку.

IgE, sIgA, цитокины (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-25, TSLP, TGFβ₁, TGFβ₂, IFN-γ, CCL22, CCL17, CXCL10) в грудном молоке определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) согласно рекомендациям в инструкции к используемым наборам реагентов (Fine test, Китай) на автоматическом анализаторе SUNRISE TECAN (Австрия).

Статистический анализ выполнен с использованием программы Statistica 10.0, лицензионный номер AXXAR207F394425FA-Q. Учитывая, что распределение большинства изученных признаков было отличным от нормального, применяли методы непараметрической статистики. Количественные переменные представлены в виде медианы и нижнего и верхнего квартилей (Me [Q₁; Q₃]). Качественные переменные описывали абсолютными значениями и относительными частотами (абс. (%)). Межгрупповые различия оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни и ANOVA Краскела-Уоллиса, T-критерия Уилкоксона. Нулевая гипотеза отвергалась при $p \leq 0,05$, для промежуточных значений $0,05 < p \leq 0,10$ обсуждали тенденцию к достоверности.

Проведенное исследование соответствовало этическим принципам и было одобрено комитетами по биомедицинской этике УЗ «Гродненский областной клинический перинатальный центр», УЗ «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи г. Гродно», УО «Гродненский государственный медицинский университет» (протокол от 12.02.2021 №2).

Результаты и их обсуждение

В проспективное когортное исследование согласно разработанным критериям отбора было включено 265 женщин, проживающих в Гродненской области. Медианный возраст женщин на момент наступления беременности был 30 лет [26; 33]. Частота родоразрешения путем вагинальных родов и кесарева сечения составила 55 % и 45 %, соответственно. Из всех обследуемых в первые месяцы после родов кормили ребенка грудным молоком только чуть более 50 % женщин. Характеристики референтной популя-

ции обследуемых женщин представлены в таблице 1.

Содержание цитокинов и иммуноглобулинов в динамике в первые месяцы лактации для популяции женщин, проживающих в западном регионе Беларуси представлены впервые. Показатели описательной статистики концентраций изучаемых иммунных факторов в грудном молоке, а также рассчитанный референтный интервал представлены в таблице 2 и 3. Референтный интервал представляет собой диапазон, охватывающий 95 % всех значений результатов лабораторных исследований определенного аналита, полученный в референтной популяции, состоящей из референтных индивидуумов, отобранных по специальным критериям, таким образом, что 2,5 % значений будет меньше нижней границы и 2,5 % – больше верхней границы этого интервала, независимо от распределения этих значений [11].

По данным литературы цитокиновый профиль грудного молока варьирует в течение лактационного периода, при этом наиболее высокие концентрации многих иммунных факторов отмечаются в молозиве и по мере увеличения длительности

Таблица 1 – Характеристика группы обследуемых

Table 1 – Characteristics of the examined group

Критерий	Количество
Количество женщин	265
Возраст на момент наступления беременности	30 [26; 33]
Вид родоразрешения:	
Естественные роды	146 (55)
Кесарево сечение (плановое)	119 (45)
Паритет родов	
Первородящие	86 (32)
2 и более родов	179 (68)
Прерывание беременности в анамнезе (аборты, выкидыши и др.)	48 (18)
Гестационная прибавка массы тела	14 [11; 17]
Курение женщины	
До беременности	13 (5)
Во время и после беременности	0 (0)
Курение отца ребенка	88 (33)
Пол рожденных детей	
Девочки	125 (47)
Мальчики	140 (53)
Через 1 месяц после родов	
Грудное вскармливание	154 (58)
Смешанное вскармливание	63 (24)
Не кормили грудью	48 (18)
Через 3 месяца после родов	
Грудное вскармливание	135 (51)
Смешанное	37 (14)
Не кормили грудью	93 (35)

Таблица 2 – Медиана, 1-я и 3-я квартиль, 95 % референсный интервал концентрации цитокинов (pg/ml), IgE (ng/ml) и sIgA (ng/ml) в грудном молоке женщин через 1 месяц после родов

Table 2 – Median, 1st and 3rd quartile, 95% reference range of cytokine concentrations (pg/ml), IgE level (ng/ml) and sIgA level (ng/ml) in human milk in 1 month after delivery

Показатель	n	Me	P25	P75	P2,5	P97,5
CCL22	23	4558,60	4468,10	4689,30	2889,70	6017,90
CCL17	23	197,34	115,08	343,10	43,87	889,07
CXCL10	23	252,59	206,02	380,83	35,98	642,30
IL-4	96	45,59	13,61	107,24	0,89	2234,10
IL-5	94	4,50	2,44	15,63	0,10	1594,20
IL-6	98	6,37	2,30	9,38	0,27	92,73
IL-10	97	6,44	0,13	47,06	НЛД	612,00
IL-25	70	124,35	67,17	262,53	23,54	741,35
TSLP	87	14,76	0,11	61,57	НЛД	2452,00
TGFβ1	86	77,75	1,17	98,46	0,12	399,88
TGFβ2	55	9,31	6,21	29,02	НЛД	1135,60
IFN-γ	78	4,71	1,35	14,28	НЛД	1235,20
IgE	99	13,46	6,02	21,94	2,83	99,00
sIgA	93	99,69	54,46	167,25	16,29	428,00

Примечание: НЛД – ниже лимита детекции

Note: LLD – lower limit of detection

Таблица 3 – Медиана, 1-я и 3-я квартиль, 95 % референсный интервал концентрации цитокинов (pg/ml), IgE (ng/ml) и sIgA (ng/ml) в грудном молоке женщин через 3 месяца после родов

Table 3 – Median, 1st and 3rd quartile, 95 % reference range of cytokine concentrations (pg/ml), IgE level (ng/ml) and sIgA level (ng/ml) in human milk in 3 months after delivery

Показатель	n	Me	P25	P75	P2,5	P97,5
IL-4	81	27,45	2,17	79,25	НЛД	2214,00
IL-5	81	5,89	2,15	14,34	НЛД	1244,20
IL-6	83	1,82	0,40	4,43	НЛД	23,72
IL-10	83	8,41	3,65	35,55	0,13	559,00
IL-25	59	122,54	66,26	304,11	45,69	823,98
TSLP	70	1,13	0,09	20,18	НЛД	2340,00
IFN-γ	78	3,83	0,60	19,48	НЛД	1414,00
TGFβ1	75	5,29	0,14	16,90	НЛД	437,00
TGFβ2	40	3,68	2,57	5,88	0,64	224,57
IgE	79	11,53	7,05	19,31	3,25	125,00
sIgA	39	185,42	120,26	272,24	21,09	443,00

Примечание: НЛД – ниже лимита детекции

Note: LLD – lower limit of detection

лактации уровни их в зрелом молоке снижаются. Предполагается, что по мере выполнения определенной биологической роли в постнатальном развитии ребенка, содержание биологически активных компонентов грудного молока соответственно изменяется. Однако динамика не всех иммунных показателей имеет одинаковый тренд [6].

Согласно полученным нами данным, при попарном сравнении содержания изучаемых цитокинов и иммуноглобулинов в грудном молоке женщин через 1 и 3 месяца после родов (таблица 4) отмечалось статистически значимое снижение концентрации IL-4, IL-6, TSLP, TGFβ₁, TGFβ₂ и существенное увеличение содержания IL-10 и sIgA. Стоит отметить, что среди перечисленных цитоки-

нов наиболее высокие концентрации и значимая динамика была отмечена для изоформ TGFβ, что согласуется с результатами исследований других авторов. В подавляющем большинстве доступных нам исследований авторы описывают значительное снижение концентрации TGFβ в зрелом молоке в сравнении с молозивом [4, 12]. TGFβ обладает выраженными противовоспалительными свойствами, подавляя дифференцировку наивных Т лимфоцитов в Th1 или Th2 типа, и способствует дифференцировке Treg. Попадая в желудочно-кишечный тракт, играет важную роль в формировании оральной толерантности, в частности, снижает проницаемость интестинального барьера, стимулирует переключение В-лимфоцитов на синтез

IgA, регулирует противовоспалительную активность и состав кишечной микробиоты [3, 13, 14]. Для оптимального переключения В-лимфоцитов на синтез IgA необходима кооперация TGF β с IL-6 и IL-10 [1, 14, 15].

Таблица 4 – Динамика концентрации цитокинов и иммуноглобулинов в грудном молоке женщин через 1 и 3 месяца после родов (Wilcoxon Matched Pairs Test)

Table 4 – Dynamics of the cytokine and immunoglobulin concentration in human milk in 1 month and 3 months after delivery (Wilcoxon Matched Pairs Test)

Показатель	Изменение концентрации вещества в течение времени	Значимость различий
IL-4	Уменьшается	$p = 0,002$
IL-5	Нет различий	$p > 0,05$
IL-6	Уменьшается	$p = 0,0001$
IL-10	Увеличивается	$p = 0,04$
IL-25	Нет различий	$p > 0,05$
TSLP	Уменьшается	$p = 0,03$
IFN-γ	Нет различий	$p > 0,05$
TGFβ1	Уменьшается	$p = 0,0001$
TGFβ2	Уменьшается	$p = 0,002$
IgE	Нет различий	$p > 0,05$
sIgA	Увеличивается	$p = 0,03$

Согласно нашим данным, которые согласуются с данными других авторов, IL-6 в наибольшей концентрации определяется в молозиве и в последующем постепенно его уровень снижается. Это связывают с изменениями, происходящими в организме женщины во время беременности и родов [3, 4]. IL-6 представляет собой плеiotропный цитокин, который оказывает как провоспалительное, так и противовоспалительное воздействие, играя ключевую роль в регуляции острофазового ответа, который одновременно усиливает врожденную антибактериальную защиту и ограничивает некоторые из негативные последствия воспаления. IL-6 также является важным регулятором выработки слизи бокаловидными клетками, связан с выработкой IgA в кишечнике новорожденного путем индукции фолликулярных Т-хелперных клеток в зародышевых центрах Пейеровых бляшек [3, 16].

В отличие от вышеописанных цитокинов более высокий уровень IL-10 по данным ряда авторов, определялся в зрелом молоке в сравнении с молозивом [4]. Однако в некоторых литературных обзорах описано как снижение (Garofalo R. et al.) уровня IL-10 в динамике лактации, так и его стабильная концентрации (Agarwal S. et al.). Интерлейкин-10 наряду с TGF β является наиболее важным противовоспалительным цитокином. IL-10 увеличивает выживаемость и размножение В-клеток, ингибирует Th1 ответы. IL-10 участвует в мо-

дуляции воспаления в кишечнике и регулирует активность ответных реакций на антигены кишечной микробиоты [3]. Биологическая роль IL-10 в грудном продолжает изучаться.

По мере увеличения длительности лактационного периода наряду с ростом концентрации IL-10 увеличивается также и содержание IgA. IgA является основным иммуноглобулином женского молока и составляет 85–95 % от общего количества иммуноглобулинов в этом биоматериале. IgA грудного молока синтезируется В-клетками, которые мигрируют из тонкого кишечника матери, хоуминг в молочные железы обеспечивается хемокином CCL28 [17]. Основным источником IgA для новорожденных является грудное молоко, собственная секреция данного иммуноглобулина начинается только с 3–4-недельного возраста. sIgA в грудном молоке играют важную роль в антимикробной защите, а также контролирует презентацию антигенов кишечной микробиоты мукозальной иммунной системе, что важно для формирования иммунной толерантности. По данным исследований уровни IgA в грудном молоке тесно коррелируют с концентрациями TGF- β , IL-10 и IL-6. Сообщается, что высокие уровни IgA в грудном молоке защищают от развития аллергических заболеваний, включая аллергию на коровье молоко [3, 16]. Исследование PASTURE показало, что содержание IgA в грудном молоке, а соответственно количество потребляемого IgA обратно пропорционально связано с риском развития атопического дерматита у младенцев [14, 18].

Во время беременности иммунная система матери, и, в частности, децидуальная ткань, перестраивается на доминирование синтеза регуляторных цитокинов (TGF β , IL-10) и Th2- цитокинового профиля, что физиологически необходимо для предотвращения отторжения плода, несущего чужие для матери антигены. После родов Th1/Th2 баланс постепенно восстанавливается. Это, как предполагается, может быть фактом, объясняющим динамику Th2-ассоциированных цитокинов в грудном молоке женщин по мере удлинения лактационного периода [19]. Согласно нашим данным, у здоровых женщин в грудном молоке в первые месяцы лактации концентрации IL-4 и TSLP значительно уменьшаются, аналогичная тенденция показана и для IL-5. Интерлейкин 4 направляет развитие иммунного ответа по Th2 пути, индуцирует переключение В-клеток на продукцию IgE, подавляет синтез провоспалительных цитокинов. Цитокины, известные как алармины (TSLP, IL-25, IL-33), высвобождаются эпителиальными клетками слизистой оболочки при контакте с различны-

ми потенциально опасными антигенами. Алармины стимулируют лимфоциты врожденного иммунитета 2-го типа, которые секретируют IL-4 и IL-5. Это создает микроокружение для смещения адаптивного ответа в сторону Th-2 доминирования, тем самым способствуя выработке IgE и активации эозинофилов.

Заключение

Работы по исследованию компонентов грудного молока важны в том числе для обоснования важности грудного вскармливания с точки зрения формирования здоровья детей, поскольку имеющаяся тенденция по снижению частоты и длительности грудного вскармливания не может не настораживать. Согласно нашим данным в пер-

вые месяцы после родов кормили грудью чуть более 50 % матерей.

Иммунный профиль грудного молока зависит от длительности лактационного периода. Динамика содержания иммунных факторов в грудном молоке в первые месяцы лактации и данные референсного диапазона содержания IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-25, TSLP, TGFβ₁, TGFβ₂, IFN-γ, CCL22, CCL17, CXCL10, а также IgE и sIgA в грудном молоке через 1 и 3 месяца после родов у женщин, проживающих в западном регионе Беларуси, были представлены впервые. Для выяснения клинической значимости, описанных особенностей грудного молока продолжается мониторинг физического развития и состояния здоровья детей, рожденных женщинами обследованной группы.

Благодарности

Исследование выполнено в рамках государственной программы научных исследований на 2021–2025 гг. ГПНИ 4 «Трансляционная медицина», подпрограмма 4.2 «Фундаментальные аспекты медицинской науки», задание 3.32 (01.01.2022 – 31.12.2024; № госрегистрации 20220218, от 28.02.2022)

Acknowledgements

The study has been funded by the State Research Program for 2021–2025 №4 “Translational Medicine”, subprogram 4.2 “Fundamental Aspects of Medical Science”, task 3.32 (01.01.2022 – 31.12.2024; State Registration №20220218, dated 28.02.2022)

Список использованных источников

1. Lokossou, G. A. G. Human breast milk: from food to active immune response with disease protection in infants and mothers / G. A. G. Lokossou, L. Kouakanou, A. Schumacher, A.C. Zenclussen // *Front. Immunol.* – 2022. – Vol.13. – P. 849012. doi:10.3389/fimmu.2022.849012.
2. Human milk and allergic diseases: an unsolved puzzle / D. Munblit [et al.] // *Nutrients.* – 2017. – Vol. 9. – P. 894. doi:10.3390/nu9080894.
3. Dawod, B. Cytokines and soluble receptors in breast milk as enhancers of oral tolerance development / B. Dawod, J. S. Marshall // *Front. Immunol.* – 2019. – Vol.10. – P. 16. doi:10.3389/fimmu.2019.00016
4. Kielbasa, A. Cytokines-biogenesis and their role in human breast milk and determination / A. Kielbasa, R. Gadzała-Kopciuch, B. Buszewski // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22, №12. – P.6238. doi:10.3390/ijms22126238.
5. Rajani, P. S. Immunologically active components in human milk and development of atopic disease, with emphasis on food allergy, in the pediatric population / P. S. Rajani, A. E. Seppo, K.M. Järvinen // *Front. Pediatr.* – 2018. – Vol. 6. – P. 218. doi: 10.3389/fped.2018.00218.
6. Maternal and neonatal factors modulating breast milk cytokines in the first month of lactation / D. Ramiro-Cortijo [et al.] // *Antioxidants* (Basel). – 2023. – Vol.12, №5. – P. 996. doi:10.3390/antiox12050996.
7. A review of bioactive factors in human breastmilk: a focus on prematurity / A. Gila-Diaz [et al.] // *Nutrients.* – 2019. – Vol. 11, №6. – P. 1307. doi:10.3390/nu11061307.
8. Duale, A. Breast milk: a meal worth having / A. Duale, P. Singh, S. Al Khodor // *Front Nutr.* – 2022. – Vol. 8. – P. 800927. doi:10.3389/fnut.2021.800927.
9. Warner, J. O. The foetal origins of allergy and potential nutritional interventions to prevent disease / J. O. Warner, J. A. Warner // *Nutrients.* – 2022. – Vol. 14, №8. – P. 1590. doi:10.3390/nu14081590.
10. Pajewska-Szmyt, M. The impact of environmental pollution on the quality of mother's milk / M. Pajewska-Szmyt, E. Sinkiewicz-Darol, R. Gadzała-Kopciuch // *Environ. Sci. Pollut. Res.* – 2019. – Vol. 26. – P.7405–7427. doi:10.1007/s11356-019-04141-1.
11. ГОСТ Р 53022.3-2008. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3 Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов.
12. TGF-beta concentration in breast milk is associated with the development of eczema in infants / Y. Morita [et al.] // *Front. Pediatr.* – 2018. – Vol. 6. – P.162. doi:10.3389/fped.2018.00162.
13. Breast milk transforming growth factor β is associated with neonatal gut microbial composition / A.R. Sitarik [et al.] // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 2017. – Vol. 65, №3. – P.60–677. doi:10.1097/MPG.0000000000001585.
14. The role of IgA in the manifestation and prevention of allergic immune responses / S. Scheurer // *Curr Allergy Asthma Rep.* – 2023. – Vol. 23, №10. – P. 589–600. doi:10.1007/s11882-023-01105-
15. Cerutti, A. The regulation of IgA class switching / A. Cerutti // *Nat Rev Immunol.* – 2008. – Vol. 8, №6. – P. 421–434. doi:10.1038/nri2322.
16. Immune factors in breast milk related to infant milk allergy are independent of maternal atopy / K.M. Järvinen [et al.] // *J Allergy Clin Immunol.* – 2015. – Vol. 135. – P. 1390–1393. doi:10.1016/j.jaci.2014.10.051
17. Harmancıoğlu, B. Breast milk: its role in early development of the immune system and long-term health // B. Harmancıoğlu,

- S. Kabaran // Open Journal of Obstetrics and Gynecology – 2019. – Vol. 9. – P. 458–473. doi:10.4236/ojog.2019.94045.
18. Soluble immunoglobulin A in breast milk is inversely associated with atopic dermatitis at early age: the PASTURE cohort study / L. Orivuori [et al.] // Clin Exp Allergy. – 2014. – Vol. 44, №6. – P. 102–112. doi:10.1111/cea.12199.
 19. Maternal immunological adaptation during normal pregnancy / B. Abu-Raya [et al.] // Front. Immunol. – 2020. – Vol. 11. – P. 575197 doi:10.3389/fimmu.2020.575197.
- References**
- 1 Lokossou GAG, Kouakanou L, Schumacher A, Zenclussen AC. Human breast milk: from food to active immune response with disease protection in infants and mothers. *Front Immunol.* 2022 Apr 5;13:849012. doi:10.3389/fimmu.2022.849012.
 - 2 Munblit D, Peroni DG, Boix-Amorós A, Hsu PS, Van't Land B, Gay MCL, Kolotilina A, Skevaki C, Boyle RJ, Collado MC, Garssen J, Geddes DT, Nanan R, Slupsky C, Wegienka G, Kozyrskyj AL, Warner JO. Human Milk and Allergic Diseases: An Unsolved Puzzle. *Nutrients.* 2017 Aug 17;9(8):894. doi:10.3390/nu9080894.
 - 3 Dawod B, Marshall JS. Cytokines and Soluble Receptors in Breast Milk as Enhancers of Oral Tolerance Development. *Front Immunol.* 2019 Jan 22;10:16. doi:10.3389/fimmu.2019.00016.
 - 4 Kielbasa A, Gadzała-Kopciuch R, Buszewski B. Cytokines-biogenesis and their role in human breast milk and determination. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 9;22(12):6238. doi:10.3390/ijms22126238.
 - 5 Rajani PS, Seppo AE, Järvinen KM. Immunologically active components in human milk and development of atopic disease, with emphasis on food allergy, in the pediatric population. *Front Pediatr.* 2018 Aug 7;6:218. doi:10.3389/fped.2018.00218.
 - 6 Ramiro-Cortijo D, Herranz Carrillo G, Singh P, Rebollo-Hernanz M, Rodríguez-Rodríguez P, Ruvira S, Martín-Trueba M, Martín CR, Arribas SM. Maternal and neonatal factors modulating breast milk cytokines in the first month of lactation. *Antioxidants (Basel).* 2023 Apr 25;12(5):996. doi:10.3390/antiox12050996.
 - 7 Gila-Díaz A, Arribas SM, Algara A, Martín-Cabrejas MA, López de Pablo ÁL, Sáenz de Pipaón M, Ramiro-Cortijo D. A review of bioactive factors in human breastmilk: a focus on prematurity. *Nutrients.* 2019 Jun 10;11(6):1307. doi:10.3390/nu11061307.
 - 8 Duale A, Singh P, Al Khodor S. Breast milk: a meal worth having. *Front Nutr.* 2022 Jan 26;8:800927. doi:10.3389/fnut.2021.800927.
 - 9 Warner JO, Warner JA. The foetal origins of allergy and potential nutritional interventions to prevent disease. *Nutrients.* 2022 Apr 12;14(8):1590. doi:10.3390/nu14081590.
 - 10 Pajewska-Szmyt M, Sinkiewicz-Darol E, Gadzała-Kopciuch R. The impact of environmental pollution on the quality of mother's milk. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2019 Mar;26(8):7405-7427. doi:10.1007/s11356-019-04141-1.
 - 11 GOST R 53022.3-2008. Tekhnologii laboratornyye klinicheskkiye. Trebovaniya k kachestvu klinicheskikh laboratornykh issledovaniy. Chast' 3 Pravila otsenki klinicheskoy informativnosti laboratornykh testov.
 - 12 Morita Y, Campos-Alberto E, Yamaide F, Nakano T, Ohnisi H, Kawamoto M, Kawamoto N, Matsui E, Kondo N, Kohno Y, Shimajo N. TGF- β concentration in breast milk is associated with the development of eczema in infants. *Front Pediatr.* 2018 Jun 1;6:162. doi:10.3389/fped.2018.00162.
 - 13 Sitarik AR, Bobbitt KR, Havstad SL, Fujimura KE, Levin AM, Zoratti EM, Kim H, Woodcroft KJ, Wegienka G, Ownby DR, Joseph CLM, Lynch SV, Johnson CC. Breast milk transforming growth factor β is associated with neonatal gut microbial composition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017 Sep;65(3):e60-e67. doi:10.1097/MPG.0000000000001585.
 - 14 Scheurer S, Junker AC, He C, Schülke S, Toda M. The role of iga in the manifestation and prevention of allergic immune responses. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2023 Oct;23(10):589-600. doi:10.1007/s11882-023-01105-x.
 - 15 Cerutti A. The regulation of IgA class switching. *Nat Rev Immunol.* 2008 Jun;8(6):421-34. doi:10.1038/nri2322.
 - 16 Järvinen KM, Suárez-Fariñas M, Savilahti E, Sampson HA, Berin MC. Immune factors in breast milk related to infant milk allergy are independent of maternal atopy. *J Allergy Clin Immunol.* 2015 May;135(5):1390-3.e1-6. doi:10.1016/j.jaci.2014.10.051.
 - 17 Harmancıoğlu B, Kabaran S. Breast milk: its role in early development of the immune system and long-term health. *Open Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2019; 9:458-473. doi:10.4236/ojog.2019.94045.
 - 18 Orivuori L, Loss G, Roduit C, Dalphin JC, Depner M, Genuneit J, Lauener R, Pekkanen J, Pfefferle P, Riedler J, Roponen M, Weber J, von Mutius E, Braun-Fahrlander C, Vaarala O; PASTURE Study Group. Soluble immunoglobulin A in breast milk is inversely associated with atopic dermatitis at early age: the PASTURE cohort study. *Clin Exp Allergy.* 2014 Jan;44(1):102-12. doi:10.1111/cea.12199.
 - 19 Abu-Raya B, Michalski C, Sadarangani M, Lavoie PM. Maternal immunological adaptation during normal pregnancy. *Front Immunol.* 2020 Oct 7;11:575197. doi:10.3389/fimmu.2020.575197.

BREAST MILK CONCENTRATION OF IMMUNOLOGICALLY ACTIVE FACTORS IN WOMEN RESIDING IN THE WESTERN REGION OF BELARUS

N. M. Tsikhan¹, S. A. Lialikau¹, M. V. Belevtsev², U. L. Zverko³,
A. N. Kupchynskaya², V. S. Dubovik², A. K. Nikolskaya⁴

¹Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

²Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Republic of Belarus

³Grodno Regional Clinical Perinatal Center, Grodno, Republic of Belarus

⁴City Clinical Emergency Hospital of Grodno, Republic of Belarus

Background. Human milk immunological composition varies from one study to another, which is believed to be due not only to differences in design but also to the region of residence of the studied women.

Objective. To determine reference range values for the immune active factors in breast milk in 1 month and 3 months after delivery in women residing in the western region of Belarus

Materials and methods. 265 women residing in the Grodno region of Belarus were included for the prospective cohort study. IgE, sIgA and cytokines in breast milk were determined by ELISA.

Results. Human milk concentration of IL-4 ($p=0,002$), IL-6 ($p=0,0001$), TSLP ($p=0,03$), TGF β 1 ($p=0,0001$), TGF β 2 ($p=0,002$) were significantly higher while the level of IL-10 ($p=0,04$) and sIgA ($p=0,03$) were significantly lower in 1 month after delivery in comparing to 3 months postpartum. The highest concentration and the most significant dynamic among the listed cytokines were noted for TGF β isotypes.

Conclusions. For the first time, the dynamics of human milk immune factor concentration for the first months postpartum and the reference range values for IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-25, TSLP, TGF β 1, TGF β 2, IFN- γ , CCL22, CCL17, CXCL10, IgE and sIgA in 1 month and 3 months after delivery in women residing in the western region of Belarus were determined.

Keywords: human milk, cytokines, immunoglobulins, reference range.

For citation: Tsikhan NM, Lialikau SA, Belevtsev MV, Zverko UL, Kupchynskaya AN, Dubovik VS, Nikolskaya AK. Breast milk concentration of immunologically active factors in women residing in the western region of Belarus. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2024, vol. 3, no 1(4). pp. 155–162 (in Russian).

Поступила 15.04.2024

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ГИДРОКСИПРОИЗВОДНЫХ СТАНОЗОЛОЛА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ СЕМЕЙСТВА ЦИТОХРОМОВ P450 ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ДОПИНГ-КОНТРОЛЯ

Ю. С. Бакакина¹, Д. В. Бабарико¹, Т. В. Цыбрук², А. В. Свирид², М. С. Кисель²,
А. М. Тумилович², Ю. Г. Походня¹, А. А. Гилеп², В. Э. Сяхович¹

¹Учреждение здравоохранения «Национальная антидопинговая лаборатория»,
аг. Лесной, Республика Беларусь,

²Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь

Введение. Анаболический андрогенный стероид (ААС) станозолол, относящийся к группе S1 Запрещенного списка Всемирного антидопингового агентства (ВАДА), является одним из наиболее часто выявляемых ААС при допинг-контроле. В организме человека ААС метаболизируются в ходе реакций I и II фаз биотрансформации, в результате которых образуется серия метаболитов, экскретируемых с мочой. Для точного определения ААС в пробах необходимо наличие эффективной методики получения стандартов их метаболитов.

Цель исследования. Разработка метода биотехнологического получения гидроксипроизводных станозолола с использованием рекомбинантных ферментов семейства цитохромов P450 человека для допинг-контроля.

Материалы и методы. Для получения гидроксипроизводных станозолола использовали рекомбинантные ферменты CYP3A4 и CYP2B6 человека. Метаболиты станозолола определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием.

Результаты. Было показано, что для эффективного протекания гидроксирования станозолола с участием CYP3A4 достаточно стабилизации реакционной системы смесью фосфолипидов, тогда как для стабилизации каталитически активной формы CYP2B6 необходимо включение фермента в бактериальные мембраны. В результате реакций с участием ферментов CYP3A4 и CYP2B6 выявлено образование ряда гидроксипроизводных станозолола, которые представляют интерес для допинг-контроля.

Заключение. В ходе выполнения исследования разработан метод биотехнологического получения гидроксипроизводных станозолола с участием рекомбинантных ферментов CYP3A4 и CYP2B6 человека, который был использован для получения моногидроксипроизводных станозолола, в частности, основных метаболитов I фазы биотрансформации станозолола – 16β-гидрокси-, 4β-гидрокси- и 3'-гидроксистеранозолола, являющихся значимыми для допинг-контроля. Разработанный метод послужит основой для получения долгоживущих метаболитов станозолола, которые используются для подтверждения положительных результатов допинг-контроля при тестировании спортсменов.

Ключевые слова: рекомбинантные ферменты семейства цитохромов P450 человека CYP3A4 и CYP2B6, станозолол, метаболиты, жидкостная хромато-масс-спектрометрия, допинг-контроль.

Для цитирования. Биотехнологическое получение гидроксипроизводных станозолола с использованием рекомбинантных ферментов семейства цитохромов p450 человека для целей допинг-контроля / Ю. С. Бакакина [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. – 2024. – Т. 3, № 1(4). – С. 163–169.

Введение

Анаболический андрогенный стероид (ААС) станозолол (17β-гидрокси-17α-метил-5α-андростано[3,2-с]пирозол) – синтетическое производное дигидротестостерона, относится к классу S1 Запрещенного списка Всемирного антидопингового агентства (ВАДА) и является одним из наиболее часто выявляемых ААС при допинг-контроле [1, 2].

Употребление станозолола выявляется путем мониторинга его метаболитов, экскретируемых с мочой. В организме человека ААС метаболизируются

в ходе реакций фаз I и II биотрансформации, в результате которых образуется серия метаболитов. У человека основными метаболитами I фазы биотрансформации станозолола являются моногидроксированные производные – 16β-гидроксистеранозолол, 4β-гидроксистеранозолол и 3'-гидроксистеранозолол, а также соответствующие аналоги с эпимеризацией по C17-положению стероидного кольца [3].

Долгое время метаболит 3'-гидроксистеранозолол использовался в качестве целевого анализата для

долгосрочного выявления употребления станозолола с использованием различных подходов дериватизации и газовой хроматографии (ГХ) в сочетании с масс-спектрометрией низкого или высокого разрешения [3].

Современные стратегии в различных областях аналитической химии, таких как допинг-контроль и безопасность пищевых продуктов, основаны на использовании метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (МС/МС), поскольку для его проведения не требуется трудоемких этапов подготовки проб и возможно определение плохо дериватирующихся ААС. Использование ВЭЖХ-МС/МС привело к разработке быстрого и чувствительного анализа, позволяющего идентифицировать станозолол и его 16 β - и 4 β -гидроксированные метаболиты в моче человека.

Для точного определения ААС в пробах необходимо наличие эффективной методики получения стандартов их метаболитов.

Для получения стандартов метаболитов ААС используют разные подходы, такие как химический синтез, использование модельных клеточных культур для наработки метаболитов, применение рекомбинантных микроорганизмов, экспрессирующих стероид-модифицирующие ферменты, а также получение метаболитов с использованием рекомбинантных ферментов человека, участвующих в метаболизме ААС.

Предлагаемый нами подход синтеза метаболитов ААС включает получение рекомбинантных стероид-модифицирующих ферментов человека в высокоочищенном виде, их применение для проведения последовательных реакций с получением спектра метаболитов синтетических ААС и выделение в чистом виде целевых метаболитов. Комплексное применение рекомбинантных ферментов для биотрансформации ААС отличает настоящий подход от представленных в литературе.

Ферменты семейства цитохромов P450 (СYP) участвуют в I фазе биотрансформации ААС и катализируют гидроксилирование в различных положениях стероидного кольца [4]. Следовательно, использование ферментов семейства P450 является оптимальным для решения задачи биотехнологического синтеза метаболитов I фазы биотрансформации ААС.

Цель исследования – разработка метода биотехнологического получения гидроксипроизводных станозолола с использованием рекомбинантных ферментов семейства цитохромов P450 человека для допинг-контроля.

Материалы и методы

Объектом исследования являлось получение гидроксипроизводных станозолола с использова-

нием рекомбинантных ферментов семейства цитохромов P450 человека СYP3A4 и СYP2B6.

Получение стероидгидроксилаз СYP3A4 и СYP2B6 человека, НАДФН-цитохром P450 редуктазы (CPR) и микросомального цитохрома b5 (b5). Рекомбинантные препараты ферментов стероидгидроксилазы СYP3A4 человека, НАДФН-цитохром P450 редуктазы (CPR) и микросомального цитохрома b5 (b5) были получены в высокоочищенном виде (чистота >95 % по данным электрофореза в денатурирующих условиях в 12 %-ом полиакриламидном геле) согласно [5]. Препарат мембранной фракции *Escherichia coli* (*E. coli*), содержащий рекомбинантную стероидгидроксилазу СYP2B6 человека, был получен в соответствии с методикой [6].

Получение гидроксипроизводных станозолола. Реакционная смесь включала ферментативный комплекс, состоящий из стероидгидроксилазы СYP3A4 или СYP2B6, CPR и цитохрома b5 в молярном соотношении ферментов 1:2:2, 50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,4), 30 мМ хлорид магния, 200 мкг/мл смеси фосфолипидов (L- α -дилаурил-sn-глицеро-3-фосфохолина, L- α -диолеил-sn-глицеро-3-фосфохолина, L- α -фосфатидил-L-серина), 750 нг/мл холата натрия, 3 мМ восстановленный глутатион и 100 мкМ станозолол в конечном объеме 250 мкл. С целью повышения эффективности протекания ферментативной реакции (увеличения количества образующихся гидроксипроизводных станозолола) в реакционную смесь вносили НАДФН-регенерирующую систему, включающую 1,3 Ед/мл изоцитратдегидрогеназы и 15 мМ изоцитрат натрия. Реакцию запускали добавлением 10 мМ НАДФН и инкубировали в течение 60 мин при 37 °С. В качестве контроля использовали образцы, не содержащие НАДФН. Реакцию останавливали внесением 50 % ацетонитрила в воде. Эксперименты проводили в 3-х повторах для каждого образца.

Гидроксипроизводные станозолола определяли методом ВЭЖХ-МС/МС на обращенно-фазной колонке Hypersil Gold C18 (150 \times 2,1 мм, размер частиц 5 мкм, Thermo Scientific, США) с использованием сверхвысокоэффективного жидкостного хроматографа Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, США). Масс-спектрометрическую детекцию осуществляли с использованием масс-спектрометра высокого разрешения Q Exactive Plus (Thermo Scientific, США). В качестве внутреннего стандарта использовали метилтестостерон. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения XCalibur (Thermo Scientific, США). Для идентификации образовавшихся метаболитов был проведен анализ их МС/МС-спектров на наличие характеристических дочерних ионов.

Результаты и их обсуждение

В настоящей работе нами предложен вариант биотрансформации ААС на примере станозолола, включающий получение рекомбинантных ферментов стероидгидроксилаз СYP3A4 и СYP2В6 человека и их последующее использование для наработки спектра метаболитов станозолола.

Функционирование мембранных белков вне их естественной мембранной среды может дестабилизировать эти белки и/или изменить их свойства [7]. Для создания условий, аналогичных таковым в клетке, используются несколько подходов. В частности, получило распространение применение фосфолипидов для образования мицелл, включение белков в липосомальные частицы или бактериальные мембраны (бактосомы).

Ранее нами было показано, что для эффективного протекания реакции гидроксилирования ААС с участием СYP3A4 достаточно стабилизации реакционной системы смесью фосфолипидов [5].

Подобранные условия использовали для получения гидроксипроизводных станозолола.

В результате проведения реакции гидроксилирования станозолола с участием ферментативной системы СYP3A4 выявлено образование пяти моногидроксилированных метаболитов, а также незначительная примесь дигидроксилированных форм. Для установления структуры ААС и определения сайтов гидроксилирования был проведен МС/МС-анализ метаболитов. Подтверждение наличия гидроксилирования и его локализации осуществлялось на основе дочерних ионов МС/МС-анализа стандартов метаболитов станозолола (3'-гидрокси-, 4 α -гидрокси-, 4 β -гидрокси- и 16 β -гидроксистанозолола).

На рисунке 1 приведены хроматограммы разделения и МС/МС-спектры моногидроксипроизводных станозолола, полученных в результате реакции, катализируемой рекомбинантной СYP3A4 человека. Как видно из представленных данных,

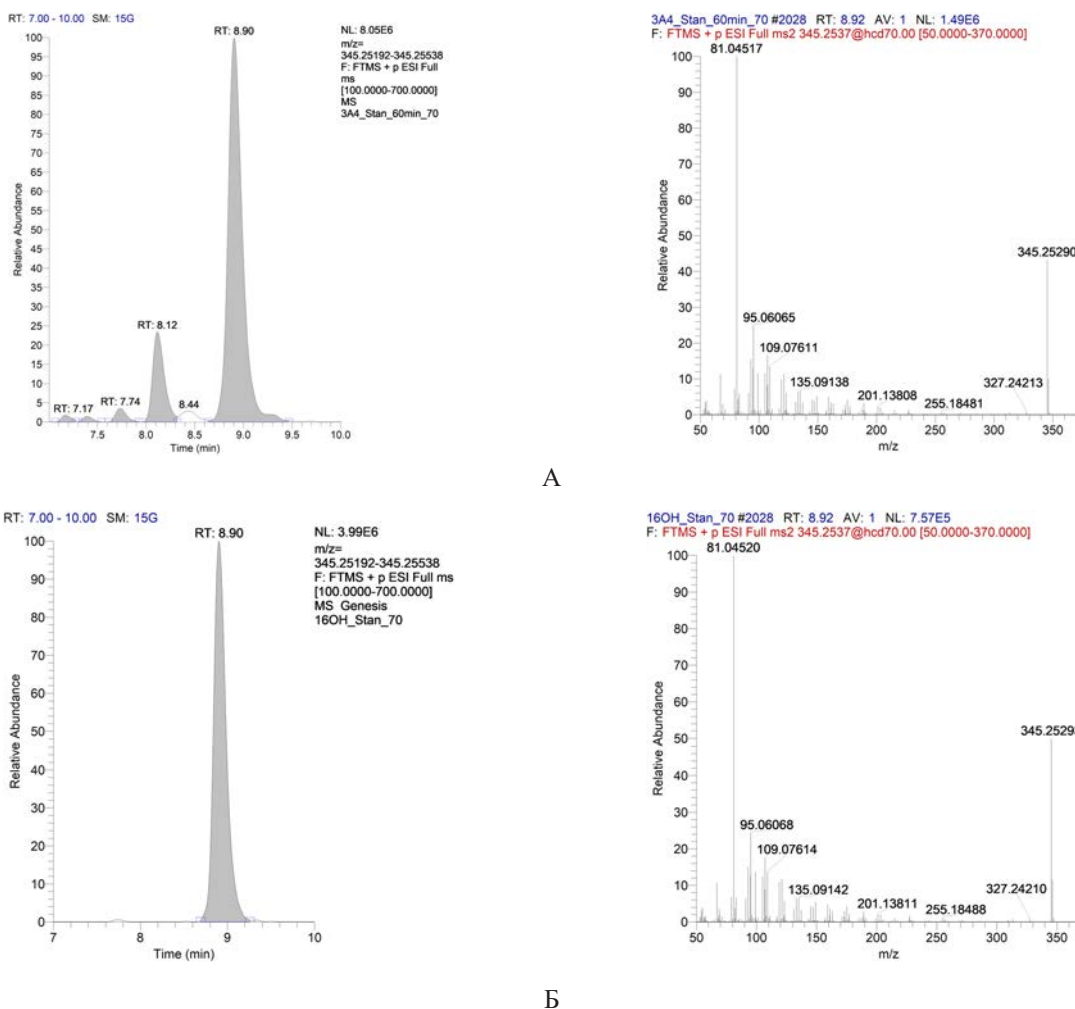


Рисунок 1 – Хроматограммы разделения и МС/МС-спектры моногидроксипроизводных станозолола, полученных при протекании реакции с участием рекомбинантной СYP3A4 человека (А) и стандарта 16 β -гидроксистанозолола (время удерживания 8,9 мин) (Б)

Figure 1 – Chromatograms and MS/MS spectra of stanozolol monohydroxyderivatives produced by human recombinant CYP3A4 (A) and 16 β -hydroxystanozolol standard (retention time 8,9 min) (B)

CYP3A4 катализирует гидроксилирование станозолола с образованием 16 β -гидроксистеранозолола (время удерживания 8,9 мин) в качестве основного метаболита. Продемонстрировано точное совпадение времени удерживания стандарта 16 β -гидроксистеранозолола и основного метаболита станозолола, полученного в результате проведения реакции.

На следующем этапе работы были подобраны условия для стабильной работы рекомбинантной стероидгидроксилазы CYP2B6 человека.

В данной работе использование мембранной фракции (бактосом) *E. coli*, содержащей рекомбинантный фермент CYP2B6, вместо двухстадийной очистки белка методами колоночной хроматографии, что позволило в значительной степени увеличить содержание целевого белка в препарате, а также стабилизировать каталитически активную форму фермента. Кроме того, был проведен ряд молекулярно-генетических модификаций с целью увеличения уровня гетерологической экспрессии и снижения степени агрегации CYP2B6 [8, 9].

Было установлено, что реакция гидроксилирования с участием CYP2B6 эффективно протекает при включении фермента в мембрану бактосом.

На рисунке 2 представлена хроматограмма разделения моногидроксипроизводных станозолола,

полученных в реакции, катализируемой рекомбинантной CYP2B6 человека. В результате проведения реакции выявлено образование четырех моногидроксильированных метаболитов станозолола, а также незначительная примесь дигидроксильированных форм.

Было установлено, что полученные в результате реакции метаболиты станозолола с временами удерживания 8,6 мин, 8,7 мин и 9,2 мин совпадают с временем удерживания стандартов 3'-гидрокси-, 4 α -гидрокси- и 4 β -гидроксистеранозолола соответственно (рисунок 3). Основным метаболитом станозолола (время удерживания 8,4 мин), образовавшийся в результате реакции не совпадает по времени выхода с используемыми стандартами метаболитов станозолола. Результаты МС/МС-анализа данного метаболита не дают однозначной картины его структуры.

Следует отметить, что гидроксипроизводные станозолола далее метаболизируются в организме в ходе реакций фазы II биотрансформации, которые включают конъюгацию с глюкуроновой кислотой и сульфатирование.

В исследованиях по экскреции станозолола с мочой после однократного приема было показано, например, что 16 β -гидроксистеранозолол-16 β -сульфат и 3'-гидроксистеранозолол глюкуронид обнаруживаются

в течение 10 дней. Долгоживущий метаболит станозолола – 17-эпистеранозолол-N-глюкуронид, выявлялся в моче в течение 28 дней [3].

Таким образом, настоящие исследования являются частью комплексной научно-практической работы по получению долгоживущих метаболитов станозолола, которые представляют интерес для допинг-контроля, под действием как ферментов I фазы (стероидгидроксилаз и гидроксистероиддегидрогеназ), так и ферментов II фазы (сульфотрансфераз и глюкуронозилтрансфераз) биотрансформации ААС.

Заключение

В результате выполнения исследования разработан метод биотехнологического получения гидроксипроизводных станозолола с участием рекомбинантных ферментов CYP3A4 и CYP2B6 человека, который был использо-

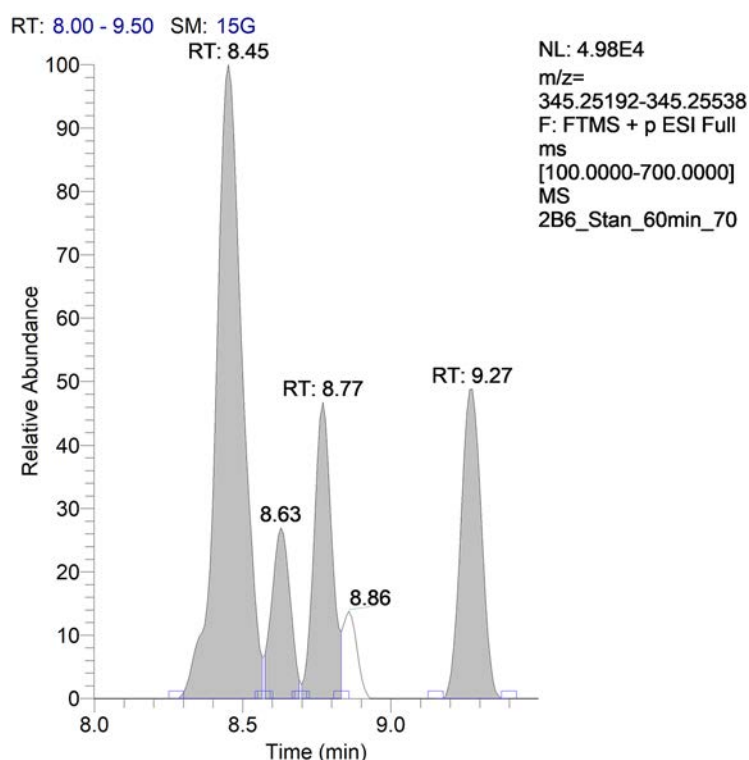


Рисунок 2 – Хроматограмма разделения моногидроксипроизводных станозолола, полученных при протекании реакции с участием рекомбинантной CYP2B6 человека

Figure 2 – Chromatogram of stanozolol monohydroxyderivatives produced by human recombinant CYP2B6

ван для получения моногидроксипроизводных станозолола, в частности, основных метаболитов I фазы биотрансформации станозолола – 16 β -гидрокси-, 4 β -гидрокси- и 3'-гидроксистеранозолола, являющихся значимыми для допинг-контроля.

Разработанный метод послужит основой для получения долгоживущих метаболитов станозолола, которые используются для подтверждения положительных результатов допинг-контроля при тестировании спортсменов.

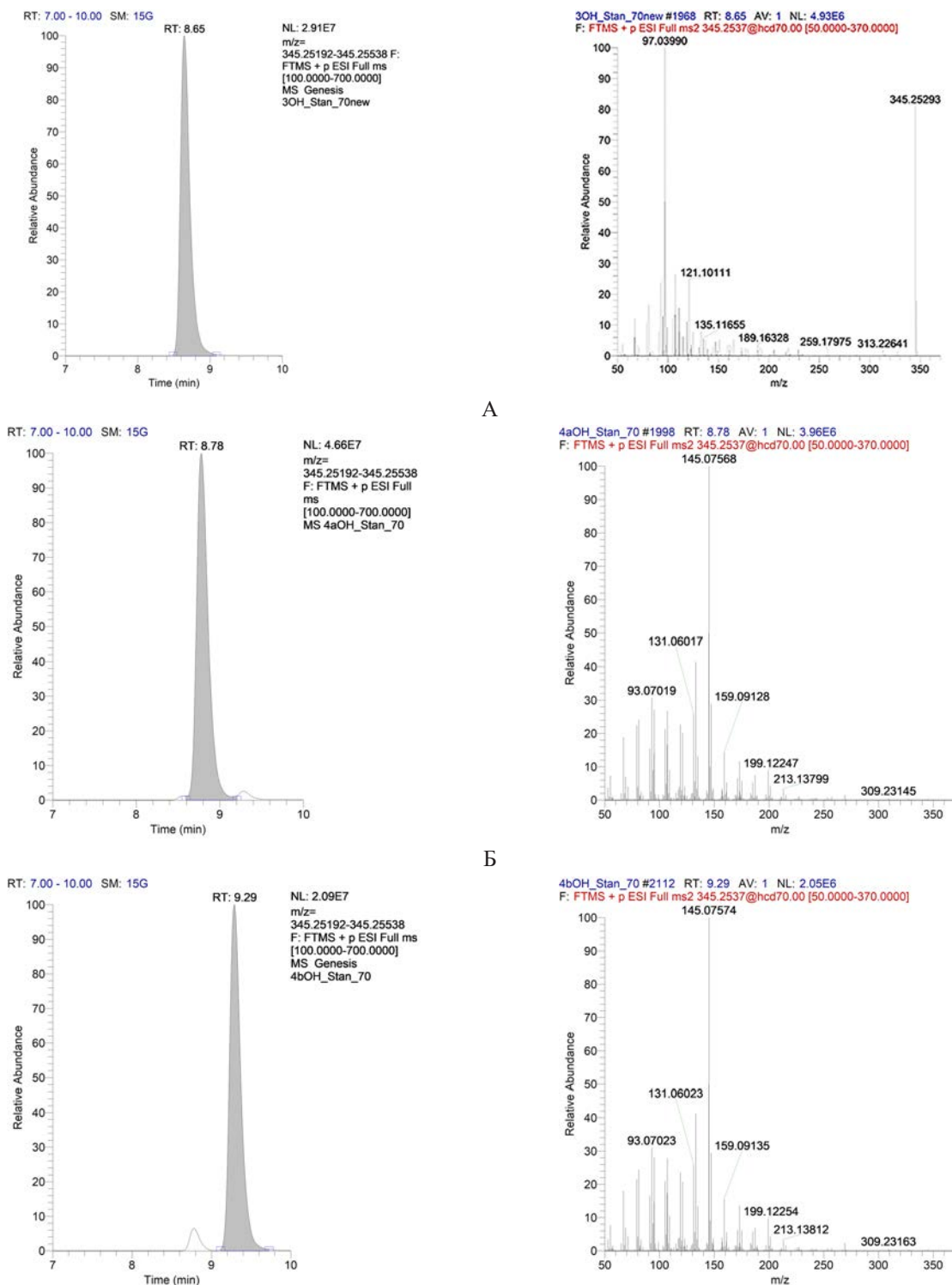


Рисунок 3 – Хроматограммы разделения и МС/МС-спектры стандартов 3'-гидроксистеранозолола (А), 4 α -гидроксистеранозолола (Б), 4 β -гидроксистеранозолола (В)

Figure 3 – Chromatograms and MS/MS spectra of standards of 3'-hydroxysteranazolol (A), 4 α -hydroxysteranazolol (B), 4 β -hydroxysteranazolol (C)

Список цитированных источников

1. World Anti-Doping Agency. The 2024 prohibited list [Electronic resource]. – Mode of access: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2023-09/2024list_en_final_22_september_2023.pdf – Date of access: 04.04.2024.
2. Thevis, M. H. Annual banned-substance review 16th edition – analytical approaches in human sports drug testing 2022/2023 / M. Thevis, T. Kuuranne, H. Geyer // *Drug Test. Anal.* – 2024. – Vol. 16, № 1. – P. 5–29.
3. Expanding analytical possibilities concerning the detection of stanozolol misuse by means of high resolution/high accuracy mass spectrometric detection of stanozolol glucuronides in human sports drug testing / W. Schänzer [et al.] // *Drug Testing Analysis.* – 2013. – Vol. 5. – P. 34–37.
4. Schiffer, L. Intracrine androgen biosynthesis, metabolism and action revisited / L. Schiffer, W. Arlt, K. H. Storbeck // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2018. – Vol. 465. – P. 4–26.
5. Получение 6 β -гидроксипроизводных анаболических стероидов с использованием рекомбинантной ферментативной системы CYP3A4 человека для целей допинг-контроля / Ю. С. Бакакина [и др.] // *БГМУ – в авангарде медицинской науки и практики.* – 2022. – Т. 2. – С. 235–243.
6. Evaluation of *Escherichia coli* membrane preparations of canine CYP1A1, 2B11, 2C21, 2C41, 2D15, 3A12, and 3A26 with coexpressed canine cytochrome P450 reductase / C. W. Locuson [et al.] // *Drug Metab. Dispos.* – 2009. – Vol. 37, № 3. – P. 457–461.
7. Errasti-Murugarren, E. Membrane protein stabilization strategies for structural and functional studies / E. Errasti-Murugarren, P. Bartoccioni, M. Palacín // *Membranes.* – 2021. – Vol. 11, № 2. – Article number: 155.
8. Hausjell, J. Recombinant production of eukaryotic cytochrome P450s in microbial cell factories / J. Hausjell, H. Halbwrith, O. Spadiut // *Biosci. Rep.* – 2018. – Vol. 38, № 2. – P. 1–13.
9. Crystal structure of a cytochrome P450 2B6 genetic variant in complex with the inhibitor 4-(4-chlorophenyl)imidazole at 2.0-Å resolution / S. C. Gay [et al.] // *Mol. Pharmacol.* – 2010. – Vol. 77, № 4. – P. 529–538.
10. [ama.org/sites/default/files/2023-09/2024list_en_final_22_september_2023.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2023-09/2024list_en_final_22_september_2023.pdf) – Date of access: 04.04.2024.
11. Thevis M, Kuuranne T, Geyer H. Annual banned-substance review 16th edition - analytical approaches in human sports drug testing 2022/2023. *Drug Test. Anal.* 2024 Jan; 16(1):5-29. doi:10.1002/dta.3602.
12. Schänzer W, Guddat S, Thomas A, Opfermann G, Geyer H, Thevis M. Expanding analytical possibilities concerning the detection of stanozolol misuse by means of high resolution/high accuracy mass spectrometric detection of stanozolol glucuronides in human sports drug testing. *Drug Test. Anal.* 2013 Nov-Dec; 5(11-12):810-8. doi:10.1002/dta.1516.
13. Schiffer L, Arlt W, Storbeck KH. Intracrine androgen biosynthesis, metabolism and action revisited. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2018 Apr 15; 465:4–26. doi:10.1016/j.mce.2017.08.016.
14. Bakakina YS, Babaryko DV, Efimovich DD, Shkel TV, Svirid AV, Kisel MS, Pakhadnia YG, Gilep AA, Syakhovich VE. Preparation of 6 β -hydroxy derivatives of anabolic steroids using human recombinant CYP3A4 enzyme system for doping control purposes. *BSMU – at the forefront of medical science and practice.* 2022; 2:235-43.
15. Locuson CW, Ethell BT, Voice M, Lee D, Feenstra KL. Evaluation of *Escherichia coli* membrane preparations of canine CYP1A1, 2B11, 2C21, 2C41, 2D15, 3A12, and 3A26 with coexpressed canine cytochrome P450 reductase. *Drug Metab. Dispos.* 2009 Mar; 37(3):457-61. doi:10.1124/dmd.108.025312.
16. Errasti-Murugarren E, Bartoccioni P, Palacín M. Membrane protein stabilization strategies for structural and functional studies. *Membranes.* 2021 Feb 22; 11(2):155. doi:10.3390/membranes11020155.
17. Hausjell J, Halbwrith H, Spadiut O. Recombinant production of eukaryotic cytochrome P450s in microbial cell factories. *Bioscience Rep.* 2018 Mar 5; 38(2):BSR20171290. doi:10.1042/BSR20171290.
18. Gay SC, Shah MB, Talakad JC, Maekawa K, Roberts AG, Wilderman PR, Sun L, Yang JY, Huelga SC, Hong WX, Zhang Q, Stout CD, Halpert JR. Crystal structure of a cytochrome P450 2B6 genetic variant in complex with the inhibitor 4-(4-chlorophenyl)imidazole at 2.0-Å resolution. *Mol. Pharmacol.* 2010 Apr; 77(4):529-38. doi:10.1124/mol.109.062570.

References

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF HYDROXYDERIVATIVES OF STANOZOLOL USING HUMAN RECOMBINANT CYTOCHROME P450 ENZYMES FOR DOPING CONTROL PURPOSES

Y. S. Bakakina¹, D. V. Babaryko¹, T. V. Tsybruk², A. V. Svirid², M. S. Kisel²,
A. M. Tumilovich², Y. G. Pokhodnya¹, A. A. Gilep², V. E. Syakhovich¹

¹National Anti-Doping Laboratory, Lesnoy, Republic of Belarus

²The State Scientific Institution «The Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus», Minsk, Republic of Belarus

Background. The anabolic androgenic steroid (AAS) stanozolol, which belongs to group S1 of the World Anti-Doping Agency (WADA) Prohibited List, is one of the most frequently detected AAS in doping controls. In the human body, AAS are metabolized during phase I and II biotransformation reactions, which result in a series of metabolites excreted in the urine. For accurate determination of AAS in samples, an effective method for production of metabolite standards is necessary.

Objective. The purpose of the study was to develop a method for the biotechnological production of stanozolol hydroxyderivatives using human recombinant cytochrome P450 enzymes for doping control.

Materials and methods. The human recombinant enzymes CYP3A4 and CYP2B6 were used to obtain hydroxyderivatives of stanozolol. Metabolites of stanozolol was determined using high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry detection.

Results. It was shown that for the efficient stanozolol hydroxylation using CYP3A4, it is sufficient to stabilize the reaction system with a mixture of phospholipids. Whereas, in order to stabilize the catalytically active form of CYP2B6, the inclusion of the enzyme in bacterial membranes is necessary. As a result of the reactions using cytochrome P450 enzymes CYP3A4 and CYP2B6, a number of stanozolol hydroxyderivatives was produced, that are of interest for doping control.

Conclusions. A method for the biotechnological production of stanozolol hydroxyderivatives using human recombinant enzymes CYP3A4 and CYP2B6 was developed, which was used to produce monohydroxyderivatives of stanozolol, in particular, main metabolites of phase I biotransformation of stanozolol – 16 β -hydroxy-, 4 β -hydroxy- and 3'-hydroxystanozolol, that are significant for doping control. The developed method will serve as the basis for production of long-term stanozolol metabolites, which are used to confirm positive test results of sportsmen.

Keywords: human recombinant cytochrome P450 enzymes CYP3A4 and CYP2B6, stanozolol, metabolites, liquid chromatography-mass spectrometry, doping control.

For citation: Bakakina YS, Babaryko DV, Tsybruk TV, Svirid AV, Kisel MS, Tumilovich AM, Pokhodnya YG, Gilep AA, Syakhovich VE. Biotechnological production of hydroxyderivatives of stanozolol using human recombinant cytochrome p450 enzymes for doping control purposes *Biochemistry and Molecular Biology*. 2024, vol. 3, no 1(4). pp. 163–169 (in Russian).

Поступила 15.04.2024

МОЛЕКУЛЯРНО-МЕМБРАННЫЕ ОСОБЕННОСТИ *IN VITRO* ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛЕКТИНОВ, СПЕЦИФИЧНЫХ К ФУКОЗЕ И СИАЛОВОЙ КИСЛОТЕ, С ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ КРОВИ

А. В. Тамашевский¹, Ю. М. Гармаза¹, Д. С. Мигун²

¹Республиканский научно-практический центр трансфузиологии
и медицинских биотехнологий, г. Минск, Республика Беларусь

²Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

Введение. Известно, что аберрантное гликозилирование, характерное в большей степени для опухолевых клеток, способствует проявлению ряда аномальных событий. В частности, при прогрессировании опухолевого процесса наблюдается сиалирование или фукозилирование белков и липидов клеточных мембран. Таким образом, при детальном изучении механизмов, участвующих в данных процессах, возможна разработка более эффективных подходов к лечению онкологических заболеваний с использованием агентов, нацеленных на эти мишени.

Цель работы. Исследовать молекулярно-мембранные особенности взаимодействия лектинов, специфичных к фукозе (Tulipa) и сиаловой кислоте (WGA), с опухолевыми клеточными линиями человека IM-9 и MOLT-4.

Материалы и методы исследования. В работе использованы Т- и В-лимфобластоидные клеточные линии MOLT-4 и IM-9, а также периферические мононуклеарные клетки крови доноров. Редокс-баланс в клетках оценивали по содержанию низкомолекулярных антиоксидантов, их жизнеспособность – с помощью МТТ-теста. Микровязкость липидного бислоя клеточных мембран изучали с помощью липофильного флуоресцентного зонда лаурдан.

Результаты и выводы. Установлено, что отдельное применение лектина WGA, специфичного к сиаловой кислоте, способно снижать выживаемость опухолевых В- и Т- лимфобластов, не затрагивая при этом здоровые клетки, но лишь в определенном диапазоне концентраций. Продемонстрирована ключевая роль окислительно-восстановительного баланса и модификации мембранных липидов в механизме развития процессов апоптоза в клетках IM9/MOLT-4 при их взаимодействии с исследуемыми лектинами.

Ключевые слова: лектины, специфичные к фукозе и сиаловой кислоте, опухолевые Т- и В-лимфобласты, окислительно-восстановительный баланс, липидный бислой мембраны/

Для цитирования. Молекулярно-мембранные особенности *in vitro* взаимодействия лектинов, специфичных к фукозе и сиаловой кислоте, с опухолевыми клетками крови / А. В. Тамашевский // Биохимия и молекулярная биология. – 2024. – Т. 3, № 1(4). – С. 170–177.

Введение

Известно, что аберрантное гликозилирование чаще происходит в раковых клетках, чем в нормальных. При этом считается, что именно этот процесс является ключевым в трансформации здоровых клеток в опухолевые. Так, процесс гликозилирования маскирует некоторые рецепторные системы клеток, и они перестают отвечать на внешние сигналы, в частности, на сигналы, индуцирующие процессы апоптоза (программируемой клеточной гибели). В результате чего клетка теряет способность к гибели и перерождается в “бессмертную” (раковую) [1, 2]. Такими типичными углеводными изменениями, которые отличают опухолевые клетки от нормальных, являются процессы фукозилирования или сиализации опухолевых клеток [3, 4]. В некоторых случаях происходит также плотное маннозилирование [2]. Эти изменения позволяют “различать” патологические и нор-

мальные клетки, а также открывают новые перспективы для диагностики и селективной терапии [5, 6]. В этом плане одним из перспективных направлений является использование лектинов – гликопротеинов природного происхождения, обладающих способностью высокоспецифично связывать остатки углеводов на поверхности клеток, в частности, вызывая их агглютинацию. Они могут вызывать агглютинацию эритроцитов, а также обладают избирательной митогенной активностью в отношении различных субпопуляций клеток крови [7, 8].

В настоящее время выделены и охарактеризованы многие лектины с различными свойствами [8]. Очевидно, что лектины со специфичностью к фукозе и сиаловым кислотам могут рассматриваться в качестве селективных систем доставки лекарственных средств к опухолевым клеткам. Более того, некоторые лектины, сами по себе облада-

ют антинеопластическими свойствами и способны индуцировать апоптоз в опухолевых клетках [9, 10]. Одним из основных преимуществ использования лектинов в качестве апоптоз-индуцирующих факторов при терапии опухолей является их способность активировать внутренние механизмы клетки, приводящие ее к естественной гибели. Такой подход позволяет избежать мобилизации опухолевыми клетками детоксикационных защитных механизмов, приводящих впоследствии к развитию феномена множественной лекарственной резистентности [9, 10].

Цель работы – исследовать молекулярно-мембранные особенности взаимодействия лектинов, специфичных к фукозе и сиаловой кислоте, с опухолевыми клеточными линиями человека IM-9 и MOLT-4.

Материалы и методы

В работе использована периферическая кровь практически здоровых доноров (получены информированные согласия на взятие крови от доноров для научных исследований) ГУ “Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий” МЗ РБ. В работе использована коммерческая В-лимфобластоидная клеточная линия IM-9 (ATCC CCL 159), полученная от пациентки с множественной В-миеломой и Т-лимфобластоидная клеточная линия MOLT-4 (ATCC CRL 1582), полученная от пациента с острым Т-лимфобластным лейкозом.

Периферические мононуклеарные клетки крови человека (ПМНК) изолировали в градиенте плотности гистопака-1077 путем центрифугирования крови ($300 \times g$, 30 мин) и последовательных отмывок в изотоническом NaCl (155 мМ). После выделения ПМНК помещали в коммерческую питательную среду RPMI-1640 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и 2 мМ L-глутамин. Клеточные линии и ПМНК инкубировали в увлажненной атмосфере с 5%-ым содержанием CO₂ при температуре 37 °C в течение 24 ч с различными концентрациями лектинов, а затем использовали согласно экспериментальным протоколам исследования.

В качестве лектина, специфичного к фукозе, был использован лектин, выделенный из лукович тюльпана (*Tulipa*). Он проявляет сложную специфичность, тогда как его агглютинация с человеческими эритроцитами легко ингибируется N-ацетилгалактозамином, лактозой, фукозой и галактозой [11]. В качестве лектина, специфичного к сиаловой кислоте, был использован лектин, выделенный из семян пшеницы *Triticum vulgare*, также известный как агглютинин зародышей пшени-

цы (WGA). Он специфически связывается с N-ацетил-D-глюкозамином и, как было показано, способен взаимодействовать с остатками сиаловой кислоты [10]. Лектины были использованы в диапазоне концентраций от 0,1 до 100 мкг/мл.

Чувствительность ПМНК и клеточных линий к лектинам определяли с помощью 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромида (МТТ-тест [12]). Измерение оптической плотности проводили на планшетном спектрометре Sunrise (Tecan) при $\lambda=570$ нм. МТТ-тест позволяет проводить сравнительную оценку метаболической (дегидрогеназной) активности митохондрий, степень которой коррелирует с жизнеспособностью клеток.

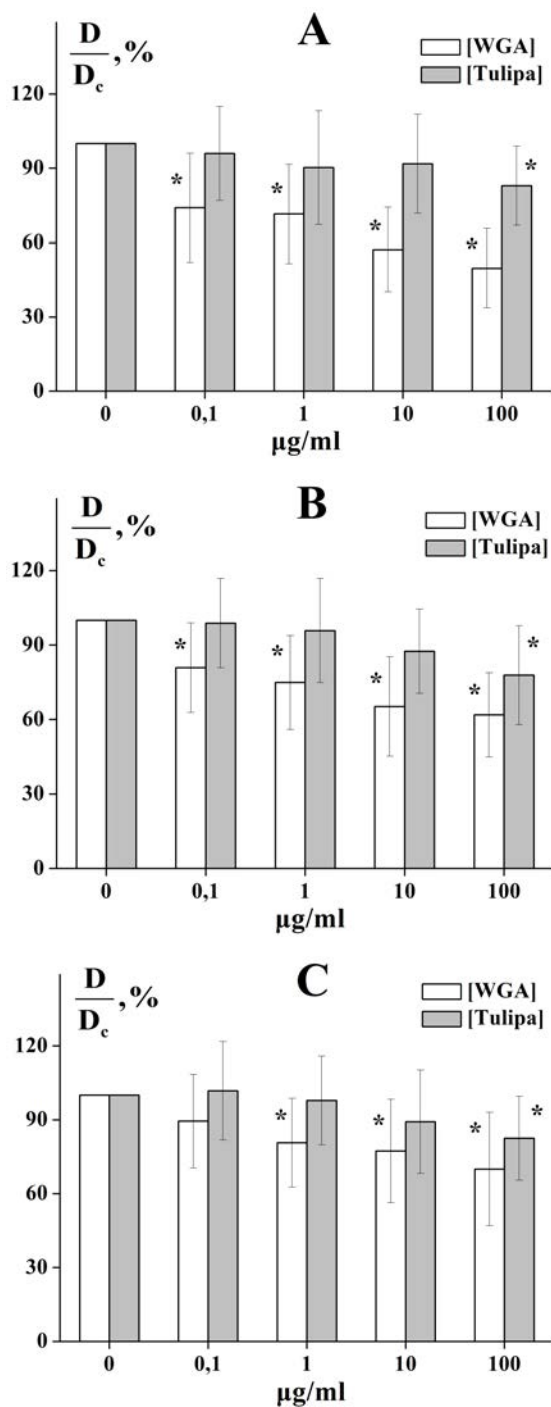
Количественное определение содержания низкомолекулярных антиоксидантов (АО) в ПМНК и клеточных линиях проводили с использованием метода, основанного на модельной системе “миоглобин – пероксид водорода – (2,2’-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфо)кислоты)диаммониевая соль (АБТС) – тролокс” [13]. Исследовали лизаты ПМНК или клеточных линий до и после воздействия на них лектинов. Измерение оптической плотности проводили на планшетном спектрометре Sunrise (Tecan) при $\lambda = 405$ нм. Содержание АО определяли по эквиваленту концентрации тролокса (водорастворимого аналога витамина Е) согласно уравнению, полученному из линейной регрессии калибровочной кривой.

Для оценки модификации микровязкости липидного бислоя мембран ПМНК и клеточных линий в работе был использован липофильный флуоресцентный зонд 6-додеканол-2-диметиламинонафтален (лаурдан). Интенсивность флуоресценции лаурдана измеряли с помощью спектрофлуориметра CM2203 (Solar) при $\lambda_{\text{пер}} = 440$ нм и 490 нм ($\lambda_{\text{возб}} = 350$ нм). Генерализованную поляризацию (GP) лаурдана рассчитывали по формуле, предложенной в работе [14]. Величина GP позволяет судить о микровязкости гидрофобной области внешнего липидного монослоя.

Результаты экспериментов ($n = 4-6$) анализировали методом вариационной статистики с использованием непараметрического критерия Уилкоксона в программе STATISTICA 8.0. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Как видно из рисунков 1А и 1В, инкубация опухолевых клеточных линий IM-9 (В-лимфобластов) и MOLT-4 (Т-лимфобластов) с лектином WGA на всем исследуемом диапазоне концентраций приводит к статистически достоверному снижению их жизнеспособности в среднем на 25–50 % для IM-9



Величина средней оптической плотности клеток с МТТ в отсутствие лектинов принята за 100% (D_c – контроль); * – различия по сравнению с контролем достоверны ($p < 0,05$)

Рисунок 1 – Относительная оптическая плотность МТТ в клетках IM-9 (A), MOLT-4 (B) и ПМНК доноров (C) после воздействия лектинов WGA и Tulipa в различных концентрациях.

The value of the average optical density of cells with MTT in the absence of lectins was taken as 100% (D_c – control); * – differences compared to control are significant ($p < 0.05$)

Figure 1 – Relative optical density of MTT in cell lines IM-9 (A), MOLT-4 (B) and donor's PBMCs (C) after exposure to WGA and Tulipa lectins at various concentrations

и на 20–40 % для MOLT-4 клеток относительно контроля. В то же время воздействие лектина Tulipa в исследуемом диапазоне концентраций приводит к снижению жизнеспособности клеточных линий в среднем на 20–25 % по сравнению с контролем, но лишь на последней исследуемой концентрации.

Используя суммарную популяцию лимфоцитов доноров в качестве “модельной системы здоровых клеток”, показано, что их экспозиция с лектином Tulipa в тестируемом диапазоне концентраций приводит к статистически значимому снижению жизнеспособности клеток в среднем на 20 % лишь при концентрации 100 мкг/мл (рисунок 1С). В то же время воздействие лектина WGA в концентрациях 1–100 мкг/мл на ПМНК человека приводит к статистически значимому снижению их жизнеспособности в среднем на 20–30 % по сравнению с контролем.

Таким образом, лектин WGA проявляет максимальную цитотоксичность в отношении клеточной линии IM-9 и минимальную – в отношении суммарной популяции лимфоцитов доноров, а лектин Tulipa снижает жизнеспособность исследуемых клеток лишь в концентрации 100 мкг/мл, причем в равной степени, независимо от их типа.

Стоит отметить, что митохондриальная дисфункция приводит к гибели клеток и была идентифицирована как основной фокусирующий элемент апоптотических сигнальных каскадов [15]. Таким образом, МТТ-тест, как метод для оценки метаболической активности митохондрий в определенной степени может свидетельствовать также о процентном содержании апоптотических клеток в суспензии.

Ранее было показано, что маннозо-специфичный лектин ConA из *Conavalin brasiliensis* L. также способен запускать процессы апоптоза в лейкозных клетках человека MOLT-4 и HL-60, проявляя наименьшую цитотоксичность по отношению к лимфоцитам периферической крови здорового человека [16]. Этот результат хорошо коррелирует с полученными нами данными по воздействию лектина WGA на клетки IM-9 и MOLT-4.

С целью исследования молекулярно-мембранных клеточных процессов, являющихся элементами сигнальных каскадов, способных привести клетку к апоптозу, нами было определено содержание низкомолекулярных антиоксидантов в цитозоле клеток, а также исследована модификация липидного бислоя клеточной мембраны до и после взаимодействия с лектинами.

Известно, что ферментативные (каталаза, глутатионпероксидаза, супероксиддисмутаза и др.) и низкомолекулярные антиоксиданты (α -токофе-

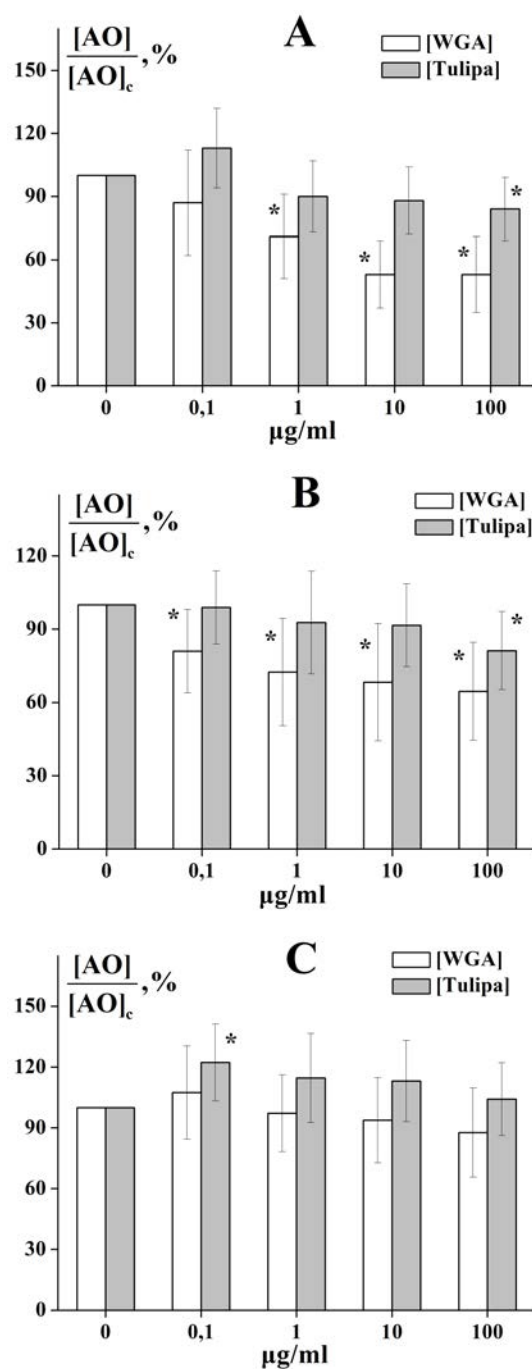
рол, аскорбиновая кислота, мочевая кислота, глутатион, билирубин, флавоноиды и т. п.) формируют разветвленную сеть внеклеточных и внутриклеточных антиоксидантов, изучение которых необходимо для оценки редокс-состояния на клеточном уровне. Однако, большое их количество в цитозоле клетки создает определенные трудности в изучении каждого антиоксиданта в отдельности. По этой причине в последнее время используют самые разнообразные методы оценки общей антиоксидантной активности биологических жидкостей и клеточных лизатов *in vitro*. Одним из наиболее показательных считается метод, основанный на модельной системе “метмиоглобин- H_2O_2 -АБ-ТС-тролокс” [13].

Воздействие лектина WGA в диапазоне концентраций 1–100 мкг/мл на В-лимфоциты приводит к статистически достоверному снижению содержания АО в среднем на 30–50 % по сравнению с контролем (рисунок 2А), что указывает на сдвиг окислительно-восстановительного баланса в клеточной линии IM-9 в сторону “окислителей”, т.е. в клетках происходит накопление активных форм кислорода (АФК). Похожая тенденция наблюдается и в клеточной линии MOLT-4 после воздействия WGA (рисунок 2В), причем на всем исследуемом диапазоне концентраций, но в меньшей степени (20–35%). В то же время воздействие лектина Tulipa также приводит к снижению содержания АО в исследуемых клеточных линиях в среднем на 15–20%, но лишь в концентрации 100 мкг/мл (рисунок 2А, 2В).

На содержание АО в ПМНК человека лектин WGA во всем исследуемом диапазоне концентраций влияния не оказывал. Однако лектин Tulipa в концентрации 0,1 мкг/мл приводил к увеличению содержания АО в ПМНК в среднем на 20% по сравнению с контролем (рисунок 2 С), что указывает на смещение редокс-статуса клеток в сторону “восстановителей”.

Таким образом, максимальное смещение окислительно-восстановительного баланса в сторону “окислителей” наблюдалось после воздействия лектина WGA в клеточной линии IM-9, а минимальное – в суммарной популяции лимфоцитов условно здоровых доноров. В то же время, воздействие лектина Tulipa лишь в концентрации 100 мкг/мл приводило к накоплению АФК в клеточных линиях, причем в равной степени, независимо от их типа.

Как известно, липиды в биологических мембранах выполняют различные функции: обеспечивают структурную организацию и стабильность клеточных мембран, выполняют барьерную и транспортную функции, а также участвуют

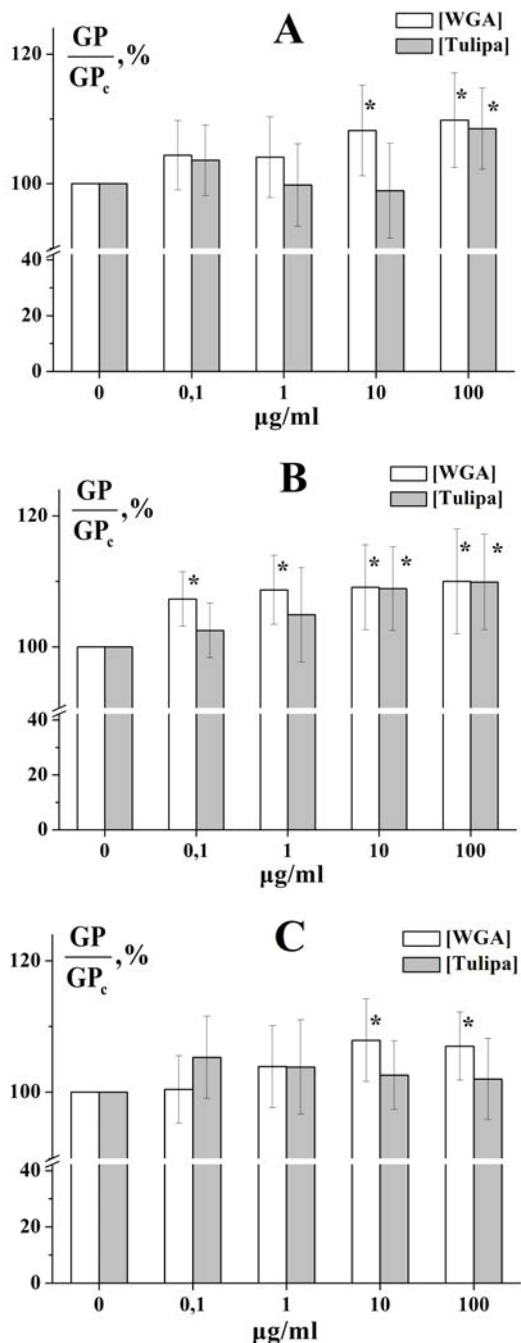


Среднее содержание низкомолекулярных антиоксидантов в клетках в отсутствие лектинов в среде инкубации принято за 100 % (AO_c – контроль); * – различия по сравнению с контролем достоверны ($p < 0,05$)

Рисунок 2 – Относительное содержание низкомолекулярных антиоксидантов в клеточной линии IM-9 (А), MOLT-4 (В) и ПМНК доноров (С) после воздействия лектинов WGA и Tulipa в различных концентрациях

*The average content of low molecular weight antioxidants in cells in the absence of lectins in the incubation medium is taken as 100 % (AO_c – control); * – differences compared to control are significant ($p < 0.05$)*

Figure 2 – Relative content of low molecular weight antioxidants in the cell line IM-9 (A), MOLT-4 (B) and donor’s PBMCs (C) after exposure to WGA and Tulipa lectins at various concentrations



Значение генерализованной поляризации лаурдана, встроенного в клеточные мембраны, в отсутствие лектинов в среде инкубации клеток принято за 100 % (GP_c – контроль); * – различия по сравнению с контролем достоверны ($p < 0,05$)

Рисунок 3 – Относительные значения генерализованной поляризации лаурдана, встроенного в мембраны клеток IM-9 (A), MOLT-4 (B) и ПМНК (C), в зависимости от концентрации лектинов WGA и Tulipa в среде инкубации

The value of generalized polarization of laurdan incorporated into cell membranes under lectins absence in the incubation medium is taken as 100 % (GP_c – control);

* – differences compared to control are significant ($p < 0.05$)

Figure 3 – Relative values of generalized polarization of laurdan incorporated into cell membranes of IM-9 (A), MOLT-4 (B) and PMNCs (C), depending on the concentration of WGA and Tulipa lectins in the incubation medium

в передаче информации и регулировании метаболических процессов в клетке (в том числе и апоптотических процессов, т.н. внешнего пути апоптоза с участием рецепторов семейства фактора некроза опухоли). Поэтому в следующей части работы была проведена оценка физического состояния липидов в мембранах исследуемых клеток при действии на них лектинов WGA и Tulipa *in vitro*.

Как видно из рисунка 3А, при взаимодействии В-лимфобластной клеточной линии IM-9 с лектином WGA значения GP лаурдана, встроенного в их мембрану, концентрационно-зависимо увеличивались в среднем до 5–18 % по сравнению со значением GP, характерного для интактных клеток. При взаимодействии IM-9 клеток с лектином Tulipa в концентрации 100 мкг/мл значения GP лаурдана статистически достоверно увеличивались в среднем на 7–10 %. Это свидетельствует об увеличении микровязкости липидов в гидрофобной части внешнего липидного монослоя В-лимфоцитов.

В то же время воздействие, лектинов WGA и Tulipa на Т-лимфобластную клеточную линию MOLT-4, сопровождалось увеличением микровязкости липидного бислоя в среднем до 20 % с достоверным отличием на концентрациях лектинов – 10 и 100 мкг/мл (рисунок 3В). Причем для лектина WGA статистические значимые отличия по сравнению с контролем наблюдались также и для концентраций 0,1 и 1,0 мкг/мл (в среднем на 5–10%), что указывает на снижение молекулярной динамики фосфолипидов и проницаемости внешнего липидного монослоя в клеточной линии MOLT-4 для всего диапазона исследуемых концентраций лектина WGA.

Проведенный сравнительный анализ воздействия лектинов WGA (0,1 и 1,0 мкг/мл) и Tulipa (0,1 – 100 мкг/мл) на физическое состояние липидного бислоя ПМНК условно здоровых доноров не выявил значимых отличий от контроля (рисунок 3С). При этом стоит отметить, что воздействие лектина WGA в концентрациях 10 и 100 мкг/мл на ПМНК условно здоровых доноров приводило к статистически значимому увеличению значений GP лаурдана в среднем на 5–15% по сравнению с контролем, что указывает на снижение молекулярной динамики фосфолипидов/увеличение микровязкости внешнего липидного монослоя.

Таким образом, лектин WGA в концентрациях 10 и 100 мкг/мл способен модифицировать структурно-функциональное состояние липидного бислоя всех исследуемых клеток, причем в большей степени опухолевых клеточных линий IM9/MOLT-4 по сравнению с клетками доноров. В тоже время

лектин Tulipa способен снижать молекулярную динамику фосфолипидов и проницаемость внешнего липидного монослоя в большей степени в клеточной линии MOLT-4 и в наименьшей степени в клетках IM9, при этом не оказывая эффекта на липидный бислой ПМНК доноров.

Завершая анализ экспериментального изучения лектинов WGA и Tulipa, следует констатировать, что они в определенном диапазоне концентраций обладают несомненным апоптотическим действием на опухолевые Т- и В-клетки, причем, механизмы этого эффекта во многом схожи с механизмами действия некоторых противоопухолевых препаратов (сдвиг редокс-баланса клетки в сторону “окислителей”) [17, 18]. Достаточно ли этих эффектов для практически значимой клинической эффективности остается неясным [10]. Очевидно, что для возможного признания лектина WGA в качестве конвенционального противоопухолевого препарата необходимы полноценные клинические испытания.

Заключение

Установлено, что лектины, специфичные к фукозе и сиаловой кислоте, при взаимодействии с опухолевыми В- и Т-лимфоцитами человека вызывают как накопление в них продукции АФК, так и снижение молекулярной динамики фосфолипидов в их мембранах. Полученный результат хорошо коррелирует со снижением жизнеспособности этих клеток после воздействия лектина WGA на всем диапазоне исследуемых концентраций, а лектина Tulipa – в концентрации 100 мкг/мл, что может указывать на реализацию программы апоптоза в опухолевых В- и Т-лимфоцитах, как по внешнему (рецепторному), так и по внутреннему (с участием митохондрий) пути. Тем не менее, влияния на жизнеспособность здоровых клеток лектин WGA не оказывает лишь в концентрациях, не превышающих 1,0 мкг/мл. В то время как лектин Tulipa, в силу своей сложной специфичности, снижает жизнеспособность всех исследуемых клеток в равной степени, независимо от их типа.

Благодарности

Работа поддержана международным грантом ГКНТ Беларусь–Армения M21ARMG-003 «Лектинсодержащие транспортные системы для селективной доставки лекарств к опухолевым и бактериальным клеткам» (2021–2023 гг.). Авторы благодарят сотрудников лаборатории медицинской биотехнологии Института биохимии им. Г. Бунятына НАН Республики Армения (г. Ереван, Армения) под руководством к.б.н. В.К. Гаспаряна, которыми была проведена изоляция и очистка лектинов с различной специфичностью для возможности проведения данного исследования.

Acknowledgements

The work was supported by the Belarus-Armenia International grant M21ARMG-003 “Lectin containing transport systems for targeting delivery of drugs to tumor and bacterial cells” (2021–2023). The authors thank the staff of the Laboratory of Medical Biotechnology, Institute of Biochemistry G. Bunyatyan NAS of the Republic of Armenia (Yerevan, Armenia) (Head Lab Ph.D. (Biology) Vardan C. Gasparyan) for isolation and purification lectins with different specificity for this study.

Список цитированных источников

1. Гармаза, Ю. М. Роль гликозиро-ванных белков в диагностике и лечении онкозаболеваний / Ю. М. Гармаза, Д. С. Мигун, А. В. Тамашевский // *Новости медико-биологических наук*. – 2023. – Т. 23, №2. – С. 98–108.
2. Silsirivanit, A. Glycosylation markers in cancer / A. Silsirivanit // *Adv. Clin. Chem.* – 2019. – Vol. 89. – P. 189–213.
3. Fucosylation in cancer biology and its clinical applications / M. Shan [et al.] // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* – 2019. – Vol. 162. – P. 93–119.
4. Munkley, J. Aberrant sialylation in cancer: therapeutic opportunities / J. Munkley // *Cancers*. – 2022. – Vol. 14, №17: 4248.
5. Glyco-nano-oncology: Novel therapeutic opportunities by combining small and sweet / P. F. Hockl [et al.] // *Pharmacol. Res.* – 2016. – Vol. 109. – P. 45–54.
6. Barchi, J. J. Glycoconjugate nanoparticle-based systems in cancer immunotherapy: novel designs and recent updates / J. J. Barchi // *J. Front. Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 852147.
7. Timoshenko, A. V. Lectins from medicinal plants: bioeffectors with diverse activities / A. V. Timoshenko, I. V. Gorudko,

- H. J. Gabius // *Rec. Advanc. Phytochem.* – 2014. – Vol. 44. – P. 43–56.
8. Tsaneva, M. 130 years of plant lectin research / M. Tsaneva, E. J. M. Van Damme // *Glycoconj J.* – 2020. – Vol. 37, N 5. – P. 533–551.
9. Lectins with potential for anti-cancer therapy / T. Yau [et al.] // *Molecules*. – 2015. – Vol. 20, №3. – P. 3791–3810.
10. Wheat germ agglutinin as a potential therapeutic agent for leukemia / B. Ryva [et al.] // *Front Oncol.* – 2019. – Vol. 9. – P. 100.
11. Screening method of carbohydrate-binding proteins in biological sources by capillary affinity electrophoresis and its application to determination of Tulipa gesneriana agglutinin in tulip bulbs / K. Nakajima [et al.] // *Glycobiology*. – 2004. – Vol. 14, №9. – P. 793–804.
12. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / T. Mosmann // *J. Immunol. Methods*. – 1983. – Vol. 65, №1–2. – P. 55–63.
13. Слобожанина Е. И., Тамашевский А. В., Гармаза Ю. М., Пасюков В. В., Федуро Н. А., Рыженкова О. В. Набор

- реагентов для определения чувствительности лейкозных клеток к химиотерапевтическим лекарственным средствам в зависимости от их редокс-состояния “ОВБ–ЛЕК–ОТВЕТ” по ТУ ВУ 190572781.051-2022 // Регистрационное удостоверение № ИМ–7.112950.
14. Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence / T. Parasassi [et al.] // *Bioph. J.* – 1991. – Vol. 60. – P. 179–189.
 15. Programmed cell death detection methods: a systematic review and a categorical comparison / S. Kari [et al.] // *Apoptosis.* – 2022. Vol. 27, P. 482–508.
 16. Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines / G.V. Faheina-Martins [et al.] // *Toxicol. in Vitro.* – 2012. – Vol. 26, №7. – P. 1161–1169.
 17. Состояние окислительно-восстановительного баланса в лимфоцитах периферической крови пациентов с хроническим В-лимфоцитарным лейкозом как критерий персонализированной оценки ответа их организма на проводимую лекарственную терапию / А. В. Тамашевский [и др.] // *Лабораторная диагностика. Восточная Европа.* – 2023. – Т. 12, №4. – С.536–550.
 18. Окислительно-восстановительный баланс в клетках пациентов с острым лимфобластным лейкозом как критерий для персонализированного учета их ответа на терапию / А. В. Тамашевский [и др.] // *Новости медико-биологических наук.* – 2023. – Т. 23, №2. – С. 26–36.
- ### References
- 1 Garmaza JuM, Migun DS, Tamashevski AV. Rol' glikozirovannykh belkov v diagnostike i lechenii onkozabolevanij. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk.* 2023; 23(2):98-108. [Harmaza Y, Migun D, Tamashevski A. Glycosated proteins as diagnostic and treatment tools of cancer diseases. *News of biomedical sciences.* 2023; 23(2):98-108.] (in Russ.)
 - 2 Silsirivanit A. Glycosylation markers in cancer. *Adv Clin Chem.* 2019;89:189-213. doi: 10.1016/bs.acc.2018.12.005.
 - 3 Shan M, Yang D, Dou H, Zhang L. Fucosylation in cancer biology and its clinical applications. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2019;162:93-119. doi: 10.1016/bs.pmbts.2019.01.002.
 - 4 Munkley J. Aberrant sialylation in cancer: therapeutic opportunities. *Cancers (Basel).* 2022;14(17):4248. doi: 10.3390/cancers14174248.
 - 5 Hockl PF, Wolosiuk A, Pérez-Sáez JM, Bordoni AV, Croci DO, Toum-Terrones Y, Soler-Illia GA, Rabinovich GA. Glyco-nano-oncology: Novel therapeutic opportunities by combining small and sweet. *Pharmacol Res.* 2016;109:45-54. doi: 10.1016/j.phrs.2016.02.005.
 - 6 Barchi JJ Jr. Glycoconjugate nanoparticle-based systems in cancer immunotherapy: novel designs and recent updates. *Front Immunol.* 2022;13:852147. doi: 10.3389/fimmu.2022.852147.
 - 7 Timoshenko AV, Gorudko IV, Gabius HJ. Lectins from medicinal plants: bioeffectors with diverse activities. In: *Recent Advances in Phytochemistry*, 2014. Vol. 44 (R. Jetter, Ed.), Springer, pp. 43-56.
 - 8 Tsaneva M, Van Damme EJM. 130 years of Plant Lectin Research. *Glycoconj J.* 2020;37(5):533-551. doi: 10.1007/s10719-020-09942-y.
 - 9 Yau T, Dan X, Ng CC, Ng TB. Lectins with potential for anti-cancer therapy. *Molecules.* 2015;20(3):3791-810. doi: 10.3390/molecules20033791.
 - 10 Ryva B, Zhang K, Asthana A, Wong D, Vicioso Y, Parameswaran R. Wheat Germ Agglutinin as a Potential Therapeutic Agent for Leukemia. *Front Oncol.* 2019;9:100. doi: 10.3389/fonc.2019.00100.
 - 11 Nakajima K, Kinoshita M, Oda Y, Masuko T, Kaku H, Shibuya N, Kakehi K. Screening method of carbohydrate-binding proteins in biological sources by capillary affinity electrophoresis and its application to determination of Tulipa gesneriana agglutinin in tulip bulbs. *Glycobiology.* 2004;14(9):793-804. doi: 10.1093/glycob/cwh094.
 - 12 Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
 - 13 Slobozhanina E.L., Tamashevski A.V., Garmaza Ju.M., Pasjukov V.V., Feduro N.A., Ryzhenkova O.V. Nabor reagentov dlja opredelenija chuvstvitel'nosti lejkoznykh kletok k himioterapevticheskim lekarstvennym sredstvam v zavisimosti ot ih redoks-sostojanija “OVБ–ЛЕК–ОТВЕТ” по ТУ ВУ 190572781.051-2022 // Регистрационное удостоверение № ИМ–7.112950. (In Russ.)
 - 14 Parasassi T, De Stasio G, Ravagnan G, Rusch RM, Gratton E. Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophys J.* 1991;60(1):179-89. doi: 10.1016/S0006-3495(91)82041-0.
 - 15 Kari S., Subramanian K., Altomonte I. A., Murugesan A., Yli-Harja O., Kandhavelu M. Programmed cell death detection methods: a systematic review and a categorical comparison. *Apoptosis.* 2022; 27(7-8): 482–508. doi:10.1007/s10495-022-01735-y.
 - 16 Faheina-Martins GV, da Silveira AL, Cavalcanti BC, Ramos MV, Moraes MO, Pessoa C, Araújo DA. Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. *Toxicol In Vitro.* 2012;26(7):1161-9. doi: 10.1016/j.tiv.2012.06.017.
 - 17 Tamashevski AV, Garmaza JuM, Feduro NA, Pasjukov VV, Slobozhanina EI. Sostojanie oksislitel'no-vosstanovitel'nogo balansa v limfocitah perifericheskoj krvi pacientov s hronicheskim V-limfocitarnym lejkozom kak kriterij personalizirovannoj ocenki otveta ih organizma na provodimuju lekarstvennuju terapiju. *Laboratornaja diagnostika. Vostochnaja Evropa.* 2023;12(4):536-550. [Tamashevski A, Harmaza Y, Fiadura N, Pasiukov V, Slobozhanina E. Redox Reactions Balance in Peripheral Blood Lymphocytes of Patients with Chronic B-Lymphocytic Leukemia as a Personalist Criterion for Assessment of the Organism Response to Drug Therapy. *Laboratory Diagnostics. Eastern Europe.* 2023; 12(4):536-550. doi:10.34883/Pl.2023.12.4.005.] (in Russ.)
 - 18 Tamashevski AV, Garmaza JuM, Feduro NA, Pasjukov VV, Slobozhanina EI. Okislitel'no-vosstanovitel'nyj balans v kletkah pacientov s ostrym limfoblastnym lejkozom kak kriterij dlja personalizirovannogo ucheta ih otveta na terapiju. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk.* 2023; 23(2): 26-36. [Tamashevski A, Harmaza Y, Fiadura N, Pasiukov V, Slobozhanina E. Redox balance in cells of patients with acute lymphoblastic leukemia as a criterion for personalized register of their response to therapy. *News of biomedical sciences.* 2023;23(2):26-36.] (in Russ.)

MOLECULAR AND MEMBRANE FEATURES OF *IN VITRO* INTERACTION OF FUCOSE / SIALIC ACID SPECIFIC LECTINS WITH BLOOD TUMOR CELLS

A. V. Tamashevski¹, Y. M. Harmaza¹, D. S. Migun²

¹Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnology,
Minsk, Republic of Belarus

²Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

Background. It is known that aberrant glycosylation, which is more typical process for tumor cells, contributes to the manifestation of a number of abnormal events. In particular, sialylation or fucosylation of proteins and lipids of cell membranes is observed during tumor progression. Therefore, it was suggested that under deep study of the mechanisms involved in these processes, it may be possible to develop new effective treatments for cancer using agents targeting fucose or sialic acid.

Objective. To study the molecular and membrane features of the interaction of lectins specific to fucose (Tulipa) and sialic acid (WGA) with tumor human cell lines IM-9 and MOLT-4.

Materials and methods. T- and B-lymphoblastoid cell lines MOLT-4 and IM-9, as well as donor's peripheral mononuclear blood cells were used in the work. Redox balance in cells was assessed by the content of cytosolic low molecular weight antioxidants, cell viability – using the MTT test. The lipid bilayer microviscosity of cell membranes was studied using the lipophilic fluorescent probe laurdan.

Results and conclusions. It has been established that the individual cell treatment with WGA lectin, specific to sialic acid, is capable to reduce the viability of tumor B- and T-lymphoblastic cells, without affecting on healthy cells, but only in a certain concentration range. The key role of the redox balance and membrane lipids modification in the mechanism of apoptosis pathways induction in IM9/MOLT-4 cells during their interaction with lectins has been demonstrated.

Keywords: fucose and sialic acid-specific lectins, cancer T- and B-lymphoblasts, redox balance, membrane lipid bilayer.

For citation: Tamashevski AV, Harmaza YM, Migun DS. Molecular and membrane features of *in vitro* interaction of fucose / sialic acid specific lectins with blood tumor cells *Biochemistry and Molecular Biology*. 2024, vol. 3, no 1(4). pp. 170–177 (in Russian).

Поступила 12.04.2024

МЕХАНИЗМЫ МОДИФИКАЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ КОРИЧНОЙ И КОФЕЙНОЙ КИСЛОТ

Е. А. Мельникова¹, Н. В. Амазгбери¹, Г. Н. Семенкова², К. А. Лукьянова¹, О. В. Орешко¹

¹Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

²Белорусский государственный медицинский университет, Минск, г. Минск, Республика Беларусь

Введение. Циннаматы, в том числе коричная и кофейная кислоты, обладают широким спектром свойств, связанных с их биологической активностью. Уникальные химические и биологические свойства позволяют рассматривать циннаматы в качестве потенциальных лекарств для профилактики и лечения ряда заболеваний, сопряженных с развитием воспаления. Однако их вовлечение в развитие оксидативного стресса детально не выяснено.

Цель исследования – изучить влияние коричной и кофейной кислот на механизмы формирования «респираторного взрыва» в нейтрофилах.

Материалы и методы. Гистопак-1077, люминол, коричная кислота, кофейная кислота, *Micrococcus lysodeikticus*, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, PI, JC-1, фосфатный буферный раствор. Хемиллюминесценция, спектрофотометрия, флуоресценция.

Результаты. Кофейная и коричная кислоты регулируют продукцию активных форм кислорода и хлора нейтрофилами, модифицируют процессы внутриклеточной сигнализации, снижают величину митохондриального мембранного потенциала в этих клетках.

Заключение. Кофейная и коричная кислоты модифицируют функциональную активность нейтрофилов за счёт уменьшения митохондриального мембранного потенциала и модификации многочисленных процессов внутриклеточной сигнализации, вовлечённых в формирование «респираторного взрыва» в этих клетках. Кофейная кислота, в отличие от коричной, значительно снижает образование активных форм кислорода и НОС1 стимулированными нейтрофилами, что обусловлено способностью этого соединения ингибировать миелопероксидазу.

Ключевые слова: коричная кислота, кофейная кислота, нейтрофилы, активные формы кислорода и хлора, внутриклеточная сигнализация.

Для цитирования. Механизмы модификации функциональной активности нейтрофилов при действии коричной и кофейной кислот / Е. А. Мельникова [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. – 2024. – Т. 3, № 1(4). – С. 178–185.

Введение

3-Фенилпропеновая кислота (коричная кислота) и ее гидроксипроизводные (циннаматы), в частности, 3-(3,4-дигидроксифенил) 2-пропеновая кислота (кофейная кислота) являются природными фенольными соединениями, присутствующими во многих пищевых продуктах в высоких концентрациях. Циннаматы обладают широким спектром свойств, связанных с их биологической активностью. Показано, что эти соединения проявляют противовоспалительное, антибактериальное, противовирусное, нейропротекторное, противоопухолевое и антиоксидантное действие *in vitro* и *in vivo* [1]. Это свидетельствует о наличии разнообразных механизмов влияния циннаматов на функции клеток, их жизненный цикл и внутриклеточную сигнализацию.

Процессы воспаления, микробицидности, пролиферации, опухолевого роста, нейродегенератив-

ных нарушений сопряжены с активацией окислительно-восстановительных реакций преимущественно в клетках иммунной системы, связанных с продукцией активных форм кислорода и хлора (АФКХ). Главным источником АФКХ в организме являются нейтрофилы. Эти клетки мигрируют в очаг инфицирования, осуществляя уничтожение и утилизацию чужеродных бактерий, а также поврежденных клеток, посредством генерации активных интермедиатов, образующихся при так называемом «респираторном взрыве» [2]. Однако гиперпродукция АФКХ является одной из причин развития оксидативного стресса и, как следствие, воспаления [3].

Для профилактики и лечения заболеваний, сопряженных с оксидативным стрессом, актуальным является использование соединений, обладающих антиоксидантными и противовоспалительными свойствами. В то же время, антиоксидантная тера-

пия не всегда является успешной. Следует учитывать, что АФКХ участвуют в регуляции многих жизненно важных процессов. Некоторые из активных интермедиатов, такие как H_2O_2 и $HOCl$, в физиологических концентрациях оказывают модифицирующее действие на функции клеток, выполняя тем самым роль вторичных мессенджеров или сигнальных молекул [4, 5]. Показано, что пероксид водорода и хлорноватистая кислота в микромолярных концентрациях модифицируют ферменты, участвующие в трансдукции внутриклеточного активационного сигнала, индуцируя или ингибируя пролиферацию, апоптоз и аутофагию [6]. Из этого следует, что при использовании антиоксидантов в медицинской практике необходимо учитывать молекулярно-клеточные механизмы их действия на редокс-системы клеток, чтобы ингибировать образование наиболее токсичных типов АФКХ до уровня, не ниже физиологических значений.

Уникальные химические и биологические свойства позволяют рассматривать циннаматы в качестве потенциальных лекарств для профилактики и лечения ряда заболеваний, сопряженных с развитием воспаления. Однако их вовлечение в развитие оксидативного стресса детально не выяснено. Целью данной работы явилось изучение влияния коричной и кофейной кислот на механизмы формирования «респираторного взрыва» в нейтрофилах.

Материалы и методы

В работе использовали коричную кислоту (3-фенилпропеновую кислоту), кофейную кислоту (3-(3,4-дигидроксифенил) 2-пропеновую кислоту) («Chem-Implex», США), карбонилцианид р-трифторометоксифенилгидразон (FCCP) («Chem-Implex», США), декстран, гистопак-1077, питательную среду RPMI-1640, иодида пропидиум (PI), люминол (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион), Triton X-100, 5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтил-бензамидозолокарбоцианин йодид (JC-1), *Micrococcus lysodeikticus*, n-формилметионил-лейцил-фенилаланин (fMLP), DPI (дифениленийдониум), АВАН (гидразид 4-аминобензойной кислоты), LY294002, Gö6976, PD98059, SB202190 («Sigma», США), 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) («Carl Roth», Германия), спирт этиловый пищевой марки «Люкс» (96 об.%) (РБ), лимонная кислота, компоненты для приготовления фосфатного буферного раствора (ФБР) и сбалансированного буферного солевого раствора Эрла (СБСРЭ) («Анализ Х», Беларусь).

Нейтрофилы выделяли из гепаринизированной периферической крови здоровых людей путем центрифугирования (25 мин, 400 g) в градиенте

плотности гистопак-1077 по стандартной методике [7]. Примесь эритроцитов удаляли с помощью гипотонического лизиса, после чего восстанавливали осмотичность добавлением 0,3 М раствора NaCl. Полученную фракцию клеток суспензировали в среде RPMI (pH 7,4), затем подсчитывали клетки в камере Горяева. Число нейтрофилов в суспензии составляло не менее 90 %. Жизнеспособность клеток изучали флуоресцентным методом с использованием PI ($\lambda_{\text{возб}}=530$ нм, $\lambda_{\text{рег}}=640$ нм) [8]. Секреторную дегрануляцию определяли по выходу лизоцима из клеток [9]. Активность лизоцима в супернатанте оценивали по скорости лизиса клеточных стенок бактерий *Micrococcus lysodeikticus* спектрофотометрически ($\lambda=450$ нм) (спектрофлуориметр CM 2203 («Солар», Беларусь)). Генерацию АФКХ исследовали методом люминолзависимой хемилюминесценции (ЛХЛ) на хемилюминометре БХЛ-1 (БГУ, Беларусь) с применением системы получения и обработки информации «Unichrom» (Новые аналитические системы, Беларусь). Клетки стимулировали к фагоцитозу адгезией к поверхности стекла в течение 10 мин [10] либо добавлением 0,1 мкМ хемотаксического пептида fMLP. Для исследования влияния циннаматов на процессы внутриклеточной сигнализации, к клеткам добавляли 1 мкМ DPI (ингибитор НАДФН-оксидазы), 0,1 мкМ АВАН (ингибитор миелопероксидазы (МПО)), 0,1 мкМ LY294002 (ингибитор фосфоинозитол-3-киназы (ФИЗК)), 0,1 мкМ Gö6976 (ингибитор протеинкиназы С (ПКС)), 0,1 мкМ PD98059 (ингибитор ERK1/2 МАПК), 0,3 мкМ SB202190 (ингибитор p38-МАП-киназы) и инкубировали 30 мин. Обработку результатов проводили, как описано в работе [11]. Интегральную интенсивность ЛХЛ ($\Sigma I_{\text{ЛХЛ}}$) определяли как площадь под кинетической кривой, регистрируемой в течение 10 мин, и выражали в % от контроля ($\Sigma I / \Sigma I_0 * 100$ %). При использовании ингибиторного анализа – $\Sigma I_i / \Sigma I_{i0} * 100$ %, где ΣI – интенсивность ЛХЛ в присутствии циннаматов, ΣI_0 – интенсивность ЛХЛ в отсутствие циннаматов, ΣI_i – интенсивность ЛХЛ в присутствии ингибитора и соответствующего циннамата, ΣI_{i0} – интенсивность ЛХЛ в присутствии ингибитора в отсутствие циннаматов.

Пероксидазную активность МПО в присутствии и отсутствие исследуемых соединений определяли по скорости окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) пероксидом водорода в присутствии МПО в окрашенный продукт – 3,3',5,5'-тетраметилбензидиндиимин [12]. Образование этого продукта оценивали спектрофотометрически на спектрофлуориметре CM2203 «Солар», РБ ($\lambda=450$ нм). Для расчёта использовали $\epsilon = 5,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Изменение митохондриального мембранного потенциала нейтрофилов ($\Delta\Psi_m$) оценивали с помощью флуоресцентного зонда JC-1 ($\lambda_{\text{возб}}=490$ нм, $\lambda_{\text{рег}}=530$ нм, 590 нм) [13]. Отношение интенсивностей флуоресценции при 590 и 530 нм (I590/I530) пропорционально $\Delta\Psi_m$. Интенсивность флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре CM 2203 («Солар», Беларусь). Статистическую обработку результатов проводили методом однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Различия между контрольной и экспериментальными группами анализировали с помощью теста Даннета. Данные представлены как среднее значение трех и более независимых экспериментов \pm стандартное отклонение. Результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

С целью выявления цитотоксического действия исследуемых соединений (0,1–10 мкМ) нами изучена жизнеспособность нейтрофилов. С использованием PI установлено, что цитотоксические эффекты наблюдаются только через 60 мин после внесения в клеточную суспензию коричной или кофейной кислот в концентрациях 1 и 10 мкМ. Причем кофейная кислота более токсична для нейтрофилов в этих условиях и в концентрациях 1 и 10 мкМ вызывает снижение жизнеспособности клеток на 25,2 и 32,7 %, соответственно. Следует отметить, что исследуемые соединения в диапазоне анализируемых концентраций не оказывают разрушающее действие на клетки при совместном инкубировании в течение 20, или 40 мин. Это является важным, поскольку все последующие манипуляции с нейтрофилами занимали от 10 до 40 мин.

Стимуляция нейтрофилов к фагоцитозу происходит в результате рецепторопосредованной либо неспецифической активации мембранных структур и связанных с ними многочисленных процессов внутриклеточной сигнализации, что приводит к «респираторному взрыву», связанному с увеличением продукции АФКХ, усилению секреторной дегрануляции, изменению метаболизма [14]. Нами изучено влияние коричной и кофейной кислот на генерацию АФКХ нейтрофилами при стимуляции адгезией и хемотаксическим пептидом fMLP (рисунок 1). Из рисунка 1 (А, В) видно, что инкубирование нейтрофилов с коричной кислотой не приводит к изменению суммарного выхода АФКХ в клетках, стимулированных адгезией. Воздействие 1 мкМ кофейной кислоты не влияет, а 10 мкМ – вызывает уменьшение продукции АФКХ адгезиро-

ванными нейтрофилами на 23 %. В то же время, выход АФКХ в нейтрофилах, стимулированных fMLP, после предварительного инкубирования с 1 мкМ коричной либо кофейной кислот снижается на 10 и 38 %, соответственно (рисунок 1 (С)).

Из этих данных следует, что кофейная кислота, в отличие от коричной, более эффективно снижает генерацию АФКХ в нейтрофилах. Это может быть связано с наличием в бензольном кольце кофейной кислоты двух гидроксильных групп, благодаря чему данное соединение может напрямую взаимодействовать с кислородцентрированными радикалами, как было показано ранее [15]. Однако, тот факт, что оба циннамата в концентрации 1 мкМ подавляют образование АФКХ при рецепторопосредованной стимуляции клеток fMLP свидетельствует о существовании и других механизмов влияния коричной и кофейной кислот на генерацию АФКХ нейтрофилами, связанных, например, с участием внутриклеточных сигнальных путей.

С целью подтверждения этого предположения, нами изучено влияние коричной и кофейной кислот на продукцию АФКХ клетками в присутствии специфических ингибиторов ряда ферментов, участвующих в процессах трансдукции активационного сигнала в fMLP-стимулированных нейтрофилах.

В таблице 1 представлены значения интегральной интенсивности ЛХЛ нейтрофилов после инкубирования клеток с ингибиторами НАДФН-оксидазы, МПО, ФИЗК, ПКС, ERK1/2 и р38-МАПК.

Ферменты НАДФН-оксидазы и МПО являются основными источниками АФКХ в нейтрофилах [2]. Сборка и активация НАДФН-оксидазного комплекса осуществляется при участии ПКС [16]. Из таблицы 1 видно, что инкубирование клеток с ингибитором НАДФН-оксидазы DPI в присутствии коричной и кофейной кислот приводит к небольшому снижению ЛХЛ по сравнению с контролем (в присутствии ингибитора).

Ингибирование ПКС G6976 также незначительно влияет на ЛХЛ клеток. В то же время, присутствие коричной кислоты в 1,6 раза усиливает действие АВАН, специфического ингибитора МПО. Напротив, в присутствии кофейной кислоты наблюдается повышение генерации АФКХ нейтрофилами в 2,7 раза после обработки клеточной суспензии этим ингибитором, что может быть связано с подавлением активности МПО данной кислотой.

Одним из регуляторов функциональной активности нейтрофилов является ФИЗК. Фосфотидилинозитол-3,4,5-трифосфат, образующийся при действии этого фермента, контролирует хемотаксис, продукцию супероксидных анион-радикалов и фагоцитоз [17].

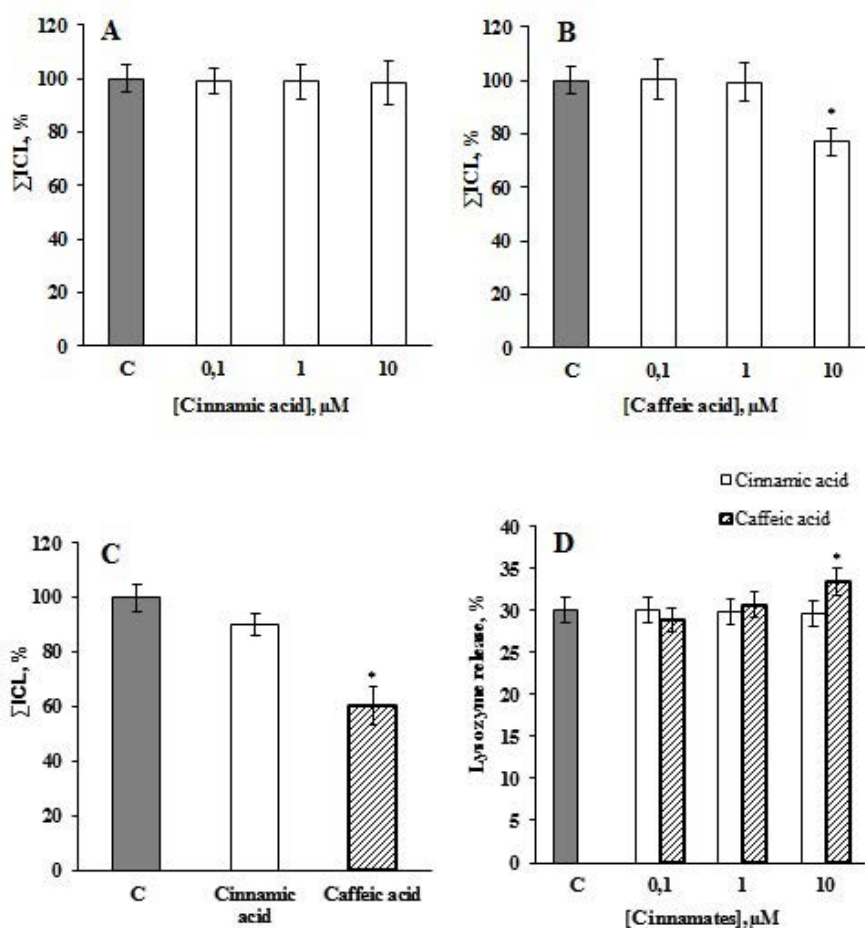


Рисунок 1 – Влияние циннаматов на формирование «респираторного взрыва» в нейтрофилах Генерация АФКХ при стимуляции клеток адгезией (А, В) и fMLP (С); секреторная дегрануляция нейтрофилов при действии циннаматов (D). * $p < 0,05$ по сравнению с контрольными значениями. Концентрация циннаматов при стимуляции нейтрофилов fMLP – 1 мкМ. Время инкубирования клеток с добавками – 30 мин

Figure 1 – Effect of cinnamates on the “respiratory burst” formation in neutrophils ROCS generation upon cells stimulation with adhesion (A, B) and fMLP (C); secretory degranulation of neutrophils under the influence of cinnamates (D). * $p < 0.05$ compared to control values. The concentration of cinnamates when stimulating neutrophils with fMLP – 1 μM . The incubation time of cells with additives – 30 min

Как следует из таблицы 2, при добавлении LY294002, ингибитора ФИЗК, интенсивность ЛХЛ в присутствии коричной кислоты не изменяется. В то же время, при добавлении кофейной кислоты в присутствии ингибитора ФИЗК наблюдается снижение (в 1,4 раза) продукции АФКХ нейтрофилами. Важную роль в активации нейтрофилов играют каскады МАПК, в том числе MEK-, ERK1/2- и p38-МАПК. Эти ферменты регулируют фагоцитоз, генерацию АФКХ, секреторную дегрануляцию, образование липидных медиаторов и апоптоз нейтрофилов [18, 19].

Из таблицы 1 видно, что интенсивность ЛХЛ клеток, обработанных коричной и кофейной кислотами после блокады ERK1/2 МАПК, снижается в 1,5 и 1,9 раз, соответственно. Коричная и кофейная кислоты практически не оказывают влияния на продукцию АФКХ нейтрофилами в присутствии ингибитора p38-МАПК.

Из результатов, полученных с помощью ингибиторного анализа, следует, что коричная и кофейная кислоты способны регулировать процессы формирования “респираторного взрыва” посредством воздействия на пути трансдукции активационного сигнала в нейтрофилах, поскольку в присутствии ряда используемых нами ингибиторов компонентов сигнальных путей генерация АФКХ либо увеличивается, либо уменьшается. Причем одной из важнейших причин снижения выхода АФКХ в клетках, обработанных кофейной кислотой, может быть способность этого соединения ингибировать МПО. Для подтверждения этого предположения мы изучили влияние анализируемых циннаматов на пероксидазную активность МПО (таблица 2). Видно, что активность МПО под действием коричной кислоты (0,1-10 мкМ) практически не изменяется. В то же время 0,1 мкМ и 1 мкМ кофейной кислоты ингибируют пероксидаз-

Таблица 1 – Влияние ингибиторов компонентов сигнальных путей на интенсивность ЛХЛ при действии коричневой и кофейной кислот на стимулированные fMLP нейтрофилы

Table 1 – Effect of signaling pathways components inhibitors on the LCL intensity of fMLP-stimulated neutrophils under the action of cinnamic and caffeic acids

Фермент	Ингибитор	ΣI_0 , %	Коричневая кислота	Кофейная кислота
–	–	100	ΣI , %	ΣI , %
–	–		89±4,2*	62±3,1*
Фермент	Ингибитор	ΣI_0 , %	ΣI_i , %	ΣI_i , %
НАДФН-оксидаза	DPI	3,1±0,5**	2,3±0,2 [#]	2,2±0,3 [#]
МПО	АВАН	26,6±1,7*	16,6±1,5 [#]	71,9±3,2 [#]
ФИЗК	LY294002	81,9±4,1*	93,9±5,6	58,2±2,4 [#]
ПКС	Gö6976	55,9±2,6*	46,2±3,2	63,8±3,1
ERK1/2-МАПК	PD98059	125,5±7,1*	84,7±4,7 [#]	65,1±3,5 [#]
p38-МАПК	SB202190	53,6±3,0*	64,7±3,8	58,2±4,0

Примечание: ΣI_0 – интенсивность ЛХЛ в присутствии ингибитора в отсутствие циннаматов, ΣI_i – интенсивность ЛХЛ в присутствии ингибитора и циннаматов. Концентрация циннаматов – 1 мкМ. ΣI_0 – интенсивность ЛХЛ в отсутствие циннаматов и ингибиторов, ΣI – интенсивность ЛХЛ в присутствии коричневой или кофейной кислот и в отсутствие ингибиторов. ** – $p < 0,01$, * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем без добавок (ΣI_0), [#] – $p < 0,05$ по сравнению с контролем в присутствии соответствующего ингибитора (ΣI_0).

Note: ΣI_0 – LCL intensity in the presence of an inhibitor in the absence of cinnamates, ΣI_i – LCL intensity in the presence of an inhibitor and cinnamates. Cinnamates concentration – 1 μ M. ΣI_0 – the intensity of LCL in the absence of cinnamates and inhibitors, ΣI – the intensity of LCL in the presence of cinnamic or caffeic acids and in the absence of inhibitors. ** – $p < 0,01$, * – $p < 0,05$ compared to control without additives (ΣI_0), [#] – $p < 0,05$ compared to control in the presence of the corresponding inhibitor (ΣI_0).

Таблица 2 – Влияние коричневой и кофейной кислот на пероксидазную активность миелопероксидазы

Table 2 – Effect of cinnamic and caffeic acids on the peroxidase activity of myeloperoxidase

Концентрация циннаматов, мкМ	Активность МПО, мкМ/мл*мин	
	Коричневая кислота	Кофейная кислота
0 (контроль)	945,2±53	
0,1	950±55	560±26*
1	948±59	297±19*
10	875±47	5±0,3*
АВАН	4,6±0,2*	

Примечание: время инкубирования с добавками – 30 мин, T = 37° C. pH = 5,0. [H₂O₂] = 0,3 мМ, [АВАН] = 1 мкМ, [ТМБ] = 1,6 мМ. * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольными значениями

Note: incubation time with additives – 30 minutes, T = 37° C. pH = 5.0. [H₂O₂] = 0.3 mM, [АВАН] = 1 μ M, [ТМБ] = 1.6 mM. * – $p < 0,05$ compared to control values

ную активность этого фермента в 1,7 и 3,2 раза соответственно, а 10 мкМ этого соединения подавляют МПО практически полностью, что сопоставимо с данными, полученными с помощью специфического ингибитора АВАН.

Для стимулированных к фагоцитозу нейтрофилов характерно усиление секреторной дегрануляции, в результате чего во внеклеточное пространство высвобождается ряд ферментов, в том числе и МПО [2]. На рисунке 1 (D) показано влияние исследуемых циннаматов на секрецию лизоцима из нейтрофилов. Видно, что только инкубирование клеток с 10 мкМ кофейной кислоты приводит к увеличению выхода лизоцима во внеклеточную среду на 11,4 %, тогда как коричневая кислота не влияет на этот процесс. Из этих данных следует, что, в отличие от коричневой, кофей-

ная кислота способна усиливать секреторную дегрануляцию нейтрофилов. Однако секреция МПО во внеклеточную среду под действием кофейной кислоты не может представлять опасности для окружающих клеток, поскольку, как показано выше, активность этого фермента практически полностью заингибирована.

Ещё одним источником активных кислородных метаболитов в различных типах клеток являются митохондрии. Известно, что митохондрии нейтрофилов регулируют «респираторный взрыв», образование NETs, миграцию, адгезию, дифференцировку и дегрануляцию [20]. Влияние исследуемых циннаматов на функциональную активность митохондрий нейтрофилов мы оценили по изменению величины митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$) (рисунок 2).

Как показано на рисунке 2, инкубирование нейтрофилов в течение 30 мин с коричневой или кофейной кислотами приводит к уменьшению $\Delta\Psi_m$ на 20 % и 28 %, соответственно. Снижение значений $\Delta\Psi_m$ свидетельствует о модификации редокс-систем митохондрий под действием циннаматов.

Авторами работы [21] выявлено, что коричневая кислота в концентрации 100 мкМ снижает мембранный потенциал митохондрий, выделенных из печени, и значительно подавляет продукцию АФКХ в нейтрофилах. Однако в нашем исследовании показано, что подобные эффекты проявляются и при более низких (нетоксичных) концентрациях этого соединения.

Заключение

Кофейная и коричневая кислоты модифицируют функциональную активность нейтрофилов за счёт уменьшения митохондриального мембранного потенциала и модификации многочисленных процессов внутриклеточной сигнализации, вовлечённых в формирование “респираторного взрыва” в этих клетках.

Установлено, что кофейная кислота, в отличие от коричневой, значительно снижает образование АФКХ стимулированными нейтрофилами. Это обусловлено главным образом способностью данного соединения ингибировать МПО. Усиление секреторной дегрануляции кофейной кислотой не может приводить к развитию оксидативного стресса вследствие значительного подавления активности МПО.

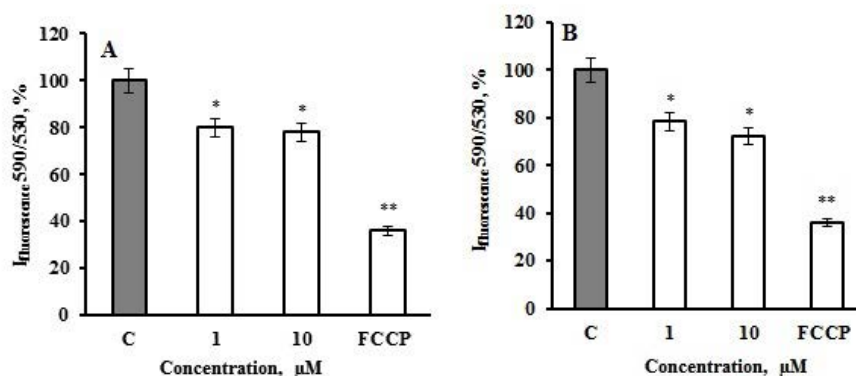


Рисунок 2 – Влияние коричневой (А) и кофейной (В) кислот на величину митохондриального мембранного потенциала нейтрофилов
Время инкубирования с добавками – 30 мин; * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ по сравнению с контрольными значениями

Figure 2 – Effect of cinnamic (A) and caffeic (B) acids on mitochondrial membrane potential value of neutrophils
Incubation time with additives – 30 minutes; * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ compared with control values

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, грант М22М-071.

Acknowledgements

The work was supported by Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research, grant M22M-071.

Список цитированных источников

- Ruwizhi, N. Cinnamic acid derivatives and their biological efficacy / N. Ruwizhi, A.B. Atim // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21. – P. 1–34.
- Dupré-Crochet, S. ROS production in phagocytes: why, when, and where? / S. Dupré-Crochet, M. Erard, O. Nüße // *J. Leukoc. Biol.* – 2013. – Vol. 94(4). – P. 657–670.
- Cabello-Verrugio, C. Oxidative stress in disease and aging: mechanisms and therapies / C. Cabello-Verrugio, M. Ruiz-Ortega, M. Mosqueira, F. Simon // *Oxid. Med. Cell Longev.* – 2016:8786564.
- Kuznetsova, T. Morphometric characteristics of neutrophils stimulated by adhesion and hypochlorite / T. Kuznetsova [et al.] // *Mol. Immunol.* – 2017. – Vol. 87. – P. 317–324.
- Ткачук, В. А. Пероксид водорода как новый вторичный посредник / В. А. Ткачук, П. А. Тюрин-Кузьмин, В. В. Белоусов, А. В. Воротников // *Биологические мембраны.* – 2012. – Т. 29 (1–2). – С. 21–37.
- Nindl, G. Effect of hydrogen peroxide on proliferation, apoptosis and interleukin-2 production of Jurkat T cells /

- G. Nindl [et al.] // *Biomed. Sci. Instrum.* – 2004. – Vol. 40. – P. 123–128.
- Böyum, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages / A. Böyum // *Scand. J. Immunol.* – 1976. – Vol. 5. – P. 9–15.
- Kato, F. Rapid fluorometric assay for cell viability and cell growth using nucleic acid staining and cell lysis agents / F. Kato, M. Tanaka, K. Nakamura // *Toxicol. in Vitro.* – 1999. – Vol. 13. – P. 923–929.
- Shugar, D. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme / D. Shugar // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1952. – Vol. 8. – P. 302–309.
- Kavalenka, A. I. Effects of hydrogen peroxide on neutrophil ability to generate reactive oxygen and chlorine species and to secrete myeloperoxidase *in vitro* / A. I. Kavalenka, G. N. Semenkov, S. N. Cherenkevich // *Cell Tissue Biol.* – 2007. – Vol. 1(6). – P. 551–559.
- Krylova, N. G. Cytotoxic and antiproliferative effects of thymoquinone on rat C6 glioma cells depend on oxidative stress / N. G. Krylova [et al.] // *Mol. Cell. Biochem.* – 2019. – Vol. 462. – P. 195–206.

12. Pulli, B. Measuring Myeloperoxidase Activity in Biological Samples / B. Pulli [et al.] // PLoS ONE. –2013. – Vol. 8(7): e67976.
13. Sivandzade, F. Analysis of the mitochondrial membrane potential using the cationic JC-1 dye as a sensitive fluorescent probe / F. Sivandzade, A. Bhalerao, L. Cucullo // Bio Protoc. – 2019. – Vol. 9 (1):e3128.
14. Zhang, J. ROS and ROS-mediated cellular signaling / J. Zhang [et al.] // Oxid. Med. Cell. Longev. . – 2016. – Vol. 2016: 4350965.
15. Samovich, S. N. Interaction of aromatic alcohols, aldehydes and acids with α -hydroxyl-containing carbon-centered radicals: A steady state radiolysis study / S. N. Samovich, S. D. Brinkevich, O. I. Shadyro // Rad. Phys. Chem. – 2013. – Vol. 82 (1). – P. 35–43.
16. Bertram, A. Protein kinase C isoforms in neutrophil adhesion and activation. Arch / A. Bertram, K. Ley // Immunol. Ther. Exp. (Warsz). – 2011. – Vol. 59 (2). – P. 79–87.
17. Reyes-Reyes, M. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates integrin-dependent NF-(κ)B and MAPK activation through separate signaling pathways / M. Reyes-Reyes, N. Mora, A. Zentella, C. Rosales // J. Cell Sci. – 2001. – Vol. 114. – P. 1579–1589.
18. Kim, D. The role of p38 MAPK in neutrophil functions: Single cell chemotaxis and surface marker expression / D. Kim, C. L. Haynes // Analyst. – 2013. – Vol. 138 (22). – P. 1–17.
19. Lucas, R. M. ERK1/2 in immune signaling / R. M. Lucas, L. Luoand, J. L. Stow // Biochem. Soc. Trans. – 2022. – Vol. 50. – P. 1341–1352.
20. Cao, Z. Roles of mitochondria in neutrophils / Z. Cao [et al.] // Front. Immunol. – 2022. – Vol. 13: 934444.
21. Beloborodova N., Bairamov I., Olenin A., Shubina V., Teplova V., Fedotcheva N. Effect of phenolic acids of microbial origin on production of reactive oxygen species in mitochondria and neutrophils / N. Beloborodova [et al.] // J. Biomed. Sci. – 2012. – Vol. 19(1):89.

References

- 1 Ruwizhi N, Atim AB Cinnamic acid derivatives and their biological efficacy. *Int. J. Mol. Sci.* 2020 Aug 9;21:1–34. doi: 10.3390/ijms21165712.
- 2 Dupré-Crochet S, Erard M, Nüße O. ROS production in phagocytes: why, when, and where? *J. Leukoc. Biol.* 2013 Oct 1;94(4):657–670. doi: 10.1189/jlb.1012544
- 3 Cabello-Verrugio C, Ruiz-Ortega M, Mosqueira M, Simon F. Oxidative stress in disease and aging: mechanisms and therapies. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2016 Dec 10;2016:8786564. doi: 10.1155/2016/8786564
- 4 Kuznetsova T, Kulahava T, Zholnerevich I, Amaegberi N, Semenkova G, Shadyro O, Arnhold J. Morphometric characteristics of neutrophils stimulated by adhesion and hypochlorite. *Mol. Immunol.* 2017 May 22;87:317–324. doi: 10.1016/j.molimm.2017.05.007
- 5 Tkachuk VA Peroksid vodoroda kak novyj vtorichnyj posrednik / V.A. Tkachuk, P.A. Tjurin-Kuz'min, V.V. Belousov, A.V. Vorotnikov // *Biologicheskie membrany.* – 2012. – T. 29 (1–2). – S. 21–37.
- 6 Nindl, G., Peterson N.R., Hughes E.F., Waite L.R., Johnson M.T. (2004) Effect of hydrogen peroxide on proliferation, apoptosis and interleukin-2 production of Jurkat T cells. *Biomed. Sci. Instrum.*, 40, 123–128.
- 7 Böyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol.* 1976 Jun; 5:9-15.
- 8 Kato F, Tanaka M, Nakamura K. Rapid fluorometric assay for cell viability and cell growth using nucleic acid staining and cell lysis agents. *Toxicol in Vitro.* 1999 Dec 13;13:923–929. doi: 10.1016/s0887-2333(99)00078-8.
- 9 Shugar D. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochim Biophys Acta.* 1952;8:302–309. doi: 10.1016/0006-3002(52)90045-0.
- 10 Kavalenka AI, Semenkova GN, Cherenkevich SN. Effects of hydrogen peroxide on neutrophil ability to generate reactive oxygen and chlorine species and to secrete myeloperoxidase in vitro. *Cell Tissue Biol.* 2007 Dec;1:551–559. doi: 10.1134/S1990519X07060120.
- 11 Krylova NG, Drobysh MS, Semenkova GN, Kulahava TA, Pinchuk SV, Shadyro OI. Cytotoxic and antiproliferative effects of thymoquinone on rat C6 glioma cells depend on oxidative stress. *Mol Cell Biochem.* 2019 Sep 6;462:195–206. doi: 10.1007/s11010-019-03622-8
- 12 Pulli B, Ali M, Forghani R, Schob S, Hsieh KLC, Wojtkiewicz G, Linnoila JJ, Chen JW. Measuring myeloperoxidase activity in biological samples // *PLoS ONE.* 2013 Jul 5;8(7):e67976. doi: 10.1371/journal.pone.0067976.
- 13 Sivandzade F, Bhalerao A, Cucullo L. Analysis of the mitochondrial membrane potential using the cationic JC-1 dye as a sensitive fluorescent probe. *Bio Protoc.* 2019 Jan 5;9(1):e3128. doi: 10.21769/BioProtoc.3128.
- 14 Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, Dong W. ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxid Med Cell Longev.* 2016 Feb 22;2016:4350965. doi: 10.1155/2016/4350965.
- 15 Samovich S.N., Brinkevich S.D., Shadyro O.I. (2013) Interaction of aromatic alcohols, aldehydes and acids with α -hydroxyl-containing carbon-centered radicals: A steady state radiolysis study. *Rad. Phys. Chem.* 82 (1), 35–43. doi: 10.1016/j.radphyschem.2012.09.010.
- 16 Bertram A, Ley K. Protein kinase C isoforms in neutrophil adhesion and activation. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2011 Feb 6;59 (2):79–87. doi: 10.1007/s00005-011-0112-7.
- 17 Reyes-Reyes M, Mora N, Zentella A, Rosales C. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates integrin-dependent NF-(κ)B and MAPK activation through separate signaling pathways. *J Cell Sci.* 2001 Apr 11;114:1579–1589. doi: 10.1242/jcs.114.8.1579.
- 18 Kim D, Haynes CL. The role of p38 MAPK in neutrophil functions: Single cell chemotaxis and surface marker expression. *Analyst.* 2013 Nov 21;138(22):1–17. doi: 10.1039/c3an01076g.
- 19 Lucas RM, Luoand L, Stow JL. ERK1/2 in immune signaling. *Biochem Soc Trans.* 2022 Oct 31;50:1341–1352. doi: 10.1042/BST20220271.
- 20 Cao Z, Zhao M, Sun H, Hu L, Chen Y, Fan Z. Roles of mitochondria in neutrophils. *Front Immunol.* 2022 Aug 19;13:934444. doi: 10.3389/fimmu.2022.934444.
- 21 Beloborodova N, Bairamov I, Olenin A, Shubina V, Teplova V, Fedotcheva N. Effect of phenolic acids of microbial origin on production of reactive oxygen species in mitochondria and neutrophils. *J Biomed Sci.* 2012 Oct 12;19(1):89. doi: 10.1186/1423-0127-19-89.

MECHANISMS OF NEUTROPHILS' FUNCTIONAL ACTIVITY MODIFICATION UNDER THE ACTION OF CINNAMIC AND CAFFEIC ACIDS

E. A. Melnikova¹, N. V. Amaegberi¹, G. N. Semenkova², K. A. Lukyanava¹, O. V. Oreshko¹
¹Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus
²Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Background. Cinnamates, including cinnamic and caffeic acids, have a wide range of properties associated with their biological activity. Unique chemical and biological properties allow us to consider cinnamates as potential drugs for the prevention and treatment of a number of diseases associated with the inflammation development. However, their involvement in the oxidative stress formation has not been clarified in detail.

Objective. To study the effect of cinnamic and caffeic acids on the mechanisms of “respiratory burst” formation in neutrophils.

Materials and methods. Histopak-1077, luminol, cinnamic acid, caffeic acid, *Micrococcus lysodeikticus*, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, PI, JC-1, phosphate buffer solution. Chemiluminescence, spectrophotometry, fluorescence.

Results. Caffeine and cinnamic acids regulate the reactive oxygen and chlorine species production by neutrophils, modify intracellular signaling processes, and reduce the mitochondrial membrane potential in these cells.

Conclusions. Caffeic and cinnamic acids modify the functional activity of neutrophils by reducing the mitochondrial membrane potential and modifying numerous intracellular signaling processes involved in the “respiratory burst” formation in these cells. Caffeic acid, unlike cinnamic acid, significantly reduces the reactive oxygen species and HOCl formation by stimulated neutrophils, which is due to this compound ability to inhibit myeloperoxidase.

Keywords: cinnamic acid, caffeic acid, neutrophils, reactive oxygen and chlorine species, intracellular signaling

For citation: Melnikova EA, Amaegberi NV, Semenkova GN, Lukyanava KA, Oreshko OV. Mechanisms of neutrophils' functional activity modification under the action of cinnamic and caffeic acids. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2024, vol. 3, no 1(4). pp. 178–185 (in Russian).

Поступила 14.04.2024

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ И БИОЭЛЕМЕНТНЫЙ СТАТУС МИТОХОНДРИЙ МИОКАРДА КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Е. Г. Бадун¹, А. В. Шуриберко¹, Е. О. Казинец¹, Ю. Е. Разводовский¹, А. В. Шульга², О. Е. Кузнецов¹

¹ Институт биохимии биологически активных соединений

Национальной академии наук Беларуси, г. Гродно, Республика Беларусь

² Гродненский государственный медицинский университет, г. Гродно, Республика Беларусь

Введение. Хроническая алкогольная интоксикация (ХАИ) сопровождается метаболическими и структурными изменениями в ткани сердца, что способствуют нарушению его функциональной активности.

Цель работы: исследование функциональной активности, биоэлементного статуса митохондрий миокарда крыс при хронической алкогольной интоксикации, оценка возможности коррекции нарушений композицией аминокислот и микроэлементов.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на 40 крысах-самках линии Wistar (3 опытных группы и группа контроля). Проведены исследования активности ферментов цикла Кребса, дыхательной цепи, респираторной активности митохондрий, показателей антиоксидантной системы, биохимических показателей и состава биоэлементов; морфологический анализ миокарда. Для коррекции метаболических нарушений при ХАИ, животным вводилась композиция L-глутамина, L-аргинина гидрохлорида с сульфатом цинка и сульфата магния.

Результаты. ХАИ приводит к изменению состава биоэлементов в крови, миокарде и митохондриях миокарда крыс. Нарушения клеточного метаболизма, ионного транспорта являются причиной снижения процессов энергопродукции (ферментов цикла трикарбоновых кислот, митохондриальной дыхательной цепи переноса электронов) в митохондриях.

Заключение. Применение композиции аминокислот, обогащенной цинком и магнием, при ХАИ оказывает кардиопротекторное действие: оптимизирует антиоксидантный статус, восстанавливает ионный транспорт, значительно улучшает биоэлементный статус митохондрий миокарда крыс.

Ключевые слова: биоэлементы, хроническая алкогольная интоксикация, аминокислоты, митохондрии, миокард.

Для цитирования. Функциональная активность и биоэлементный статус митохондрий миокарда крыс при хронической алкогольной интоксикации / Е. Г. Бадун [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. – 2024. – Т. 3, № 1(4). – С. 186–195.

Введение

Злоупотребление алкоголем может приводить к патологическим нарушениям функции сердца, что является фактором риска развития сердечно-сосудистой патологии. Последствиями хронической алкогольной интоксикации (ХАИ) являются, в том числе, морфологические изменения в ткани миокарда при развитии алкогольной кардиомиопатии (около 45 % случаев) [1].

Метаболизм этанола сопровождается образованием активных форм кислорода (АФК), развитием окислительного стресса, дисфункцией митохондрий сердца (комплексов дыхательной цепи, мембранного потенциала митохондрий), приводит к изменению ионного транспорта в кардиомиоцитах [2, 3]. У пациентов с диагностированной алкогольной зависимостью может наблюдаться снижение кишечной абсорбции, полиурия из-за окислительного и провоспалительного стресса, что усугубляет дефицит микроэлементов [4].

Литературные данные относительно изменения уровня биоэлементов при алкогольной интоксикации (в сыворотке, печени, мозге) достаточно противоречивы [2]. Некоторыми авторами предложено изучение соотношения и корреляционной взаимосвязи химических элементов при ХАИ [5], изучается увеличение молярных соотношений Cu/Zn и Cu/Se в сыворотке крови пациентов с острым ишемическим инсультом, сопровождающимся окислительным стрессом [6].

Одним из критериев оценки степени повреждения тканей при ХАИ может являться оценка элементного состава. Практически отсутствуют данные научных исследований в этом направлении, что обуславливает актуальность выполнения таких работ. Полученные результаты позволят не только исследовать характер нарушений в миокарде при алкогольной интоксикации, но и изучить возможность их коррекции, в том числе аминокислотными добавками, обогащенными соединениями

ми элементов, важных для функционирования миокарда.

Цель работы: исследование функциональной активности, биоэлементного статуса митохондрий миокарда крыс при хронической алкогольной интоксикации, оценка возможности коррекции нарушений композицией аминокислот и микроэлементов.

Материалы и методы

Исследование проведено в отделе медико-биологических проблем алкоголизма ГП «Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси». Эксперименты выполнены на 40 крысах-самках линии Wistar с массой тела в начале эксперимента $182 \pm 1,94$ г, содержащихся в стандартных условиях вивария на стандартном рационе питания, в соответствии с соблюдением требований Директивы ЕС №2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, используемых для научных целей. Длительность эксперимента составила 28 недель.

Все животные были разделены на 4 группы:

группа 1 (контроль, $n=10$) – интактные животные, не подвергавшиеся алкогольной интоксикации, получавшие в качестве питья воду на протяжении всего эксперимента);

группа 2 (контроль + разработанная композиция, $n=10$) – животные контрольной группы получающие разработанную композицию аминокислот и микроэлементов. Животные, не подвергавшиеся алкогольной интоксикации, получавшие в качестве питья воду на протяжении всего эксперимента, с 14 недели животным дополнительно интрагастрально ежедневно вводили разработанную композицию L-глутамина, L-аргинина гидрохлорида (каждого в дозе по 250 мг/кг массы тела) с семиводным сульфатом цинка (15,4 мг/кг) и безводным сульфатом магния (62 мг/кг);

• группа 3 (ХАИ, $n=10$) – животные получали в качестве единственного источника питья 20%-й водный раствор этанола на протяжении 28 недель эксперимента [7];

• группа 4 (ХАИ + разработанная композиция, $n=10$) – животные, получающие в качестве единственного источника питья 20 %-й раствор этанола на протяжении 28 недель, с 14 недели животным дополнительно интрагастрально ежедневно вводили разработанную композицию L-глутамина, L-аргинина гидрохлорида (каждого в дозе по 250 мг/кг массы тела) с семиводным сульфатом цинка (15,4 мг/кг) и безводным сульфатом магния (62 мг/кг).

Для исследования использованы: цельная кровь, плазма/сыворотка крови, ткань миокарда, митохондрии миокарда крыс.

Исследуемые показатели: активность ферментов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) – аконитаза, изоцитрадегидрогеназа (ИЦДГ), малатдегидрогеназа (МДГ); комплекс митохондриальной электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) – I, II комплекс; мембранный потенциал (МП), респираторная активность митохондрий (субстратное дыхание V1, АДФ-стимулированное дыхание V3, FCCP-стимулированное дыхание V3, дыхательный контроль V3/V4, МП митохондрий, АДФ-падение МП), показатели антиоксидантной системы – супероксид-дисмутаза-1 (СОД-1), супероксиддисмутаза-2 (СОД-2), глутатионпероксидаза (ГПО), глутатион восстановленный, каталаза [8, 9].

Об интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) судили по количеству окрашенных продуктов, образованных с 2-тиобарбитуратовой кислотой (ТБК-реагирующие соединения - ТБК РС), методом Ohkawa [8, 9]. Определение биохимических показателей крови (гаммаглутамил-транспептидаза (ГГТП), аланинаминотрансфераза (АлАТ), аспаргатаминотрансфераза (АсАТ), мочевая кислота, креатининфосфокиназа общая (КФК)) выполнено с использованием наборов реагентов производства «Арвитмедикал» (Беларусь) на спектрофотометре «Cary-100 Scan» (Varian, Австрия).

Концентрации макро- и микроэлементов в крови и ткани миокарда, определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной (аргоновой) плазмой на масс-спектрометре NexION2000B (PerkinElmer, США). Определяемые биоэлементы: магний (Mg), кальций (Ca), марганец (Mn), железо (Fe), медь (Cu), цинк (Zn), селен (Se), молибден (Mo).

Определение концентрации CYP2E1, MT-2, ZnT1, ZIP14 проведено в 9 % осветленных гомогенатах миокарда (10 минут при 15000 g) методом иммуноферментного анализа согласно инструкции производителя, с использованием наборов реагентов (FineTest, Китай) и микропланшетного мультидетектора FLUOstar Omega (BMGLabtech, Германия).

Уровень потребления этанола оценивали по концентрации фосфатидилэтанола в крови крыс (концентрация 16:0/18:1 фосфатидилэтанола в крови): методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией [10].

Морфологическая оценка тканей (миокарда) выполнена на фиксированном в формалине гистологическом материале с окраской гематоксилин-эозином и по методу Массона. Для морфометрической съемки использовали микроскоп Olympus CX43 (Япония) с камерой OPTICA C-P12,

объективы $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$ и $\times 100$; проводилось исследование максимального количества неперекрывающихся полей зрения.

Статистическая обработка данных выполнена с помощью пакета прикладных статистических программ (StatSoft STATISTICA 13.0, GraphPad Prism 6, Microsoft Excel 2016). Результаты выражали в виде среднего и средней ошибки среднего ($M \pm m$), различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$. При ненормальном распределении данных использовали однофакторный дисперсионный анализ, критерий Краскела-Уоллиса. Результаты представляли в виде медианы (Me) и рассеяния (Q1 и Q3 процентилей). Для анализа взаимосвязи микроэлементов применяли метод корреляционного анализа.

Результаты и их обсуждение

Изменения массы тела животных, масса сердца, масса печени и массовых коэффициентов органов в ходе экспериментального исследования представлены в таблице 1.

С 12 недели эксперимента потребление этанола в группе животных ХАИ увеличилось на 14,6 % в сравнении с потреблением воды в контрольной группе, а поедание корма с 15 недели снизилось на 17,2 % в сравнении со значениями контрольной группы. Масса животных к окончанию эксперимента увеличилась на 40 % в контроле и на 33,8 % в группе ХАИ (разница по массе в группах составила 8,5 %).

Показатели масса сердца и печени животных экспериментальных групп к окончанию модели в группе животных с ХАИ и контроле не имели достоверных различий. При этом необходимо отметить, что массовые коэффициенты, масса сердца/масса тела и масса печени/масса тела, в группе

ХАИ было достоверно выше в сравнении с контролем на 8,2 % и 23,5 %, соответственно ($p < 0,01$; $p < 0,05$).

Морфологическая структура ткани миокарда контрольной и опытных групп животных, представлена на рисунке 1.

Гистологическое исследование образцов тканей миокарда крыс показало, что ХАИ способствовала формированию патогенетических нарушений в структуре ткани. В контроле и группе «контроль + композиция» миокард представлен кардиомиоцитами без видимых нарушений структуры, в то время как при ХАИ обнаружены очаговые жировые отложения в межклеточном пространстве миокарда, отек стромы, фиброз различной степени выраженности между кардиомиоцитами и в околососудистом пространстве, что косвенно может свидетельствовать о кардиотоксическом действии этанола и его метаболитов (ацетальдегида). На фоне использования при ХАИ композиции L-глутамин, L-аргинина гидрохлорида с сульфатом цинка и сульфатом магния показана меньшая выраженность морфологических изменений в миокарде.

ХАИ способствовала формированию существенных изменений и в биохимических показателях крови крыс (таблица 2).

В проведенном исследовании установлено, что алкогольная интоксикация в течение 28 недель сопровождается достоверным увеличением активности ГГТП в 3,8 раза, АсАТ – на 56,5 %, КФК – в 1,8 раз, мочевой кислоты – на 20,1 % и повышением коэффициента де Ритиса на 40,2 % в сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$). Данные изменения, вероятно, формируют патологические изменения в миокарде.

Таблица 1 – Масса тела, масса сердца и масса печени экспериментальных животных

Table 1 – Body weight, heart weight and liver weight of experimental animals

Исследуемый параметр	Контроль	Контроль+ композиция	ХАИ	ХАИ+композиция
Масса тела в начале эксперимента, г	184,5 (177; 189)	184 (162; 200)	177 (175; 194)	177 (164; 188)
Масса тела в конце эксперимента, г	259 (256; 266)	280 (240; 297)	237 (218; 241) **	261,5 (253; 288,5) ##
Масса сердца, г	0,6975 (0,666; 0,744)	0,7885 (0,697; 0,8545)	0,673 (0,628; 0,687)	0,711 (0,6715; 0,8205)
Масса сердца/масса тела (мг/г)	2,67 (2,6; 2,72)	2,71 (2,58; 2,87)	2,89 (2,81; 3,22) **	2,72 (2,65; 2,84) #
Масса печени/ масса тела (%)	3,02 (2,73; 3,14)	3,15 (3,04; 3,27)	3,73 (3,55; 3,99)***	3,07 (2,93; 3,27)##

Примечание: * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; ** – $p < 0,01$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ по сравнению с группой ХАИ; ## – $p < 0,01$ в сравнении с группой ХАИ

Note: * – $p < 0,05$ compared to control; ** – $p < 0,01$ compared to control; # – $p < 0,05$ compared with the chronic alcohol intoxication (CAI) group; ## – $p < 0,01$ compared with the CAI group

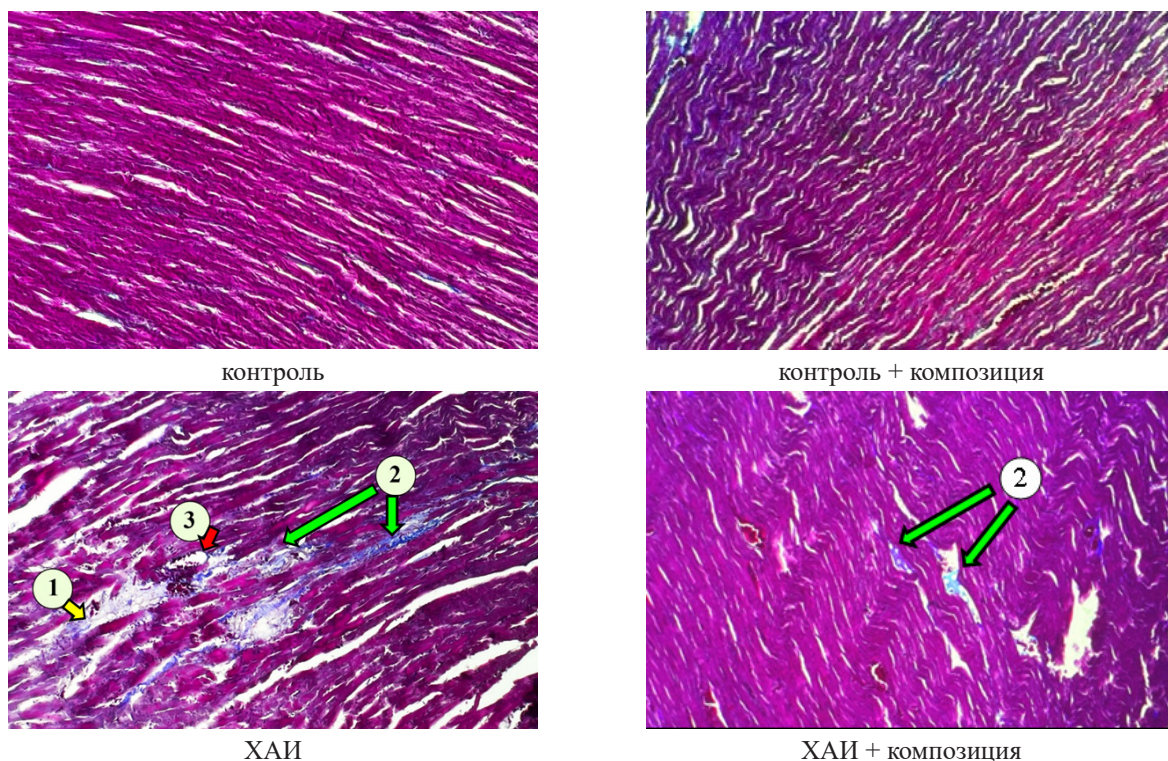


Рисунок 1 – Морфологические изменения в миокарде крыс при ХАИ; 1 – жировые отложения в межклеточном пространстве, 2 – интерстициальный фиброз между кардиомиоцитами и в околососудистом пространстве, 3 – жировые отложения в околососудистом пространстве. Окраска по Массону, $\times 100$

Figure 1 – Morphological changes in the myocardium of rats during chronic alcohol intoxication; 1 – fat deposits in the intercellular space, 2 – interstitial fibrosis between cardiomyocytes and in the perivascular space, 3 – fat deposits in the perivascular space. Masson staining, $\times 100$

Корреляционный анализ выявил положительную взаимосвязь между АсАТ и КФК ($r = 0,952; p < 0,01$), КФК и коэффициентом де Ритиса ($r = 0,709; p < 0,05$), ГГТП и мочевого кислоты ($r = 0,636, p < 0,05$) при

Таблица 2 – Биохимические показатели крови экспериментальных животных при хронической алкогольной интоксикации

Table 2 – Biochemical blood parameters of experimental animals with chronic alcohol intoxication

Исследуемый показатель	Контроль	Контроль+ композиция	ХАИ	ХАИ+композиция
ГГТП, Е/л	7,18 (0,96; 9,26)	11,23 (4,75; 15,86)	27,16 (22,99; 29,01)***	3,13 (1,97; 10,77)###
АлАТ, Е/л	29,75 (23,38; 32,98)	29,05 (24,52; 34,11)	34,95 (31,99; 40,19)**	26,35 (22,34; 27,48)###
АсАТ, Е/л	71,81 (70,24; 73,73)	75,12 (69,1; 83,06)	112,36 (103,99; 120,57)***	75,82 (68,32; 86,2)###
Коэффициент де Ритиса	2,39 (2,31; 2,4)	2,56 (2,11; 2,9)	3,35 (3,13; 3,53)**	2,99 (2,58; 3,34)◆
Мочевая кислота, мкмоль/л	277,96 (270,07; 288,36)	284,35 (267,81; 292,36)	333,95 (310,4; 346,48)**	271,95 (259,42; 309,78)##
КФК, Е/л	536,3 (428,2; 595,5)	655,4 (493,3; 663,2)	983,7 (950,2; 1108,3)**	735,1 (590,9; 942)◆

Примечание: здесь и в таблицах 3–7: * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; ** – $p < 0,01$ в сравнении с контролем; *** – $p < 0,001$ в сравнении с контролем; # – $p < 0,05$ по сравнению с группой ХАИ; ## – $p < 0,01$ в сравнении с группой ХАИ; ### – $p < 0,001$ в сравнении с группой ХАИ; ◆ – $p < 0,05$ в сравнении с контроль+композиция; ◆◆ – $p < 0,01$ в сравнении с контроль+композиция; ◆◆◆ – $p < 0,001$ в сравнении с контроль+композиция

Note: here and in the tables 3–7: * – $p < 0.05$ compared to control; ** – $p < 0.01$ compared to control; *** – $p < 0.001$ compared to control; # – $p < 0.05$ compared with the CAI group; ## – $p < 0.01$ compared with the CAI group; ### – $p < 0.001$ compared with the CAI group; ◆ – $p < 0.05$ compared with control + composition; ◆◆ – $p < 0.01$ compared with control + composition; ◆◆◆ – $p < 0.001$ compared with control+composition

ХАИ, что сопровождалось активацией свободнорадикальных процессов, о чем свидетельствуют данные, представленные в таблице 3.

При исследовании показателей антиоксидантной системы (АОС) в миокарде при ХАИ наблюдается снижение активности СОД 1 в цитозоле на 22,2 %, ГПО в гомогенате – на 18,9 % в сравнении с контрольной группой. Следует отметить резкое снижение (на 56,2 %) активности СОД-2 в митохондриях кардиомиоцитов. Данные изменения характерны для прогрессирования сердечного фиброза [11]. При этом в крови животных группы ХАИ отмечено снижение уровня восстановленного глутатиона (на 33,9 %) и повышение продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) на 44,1 %.

Активности каталазы при ХАИ по сравнению с показателями в контрольной группе имела тенденцию к увеличению (на 34,6 %). Полученные результаты доказывают активацию процессов свободнорадикального окисления в миокарде крыс. Алкоголь-индуцированная активация цитохрома P450 на 12,6 %, в сравнении с контрольной группой, может являться ключевым фактором в патогенезе алкогольной кардиомиопатии [12].

В условиях ХАИ введение разработанной композиции (L-глутамин, L-аргинин, сульфат цинка и сульфат магния) нормализовало уровень восстановленного глутатиона в крови и миокарде. При этом на фоне ингибирования ПОЛ (на 23 % относительно

но группы ХАИ) отмечалась активация СОД-1 на 71,7 % и СОД-2 на 16,4 % в сравнении с группой ХАИ, что может свидетельствовать об оптимизации функционирования СОД на фоне введения тестируемой композиции. Выявленные эффекты композиции на основе аминокислот, цинка и магния могут быть обусловлены её защитными метаболическими эффектами в кардиомиоцитах, а также свидетельствовать об проявлении антиоксидантных свойств при ХАИ.

Результаты исследования дыхательной активности и мембранного потенциала митохондрий миокарда в экспериментальных группах животных с ХАИ и с ХАИ и введением разработанной композиции представлены в таблице 4.

Показано, что в группе ХАИ, в сравнении с контрольной группой животных, в митохондриях активируется субстратное дыхание на 12,6 %, при этом отмечается снижение АДФ-стимулированного дыхания на 38,8 %, FCCP-стимулированного дыхания – на 48,5 %, АДФ-падение мембранного потенциала на 28,5 %. Увеличение субстратного и снижение АДФ-стимулированного дыхания, а также отклика митохондрий на внесение АДФ, возможно, обусловлено нарушениями в работе электрон-транспортной цепи митохондрий и активацией процессов разобщения окислительного фосфорилирования. Полученные результаты согласуются с данными полученными El-Mas M. M. (2019): при алкогольной интоксика-

Таблица 3 – Ферменты антиоксидантной системы и продукты перекисного окисления липидов в миокарде при экспериментальной ХАИ

Table 3 – Enzymes of the antioxidant system and products of lipid peroxidation in the myocardium during experimental chronic alcohol intoxication

Исследуемый параметр	Контроль	Контроль+ композиция	ХАИ	ХАИ+композиция
СОД-1 (постмитохондриальная фракция 9% гомогената миокарда), Е акт×мин/мг белка	52,89 (48,89; 55,39)	61,04 (58,05; 62,89)	41,16 (33,24; 43,24) **	47,89 (31,71; 55,57) ♦♦
СОД-2 (митохондрии миокарда), Е акт×мин/мг белка	48,93 (34,78; 58,24)	55,04 (45,04; 60,44)	21,44 (17,38; 30,48) **	36,77 (28,38; 49,94) #♦
Цельная кровь				
Глутатион (восст.), мкмоль/мл	4,6 (4,11; 5,36)	4,2 (3,99; 4,5)	3,04 (2,43; 3,39) ***	3,88 (3,31; 4,33) * #
ТБК РС, мкмоль/мл крови	30,36 (29,06; 31,42)	34,6 (31,81; 35,33)	43,75 (39,02; 46,28) ***	33,65 (32,27; 34,76) ****
Цитозольная фракция, 9 % гомогенат миокарда				
Глутатион (восст.), мкмоль/мл	5,89 (5,57; 6,15)	5,74 (5,53; 6,25)	4,73 (3,99; 5,39) **	5,56 (5,37; 5,81) ***
ГПО, мкмоль GSH×мин/г ткани	66,74 (63,35; 69,42)	74,53 (63,76; 77,69)	54,14 (44,75; 58,18) ***	58,99 (52,46; 64,42) * ♦
ТБК РС, нмоль/г ткани	22,22 (12,69; 25,14)	13,25 (12,49; 21,16)	33,7 (31,11; 42,36) **	27,18 (25,39; 29,88) ***♦
Каталаза, ммоль Н ₂ О ₂ ×мин/г белка	1,91 (1,57; 2,26)	1,93 (1,66; 2,17)	2,57 (2,48; 3,2)***	2,62 (2,29; 2,89) ***♦
Цитохром P 450 2 E1, нг/г белка	13,21 (11,04; 13,67)	12,25 (11,17; 13,12)	17,05 (16,97; 17,64)**	14,87 (14,31; 15,73)**♦

ции формируется состояние окислительного стресса, которое индуцирует повышение уровня активных форм кислорода, инактивирующих мембраносвязанные ферменты дыхательной цепи [13]. Снижение дыхательного контроля на 48,9 % в группе ХАИ в сравнении с контрольной группой, подтверждает присутствие ресопряжения электрон-транспортных комплексов и отражает снижение процессов энергообразования. Исследование влияния ХАИ на активность ферментов ЦТК и дыхательной цепи митохондрий представлено в таблице 5.

Исследование влияния ХАИ на активность ферментов ЦТК показало достоверное снижение в митохондриях активности аконитазы, фермента наиболее чувствительного к окислительному стрессу [14], на 56,6 % в сравнении с контролем. Кроме того, отмечается снижение ИЦДГ на 24,8 % и МДГ на 28,4 % в митохондриях миокарда при ХАИ по сравнению с контролем.

Наше исследование продемонстрировало нарушение окислительного фосфорилирования при

ХАИ, что сопровождается снижением активности I и II комплекса митохондриальной электрон-транспортной цепи на 27,1 % и 34 %, соответственно, в сравнении с контрольной группой. Полученные результаты согласуются с данными исследований Steiner J. L. [3]. При использовании композиции (глутамин+аргинин+ магний+ цинк) наблюдалась нормализация активности ферментов ЦТК и ЭТЦ.

Концентрация белков-транспортёров ZIP14, ZnT1 и MT-2 в миокарде экспериментальных животных при ХАИ представлена на рисунке 2.

Установлено, что при ХАИ значительно изменяется функционирование белков-транспортёров в миокарде, что сопровождается снижением ZIP14 (транспортирует цинк из внеклеточного пространства в компартменты клетки) и ZnT1 (участвует в транспортировке цинка из цитозоля во внеклеточное пространство) на 11,7 % и 27,9 %, соответственно, в сравнении с интактными животными, что обусловлено компенсаторной реакцией на снижение содержания цинка и механизмами его удержания

Таблица 4 – Респираторная активность и мембранный потенциал митохондрий миокарда крыс при хронической алкогольной интоксикации

Table 4 – Respiratory activity and membrane potential of rat myocardial mitochondria during chronic alcohol intoxication

Исследуемый параметр	Контроль	Контроль+ композиция	ХАИ	ХАИ+композиция
Субстратное дыхание V1, нмоль O \times мин/мг белка	4,56 (4,08; 4,72)	4,32 (3,81; 4,64)	5,14 (4,8; 5,7) **	4,04 (3,34; 4,84) #
АДФ-стимулированное дыхание V3, нмоль O \times мин/мг белка	27,5 (23,03; 28,56)	33,85 (31,99; 35,47)	16,82 (13,94; 21,55)**	28,83 (18,92; 29,98) \blacklozenge
ФССР-стимулированное дыхание V3, нмоль O \times мин/мг белка	41,87 (40,29; 44,54)	40,72 (35,97; 43,98)	21,55 (18,11; 25,37)**	32,52 (20,85; 39) *
Дыхательный контроль V3/V4	6,07 (5,9; 6,29)	7,68 (7,08; 9,03)	3,1 (2,73; 3,9) **	6,13 (4,29; 7,48) # \blacklozenge
МП митохондрий, Ед. флуоресценции	358,74 (347,4; 361,68)	354,955 (345,775; 371,71)	329,11 (317,88; 339,9)***	369,87 (358,21; 374,9) ###
АДФ-падение МП, %	39,93 (37,43; 45,04)	44,67 (42,43; 46,52)	28,54 (22,91; 31,12)***	35,41 (33,96; 37,9)*# $\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge$

Таблица 5 – Активность ферментов ЦТК и дыхательной цепи митохондрий крыс при хронической алкогольной интоксикации

Table 5 – Activity of enzymes in the TCA cycle and the respiratory chain of rat mitochondria during chronic alcohol intoxication

Исследуемый показатель	Контроль	Контроль+ композиция	ХАИ	ХАИ+композиция
Аконитаза-2, мкмоль НАДФ \times мин/мг белка	31,4 (28,08; 46,1)	39,27 (32,34; 42,44)	13,62 (10,29; 16,08) ***	17,04 (10,93; 19,29) *** \blacklozenge
ИЦДГ, мкмоль НАДФ \times мин/мг белка	449,6 (418,8; 482,6)	470,2 (392,3; 502,9)	338,2 (296,1; 352,8) ***	391,1 (357,3; 452,3) #
МДГ, мкмоль НАД \times мин/мг белка	1017 (992,63; 1065)	1036 (969,87; 1068,5)	728,2 (657,96; 799,8) ***	833,9 (660,8; 937,2) *** \blacklozenge
I-комплекс ЭТЦ, мкмоль НАДН \times мин/мг белка	491,6 (445,2; 519,3)	470,6 (391,5; 544,3)	358,2 (264; 382,8)***	425,4 (414,7; 429,2) ** ###
II-комплекс ЭТЦ, мкмоль ДХФИФ \times мин/мг белка	233,1 (226,2; 258)	248 (244; 267,7)	153,9 (104,1; 179,9)***	210,3 (187,7; 236,3) *# \blacklozenge

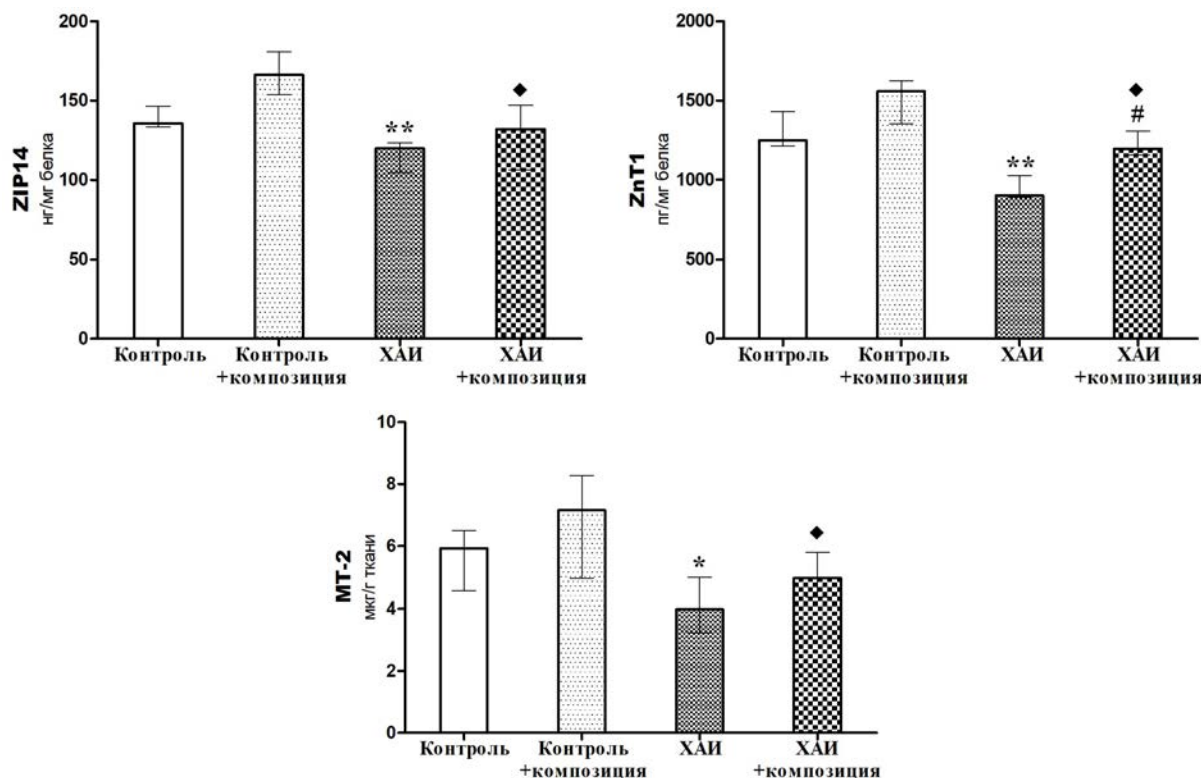


Рисунок 2 – Концентрация белков-транспортеров ZIP14, ZnT1 и MT-2 в миокарде крыс при хронической алкогольной интоксикации

Figure 2 – Transporter proteins ZIP14, ZnT1 and MT-2 in the myocardium of rats during chronic alcohol intoxication

жания в клетке. Кроме того, показано снижение на 32,9 % MT-2 при ХАИ в миокарде крыс относительно контрольных значений.

При добавлении разработанной композиции (L-глутамин, L-аргинин, сульфат цинка и сульфат магния) на фоне ХАИ у крыс установлено восстановление в сердце уровня ZnT1 до контрольных значений. Полученный результат доказывает снижение ZIP14 на фоне ХАИ у крыс, что способствует снижению поступления цинка в клетки и его внутриклеточного содержания при снижении ZnT1.

Анализ состава элементов и его изменений в плазме крови на фоне ХАИ у крыс представлены в таблице 6.

Степень снижения уровня химических элементов в плазме крови увеличивалась в ряду: кальций < магний < медь < марганец < цинк < селен. При ХАИ в плазме крови наблюдается снижение уровня селена и цинка на 17,6 % и 17,5 % и повышение железа и молибдена на 15,6 % и 32,6 % в сравнении с контрольной группой, соответственно.

Использование специфического биомаркера фосфатидилэтанола в диагностике алкогольной зависимости продемонстрировало отрицательную его взаимосвязь в плазме крови с уровнем цинка ($r = -0,684, p < 0,05$). Степень снижения концентрации цинка увеличивалась в ряду: сердце < кровь < плазма < митохондрии сердца.

Установленное снижение содержания селена и цинка в тканях, сопровождающееся активацией ПОЛ, подтверждает роль данных элементов в функционировании АОС защиты. Полученные результаты согласуются с данными исследований Grochowski С. [2].

Применение композиции (L-глутамин, L-аргинин, сульфат цинка, сульфат магния) при ХАИ предупреждало снижение концентраций магния, кальция, цинка, селен и молибдена в плазме крови. Статистически значимое увеличение концентрации магния и цинка в крови животных с ХАИ, получавших композицию с 14 недели эксперимента (на 15,2% и 17,3 % в сравнении с контрольной группой), подтверждает терапевтическую значимость их применения при алкогольной интоксикации.

Анализ элементного состава в митохондриях миокарда на фоне ХАИ представлен в таблице 7.

Закономерность снижения концентраций химических элементов в митохондриях миокарда проявлялась как цинк > магний > селен > молибден. Показано повышение содержания кальция в миокарде и митохондриях кардиомиоцитов в группе ХАИ на 30,3 % и в 1,9 раз в сравнении с контрольной группой соответственно ($p = 0,001$). При сравнительном анализе установлено увеличение соотношения уровней Cu/Zn и Cu/Se в 2,3

Таблица 6 – Биоэлементный статус плазмы крови животных при хронической алкогольной интоксикации

Table 6 – Bioelement status of animal blood plasma during chronic alcohol intoxication

Показатель	Контроль	Контроль + композиция	ХАИ	ХАИ + композиция
Mg, мг/л	4,93 (4,75; 5,15)	5,34 (5,15; 5,42)	4,58 (4,25; 4,97)*	5,28 (4,94; 5,69) #
Ca, мг/л	278,33 (269,95; 285,09)	270,89 (267,54; 277,28)	258,71 (246,63; 263,1)**	273,92 (265,29; 283,74) #
Mn, мкг/л	8,48 (7,37; 12,4)	8,51 (7,33; 9,5)	7,47 (6,59; 8,8)	8,94 (7,05; 12,4)
Fe, мг/л	7,7 (7,06; 8,52)	8,19 (7,28; 9,49)	8,9 (7,81; 9,86)	7,69 (7,49; 8,31)
Cu, мг/л	1,65 (1,57; 2,21)	1,73 (1,66; 1,8)	1,5 (1,42; 1,91)*	1,41 (1,4; 2,04)
Zn, мг/л	1,26 (1,23; 1,31)	1,23 (1,16; 1,37)	1,04 (0,97; 1,1)***	1,22 (1,15; 1,35) #
Se, мкг/л	383,1 (364,25; 393,95)	379 (343,77; 411,12)	315,76 (305,39; 345,95) ***	366,15 (335,35; 383,1) #
Mo, мкг/л	25,39 (24,07; 26,45)	23,16 (21,08; 25,76)	33,67 (26,58; 37,49) **	23,71 (21,35; 31,48) #

Таблица 7 – Биоэлементный статус митохондрий миокарда животных при хронической алкогольной интоксикации

Table 7 – Bioelemental status of animal myocardial mitochondria during chronic alcohol intoxication

Показатель	Контроль	Контроль + композиция	ХАИ	ХАИ + композиция
Mg, мг/л	123,02 (119,63; 130,88)	127,43 (120,51; 150,26)	103,08 (99,29; 105,19)***	118,45 (112,88; 121,04) ***◆
Ca, мг/л	788,11 (634,37; 822,15)	620,63 (524,96; 698,46)	1508,84 (1021,05; 1741,01)***	904,85 (874,66; 983,88) ***◆
Mn, мкг/л	0,92 (0,87; 0,96)	0,87 (0,81; 0,92)	0,68 (0,64; 0,84)**	0,8 (0,77; 0,89)*
Fe, мг/л	160,35 (157,99; 176,08)	148,41 (139,01; 167,09)	253,75 (215,43; 286,78)***	184,26 (177,18; 212,98) ***◆
Cu, мг/л	14,81 (14,13; 15,81)	13,23 (12,87; 13,99)	19,77 (19,16; 21,3)***	14,35 (12,4; 16,15) ###
Zn, мг/л	11,07 (10,72; 13,35)	13,66 (13,07; 14,06)	6,36 (5,2; 9,39)***	12,94 (11,74; 14,86) ###
Se, мкг/л	0,27 (0,25; 0,3)	0,37 (0,37; 0,38)	0,23 (0,2; 0,3)	0,28 (0,21; 0,29) ◆◆
Mo, мкг/л	0,21 (0,18; 0,25)	0,15 (0,14; 0,21)	0,18 (0,14; 0,2)*	0,16 (0,14; 0,19)*

и 1,6 раза, соответственно, в митохондриях кардиомиоцитов при ХАИ в сравнении с контрольной группой. Развитие ХАИ сопровождалось снижением концентраций магния и цинка в крови (на 16,2 % и 42,5%, соответственно) в сравнении с контролем ($p=0,01$).

ХАИ сопровождалось увеличением концентрации молибдена (в крови на 21,3 %; в миокарде на 18,6 %; митохондриях миокарда на 9,8 %) в сравнении с контрольными значениями. Обнаружена положительная корреляционная связь концентраций Mo в митохондриях с концентрацией мочевиной кислоты ($r=0,709$, $p<0,05$), что можно расценивать как увеличение риска формирования сердечно-сосудистой патологии и риска смертности при ее на-

личии. Полученный результат описан в экспериментальной модели, проведенной Limei Shi с соавторами в 2021 году [15].

Применение разработанной композиции (L-глютамин, L-аргинин, сульфат цинка, сульфат магния) при ХАИ показало возможность ее использования для коррекции уровней магния, кальция, марганца, железа и молибдена.

Заключение

Хроническая алкогольная интоксикация проявляется значительными метаболическими нарушениями и изменением состава исследованных элементов в крови, миокарде и митохондриях миокарда крыс. Нарушения клеточного метаболизма,

ионного транспорта являются причиной снижения процессов энергопродукции (нарушение функции ферментов цикла трикарбоновых кислот и митохондриальной дыхательной цепи переноса электронов). Полученные данные об изменении состава важнейших биоэлементов в митохондриях миокарда и функционировании белков-транспортеров доказывают значимость митохондриальных элементов (кальций, цинк,

железо, селен, медь, молибден) в патогенезе ХАИ.

Применение разработанной композиции аминокислот, обогащенной цинком и магнием, при ХАИ оказывает кардиопротекторное действие, проявляющееся нормализацией про-/антиоксидантного соотношения, восстановлением ионного транспорта и биоэлементного статуса митохондрий миокарда и их функциональной активности.

Список использованных источников

1. Недзьведь, М. К. Хронический алкоголизм в сочетании с изменением внутренних органов и атеросклерозом / М. К. Недзьведь, С. А. Гузов, О. В. Колбасова // Медицинский журнал. – 2023. – № 3. – С. 122–130.
2. Grochowski, C. Serum iron, Magnesium, Copper, and Manganese Levels in Alcoholism: A Systematic Review / C. Grochowski [et al.] // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24, № 7. – P. 1361.
3. Steiner, J.L. Etiology of alcoholic cardiomyopathy: mitochondria, oxidative stress and apoptosis / J. L. Steiner, C. H. Lang // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2018. – Vol. 89, № 1. – P. 125–135.
4. Alcohol Misuse and Kidney Injury: Epidemiological Evidence and Potential Mechanisms / Z. V. Varga [et al.] // *Alcohol. Res.* – 2017. – Vol. 38, № 2. – P. 283–288.
5. Correlations Between Trace Elements in Selected Locations of the Human Brain in Individuals with Alcohol Use Disorder / C. Grochowski [et al.] // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25, № 2. – P. 359.
6. Selenium, Copper, Zinc Concentrations and Cu/Zn, Cu/Se Molar Ratios in the Serum of Patients with Acute Ischemic Stroke in Northeastern Poland—A New Insight into Stroke Pathophysiology / A. Mirończuk [et al.] // *Nutrients*. – Vol. 13, № 7. – P. 2139.
7. Wrzołkowa, T. Effects of ethanol on the development of experimental atherosclerosis and cardionecrosis in rats / T. Wrzołkowa, T. Rudzińska-Kisiel // *Alcohol*. – 1990. – Vol. 7, № 4. – P. 299–306.
8. Бадун, Е. Г. Влияние субхронической алкогольной интоксикации на антиоксидантный статус, содержание цитохрома P450 2E1 и металлотионеина-2 в сердце крыс / Е. Г. Бадун, А. В. Шуриберко, О. Е. Кузнецов // *Новости медико-биологических наук*. – 2022. – Т. 22, № 4. – С. 54–58.
9. Бадун, Е. Г. Влияние комбинации аминокислот с цинком и магнием на элементный состав крови, сердца и энергетические функции митохондрий сердца при тяжелой алкогольной интоксикации / Е. Г. Бадун [и др.] // *Новости медико-биологических наук*. – 2022. – Т. 22, № 4. – С. 40–47.
10. Шуриберко, А. В. Метод определения фосфатидилэтанола в крови / А. В. Шуриберко, Ю. Е. Разводовский // *Академический журнал Западной Сибири*. – 2022. – Т. 18. – № 4 (97). – С. 36–42.
11. Insights into Manganese Superoxide Dismutase and Human Diseases / M. Liu [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23, № 24. – P. 15893.
12. New Molecular Mechanism Underlying Myc-Mediated Cytochrome P450 2E1 Upregulation in Apoptosis and Energy Metabolism in the Myocardium / F. Guan [et al.] // *J. Am. Heart. Assoc.* – 2019. – Vol. 8, № 1. – P. 009871.
13. El-Mas, M. M. Role of alcohol oxidative metabolism in its cardiovascular and autonomic effects / M. M. El-Mas, A. A. Abdel-Rahman // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2019. – Vol. 1193. – P. 1–33.
14. Murakami, K. Effect of fructose 1,6-bisphosphate on the iron redox state relating to the generation of reactive oxygen species / K. Murakami, M. Yoshino // *Biometals*. – 2015. – Vol. 28, № 4. – P. 687–91.
15. Associations of plasma metal concentrations with the risks of all-cause and cardiovascular disease mortality in Chinese adults / L. Shi [et al.] // *Environ. Int.* – 2021. – Vol. 157. – P. 106808.

References

1. Nedz'ved' MK, Guзов SA, Kolbasova OV. Khronicheskiy alkogolizm v sochetanii s izmeneniyem vnutrennikh organov i aterosklerozom. *Meditsinskiy zhurnal*. 2023;3:122–130. (In Russian)
2. Grochowski C, Blicharska E, Baj J, Mierzwińska A, Brzozowska K, Forma A, Maciejewski R. Serum iron, Magnesium, Copper, and Manganese Levels in Alcoholism: A Systematic Review. *Molecules*. 2019 Apr 7;24(7):1361. doi: 10.3390/molecules24071361.
3. Steiner JL, Lang CH. Etiology of alcoholic cardiomyopathy: Mitochondria, oxidative stress and apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2017 Aug;89:125-135. doi: 10.1016/j.biocel.2017.06.009.
4. Varga ZV, Matyas C, Paloczi J, Pacher P. Alcohol Misuse and Kidney Injury: Epidemiological Evidence and Potential Mechanisms. *Alcohol Res*. 2017;38(2):283-288.
5. Grochowski C, Szukała M, Litak J, Budny A, Proch J, Majerek D, Blicharska E, Niedzielski P. Correlations Between Trace Elements in Selected Locations of the Human Brain in Individuals with Alcohol Use Disorder. *Molecules*. 2020 Jan 15;25(2):359. doi: 10.3390/molecules25020359.
6. Mirończuk A, Kapica-Topczewska K, Socha K, Soroczyńska J, Jamiołkowski J, Kułakowska A, Kochanowicz J. Selenium, Copper, Zinc Concentrations and Cu/Zn, Cu/Se Molar Ratios in the Serum of Patients with Acute Ischemic Stroke in Northeastern Poland—A New Insight into Stroke Pathophysiology. *Nutrients*. 2021 Jun 22;13(7):2139. doi: 10.3390/nu13072139.
7. Wrzołkowa T, Rudzińska-Kisiel T. Effects of ethanol on the development of experimental atherosclerosis and cardionecrosis in rats. *Alcohol*. 1990 Jul-Aug;7(4):299-306. doi: 10.1016/0741-8329(90)90086-r.
8. Badun YG, Shuriberko AV, Kuznetsov OY. Vliyanie subkhronicheskoy alkogol'noy intoksikatsii na antioksidantnyy status, soderzhaniye tsitokhroma P450 2E1 i metallotioneina-2 v serdtse krysa. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk*. 2022;22(4):54-58. (In Russian)
9. Badun YG, Shuriberko AV, Kazinets EO, Cheremisin AC, Razvodovskiy YY, Kuznetsov OY. Vliyanie kombinatsii aminokislot s tsinkom i magniyem na elementnyy sostav krovi, serdtsa i energeticheskiye funktsii mitokhondriy serdtsa pri tyazholoy alkogol'noy intoksikatsii. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk*. 2022;22(4):40-47. (In Russian)
10. Shuriberko AV, Razvodovskiy YY. Metod opredeleniya fosfatidiletanola v krovi. *Akademicheskij zhurnal Zapadnoy Sibiri*. 2022;18(4-97):36-42. DOI: 10.32878/sibir.22-18-04(97)-36-42 (In Russian)

- 11 Liu M, Sun X, Chen B, Dai R, Xi Z, Xu H. Insights into Manganese Superoxide Dismutase and Human Diseases. *Int J Mol Sci.* 2022 Dec 14;23(24):15893. doi: 10.3390/ijms232415893.
- 12 Guan F, Yang X, Li J, Dong W, Zhang X, Liu N, Gao S, Wang J, Zhang L, Lu D. New Molecular Mechanism Underlying Myc-Mediated Cytochrome P450 2E1 Upregulation in Apoptosis and Energy Metabolism in the Myocardium. *J Am Heart Assoc.* 2019 Jan 8;8(1):e009871. doi: 10.1161/JAHA.118.009871.
- 13 El-Mas MM, Abdel-Rahman AA. Role of Alcohol Oxidative Metabolism in Its Cardiovascular and Autonomic Effects. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1193:1-33. doi: 10.1007/978-981-13-6260-6_1.
- 14 Murakami K, Yoshino M. Effect of fructose 1,6-bisphosphate on the iron redox state relating to the generation of reactive oxygen species. *Biometals.* 2015 Aug;28(4):687-91. doi: 10.1007/s10534-015-9856-6.
- 15 Shi L, Yuan Y, Xiao Y, Long P, Li W, Yu Y, Liu Y, Liu K, Wang H, Zhou L, Yang H, Li X, He M, Wu T. Associations of plasma metal concentrations with the risks of all-cause and cardiovascular disease mortality in Chinese adults. *Environ Int.* 2021 Dec;157:106808. doi: 10.1016/j.envint.2021.106808.

FUNCTIONAL ACTIVITY AND BIO-ELEMENT STATUS OF RATS MYOCARDIAL MITOCHONDRIA UNDER CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION

E. G. Badun¹, A. V. Shuriberko¹, E. O. Kazinets¹, Y. E. Razvodovsky¹, A. V. Shulga², A. E. Kuzniatsou¹

¹ *Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Republic of Belarus*

² *Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus*

Background. Chronic alcohol intoxication (CAI) is accompanied by metabolic and structural changes in the tissue of the heart, which contribute to the disruption of its functional activity.

Objective: assessment of the functional activity and bioelemental status of rat myocardial mitochondria during chronic alcohol intoxication and the possibility of correcting its disorders with a composition of amino acids with microelements.

Materials and methods. The experiments were performed on 40 female Wistar rats (3 experimental groups and a control group). Studies were carried out on the activity of Krebs cycle enzymes, the respiratory chain, the respiratory activity of mitochondria, indicators of the antioxidant system, biochemical parameters and bioelemental status. Additionally, a morphological analysis of myocardial preparations was performed. To assess the mechanisms of correction of pathology in CAI, animals were administered a composition of L-glutamine, L-arginine hydrochloride with zinc sulfate and magnesium sulfate. Statistical data processing was performed using a package of applied statistical programs.

Results. CAI leads to changes in the bioelemental composition of blood, myocardium and myocardial mitochondria in rats. Disturbances in cellular metabolism, ion transport and homeostasis cause a decrease in energy production processes (enzymes of the tricarboxylic acid cycle and the mitochondrial respiratory chain of electron transport).

Conclusions. The use of a composition of amino acids with zinc and magnesium under conditions of CAI has a cardioprotective effect, restores ion transport and bioelement homeostasis in rat myocardial mitochondria.

Keywords: bioelements, alcohol intoxication, amino acids, mitochondria, myocardium.

For citation: Badun EG, Shuriberko AV, Kazinets EO, Razvodovsky YE, Shulga AV, Kuzniatsou AE. Functional activity and bio-element status of rats myocardial mitochondria under chronic alcohol intoxication. *Biochemistry and Molecular Biology.* 2024, vol. 3, no 1(4). pp. 186–195 (in Russian).

Поступила 15.04.2024

ОЦЕНКА АНАЛИТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК АВТОМАТИЧЕСКОГО КОАГУЛОМЕТРА DIAGON COAG M

Л. И. Алехнович¹, В. С. Камышников¹, Ю. И. Степанова², Т. И. Седова³

¹*Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения
УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь,*

²*Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины
УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь,*

³*Учреждение здравоохранения «Минская областная клиническая больница»,
г. Минск, Республика Беларусь*

Введение. Автоматические анализаторы состояния системы гемостаза являются неотъемлемой частью современной клинико-диагностической лаборатории. В связи с разработкой нового оборудования большое значение имеет возможность проведения достоверных и недорогих тестов, соответствующих критериям точности и воспроизводимости.

Цель – оценка аналитических характеристик анализатора гемостаза Diagon Coag M для рутинных исследований в клинико-диагностических лабораториях учреждений здравоохранения.

Материалы и методы. Исследование проведено на 25 образцах плазмы пациентов отделений терапевтического профиля УЗ «Минская областная клиническая больница», протестированных на анализаторах гемостаза ACL TOP 550 и Diagon Coag M. Одновременно оценивали воспроизводимость результатов на анализаторе Diagon Coag M. Выполняли рутинные клоттиновые тесты: ПВ с расчетом МНО, АЧТВ, ТВ, фибриноген.

Результаты. При сравнении коагулометров Diagon Coag M и ACL установлены значимые корреляционные связи для всех проведенных тестов ($r > 0,7$), что свидетельствует о высокой сходимости результатов. Воспроизводимость результатов, полученных на анализаторе Diagon Coag M, удовлетворяет международным стандартам и не превышает 2,1 %.

Заключение. Анализатор гемостаза Diagon Coag M является надежной системой, которую можно использовать для быстрого и точного проведения рутинных тестов гемостаза.

Ключевые слова: коагуляционный гемостаз, анализатор гемостаза, клоттинговые тесты, коагулометр, аналитические характеристики.

Для цитирования. Оценка аналитических характеристик автоматического коагулометра Diagon Coag M / Л. И. Алехнович [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. – 2024. – Т. 3, № 1(4). – С. 196–201.

Введение

Автоматические анализаторы состояния системы гемостаза являются неотъемлемой частью современной клинико-диагностической лаборатории. Результаты оценки коагуляционного гемостаза в клинико-диагностических лабораториях учреждений здравоохранения могут различаться вследствие большого количества производителей оборудования, представленного в Республике Беларусь [1]. Прежде всего, низкая воспроизводимость результатов коагулологических исследований может быть связана с различными методами детекции, реализованными в оборудовании (фотооптический, оптико-механический). Кроме того, на клиническую интерпретацию может влиять специфичность реагентов, конкретные алгоритмы анализа данных, технические особенности оборудования, различные типы определения конечных точек свертывания крови [1, 2, 3].

В связи с выходом на рынок нового оборудования большое значение имеет возможность проведения достоверных и недорогих тестов, соответствующих критериям точности и воспроизводимости, поэтому скрининговые показатели первой линии, включающие активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ), тромбиновое время (ТВ), фибриноген, должны отвечать международным стандартам и характеризоваться низкой чувствительностью к наличию интерферентов в образцах [3, 4, 5]. Различия в результатах также можно ожидать в связи с факторами преаналитического этапа, особенностями состава реагентов, методами калибровки, наличием в образце веществ, влияющих на конечный результат реакций [6, 7, 8].

Цель – оценка аналитических характеристик автоматического анализатора системы гемостаза средней производительности Diagon Coag M при выполнении рутинных клоттинговых тестов.

Материалы и методы

Для исследования случайным образом отбирали 25 образцов крови пациентов из отделений терапевтического профиля во время повседневной работы клинико-диагностической лаборатории УЗ «Минская областная клиническая больница». Пациенты были проинформированы об исследовании и давали свое согласие на его проведение. Взятие крови проводилось путем кубитальной венопункции с помощью вакутайнеров, содержащих 3,2 % цитрата натрия. Плазму получали центрифугированием при 1500g в течение 10 минут и анализировали не позднее 2 часов после получения. Образцы плазмы тестировали на анализаторе ACL TOP 550 (Instrumentation Laboratory, США) по следующим параметрам: АЧТВ, ПВ с расчетом международного нормализованного отношения (МНО), ТВ, фибриноген по Клаусу с использованием реагентов HemosIL (США), применяемых на платформах ACL Instrumentation Laboratory. Одновременно для сравнительного анализа результатов исследования все образцы аналогичным образом были протестированы на анализаторе Diagon Coag M (Венгрия). Оценку воспроизводимости анализатора Diagon Coag M проводили на 15 пулированных образцах крови пациентов.

Анализатор Diagon Coag M, установленный на кафедре клинической лабораторной диагностики Института повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет», является автоматическим четырехканальным коагулометром, выполняющим клоттинговые, хромогенные и иммунотурбидиметрические тесты оптическим методом. Анализатор позволяет одновременно загрузить на борт 30 образцов в штативах, 9 реагентов, 2 позиции контроля/срочных образцов, 250 одноразовых реакционных кювет. Использовали следующие реагенты производства компании Diagon Kft (Венгрия): рекомбинантный тромбопластин Dia-PT R для исследования ПВ, реагент Dia-PTT LIQUID для оценки АЧТВ, реагент Dia-FIB для определения содержания фибриногена по Клаусу, Dia-TT - для ТВ, а также контрольную плазму 2-х уровней Dia-CONT I-II. Все применяемые реагенты имеют заводские калибровочные кривые, которые автоматически учитываются программным обеспечением по штрих-кодам при регистрации на борту анализатора.

Статистический анализ данных проводили с помощью программы Statistica v10.0. Воспроизводимость данных, полученных двумя анализаторами гемостаза, оценивали с помощью параметриче-

ских и непараметрических методов с учетом типа их распределения, установленного с помощью критерия Колмогорова-Смирнова ($p > 0,05$). Данные представляли в виде среднего арифметического и стандартного отклонения, а также медианы и 25-75 квартилей. Корреляционный анализ проводили с помощью ранговой корреляции Спирмена с расчетом коэффициента корреляции (r). Различия выборок оценивали с помощью U критерия Манна-Уитни. Отличия результатов измерений представлены на графике по Бланду-Альтману, который используется для визуализации различий в измерениях между двумя разными инструментами или двумя разными методами измерения. Статистически значимыми являлись результаты при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Воспроизводимость или степень близости результатов, полученных на различных анализаторах с применением реагентов разных фирм-производителей, варьировалась в зависимости от изучаемых параметров, как показано на графиках Бланда-Альтмана (рисунок 1). Установлено наличие сильной близости между измерениями МНО и АЧТВ. При этом по ПВ (с) и ПВ по Квику (%), фибриногену согласие между измерениями было не столь выраженным. Наличие сильной степени близости между показателями МНО при менее выраженной согласованности самого протромбинового теста еще раз свидетельствует о стандартизации данного показателя, учитывающего международный индекс чувствительности (МИЧ) тромбопластина.

Результаты сравнительного анализа исследования рутинных показателей коагуляционного гемостаза на анализаторах Coag M и ACL TOP 550 представлены в таблице 1. Установлено, что медианы активности протромбинового комплекса по Квику и содержания фибриногена были достоверно ниже при работе на анализаторе Coag M. При этом зафиксированы прямые значимые взаимосвязи между уровнями всех изучаемых показателей, протестированных на разных приборах, что свидетельствует о их воспроизводимости.

Сходимость (качество измерений, отражающее близость друг к другу результатов измерений, выполняемых в одинаковых условиях) оценивали на пулированной плазме пациентов путем 15 повторных последовательных измерений (таблица 2). Полученные коэффициенты вариации не превысили 2,1 % по всем параметрам. С учетом критериев приемлемости 2 % или 5 % для коэффициента вариации по каждому отдельно взятому показателю, установленных производителем анализатора Coag M,

Таблица 1 – Сравнительный анализ результатов исследования показателей клоттинговых тестов на коагулометрах Coag M и ACL TOP 550

Table 1 – Comparative analysis of clotting test results on Coag M and ACL TOP 550 coagulometers

Показатель	Корреляция Спирмена, r	Медиана (25-75) квартили		p
		Coag M	ACL TOP 550	
ПВ, с	0,77 p= 0,001	12,4 (11,5-13,5)	11,8 (10,8-14,9)	НЗ
ПВ, %	0,77 p= 0,001	73 (63-85)	98 (70-114)	p=0,023
МНО	0,75 p= 0,014	1,17 (1,08-1,36)	0,99 (0,91-1,27)	НЗ
АЧТВ, с	0,65 p= 0,029	33,5 (30,7-37,6)	30,2 (28,3-35,3)	НЗ
ТВ, с	0,66 p= 0,025	14,20 (11,10-16,34)	14,51 (10,95-17,10)	НЗ
Фибриноген, г/л	0,92 p= 0,000	4,64 (3,57-6,73)	6,06 (4,98-9,04)	p=0,031

Примечание: p – различия с использованием U критерия Манна-Уитни, НЗ – различия не значимы

Note: p – differences using the Mann-Whitney U test, НЗ – differences are not significant

Таблица 2 – Оценка сходимости измерений на анализаторе Coag M

Table 2 – Assessment of measurements accuracy on Coag M analyzer

Показатель	Среднее	SD	CV%	Критерий приемлемости производителя для анализатора Coag M
ПВ (с)	13,57	0,29	2,1%	2%
ПВ (%)	62,39	2,31	1,7%	2%
МНО	1,28	0,03	2,0%	2%
АЧТВ (с)	35,14	0,59	1,7%	2%
АЧТВ-R	1,14	0,02	1,8%	2%
Фибриноген (г/л)	3,92	0,03	0,8%	5%
ТВ (с)	23,68	0,17	0,7%	5%
ТВ (%)	1,20	0,01	0,8%	5%

Примечание: SD – стандартное отклонение, CV% – коэффициент вариации

Note: SD – standard deviation, CV% – variation coefficient

полученные нами значения практически полностью им удовлетворяют. Стоит отметить, что критерии приемлемости установлены на основании измерений контрольной плазмы, в то время как в нашем исследовании проанализирован биоматериал пациентов.

Проведенное исследование продемонстрировало отсутствие значимых различий по рутинным клоттинговым тестам, проводимым в повседневной лабораторной практике. Оценка протромбинового времени является ведущим тестом для мониторинга пероральной антикоагулянтной терапии. Вариабельность реагентов тромбопластина приводит к большим внутрिलाбораторным и межлабораторным различиям в результатах [8, 10]. При этом значения ПВ, выраженные как протромбиновый индекс, процент активности в меньшей степени применимы для межлабораторных сравнений [8]. Для стандартизации данного теста используется расчет МНО, как математическая модель исключения влияния чув-

ствительности тромбопластина, так как межлабораторная вариация при сравнении ПВ в секундах и активности по Квику на различных приборах достаточно велика [12]. При этом определение среднего контрольного ПВ пользователем и локальная калибровка МИЧ может значительно снизить межлабораторную вариабельность, не зависимо от того, какой метод калибровки МИЧ используется [5, 11].

АЧТВ является одним из наиболее часто назначаемых тестов, при этом известно, что он имеет широкое распределение различий результатов, выраженных как в секундах, так и в соотношениях, приводя к тому, что в целом измерение АЧТВ приводит к разбегке результатов, которая может иметь клиническое значение [4]. АЧТВ не является стандартизированным тестом, и существует множество ограничений для его проведения. Например, дефицит плазменного фактора XII является наиболее частой причиной аномального удлинения АЧТВ (30–50 % всех случаев) [13, 14]. Кроме того,

некоторые патологические состояния (сепсис, злокачественные новообразования и атеросклероз) сопровождаются нарушением состояния гемостаза, что ведет к аномальным результатам клоттинговых тестов [13, 15]. Это всегда следует учитывать при интерпретации результатов АЧТВ. Методика измерения, используемая в автоматических анализаторах (механических и оптических), также способствует разбросу результатов испытаний [13]. Для достижения максимальной диагностической ценности теста АЧТВ предлагается устанавливать локальные референтные интервалы для конкретных измерительных режимов, а также оценивать правильность получаемого результата визуальным анализом кривой реакции [4].

Поскольку концентрацию фибриногена на анализаторе Coag M определяли по методу Клауса, а в анализаторе ACL TOP 550 использовался расчетный метод определения фибриногена, то сравнивать полученные медианные значения нецелесообразно. Однако между уровнями фибриногена, определенными различными методами на анализаторах Coag M и ACL, была выявлена сильная корреляционная зависимость, что свидетельствует о сопоставимости полученных разными методами данных. Ранее было показано, что значения расчетного фибриногена, полученные с помощью ПВ, были значительно выше, чем результаты исследования фибриногена по Клаусу [16, 17]. Расхождение было выше в группах пациентов, получавших пероральные антикоагулянты. В некоторых случаях у пациентов с подтвержденной гипофибриногемией и/или дисфибриногемией расчетный фибриноген, основанный на ПВ, находился в пределах нормы, тогда как тестирование по Клаусу фиксировало более низкие уровни фибриногена [16]. Следует заключить, что расчетный метод на

основе детекции протромбинового времени можно эффективно использовать для определения фибриногена, когда основной диагностической задачей является прогнозирование повышенного риска сосудистых осложнений, связанных с высокими уровнями фибриногена в плазме крови [16].

Анализ сходимости полученных результатов с точки зрения неточности и систематической ошибки в целом соответствует рекомендациям Института клинических и лабораторных стандартов [18].

Однако наше исследование имело несколько ограничений. Во-первых, ограниченный объем выборки исследованных образцов без учета клинической картины. Во-вторых, нами рассматривались только рутинные тесты, исследования специфических гемостатических аналитов не проводились, поэтому необходимы дальнейшие исследования, с включением широкого спектра специальных тестов для оценки состояния коагуляционного гемостаза. При этом полученные на коагулометре Coag M результаты полностью сопоставимы с результатами, полученными на анализаторах премиального сегмента, такими как ACL TOP 550, за исключением концентрации фибриногена, что обусловлено разными методами его детекции на данных анализаторах.

Заключение

В результате проведенного исследования установлено, что аналитические характеристики (воспроизводимость, сходимость, коэффициенты вариации) автоматического анализатора гемостаза Coag M (DIAGON, Венгрия) обладают удовлетворительной диагностической эффективностью для проведения рутинных клоттинговых тестов гемостаза в клинико-диагностических лабораториях учреждений здравоохранения.

Список цитированных источников

1. Favalaro, E. J. On the complexity of hemostasis and the need for harmonization of test practice/ E. J. Favalaro, G. Lippi// Clin. Chem. Lab. Med. – 2018. – Vol. 56. – P. 1568–1574. doi:10.1515/cclm-2018-0174.
2. Lippi, G. Technological advances in the hemostasis laboratory/ G. Lippi, M. Plebani, E. J. Favalaro// Semin. Thromb. Hemost. – 2014. – Vol. 40. – P.178-85. doi: 10.1055/s-0033-1364206.
3. Standardization of Prothrombin Time/International Normalized Ratio (PT/INR) / A. Dorgalaleh [et al.] // Int. J. Lab. Hematol. – 2020. –Vol. 12. – P. 1–8. doi: 10.1111/ijlh.13349.
4. Milos, M. Discrepancies between APTT results determined with different evaluation modes on automated coagulation analyzers / M. Milos, D.Coen Herak, R. Zadro // Int. J. Lab. Hematol. – 2010. –Vol.32. –P.33–39. doi:10.1111/j.1751-553X.2008.01111.x.
5. International normalized ratio (INR) testing in Europe: between-laboratory comparability of test results obtained by Quick and Owren reagents / P. Meijer [et al.] // Clin. Chem. Lab. Med. – 2018. – Vol. 56. – P. 1698–1703. doi: 10.1515/cclm-2017-0976.
6. Effects of hemolysis, bilirubin, and lipemia interference on coagulation tests detected by two analytical systems / C. Nougier [et al.]// Int. J. Lab. Hematol. – 2020. – Vol. 42. – P. 88–94. doi:10.1111/ijlh.13147.
7. Kim, H. Influence of preanalytical variables on prothrombin time, activated partial thromboplastin time and fibrinogen / H. Kim, Y. Kim, H. K. Lee // Clin. Lab. – 2015. – Vol. 61. – P. 1337–1340. doi: 10.7754/clin.lab.2015.150231.
8. Performance testing of four automated coagulation analyzers in a university hospital setting with focus on global coagulation assays / R. A. Scherer-Burić [et al.] // Int. J. Lab. Hematol. – 2022. – Vol. 44. – P. 643–653. doi:10.1111/ijlh.13814.
9. Comparison of modes of prothrombin time reporting in patients with advanced liver disease associated with viral hepatitis / Y. Wei [et al.]// J. Thromb. Thrombolysis. – 2010. – Vol. 29. – P.81–86. doi:10.1007/s11239-009-0330-6.
10. Horsti, J. Poor agreement among prothrombin time international normalized ratio methods: comparison of seven

commercial reagents / J. Horsti, H. Uppa, J. A. Vilpo // *Clin. Chem.* – 2005. – Vol. 51. – P. 553–560. doi:10.1373/clinchem.2004.043836.

11. Local verification and assignment of mean normal prothrombin time and international sensitivity index values across various instruments: Recent experience and outcome from North America/ J. I. Tange. [et al.] // *Semin. Thromb. Hemost.* – 2014. – Vol. 40. – P.115–1120. doi:10.1055/s-0033-1363475.
12. Comparison of the PT/INR assay using two different reagents / A. A. Etem [et al.] // *Ann. Clin. Anal. Med.* – 2020. – Vol. 11. – P. 248–251. doi:10.4328/ACAM.20077.
13. Franchini, M. Diagnostics of inherited bleeding disorders of secondary hemostasis: an easy guide for routine clinical laboratories/ M. Franchini, E. Favaloro, G. Lippi // *Seminars in Thrombosis and Hemostasis.* – 2016. – Vol. 42. – P. 471–477. doi:10.1055/s-0036-1571311.
14. What should be the laboratory approach against isolated prolongation of a activated partial thromboplastin time? / M. Falay [et al.] // *Journal of Clinical Laboratory Analysis.* – 2018. – Vol. 32. – P. e22415. doi:10.1002/jcla.22415.
15. Reporting of activated partial thromboplastin time (aPTT): Could we achieve better comparability of the results? / A. Bronić [et al.] // *Biochem. Med. (Zagreb).* – 2021. – Vol. 31. – P. 020708. doi:10.11613/BM.2021.020708.
16. Comparison of the fibrinogen Clauss assay and the fibrinogen PT derived method in patients with dysfibrinogenemia / W. Miesbach [et al.] // *Thromb. Res.* – 2010. – Vol. 26. – P. e428-33. doi:10.1016/j.thromres.2010.09.004.
17. Use of fibrinogen determination methods in differential diagnosis of hypofibrinogenemia and dysfibrinogenemia / I. Skornova [et al.] // *Clin. Lab.* – 2021. – Vol. 67. – P. 334–339. doi:10.7754/Clin.Lab.2020.200820.
18. Wayne, P. A. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures; approved guideline. Third Edition. – CLSI: Document EP05-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014. – 123 p.

References

- 1 Favaloro E, Lippi G. On the complexity of hemostasis and the need for harmonization of test practice. *Clin Chem Lab Med.* 2018 Feb 12; 56(10):1568-574. doi:10.1515/cclm-2018-0174.
- 2 Lippi G, Plebani M, Favaloro E. Technological advances in the hemostasis laboratory. *Semin Thromb Hemost.* 2014 Dec 23; 40(2):178-85. doi: 10.1055/s-0033-1364206.
- 3 Dorgalaleh A, Favaloro E, Bahraini M, Rad F. Standardization of Prothrombin Time/International Normalized Ratio (PT/INR). *Int J Lab Hematol.* 2020 Oct 04; 12(1):1-8. doi: 10.1111/ijlh.13349.
- 4 Milos M, Coen Herak D, Zadro R. Discrepancies between APTT results determined with different evaluation modes on automated coagulation analyzers. *Int J Lab Hematol.* 2010 Feb 18; 32(1): 33-9.
- 5 Meijer P, Kynde K, van den Besselaar A, Van Blerk M, Woods T. International normalized ratio (INR) testing in Europe:

between-laboratory comparability of test results obtained by Quick and Owren reagents. *Clin Chem Lab Med.* 2018 Nov 25; 56(10): 1698-703. doi: 10.1515/cclm-2017-0976.

- 6 Nougier C, Jousset E, Sobas F, Pousseur V, Négrier C. Effects of hemolysis, bilirubin, and lipemia interference on coagulation tests detected by two analytical systems. *Int J Lab Hematol.* 2020 Oct 06; 42(1):88-4.
- 7 Kim H, Kim Y, Lee H. Influence of preanalytical variables on prothrombin time, activated partial thromboplastin time and fibrinogen. *Clin Lab.* 2015 May 31; 61(9):1337-340.
- 8 Scherer-Burić R, Lesser-Wetzold K, Nagel D. Performance testing of four automated coagulation analyzers in a university hospital setting with focus on global coagulation assays. *Int J Lab Hematol.* 2022 Oct 13; 44(3):643-653.
- 9 Wei Y, Zheng D, Xiao L. Comparison of modes of prothrombin time reporting in patients with advanced liver disease associated with viral hepatitis. *J Thromb Thrombolysis.* 2010 Feb 11; 29(1):81-6.
- 10 Horsti J, Uppa H, Vilpo J. Poor agreement among prothrombin time international normalized ratio methods: comparison of seven commercial reagents. *Clin Chem.* 2005 Oct 10; 51(1): 553-60.
- 11 Tange J, Grill D, Koch C, Tern R. Local verification and assignment of mean normal prothrombin time and international sensitivity index values across various instruments: Recent experience and outcome from North America. *Semin Thromb Hemost.* 2014 Nov 22; 40(1):115-20.
- 12 Etem A, Etem E, Mızrak S. Comparison of the PT/INR assay using two different reagents. *Ann Clin Anal Med.* 2020 May 12; 11(4):248-51.
- 13 Franchini M, Favaloro E, Lippi G. Diagnostics of inherited bleeding disorders of secondary hemostasis: an easy guide for routine clinical Laboratories. *Semin Thromb Hemost.* 2016 Dec 22; 42(05): 471-77.
- 14 Falay M, Senes M, Yücel D. What should be the laboratory approach against isolated prolongation of activated partial thromboplastin time? *J Clin Lab Anal.* 2018 Nov 20; 32(6): e22415.
- 15 Bronić A, Margetić S, Herak D. Reporting of activated partial thromboplastin time (aPTT): Could we achieve better comparability of the results? *Biochem Med (Zagreb).* 2021 May 15; 31(2): 020708.
- 16 Miesbach W, Schenk J, Alesci S. Comparison of the fibrinogen Clauss assay and the fibrinogen PT derived method in patients with dysfibrinogenemia. *Thromb Res.* 2010 Feb 03; 26(6): e428-33.
- 17 Skornova I, Simurda T, Stasko J, Redova E. Use of fibrinogen determination methods in differential diagnosis of hypofibrinogenemia and dysfibrinogenemia. *Clin Lab.* 2021 Sep 23; 67(4): 334-39.
- 18 Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures; approved guideline. 3d ed. CLSI document EP05-A3. Wayne P: Clin and Lab Stand Inst. 2014.

EVALUATION OF ANALYTICAL CHARACTERISTICS OF AUTOMATIC COAGULOMETER DIAGON COAG M

L. I. Aliakhnovich¹, V. S. Kamyshnikov¹, J. I. Stepanova², T. I. Siadova³

¹*Institute for Advanced Studies and Retraining of Healthcare Personnel of Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

²*Research Institute of Experimental and Clinical Medicine of Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

³*Health care institution «Minsk Regional Clinical Hospital», Minsk, Republic of Belarus*

Background. Automatic analyzers of the hemostasis system status are an integral part of a modern clinical diagnostic laboratory. In connection with the development of new equipment it is of great importance the ability to perform reliable and inexpensive tests which are the criteria of accuracy and reproducibility.

Objective is to evaluate the analytical characteristics of Diagon Coag M hemostasis analyzer for routine studies in clinical diagnostic laboratories of healthcare establishments.

Materials and methods. This study was carried out on 25 plasma samples at patients in the therapeutic departments of the Minsk Regional Clinical Hospital, tested on hemostasis analyzers ACL TOP 550 and Diagon Coag M. At the same time, the reproducibility of the results on the Diagon Coag M analyzer was assessed. Clotting tests were performed: PT with INR calculation, APTT, TT, fibrinogen.

Results. At comparing the Diagon Coag M and ACL coagulometers it were established significant correlations for all tests performed ($r>0.7$), which indicates a high convergence of results. The reproducibility of the results obtained on the Diagon Coag M analyzer meets international standards and does not exceed 2,1%.

Conclusions. The Diagon Coag M hemostasis analyzer is a reliable system that can be used to quickly and accurately perform routine hemostasis tests.

Keywords: coagulation hemostasis, hemostasis analyzer, clotting tests, coagulometer, analytical characteristics.

For citation: Aliakhnovich LI, Kamyshnikov VS, Stepanova JI, Siadova TI. Evaluation of analytical characteristics of automatic coagulometer Diagon Coag M. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2024, vol. 3, no 1(4). pp. 196–201 (in Russian).

Поступила 15.04.2024

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР *CitJ* КОНТРОЛИРУЕТ УТИЛИЗАЦИЮ ЦИТРАТА, АРАБИНОЗЫ И ВИРУЛЕНТНОСТЬ ФИТОПАТОГЕНА *PECTOBACTERIUM VERSATILE*

Ю. В. Дюбо, М. А. Шарангович, Е. А. Николайчик
Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Введение. *Pectobacterium versatile* – экономически значимый фитопатоген, для которого переключение между утилизацией разных метаболитов растения критично по мере развития патосистемы. Ранее мы установили, что глобальный регулятор PhoP участвует в контроле генов утилизации цитрата и арабинозы, но не является их прямым транскрипционным регулятором.

Цель исследования – уайти транскрипционный регулятор утилизации цитрата и арабинозы у *P. versatile*.

Материалы и методы. Анализ транскрипционной регуляции *in silico* производили в программе SigmaID. Молекулярное клонирование осуществляли с помощью стандартных молекулярно-биологических техник (ПЦР, рестрикция, лигирование). Мутантный штамм получали методом конъюгационного переноса суицидной плазмиды с фрагментом инактивируемого гена. Вирулентность мутантного штамма оценивали по массе мацерированной ткани спустя 48 часов после внесения бактериальной суспензии в клубни картофеля.

Результаты. Среди семи PhoP-зависимых транскрипционных факторов анализ *in silico* выявил ген вероятного регулятора транскрипции генов утилизации цитрата и арабинозы. Мутант *citJ* не утилизировал арабинозу, демонстрировал вирулентность в клубнях картофеля на 24% ниже, чем штамм дикого типа. Опыты с репортёрной конструкцией позволили выявить трёхкратную репрессию промотора *araB* в присутствии гена *citJ* в среде с арабинозой.

Заключение. Транскрипционный фактор *CitJ* участвует в контроле утилизации цитрата и арабинозы в качестве конечного звена транскрипционного каскада, запускаемого двухкомпонентной системой PhoPQ, и необходим фитопатогену при заражении растений для оптимизации порядка утилизации субстратов по мере развития растительно-бактериальной патосистемы.

Ключевые слова: вирулентность, цитрат, арабиноза, транскрипционный фактор, *Pectobacterium versatile*.

Для цитирования. Транскрипционный фактор *citj* контролирует утилизацию цитрата, арабинозы и вирулентность фитопатогена *Pectobacterium versatile* / Ю. В. Дюбо, М. А. Шарангович, Е. А. Николайчик // Биохимия и молекулярная биология. – 2024. – Т. 3, № 1(4). – С. 202–210.

Введение

Pectobacterium spp. являются патогенами важнейших сельскохозяйственных культур. По актуальной классификации Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) этот род включает 22 вида. *Pectobacterium versatile* как отдельный вид был выделен из группы штаммов *Pectobacterium carotovorum* в 2019 г. на основании сравнительного анализа геномов [1]. Большинство штаммов, попавших в новый таксон, экспериментально не охарактеризованы, лишь небольшое количество экспериментальных работ использует изолированный в Финляндии штамм SCC3193 и белорусский изолят 3-2. Официальная таксономическая принадлежность этих двух изолятов неоднократно менялась в соответствии с уточнениями классификации пектобактерий, поэтому штамм 3-2 (объект настоящего исследования) в публикациях разных лет фигурирует как

Erwinia carotovora subsp. *atroseptica*, *Pectobacterium carotovorum* и *Pectobacterium versatile*.

Пектолитические энтеробактерии разных видов и даже родов используют сходные стратегии взаимодействия с растениями. Характерной общей особенностью этих бактерий является продукция целого спектра пектолитических экзоферментов, считающихся основными факторами вирулентности этих бактерий [2]. Успехи в изучении экзоферментов на долгое время определили представление о патогенезе с участием пектобактерий как о грубой атаке растения, основанной на массивной продукцией экзоферментов, быстром разрушении растительных клеточных стенок и утилизации высвобождающихся питательных веществ. Исследования регуляции этих процессов у *Dickeya dadantii* позволили выявить ключевые регуляторы пектинолиза (*KdgR*, *PecT*, *PecSM*) [3–5], но мало что добавили к пониманию общей картины пато-

генеза. Из регуляторов *Pectobacterium* spp., связанных с контролем взаимодействия с растением, в существенной степени исследована только система чувства кворума (регуляторы ExpR, VirR и RsmA/B) [6–8].

К настоящему моменту накопилась информация о более тонкой регуляции взаимодействия между пектобактериями и их растениями-хозяевами. Работа [9] обобщила разрозненные данные и указала важность для жизненного цикла пектобактерий латентных бессимптомных инфекций, а последующие работы начали детальную расшифровку молекулярных коммуникаций между растениями и пектобактериями [10–12]. Однако молекулярная сигнализация в патосистемах зачастую бывает довольно специфичной и может быть свойством только одного вида или даже штамма. Так, *P. atrosepticum* использует синтез коронафациевой кислоты – аналога стрессового гормона жасмоната – для перенастройки гормональных сигнальных путей растения при переходе от бессимптомной к симптоматической инфекции [13]. Однако объект настоящего исследования – *Pectobacterium versatile*, как и большинство других видов пектобактерий, не имеет кластера генов биосинтеза коронафациевой кислоты и не может использовать такой механизм.

Наша недавняя работа показала, что у *P. versatile* регулятор ответа PhoP совместно с сенсорной гистидиновой киназой PhoQ могут выступать в качестве переключателей уровней экспрессии генов в ответ на изменение концентраций ионов Ca²⁺ и Mg²⁺ [14]. А поскольку концентрация этих ионов низкая на начальной стадии развития патосистемы, но растет по мере разрушения клеточных стенок, двухкомпонентная система PhoPQ является удобным переключателем активностей многих генов, необходимых патогену на разных стадиях формирования патосистемы. В частности, PhoPQ непосредственно осуществляет противофазную регуляцию активностей двух основных деполимераз полигалактуроновой кислоты: активирует полигалактуроназу PehA и репрессирует пектатлиазу PelI, поэтому первый фермент активен на ранней стадии формирования патосистемы, авторой – в конце, уже на некротической стадии. Также PhoP является репрессором генов утилизации арабинозы и цитрата [14]. Такая регуляция должна обеспечивать первоочередную утилизацию галактуронатного компонента клеточной стенки, а затем уже арабинозного, а также общедоступного в растительных тканях цитрата. Однако нам не удалось выявить сайты связывания PhoP перед большинством генов утилизации цитрата и арабинозы, что

предполагает непрямую регуляцию посредством транскрипционного каскада.

Целью настоящей работы являлась идентификация в составе регулона PhoP транскрипционного фактора, ответственного за PhoP-зависимую регуляцию утилизации цитрата и (или) арабинозы.

Материалы и методы

Использованы бактерии *P. versatile* штамма JN42, являющегося производным изолированного в Беларуси штамма 3–2, а также *Escherichia coli* штаммов XL1-Blue и BW19851 [15]. Штаммы бактерий культивировали в жидкой или на агаризованной питательных средах при 28°C (*P. versatile*) или 37°C (*E. coli*) с антибиотиками в концентрациях 100 мкг/мл (ампициллин) и 20 мкг/мл (канамицин).

ОПС гена *citJ* (*OA04_29000*) амплифицирована с помощью пары праймеров 5'-АТАСАТАТGGCTTТААСGCCCTACAGACAAG и 5'-САТGТCGАССТGАТGАТТТGАGАССТТGCTG и клонирована в составе вектора экспрессии pFLAG-CTC по сайтам NdeI-SalI.

Для инактивации гена *OA04_29000* его фрагмент амплифицирован с помощью праймеров 5'-СССАТGCTСССGCGАТТАТ и 5'-GCTCGАССАGТАGCGGААА, клонирован в векторе pUC18 по сайтам KpnI-PaeI, затем субклонирован в суицидном векторе pJP5603 [16] по сайтам EcoRI-HindIII. Штамм JD3 с инактивацией *OA04_29000* получен в результате одиночного кроссинговера между полученной плазмидой pJP5603::'*OA04_29000*' и хромосомной копией гена.

Для конструирования pUA66::ParaF→В фрагмент локуса *araB-araF* амплифицирован с помощью праймеров 5'-СТТСТCGАGСТТТАТСАGCGААСТТСС и 5'-CGCGGАТСССAGCGАТТСААТАТАGТСС и клонирован в составе плазмиды pUA66 [17] по сайтам XhoI и BamHI.

Вирулентность бактерий оценивали на клубнях картофеля сорта Лилея, как описано в работе [18].

Для измерения репортёрной активности культуры *P. versatile* и *E. coli* в объеме 200 мкл инкубировали с аэрацией в ячейках микропланшета в среде MMA (NH₄Cl (5 г/л), NH₄NO₃ (1 г/л), Na₂SO₄ (0,9 г/л), K₂HPO₄ (3 г/л), KH₂PO₄ (1 г/л), MgSO₄ (0,5 мМ), глицерин (0,2 %)). Для индукции экспрессии *citJ* добавляли L-арабинозу до 0,5 % (среда MMA-A). Регистрацию флуоресценции и оптической плотности осуществляли с помощью микропланшетного мультимодального ридера CLARIOstar Plus. Интенсивность флуоресценции выражали в относительных единицах (RFU), рассчитанных путем нормализации значений флуоресценции по оптической плотности культуры.

Анализ аннотации, регуляторных элементов, визуализация геномных последовательностей и данных RNA-seq выполнялись средствами программы SigmaID [19]. Определение операторных мотивов для транскрипционных факторов выполняли с помощью модифицированного алгоритма Sahota и Stormo [20], реализованного в SigmaID версии 2.0 [21].

Для проверки утилизации цитрата ночные культуры *P. versatile* дважды отмывали 0,85% раствором NaCl, ресуспендировали в таком же растворе и доводили плотность полученной суспензии до $OD_{600}=1,5$. К 4 мл теплой полужидкой (0,8% агар-агара) среды Симмонса [22] (NH_4Cl 5г/л; NH_4NO_3 1г/л Na_2SO_4 2г/л; K_2HPO_4 5 г/л; KH_2PO_4 1г/л), содержащей 0,2% цитрата Na, 0,5 мМ $MgSO_4$ и 0,008% бромтимолового синего, добавляли 100 мкл суспензии клеток и инкубировали при температуре 28 °С в течение 4 суток.

Результаты и их обсуждение

В работе [14] продемонстрирован контроль экспрессии системой PhoPQ семи транскрипционных факторов (ТФ). Из них в качестве регуляторов целевых генов мало подходят OA04_13340 (сигма-фактор с известными мишенями, рассмотренными в [14]) и TerW (локальный регулятор генов устойчивости к теллуриду), а также AraC (не имеет сайтов связывания возле генов утилизации цитрата). Гены ТФ семейства LysR имеют относительно низкий уровень экспрессии (за исключением *cbl*), а инактивация гена *phoP* меняет их экспрессию слабо – менее, чем в три раза. Поэтому в качестве наиболее вероятных кандидатов на роль транскрипционных регуляторов утилизации арабинозы и цитрата мы рассматривали Cbl и OA04_29000.

Построение с помощью средств программы SigmaID скрытых марковских моделей (НММ) потенциальных операторных мотивов для Cbl и последующая идентификация с помощью этих НММ операторов Cbl в геномной последовательности *P. versatile* не выявили среди потенциальных мишеней гены утилизации цитрата или арабинозы, поэтому дальнейший анализ был сконцентрирован на гене OA04_29000, кодирующем транскрипционный фактор семейства GntR.

Реализованный ранее в рамках программы SigmaID подход к построению моделей операторных мотивов опирается на концепцию КО-тега – набора критичных аминокислотных остатков ДНК-связывающего домена, непосредственно контактирующих с азотистыми основаниями оператора. Метод позволяет находить наиболее веро-

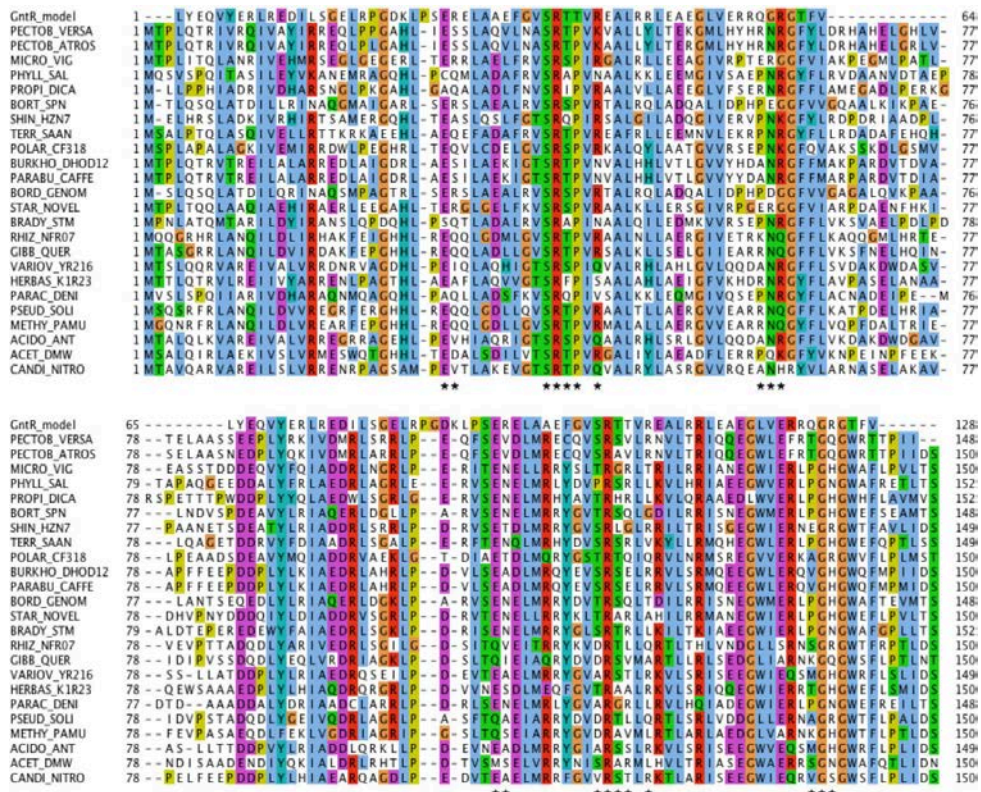
ятные модели операторных мотивов для экспериментально не охарактеризованных транскрипционных факторов, опираясь только на анализ консервативных участков регуляторных последовательностей, контролируемых ТФ с одинаковыми КО-тегами [21]. OA04_29000 имеет два ДНК-связывающих домена. Для такой структуры ТФ стандартный подход, реализованный ранее в программе SigmaID, не подходит. Поэтому для этого ТФ сконструирована новая НММ, покрывающая оба ДНК-связывающих домена одновременно.

Модель GntRx2 построена на основе выравнивания аминокислотных последовательностей гомологов OA04_29000, отобранных из наиболее удаленных таксономических групп (рисунок 1). Позиции критичных аминокислотных остатков в новой модели для каждого ДНК-связывающего домена соответствуют позициям аналогичных критичных аминокислотных остатков для модели с единственным ДНК-связывающим доменом ТФ семейства GntR для каждой из двух распознающих спиралей. Модель GntRx2 и версия программы SigmaID, обновленная для корректной работы с ТФ, имеющими два ДНК-связывающих домена, доступны через репозиторий по адресу <https://github.com/nikolaichik/SigmaID>.

С помощью конвейера поиска сайтов связывания ТФ *de novo* программы SigmaID найден потенциальный операторный мотив для транскрипционного фактора, кодируемого геном OA04_29000 (рисунок 2), который позволял идентифицировать операторы перед несколькими PhoP-зависимыми транскрипционными единицами, не имеющими операторов для PhoP.

К числу таких транскрипционных единиц относится одна (ген OA04_29010), потенциально связанная с утилизацией цитрата, и три, ответственных за утилизацию арабинозы (рисунок 3). Для контроля утилизации арабинозы ключевым может являться присутствие двух сайтов связывания в регуляторной области дивергона *araFGHC-araBA*, а также сайта связывания перед опероном *ytfRTyjfF*. Следует также отметить наличие авторегуляторного оператора в самом начале рамки считывания OA04_29000.

Для экспериментальной проверки участия OA04_29000 в контроле транскрипции генов утилизации арабинозы использована плазмидная конструкция с GFP-репортером под контролем промотора оперона *araBA*. Арабиноза многократно повышала репортёрную активность (рисунок 4а), что свидетельствует о функциональности промотора оперона *araBA* в составе плазмидной репортёрной конструкции.



Позиции критичных аминокислотных остатков отмечены звездочками
 Рисунок 1 – Множественное выравнивание ДНК-связывающих доменов гомологов транскрипционного фактора OA04_29000

The positions of critical amino acid residues are marked with asterisks (*)
 Figure 1 – Multiple alignment of DNA-binding domains of the transcription factor OA04_29000 homologues

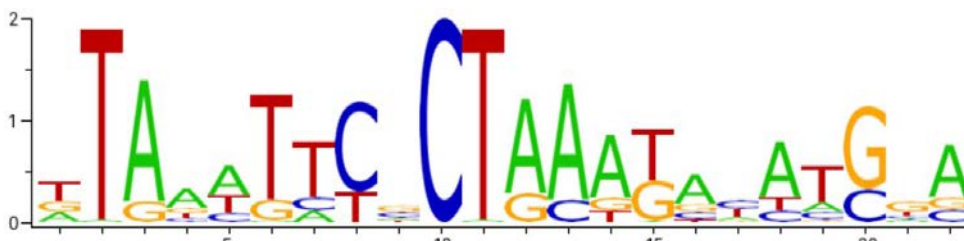
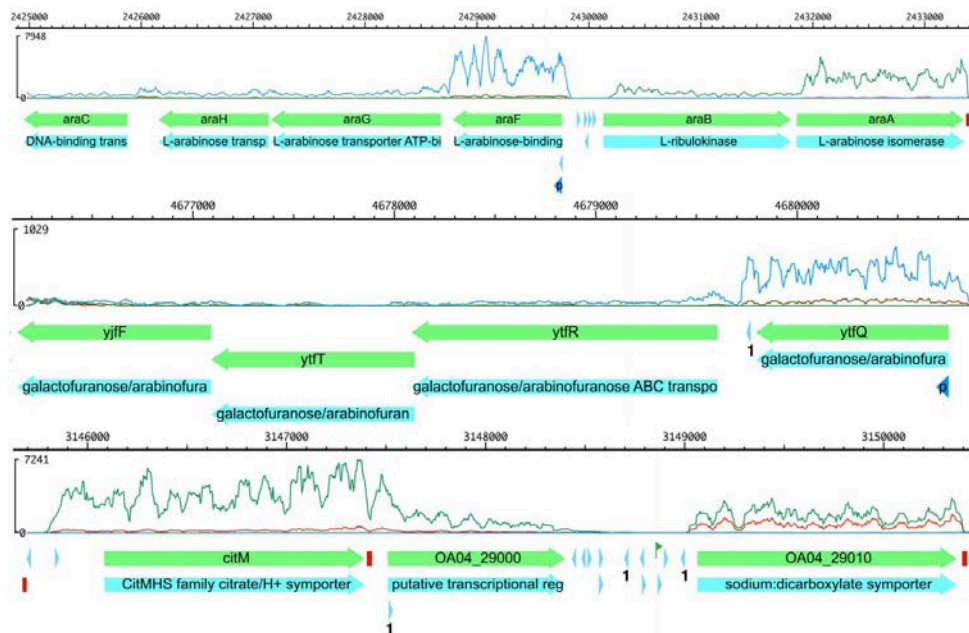


Рисунок 2 – Лого предполагаемого операторного мотива транскрипционного фактора OA04_29000
 Figure 2 – Sequence logo of the putative operator motif of the transcription factor OA04_29000

При совмещении в клетках *P. versatile* плазмиды p29000 с дополнительными копиями *OA04_29000* под контролем *tac*-промотора и репортерной плазмиды pUA66::ParaF→B в присутствии ИПТГ наблюдалась репрессорная активность *OA04_29000* по отношению к промотору оперона *araBA* (рисунок 4b). В клетках *E. coli* (рисунок 4c) для проявления репрессорной активности *OA04_29000* добавление ИПТГ не требовалось, а более высокий уровень экспрессии репортера (и более сильная репрессия в присутствии p29000) связаны с отсутствием в геноме *E. coli* ортолога исследуемого гена. Полученные данные подтверждают предположение о транскрипцион-

ном контроле генов утилизации арабинозы с помощью *OA04_29000*. В работе [14] мы зафиксировали, что PhoP примерно трехкратно активирует транскрипцию оперона *araBA* в присутствии арабинозы. Так как PhoP в соответствии с [14] является репрессором *OA04_29000*, а *OA04_29000* по данным настоящей работы – репрессором *araBA*, суммарное действие транскрипционного каскада PhoP → *OA04_29000* на активность промотора *araBA* является позитивным.

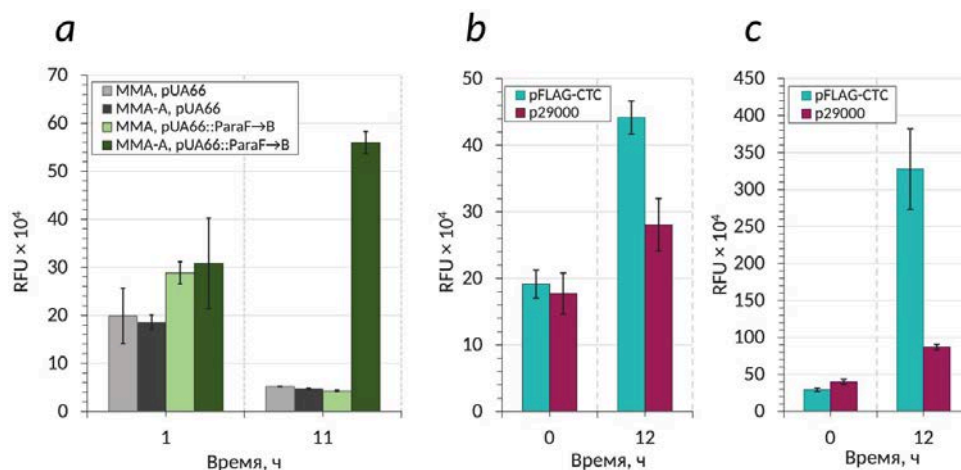
Гены бактериальных транскрипционных факторов часто располагаются рядом со своими мишенями, поэтому в поиске функций этого транскрипционного фактора мы проанализировали аннота-



Операторы обозначены голубыми треугольниками, терминаторы – красными прямоугольниками, промотор – зеленым флажком. Сайты связывания OA04_29000 подписаны цифрой 1. Графики глубины покрытия данными RNA-seq по данным работы [14] отображены зеленым и синим для *phoP*-мутанта (прямая и обратная цепи соответственно), красным и коричневым – для штамма *P. versatilis* дикого типа
 Рисунок 3 – Сайты связывания транскрипционного фактора OA04_29000 в регуляторных областях генов утилизации арабинозы и цитрата.

Operators are indicated by blue triangles, terminators by red rectangles, and promoters by a green flag. OA04_29000 binding sites are labeled with the number 1. RNA-seq data coverage depth graphs according to [14] are displayed in green and blue for the *phoP* mutant (forward and reverse strands, respectively), and red and brown for the wild-type *P. versatilis* strain

Figure 3 – Binding sites for the transcription factor OA04_29000 within the regulatory regions of the arabinose and citrate utilization genes



Приведены средние значения по 6-8 повторностям с 95-процентными доверительными интервалами
 Рисунок 4 – Интенсивность флуоресценции культур *P. versatilis* JN42 (a, b) с указанными плазмидами и *E. coli* XL-1 Blue pUA66::ParaF→B (c) в среде MMA (a) или MMA-A (b, c)

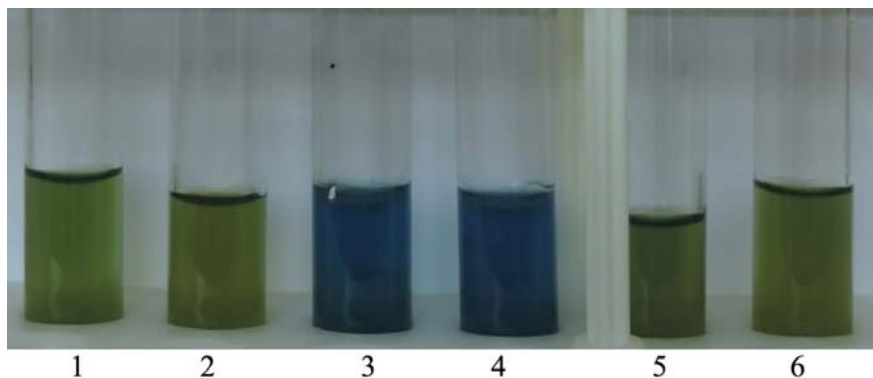
Average values from 6-8 replicates with 95% confidence intervals are shown
 Figure 4 – Fluorescence intensity in *Pectobacterium versatilis* JN42 (a, b) with the indicated plasmids and *E. coli* XL-1 Blue pUA66::ParaF→B (c) in MMA (a) or MMA-A (b, c) medium

цию соседних с OA04_29000 генов. Против хода транскрипции и, возможно, в одном опероне с OA04_29000 расположен ген *citM*, аннотированный как «CitMHS family citrate/H⁺ symporter», а по ходу транскрипции – моноцистронный оперон, чей единственный ген OA04_29010 аннотирован

как «sodium:dicarboxylate symporter». Функции обоим предполагаемым симпортерам присвоены на основании отдаленной гомологии, поэтому точные субстраты ни одного из них не известны. Однако, поскольку цитрат являлся одним из наиболее вероятных субстратов для одного или обоих симпортеров, мы проверили утилизацию цитрата штаммом с инсерционной инактивацией *OA04_29000*. Штамм *P. versatile* дикого типа в индикаторной среде Симмонса утилизировал цитрат с подщелачиванием среды, что приводило к изменению цвета индикатора бромтимолового синего

на синий, тогда как у мутантного штамма JD3 окраска среды не менялась (рисунок 5), что свидетельствует об участии продукта гена *OA04_29000* в контроле утилизации цитрата и дает нам основание предложить более информативное обозначение для его гена – *citJ*.

Инактивация *citJ* привела к умеренному (на 24%) снижению мацерирующей активности *P. versatile* (рисунок 6), что свидетельствует о важности метаболического контроля, осуществляемого CitJ, при взаимодействии с растением-хозяином.

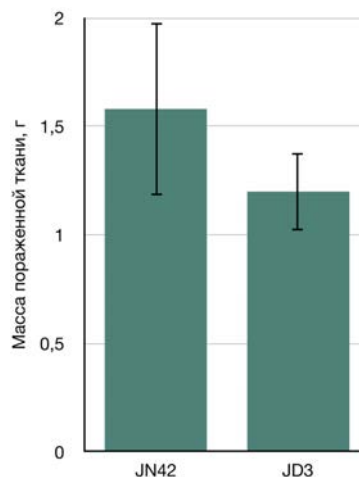


Бактерии штаммов JN42 (пробирки 3 и 4) и JD3 (пробирки 5 и 6) выращивали в среде Симмонса в течение 48 часов. В контрольные пробирки 1 и 2 бактериальные культуры не вносили
Рисунок 5 – Утилизация цитрата штаммами *P. versatile*

Strain JN42 (tubes 3 and 4) and JD3 (tubes 5 and 6) bacteria were grown in Simmons medium for 48 hours. No bacterial cultures were added to control tubes 1 and 2
Figure 5 – Citrate utilization by *P. versatile* strains

Заключение

Выполненный в настоящей работе анализ показал, что транскрипционный фактор CitJ необходим для проявления полной вирулентности фитопатогеном *Pectobacterium versatile*. Установлено, что CitJ контролирует утилизацию цитрата и влияет на экспрессию как минимум одного оперона утилизации арабинозы. Цитрат и арабиноза присутствуют в растительных клетках в достаточных количествах, однако вряд ли используются пектобактериями в начале инфекции, когда этот патоген предпочтительно утилизирует пектин. Участие CitJ в качестве конечного регулятора в транскрипционном каскаде, контролируемом двухкомпонентной системой PhoPQ, позволяет добиться активации утилизации цитрата и, возможно, арабинозы, только после существенного разрушения клеточных стенок пектолитическими ферментами и может быть полезно патогену для оптимизации очередности утилизации источников углерода и энергии. Определение полного состава регулона, контролируемого транскрипционным фактором CitJ,



Приведены средние значения с 95 % доверительным интервалом
Рисунок 6 – Интенсивность мацерации тканей клубней картофеля, инокулированных суспензиями клеток *Pectobacterium versatile* JN42 и его производного JD3 с инактивированным геном *citJ*

Average values with 95% confidence intervals are shown
Figure 6 – Intensity of maceration of tissues of potato tubers inoculated with cell suspensions of *Pectobacterium versatile* JN42 and its derivative JD3 with an inactivated *citJ* gene

и экспериментальная верификация распознаваемых им операторов позволит более четко уста-

новить роль CitJ в контроле вирулентности и других свойств *Pectobacterium versatile*.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке гранта БРФФИ Б22МС-026.

Acknowledgements

This work was supported by the BRFFR grant B22MS-026.

Список цитированных источников

1. Elevation of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* to species level as *Pectobacterium odoriferum* sp. nov., proposal of *Pectobacterium brasiliense* sp. nov. and *Pectobacterium actinidiae* sp. nov., emended description of *Pectobacterium carotovorum* and description of *Pectobacterium versatile* sp. nov., isolated from streams and symptoms on diverse plants / P. Portier [et al.] // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2019. – Vol. 69, № 10. – P. 3207–3216.
2. Production of Pectolytic Enzymes From *Erwinia* Grown On Different Carbon Sources / V.E. Shevchik [et al.] // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 1992. – Vol. 8, № 2. – P. 115–120.
3. The PecT repressor interacts with regulatory regions of pectate lyase genes in *Erwinia chrysanthemi* / A. Castillo [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* – 1998. – Vol. 1442, № 2-3. – P. 148–160.
4. Reverchon, S. pecS: a locus controlling pectinase, cellulase and blue pigment production in *Erwinia chrysanthemi* / S. Reverchon, W. Nasser, J. Robert-Baudouy // *Mol. Microbiol.* – 1994. – Vol. 11, № 6. – P. 1127–1139.
5. Nasser, W. Purification and functional characterization of the KdgR protein, a major repressor of pectinolysis genes of *Erwinia chrysanthemi* / W. Nasser, S. Reverchon, J. Robert-Baudouy // *Mol. Microbiol.* – 1992. – Vol. 6, № 2. – P. 257–265.
6. Hyytiäinen, H. Global regulators ExpA (GacA) and KdgR modulate extracellular enzyme gene expression through the RsmA-rsmB system in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* / H. Hyytiäinen, M. Montesano, E. T. Palva // *Mol Plant Microbe Interact.* – 2001. – Vol. 14, № 8. – P. 931–938.
7. Quorum Sensing in the Plant Pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: The Role of expREcc / R. A. Andersson [et al.] // *Mol. Plant. Microbe Interact.* – 2000. – Vol. 13, № 4. – P. 384–393.
8. Identification of the central quorum sensing regulator of virulence in the enteric phytopathogen, *Erwinia carotovora*: the VirR repressor / T. Burr [et al.] // *Mol. Microbiol.* – 2006. – Vol. 59, № 1. – P. 113–125.
9. Toth, I.K. Rotting softly and stealthily / I.K. Toth, P.R. Birch // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2005. – Vol. 8, № 4. – P. 424–429.
10. Pathogen-induced conditioning of the primary xylem vessels - a prerequisite for the formation of bacterial emboli by *Pectobacterium atrosepticum* / V. Y. Gorshkov [et al.] // *Plant Biol.* – 2016. – Vol. 18, № 4. – P. 609–617.
11. Dissociation of a population of *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 in tobacco plants: formation of bacterial emboli and dormant cells / V. Gorshkov [et al.] // *Protoplasma.* – 2014. – Vol. 251, № 3. – P. 499–510.
12. Plant Soft Rot Development and Regulation from the Viewpoint of Transcriptomic Profiling / I. Tsers [et al.] // *Plants.* – 2020. – Vol. 9, № 9. – P. 1176.
13. Transcriptome profiling helps to identify potential and true molecular switches of stealth to brute force behavior in *Pectobacterium atrosepticum* during systemic colonization of tobacco plants / V. Gorshkov [et al.] // *Eur. J. Plant Pathol.* – 2018. – Vol. 152, № 4. – P. 957–976.
14. The PhoPQ Two-Component System Is the Major Regulator of Cell Surface Properties, Stress Responses and Plant-Derived Substrate Utilisation During Development of *Pectobacterium versatile*-Host Plant Pathosystems / U. Kravchenko [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2021. – Vol. 11 – P. 621391.
15. Metcalf, W. W. Use of the rep technique for allele replacement to construct new *Escherichia coli* hosts for maintenance of R6K gamma origin plasmids at different copy numbers / W.W. Metcalf, W. Jiang, B.L. Wanner // *Gene.* – 1994. – Vol. 138, № 1–2. – P. 1–7.
16. Complete sequence of the suicide vector pJP5603 / T. Riedel [et al.] // *Plasmid.* – 2013. – Vol. 69, № 1. – P. 104–107.
17. A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli* / A. Zaslaver [et al.] // *Nat. Methods.* – 2006. – Vol. 3, № 8. – P. 623–628.
18. Николайчик, Е. А. Фитопатоген *Pectobacterium carotovorum* использует аппарат секреции III типа для блокирования системного защитного ответа растения-хозяина : Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем / Е. А. Николайчик, Л. Л. Хомская, Е. И. Игнатенко // *Труды БГУ.* – 2009. – Vol. 4 – P. 197–204.
19. Nikolaichik, Y. Sigmoid: a user-friendly tool for improving bacterial genome annotation through analysis of transcription control signals / Y. Nikolaichik, A. U. Damienikan // *PeerJ.* – 2016. – Vol. 4 – P. e2056.
20. Sahota, G. Novel sequence-based method for identifying transcription factor binding sites in prokaryotic genomes / G. Sahota, G. D. Stormo // *Bioinformatics.* – 2010. – Vol. 26, № 21. – P. 2672–2677.
21. Nikolaichik, Y. New approach to genome-wide automated inference of bacterial transcription factor binding sites / Y. Nikolaichik, P. Vychik // *Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/ Systems Biology.* – Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk State University, 2020. – P. 75–76.
22. Simmons, J. S. A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi. / J. S. Simmons // *J. Infect. Dis.* – 1926. – Vol. 39, № 3. – P. 209–214.

References

1. Portier P, Pédrón J, Taghouti G, Fischer-Le Saux M, Caullireau E, Bertrand C, et al. Elevation of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* to species level as *Pectobacterium odoriferum* sp. nov., proposal of *Pectobacterium brasiliense* sp. nov. and *Pectobacterium actinidiae* sp. nov., emended description of *Pectobacterium carotovorum* and description of *Pectobacterium versatile* sp. nov., isolated from streams and symptoms on diverse plants. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2019;69(10):3207–16. doi: 10.1099/ijsem.0.003611.
2. Shevchik VE, Evtushenkov AN, Babitskaya HV, Fomichev YK. Production of Pectolytic Enzymes From *Erwinia* Grown On Different Carbon Sources. *World J Microbiol Biotechnol.* 1992;8(2):115–20. doi: 10.1007/BF01195828.
3. Castillo A, Nasser W, Condemine G, Reverchon S. The PecT repressor interacts with regulatory regions of pectate lyase

- genes in *Erwinia chrysanthemi*. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1442(2–3):148–60. doi: 10.1016/S0167-4781(98)00158-4.
- 4 Reverchon S, Nasser W, Robert-Baudouy J. pecS: a locus controlling pectinase, cellulase and blue pigment production in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Microbiol*. 1994;11(6):1127–39. doi: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00389.x.
 - 5 Nasser W, Reverchon S, Robert-Baudouy J. Purification and functional characterization of the KdgR protein, a major repressor of pectinolysis genes of *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Microbiol*. 1992;6(2):257–65. doi: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb02007.x
 - 6 Hyytiäinen H, Montesano M, Palva ET. Global regulators ExpA (GacA) and KdgR modulate extracellular enzyme gene expression through the RsmA-rsmB system in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol Plant Microbe Interact*. 2001;14(8):931–8. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.8.931.
 - 7 Andersson RA, Eriksson ARB, Heikinheimo R, Mäe A, Pirhonen M, Kõiv V, et al. Quorum Sensing in the Plant Pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: The Role of expREcc. *Mol Plant Microbe Interact*. 2000;13(4):384–93. doi: 10.1094/MPMI.2000.13.4.384.
 - 8 Burr T, Barnard AML, Corbett MJ, Pemberton CL, Simpson NJL, Salmond GPC. Identification of the central quorum sensing regulator of virulence in the enteric phytopathogen, *Erwinia carotovora*: the VirR repressor. *Mol Microbiol*. 2006;59(1):113–25. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04939.x.
 - 9 Toth IK, Birch PR. Rotting softly and stealthily. *Curr Opin Plant Biol*. 2005;8(4):424–9. doi:10.1016/j.pbi.2005.04.001.
 - 10 Gorshkov VY, Daminova AG, Mikshina PV, Petrova OE, Ageeva MV, Salnikov VV, et al. Pathogen-induced conditioning of the primary xylem vessels - a prerequisite for the formation of bacterial emboli by *Pectobacterium atrosepticum*. *Plant Biol*. 2016 Jul;18(4):609–17. doi: 10.1111/plb.12448.
 - 11 Gorshkov V, Daminova A, Ageeva M, Petrova O, Gogoleva N, Tarasova N, et al. Dissociation of a population of *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 in tobacco plants: formation of bacterial emboli and dormant cells. *Protoplasma*. 2014;251(3):499–510. doi: 10.1007/s00709-013-0546-3.
 - 12 Tsers I, Gorshkov V, Gogoleva N, Parfirova O, Petrova O, Gogolev Y. Plant Soft Rot Development and Regulation from the Viewpoint of Transcriptomic Profiling. *Plants Eur J Plant Pathol*. 2020 Sep 10;9(9):1176. doi: 10.3390/plants9091176.
 - 13 Gorshkov V, Gubaev R, Petrova O, Daminova A, Gogoleva N, Ageeva M, et al. Transcriptome profiling helps to identify potential and true molecular switches of stealth to brute force behavior in *Pectobacterium atrosepticum* during systemic colonization of tobacco plants. *Eur J Plant Pathol*. 2018 May 9;152(4):957–76. doi: 10.1007/s10658-018-1496-6.
 - 14 Kravchenko U, Gogoleva N, Kalubaka N, Kruk A, Diubo Y, Gogolev Y, et al. The PhoPQ Two-Component System Is the Major Regulator of Cell Surface Properties, Stress Responses and Plant-Derived Substrate Utilisation During Development of *Pectobacterium versatile*-Host Plant Pathosystems. *Front Microbiol*. 2021;11:621391. doi: 10.3389/fmicb.2020.621391.
 - 15 Metcalf WW, Jiang W, Wanner BL. Use of the rep technique for allele replacement to construct new *Escherichia coli* hosts for maintenance of R6K gamma origin plasmids at different copy numbers. *Gene*. 1994;138(1–2):1–7. doi: 10.1016/0378-1119(94)90776-5.
 - 16 Riedel T, Rohlf M, Buchholz I, Wagner-Döbler I, Reck M. Complete sequence of the suicide vector pJP5603. *Plasmid*. 2013;69(1):104–7. doi: 10.1016/j.plasmid.2012.07.005.
 - 17 Zaslaver A, Bren A, Ronen M, Itzkovitz S, Kikoin I, Shavit S, et al. A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*. *Nat Methods*. 2006;3(8):623–8. doi: 10.1038/nmeth895.
 - 18 Nikolajchik EA, Homskaja LL, Ignatenko EI. Fitopatogen *Pectobacterium carotovorum* ispol'zuet apparat sekrecii III tipa dlja blokirovanija sistemnogo zashhitnogo otveta rastenija-hozjaina. *Trudy BGU*. 2009;4:197–204.
 - 19 Nikolaichik Y, Damienikan AU. Sigmoid: a user-friendly tool for improving bacterial genome annotation through analysis of transcription control signals. *PeerJ*. 2016 May 24;4:e2056. doi: 10.7717/peerj.2056.
 - 20 Sahota G, Stormo GD. Novel sequence-based method for identifying transcription factor binding sites in prokaryotic genomes. *Bioinformatics*. 2010 Nov 1;26(21):2672–7. doi: 10.1093/bioinformatics/btq501.
 - 21 Nikolaichik Y, Vychik P. New approach to genome-wide automated inference of bacterial transcription factor binding sites. In: *Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology*. Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk State University; 2020. p. 75–6. doi: 10.18699/BGRS/SB-2020-046.
 - 22 Simmons JS. A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi. *J Infect Dis*. 1926;39(3):209–14.

TRANSCRIPTION FACTOR CITJ CONTROLS UTILIZATION OF CITRATE, ARABINOSE AND VIRULENCE OF PLANT PATHOGEN PECTOBACTERIUM VERSATILE

*Yu. V. Dubo, M. A. Sharangovich, E. A. Nikolaichik
Belarusian State University, Minsk, Belarus*

Background. *Pectobacterium versatile* is an economically significant plant pathogen that has to switch between the utilisation of different plant metabolites as the pathosystem develops. Previously, we found that the global regulator PhoP indirectly controls the citrate and arabinose utilization genes.

Objective. To identify the direct transcriptional regulator of citrate and arabinose utilization in *P. versatile*.

Materials and Methods. *In silico* analysis of transcriptional regulation was performed using the Sigmoid program. Molecular cloning was carried out using standard molecular biology techniques (PCR, restriction digestion, ligation). The mutant strain was obtained by conjugative transfer of a suicide plasmid with a fragment of an inactivated gene. The virulence of the mutant strain was assessed by the mass of macerated tissue 48 hours after adding the bacterial suspension to potato tubers.

Results. Among the seven PhoP-dependent transcription factors, the likely transcriptional regulator of citrate and arabinose utilization genes was identified via *in silico* analysis. The *citJ* mutant did not utilize arabinose and demonstrated virulence in potato tubers that was 24% lower than the wild type strain. Experiments with a reporter construct revealed threefold repression of the *araB* promoter in the presence of the *citJ* gene in arabinose-containing medium.

Conclusions. CitJ controls citrate and arabinose utilization at the final stage of the transcription cascade triggered by the two-component PhoPQ system, and is necessary for the pathogen when infecting plants, most likely to optimize the order of substrate utilization as the plant-bacterial pathosystem develops.

Keywords: virulence, citrate, arabinose, transcription factor, *Pectobacterium versatile*.

For citation: Dubo YuV, Sharangovich MA, Nikolaichik EA. Transcription factor *citj* controls utilization of citrate, arabinose and virulence of plant pathogen *pectobacterium versatile*. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2024, vol. 3, no 1(4). pp. 202–210 (in Russian).

Поступила 15.04.2024

THE POTENTIAL OF MODIFIED NUCLEOSIDES AND NUCLEOTIDES AS NOVEL ANTIBACTERIAL AGENTS: AN IN VITRO STUDY OF BACTERIAL GROWTH INHIBITION AND OXIDATIVE STRESS INDUCTION

A. G. Sysa, E. I. Kvasyuk, A. Shihad, E. R. Gritskevitch
Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

Background. The overuse of antibiotics in healthcare has caused the rise of antibiotic resistance. New antibacterial drugs are urgently needed to fight resistant bacteria. Nucleic acid derivatives show potential as antimicrobial agents.

Objective. The objective of this research is to evaluate the antibacterial characteristics of modified nucleosides and nucleotides in an *in vitro* setting.

Materials and methods. Research studied modified nucleosides/nucleotides from purine/pyrimidine bases. *P. mirabilis* and *B. cereus* cultures were used. Growth rate assessed via resazurin metabolism in 96-well plates. DCFH-DA probe measured ROS levels in treated cultures.

Results. The results demonstrated that all the examined compounds exhibited dose-dependent inhibitory effects on the growth of studied bacterial cultures. The incorporation of the antioxidant quercetin into the reagent mixture did not alter the efficacy of the compounds in suppressing bacterial cell growth. However, there was a universal elevation in intracellular ROS levels across all bacterial cultures exposed to the studied compounds, indicating that the antibacterial activity of these compounds may be related to their capacity to induce oxidative stress in bacterial cells.

Conclusions. The study demonstrated that modified nucleosides and nucleotides have promising antibacterial properties and may be useful as novel antibacterial agents.

Keywords: modified nucleosides, nucleotides, antibacterial activity, reactive oxygen species (ROS), oxidative stress, multidrug-resistant bacterial strains.

For citation: Sysa AG, Kvasyuk EI, Shihad A, Gritskevitch ER. The potential of modified nucleosides and nucleotides as novel antibacterial agents: an in vitro study of bacterial growth inhibition and oxidative stress induction. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2024, vol. 3, no 1(4). pp. 211–219.

Introduction

The extensive utilization of antibiotics in clinical settings marks the onset of a new era in the pharmacological management of infectious ailments. Nonetheless, within a relatively short timeframe, the efficacy of anti-infective agents against pathogenic microorganisms has notably diminished. The misuse of antibiotics has precipitated the emergence and swift dissemination of resistance among microorganisms [1, 2]. Presently, an escalating array of both known and novel bacterial strains are acquiring resistance to conventional therapeutic agents. As posited by a prevailing hypothesis, society is transitioning towards a post-antibiotic epoch where commonplace illnesses and minor injuries may pose fatal risks [3].

The majority of antibiotics in use today were identified prior to the 1970s, reflecting a limited exploration for novel antimicrobial agents attributed to the substantial financial and temporal commitments essential for drug commercialization, along with restricted approaches for pinpointing bioactive compounds [4]. Furthermore, a considerable

proportion of current antibiotics exhibit notable cytotoxic effects, constraining their applicability. Evidently, there is a pressing demand for the discovery of fresh antibacterial medications featuring novel modes of action to combat multidrug-resistant bacterial strains [5].

One of the understudied categories of substances with promising antimicrobial properties comprises derivatives of nucleic acid constituents: nucleosides, nucleotides, and their altered analogs. Nucleotides and nucleosides serve as the fundamental units of DNA and RNA, participating in protein synthesis, acting as cofactors in various biochemical pathways, and regulating the function of enzymes involved in nucleotide metabolism.

Modifying either the nucleic base or the sugar component of the nucleoside has the potential to impact enzyme recognition inhibition and the overall efficacy of the nucleoside in combating various pathogens. The utilization of nucleic acid derivatives and analogues has become increasingly prevalent in the realms of anticancer, antiviral, and, to a lesser

extent, antifungal therapies, as evidenced by studies conducted by A. E. J. Yssel et al. [6] and E. De Clercq et al. [7]. Notably, the realm of antibacterial activity has recently been unveiled in natural nucleosides, as highlighted in the research by Z. Cui [8] and M. Abbas et al. [9], along with their artificially synthesized counterparts studied by G. Seydlova et al. [10] and M. R. Bockman et al. [11]. This emerging field is currently experiencing rapid growth and significant advancements, as indicated by the works of M. Serpi et al. [12] and S. D. Negrya et al. [13].

The exploration of novel compounds exhibiting potential antibacterial properties within the realm of modified nucleosides and nucleotides, alongside the investigation into the molecular mechanisms underlying their efficacy, holds significant fundamental and practical relevance.

The objective of this research was to evaluate the antibacterial characteristics of various altered nucleosides and nucleotides in an *in vitro* setting. Additionally, the study aimed to examine their interactions with antioxidants to ascertain the potential for their application as drug substrates.

Material and Methods

The research focused on the modified nucleosides and nucleotides derived from purine and pyrimidine bases. All compounds were synthesized as described in [14, 15]. Purine nucleoside analogs included halogenated compounds at the nitrogenous base, such as 2-fluoro-arabinofuranosyladenine (fludarabine) and 2-amino-6-chloro-arabinofuranosylpurine (2-NH₂-6-Cl-ara-Pur). Pyrimidine nucleosides encompassed

sugar-modified arabinofuranosylcytosine (cytarabine, ara-C), featuring arabinose in lieu of ribose, and [1-(2',3',5'-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosyl)-4-(1,2,4-triazol-1-yl)]uracil (TTU), distinguished by modifications in both the carbohydrate fragment (three acetate groups) and the nitrogenous base (triazole at the 4th position) (Figure 1).

Gram-negative (*P. mirabilis*, *E. coli*) and gram-positive (*B. cereus*) bacterial cultures were incubated at 32°C for 24 hours. Cells were centrifuged, resuspended in pH 7.4 buffer, and OD₆₀₀ was measured. The initial concentration of 10⁸ cells/ml was diluted to 10⁷ cells/ml for testing compound activity.

Bacterial cultures' viability was assessed using resazurin metabolism in 96-well plates following Travnikova et al.'s method [16]. A 10 μL cell suspension with modified nucleosides/nucleotides was incubated for 24 h, then mixed with 200 μL of 20 μmol/L resazurin in pH 7.4 phosphate buffer. After 60 min, fluorescence intensity of resorufin (λ_{ex} = 520 nm, λ_{em} = 590 nm) was measured. Each concentration was tested in six replicates, and inhibitory effect was calculated as the ratio of fluorescence intensity in test wells to control wells without compounds.

A fluorescent probe DCFH-DA was used to measure intracellular ROS levels in bacterial cultures treated with test compounds. The cultures were incubated with DCFH-DA at 5 μm concentration in saline for 24 hours at 37 °C. ROS levels were determined fluorometrically at excitation 485 nm and emission 525 nm. Negative control included cultures without test compounds. The experiment was conducted in triplicate [17].

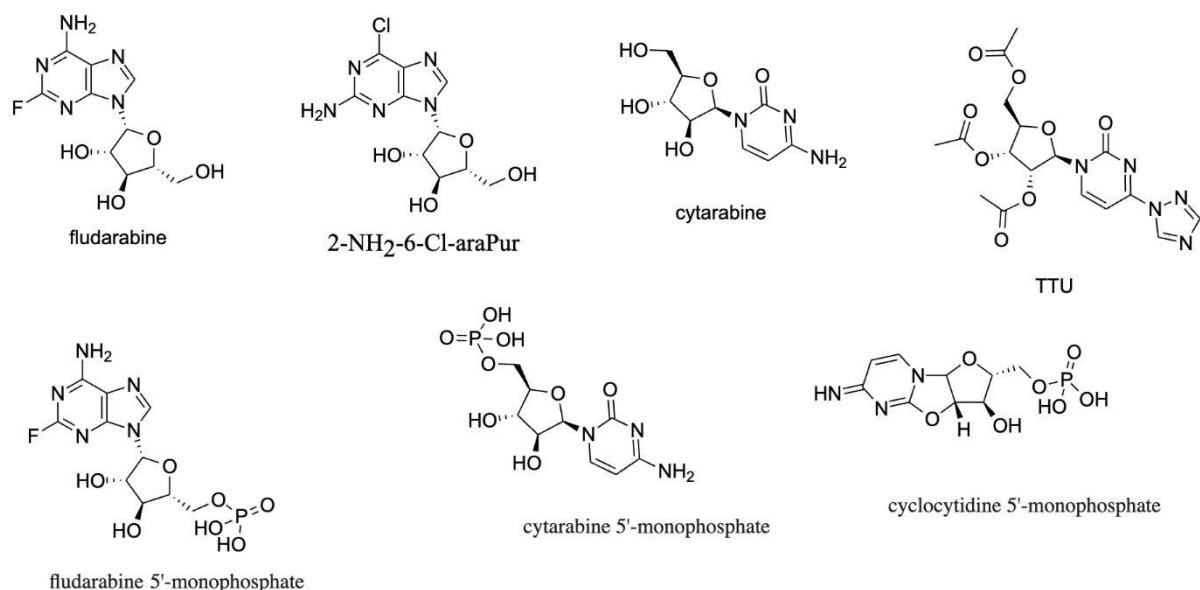


Figure 1 – The structure of the modified nucleosides and nucleotides used in the work

Рисунок 1 – Структурные формулы исследованных модифицированных нуклеозидов и нуклеотидов

Results and Discussion

All examined modified nucleosides and nucleotides demonstrated dose-dependent inhibitory effects on bacterial cultures during the exponential growth phase.

The impact of varying concentrations of modified purine nucleosides and a nucleotide in the absence of an antioxidant (A, B) compared to when equimolar amounts of an antioxidant are included (C, D) on the proliferation and antioxidative condition of *B. cereus* bacterial cells is studied.

Based on the data illustrated in Figure 2A, within the specified concentration range (10^{-5} – 10^{-3} M), all examined compounds led to a decline in *B. cereus* growth. The patterns of changes in cell growth suggest that the potency of the inhibitory impact on *B. cereus* growth, as indicated by the IC_{50} values, diminished in the fludarabine series ($1.48 \cdot 10^{-4}$ M) > fludarabine monophosphate ($2.64 \cdot 10^{-4}$ M) \approx 2-NH₂-6-Cl-ara-Pur ($2.77 \cdot 10^{-4}$ M).

Next, the impact of varying concentrations of modified purine nucleosides and a nucleotide in the absence of an antioxidant (A, B) compared to when equimolar amounts of an antioxidant are included

(C, D) on the proliferation and antioxidative condition of *P. mirabilis* bacterial cells is studied.

When the *P. mirabilis* cell culture is subjected to the tested substances at the same concentrations, the effectiveness of the compounds in inhibiting diminished in the order of 2-NH₂-6-Cl-ara-Pur ($2.43 \cdot 10^{-4}$ M) > fludarabine ($2.81 \cdot 10^{-4}$ M) \approx fludarabine monophosphate ($2.96 \cdot 10^{-4}$ M) as illustrated in figure 3A.

Upon examination of the suppressive effects of substances at a concentration of approximately 10^{-5} M, a decrease in growth of *B. cereus* cell culture by 5–10% and *P. mirabilis* cell culture by 10–20 % was observed. This suggests a heightened susceptibility of *P. mirabilis* cells to minimal levels of the substances tested.

It is well-established that in certain instances, the demise of bacterial cells ensues from an elevation in reactive oxygen species levels induced by antibacterial agents. The heightened presence of reactive oxygen species can result in impairment to iron-sulfur clusters, leading to the liberation of Fe²⁺ ions, which subsequently engage with hydrogen peroxide in the Fenton's

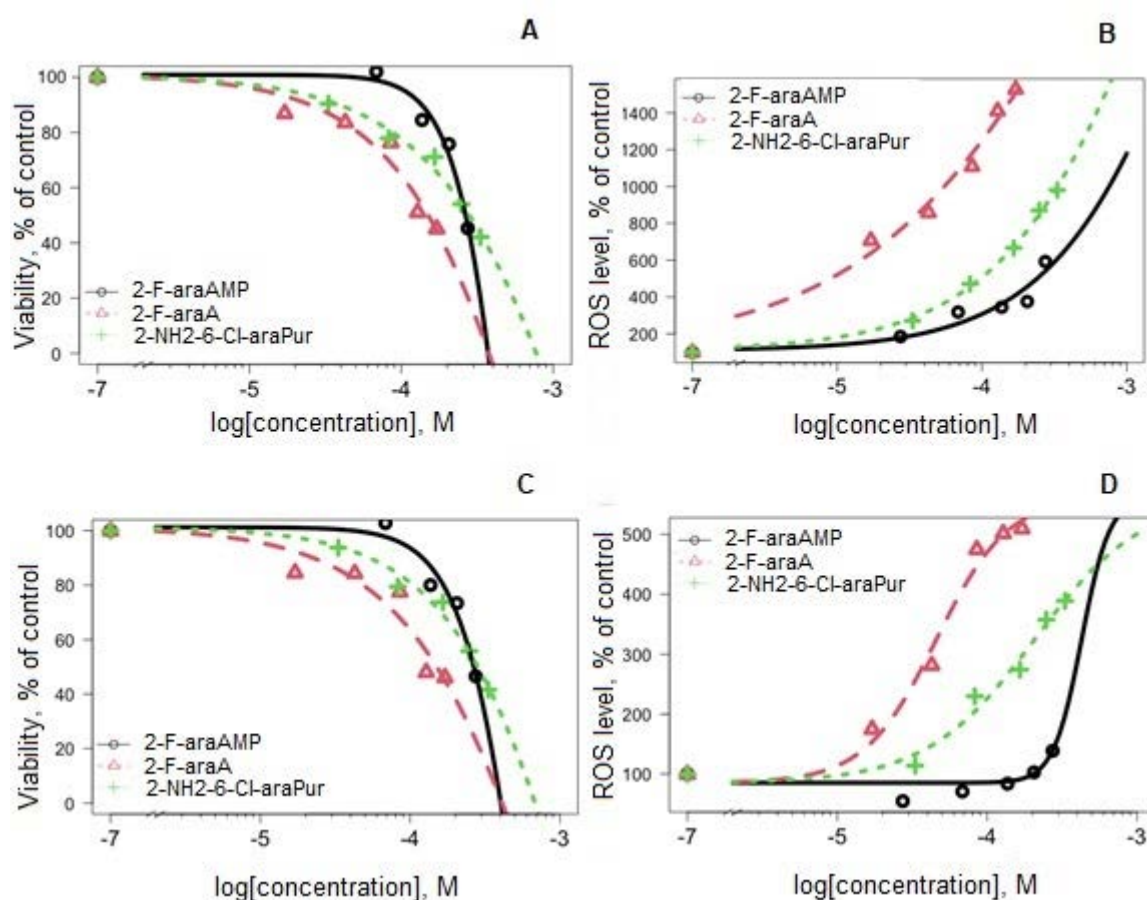


Figure 2 – Effects of different concentrations of modified purine nucleosides and a nucleotide on bacterial cells *B. cereus* growth and antioxidant status with and without equimolar quercetin

Рисунок 2 – Влияние различных концентраций модифицированных пуриновых нуклеозидов и нуклеотида на рост и антиоксидантный статус бактериальных клеток *B. cereus* с эквимоллярными антиоксидантами и без них

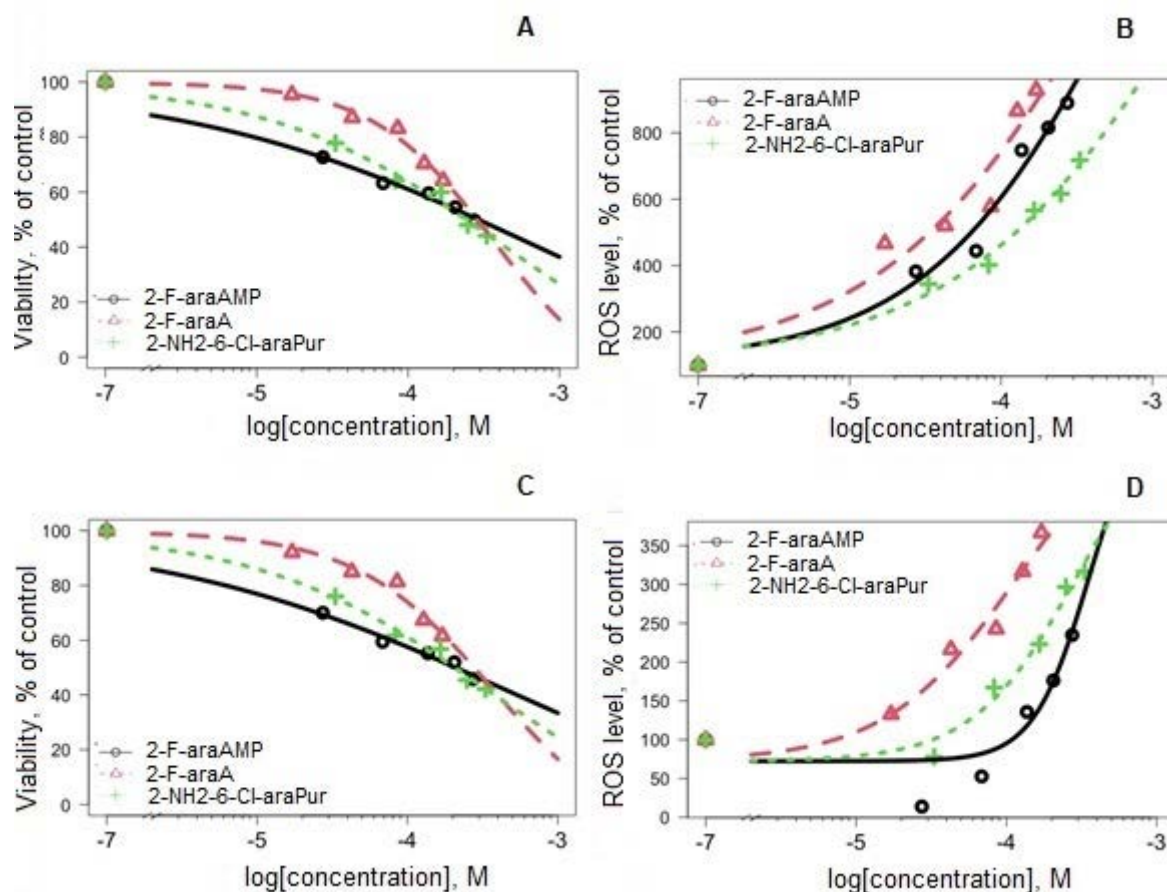


Figure 3 – Effects of different concentrations of modified purine nucleosides and a nucleotide on bacterial cells *P. mirabilis* growth and antioxidant status with and without equimolar quercetin

Рисунок 3 – Влияние различных концентраций модифицированных пуриновых нуклеозидов и нуклеотида на рост и антиоксидантный статус бактериальных клеток *P. mirabilis* с эквимоллярными антиоксидантами и без них

reaction. Consequently, a cascade process is initiated, generating hydroxyl radicals that have the potential to directly harm intracellular DNA, lipids, and proteins. To investigate the plausibility of the aforementioned antibacterial action mechanism, bacterial cultures were grown in the presence of the specified compounds at equivalent concentrations, with DCFH-DA utilized as a non-specific indicator to quantify reactive oxygen species levels. The findings demonstrated a substantial increase in reactive oxygen species levels across all bacterial cultures when cultivated with the compounds under study (See Figures 2B, 3B).

A number of conclusions can be drawn from the data presented in Figures 1B and 2B. First, fludarabine proved to be the most effective compound in increasing the level of reactive oxygen species when it acted on both bacterial cell cultures. Secondly, fludarabine demonstrated a more pronounced elevation in reactive oxygen species levels across all concentrations when targeting Gram-positive *B. cereus* cells. Moreover, a notable exponential surge in reactive oxygen species levels was observed for both bacterial cultures upon reaching concentrations of 0.1 μM for all compounds

investigated, aligning with the IC_{50} values derived from growth inhibition data. Notably, fludarabine phosphate exhibited the lowest efficacy in inducing reactive oxygen species levels in *B. cereus* cultures, while 2-amino-6-chloro-arabinofuranosylpurine was the most effective in *P. mirabilis* cultures among the compounds examined.

The incorporation of the antioxidant quercetin into the reagent mixture did not alter the efficacy of the compounds in suppressing bacterial cell growth (Figures 2C and 3C). Concurrently, there was a universal elevation in reactive oxygen species levels across all bacterial cultures exposed to the studied compounds; however, growth dynamics were comparatively subdued in the presence of the antioxidant (Figures 2D and 3D). Notably, the most potent combination, fludarabine with quercetin, led to a modest five-fold rise in intracellular reactive oxygen species levels (a three-fold reduction compared to the antioxidant-free experiment), while the least effective combination, fludarabine monophosphate with quercetin, exhibited minimal impact on reactive oxygen species levels.

Next, the impact of varying concentrations of modified pyrimidine nucleosides and nucleotides in the absence of an antioxidant (A, B) compared to when equimolar amounts of an antioxidant are included (C, D) on the proliferation and antioxidative condition of *B. cereus* bacterial cells was studied.

The trends observed in cell growth alterations suggest a diminishing efficacy in the inhibitory impact of pyrimidine derivatives on *B. cereus* cell growth in the following order: ara-CMP ($IC_{50}=1.85 \cdot 10^{-4}$ M) > TTU ($IC_{50} = 4.22 \cdot 10^{-4}$ M) > cyclo-CMP ($IC_{50} = 5.65 \cdot 10^{-4}$ M) > ara-C ($IC_{50} = 6.41 \cdot 10^{-4}$ M). Concurrently, the capacity of these compounds to induce reactive oxygen species production was escalated accordingly (Figures 4A and 4B).

The following investigation examines the influence of different levels of modified pyrimidine nucleosides and nucleotides on the growth and antioxidant status of *P. mirabilis* bacteria in two scenarios: without an antioxidant (A, B) and with equimolar quantities of an antioxidant (C, D).

Under the influence of pyrimidine series compounds at equivalent concentrations on *P. mirabilis* cells, the

inhibitory efficacy of the compounds showed a decreasing trend within the series TTU ($IC_{50} = 2.94 \cdot 10^{-4}$ M) > cyclo-CMP ($IC_{50} = 4.04 \cdot 10^{-4}$ M) > ara-C ($IC_{50} = 6.45 \cdot 10^{-4}$ M) > ara-CMP ($IC_{50} = 2.32 \cdot 10^{-2}$ M). Furthermore, the pattern of changes in cell viability in the presence of ara-CMP deviated from the dose-response models established for the other compounds (Figure 5A).

The minimal rise in reactive oxygen species occurred in the presence of ara-CMP (4-fold), contrasting with ara-C and ara-CMP which led to a 10-fold and cyclo-CMP an 8-fold elevation in reactive oxygen species levels, as depicted in Figure 5B.

Quercetin did not impact the antibacterial activity of modified nucleosides and pyrimidine nucleotides (Figures 4C and 5C); however, it attenuated their capacity for upregulation (Figures 4D–5D). The most potent compound in inhibiting the growth of *B. cereus* cells, ara-CMP, when combined with quercetin, led to a seven-fold increase in intracellular reactive oxygen species levels (a 1.7-fold decrease compared to the experiment conducted without the antioxidant). Notably, cyclo-CMP exhibited relatively lower levels

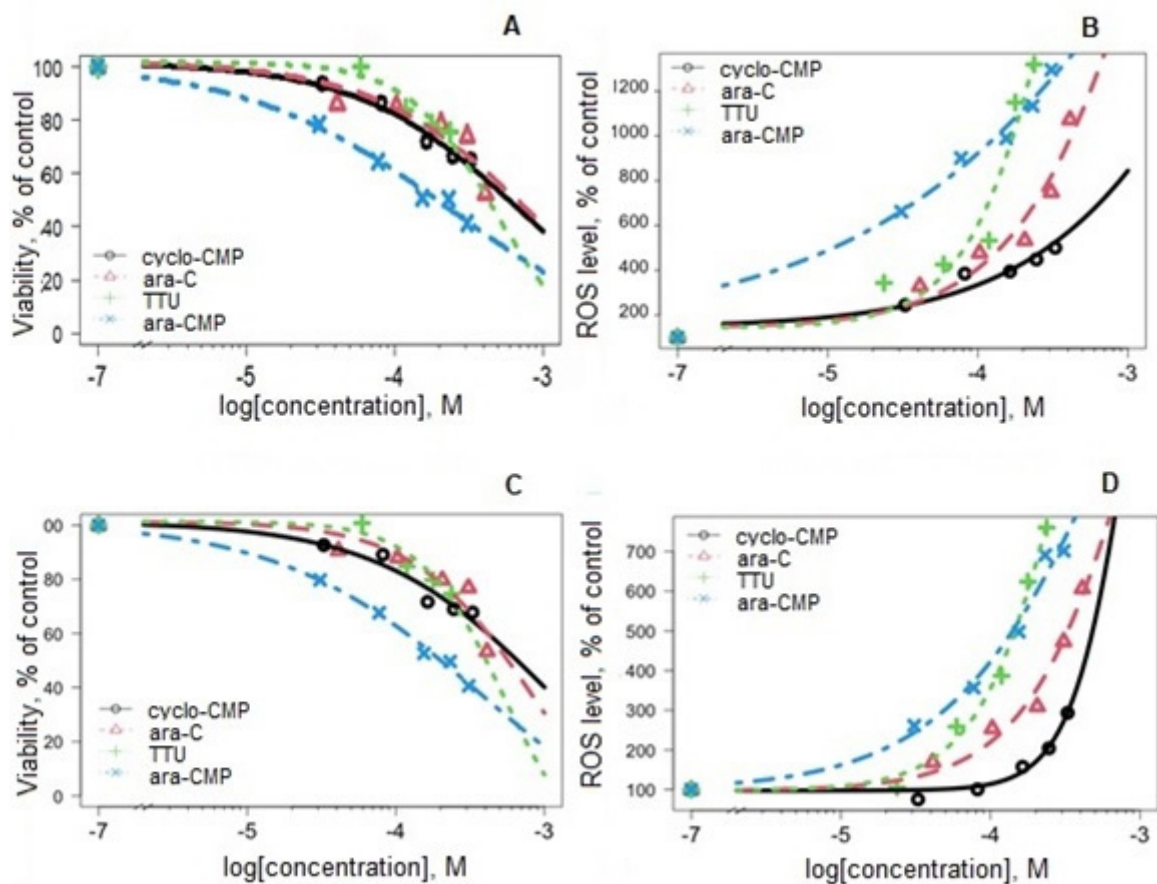


Figure 4 – Effects of different concentrations of modified pyrimidine nucleosides and nucleotides on bacterial cells *B. cereus* growth and antioxidant status with and without equimolar quercetin

Рисунок 4 – Влияние различных концентраций модифицированных пиримидиновых нуклеозидов и нуклеотидов на рост и антиоксидантный статус бактериальных клеток *B. cereus* с эквимолярными антиоксидантами и без них

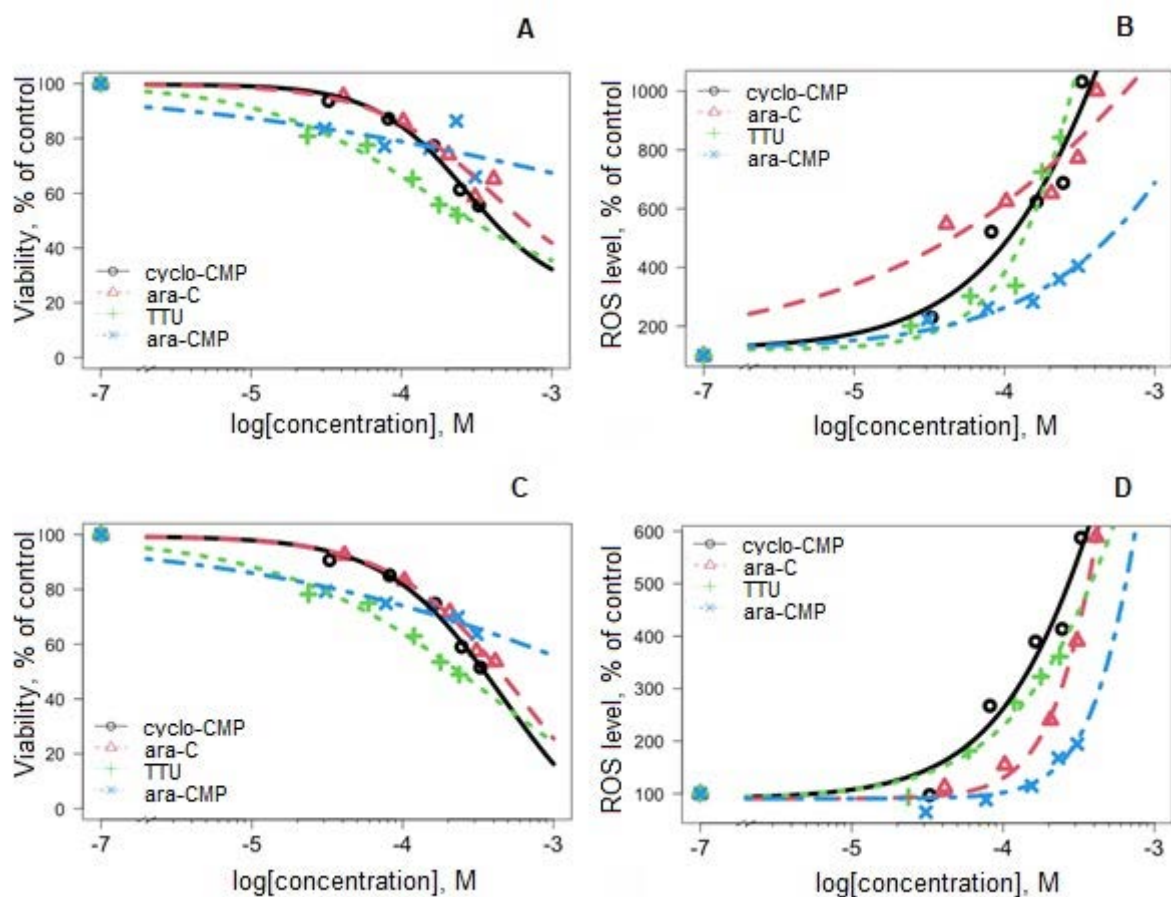


Figure 5 – Effects of different concentrations of modified pyrimidine nucleosides and nucleotides on bacterial cells *P. mirabilis* growth and antioxidant status with and without equimolar quercetin

Рисунок 5 – Влияние различных концентраций модифицированных пиридиноновых нуклеозидов и нуклеотидов на рост и антиоксидантный статус бактериальных клеток *P. mirabilis* с эквимольными антиоксидантами и без них

of reactive oxygen species: a four-fold increase under cultivation conditions without quercetin and a three-fold increase in the presence of the antioxidant (Figures 4B and 4D).

In the Gram-negative *P. mirabilis* culture, the compound ara-CMP exhibited the least impact on the relative levels of reactive oxygen species within the cells. A four-fold increase was observed without the addition of an antioxidant, and a two-fold increase was noted in its presence, aligning with the antibacterial activity data. Across the studied compounds at concentrations of 10^{-4} M and above, similar efficacy was observed concerning oxidative stress levels, with a rise in reactive oxygen species levels by 7–10 times. Notably, a higher sensitivity to the antioxidant quercetin was observed during the cultivation of *P. mirabilis* with ara-C at lower concentrations (below 10^{-4} M), resulting in only a 1.5-fold increase in reactive oxygen species levels, which is five times lower compared to a system without quercetin.

The outcomes derived from our investigation indicate that each of the substances demonstrates encouraging antibacterial efficacy, a quality that can

be linked to their capacity to trigger the generation of reactive oxygen species within bacterial cellular structures.

The mechanisms of action of these compounds, although requiring further investigation, are thought to involve interference with DNA synthesis, disruption of electron transport chains, and induction of DNA damage responses, ultimately leading to the generation of ROS and damage to intracellular components. Indeed, the generation of reactive oxygen species is a significant factor in the cytotoxic effects of these compounds. ROS, which include species such as superoxide radicals, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals, are highly reactive molecules that can cause damage to various cellular components, including proteins, lipids, and DNA. This damage can ultimately lead to cell death.

The observation that quercetin reduced levels of reactive oxygen species in bacterial cells exposed to the altered nucleosides and nucleotides is a noteworthy discovery that may be linked to its antioxidative characteristics. Quercetin's capacity to eliminate harmful free radicals, impede ROS generation, and

stimulate the activity of antioxidant enzymes probably plays a role in diminishing ROS concentrations within bacterial cells. Furthermore, this finding could have significant implications in the field of bacterial biology, particularly in understanding the mechanisms of oxidative stress in bacterial cells. The ability of quercetin to modulate oxidative stress in bacterial cells could also open up new avenues for the development of novel antimicrobial agents.

The specificity of action of these compounds towards bacterial cells is thought to be due to differences in cell wall structure, variations in metabolic pathways, and faster proliferation rates compared to human cells. However, further investigation is necessary to confirm and fully elucidate the selectivity of these compounds towards bacterial cells.

Conclusions

The extensive utilization of antibiotics and the rapid emergence of antibiotic resistance have highlighted the urgent need for the discovery of new antibacterial agents. In this context, modified nucleosides and nucleotides, which serve as the fundamental units of DNA and RNA, have emerged as promising candidates due to their potential to impact enzyme recognition and overall efficacy against various pathogens. In our study, we evaluated the antibacterial properties of various altered purine and pyrimidine nucleosides and nucleotides in an in vitro setting and examined their interactions with antioxidants.

Our findings revealed that all examined modified nucleosides and nucleotides demonstrated dose-dependent inhibitory effects on the growth of both Gram-negative

(*P. mirabilis*) and Gram-positive (*B. cereus*) bacterial cultures. Furthermore, the presence of antioxidants did not significantly alter their antibacterial activity but led to a universal elevation in intracellular reactive oxygen species levels across all bacterial cultures. These results suggest a potential antibacterial mechanism involving the generation of reactive oxygen species, leading to damage to intracellular DNA, lipids, and proteins.

Among the tested compounds, fludarabine proved to be the most effective in increasing reactive oxygen species levels and demonstrated a more significant impact on Gram-positive *B. cereus* cells. The other examined compounds, such as 2-NH₂-6-Cl-ara-Pur and fludarabine monophosphate, also induced notable increases in reactive oxygen species levels, albeit to a lesser extent than fludarabine.

In the context of modified pyrimidine nucleosides and nucleotides, the trends observed in cell growth alterations suggested a diminishing efficacy in the inhibitory impact of pyrimidine derivatives on bacterial cell growth, with ara-CMP being the most effective. Additionally, the capacity of these compounds to induce reactive oxygen species production escalated accordingly.

In conclusion, this study provides valuable insights into the antibacterial properties of modified nucleosides and nucleotides and their potential interaction with antioxidants. Our findings contribute to the growing body of evidence supporting the exploration of these compounds as potential antibacterial agents, particularly in the context of the global antibiotic resistance crisis. Future research should focus on the elucidation of the molecular mechanisms underlying the antibacterial properties of these compounds and their potential for clinical application.

References

- 1 Nguyen L. Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis*: an update. *Arch Toxicol*. 2016 Jul;90(7):1585-604. doi: 10.1007/s00204-016-1727-6.
- 2 Yssel AEJ, Vanderleyden J, Steenackers HP. Repurposing of nucleoside- and nucleobase-derivative drugs as antibiotics and biofilm inhibitors. *J Antimicrob Chemother*. 2017 Aug 1;72(8):2156-2170. doi: 10.1093/jac/dkx151.
- 3 De Clercq E, Li G. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clin Microbiol Rev*. 2016 Jul;29(3):695-747. doi: 10.1128/CMR.00102-15.
- 4 Pathak AK, Pathak V, Seitz LE, Suling WJ, Reynolds RC. 6-Oxo and 6-thio purine analogs as antimycobacterial agents. *Bioorg Med Chem*. 2013 Apr 1;21(7):1685-95. doi: 10.1016/j.bmc.2013.01.054.
- 5 Roca I, Akova M, Baquero F, Carlet J, Cavalieri M, Coenen S, Cohen J, Findlay D, Gyssens I, Heuer OE, Kahlmeter G, Kruse H, Laxminarayan R, Liébana E, López-Cerero L, MacGowan A, Martins M, Rodríguez-Baño J, Rolain JM, Segovia C, Sigauque B, Tacconelli E, Wellington E, Vila J. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes New Infect*. 2015 Apr 16;6:22-9. doi: 10.1016/j.nmni.2015.02.007. Erratum in: *New Microbes New Infect*. 2015 Nov;8:175.
- 6 Yssel AEJ, Vanderleyden J, Steenackers HP. Repurposing of nucleoside- and nucleobase-derivative drugs as antibiotics and biofilm inhibitors. *J Antimicrob Chemother*. 2017 Aug 1;72(8):2156-2170. doi: 10.1093/jac/dkx151.
- 7 De Clercq E, Li G. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clin Microbiol Rev*. 2016 Jul;29(3):695-747. doi: 10.1128/CMR.00102-15.
- 8 Kiyoshi I. Nucleoside antibiotics: structure, biological activity, and biosynthesis. *The Journal of Antibiotics*. 1988;41(12):1711-1739. doi: 10.7164/antibiotics.41.1711.
- 9 Abbas M, Elshahawi SI, Wang X, Ponomareva LV, Sajid I, Shaaban KA, Thorson JS. Puromycins B-E, Naturally Occurring Amino-Nucleosides Produced by the Himalayan Isolate *Streptomyces* sp. PU-14G. *J Nat Prod*. 2018 Nov 26;81(11):2560-2566. doi: 10.1021/acs.jnatprod.8b00720.
- 10 Seydlová G, Sokol A, Lišková P, Konopásek I, Fišer R. Daptomycin Pore Formation and Stoichiometry Depend on Membrane Potential of Target Membrane. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018 Dec 21;63(1):e01589-18. doi: 10.1128/AAC.01589-18.
- 11 Bockman MR, Engelhart CA, Dawadi S, Larson P, Tiwari D, Ferguson D. M, Schnappinger D, Aldrich CC. Avoiding Antibiotic Inactivation in *Mycobacterium tuberculosis* by

- Rv3406 through Strategic Nucleoside Modification. *ACS Infectious Diseases*. 2018;4(7):1102-1113. doi: 10.1021/acsinfectdis.8b00038.
- 12 Serpi M, Ferrari V, Pertusati F. Nucleoside Derived Antibiotics to Fight Microbial Drug Resistance: New Utilities for an Established Class of Drugs? *J Med Chem*. 2016 Dec 8;59(23):10343-10382. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00325.
 - 13 Negrya SD, Jasko MV, Solyev PN, Karpenko IL, Efremenkova OV, Vasilyeva BF, Sumarukova IG, Kochetkov SN, Alexandrova LA. Synthesis of water-soluble prodrugs of 5-modified 2'-deoxyuridines and their antibacterial activity. *J Antibiot (Tokyo)*. 2020 Apr;73(4):236-246. doi: 10.1038/s41429-019-0273-x.
 - 14 Шихад АА, Ханчевский МА, Сыса АГ, Грицкевич ЕР, Квасюк ЕИ. Оценка антибактериальной активности модифицированных арабинозидов пуринового ряда. *Веснік Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Серыя 5. Эканоміка. Сацыялогія. Біялогія*. 2022; 12(3):160-170.
 - 15 Shihad A, Khancheuski M, Sysa A, Gritskevich E, Kvasyuk E, Lemiasheuski VO. *In vitro* Antimicrobial Activity Profile of Modified Pyrimidine Nucleosides Derivatives. *Journal of Pharmaceutical Research International*. 2022;34(38A):34-45. doi: 10.9734/JPRI/2022/v34i38A36216.
 - 16 Travnickova E, Mikula P, Oprsal J, Bohacova M, Kubac L, Kimmer D, Soukupova J, Bittner M. Resazurin assay for assessment of antimicrobial properties of electrospun nanofiber filtration membranes. *AMB Express*. 2019 Nov 13;9(1):183. doi: 10.1186/s13568-019-0909-z.
 - 17 Xing L, Honda T, Fitz L, Ojima I. Case studies of fluorine in drug discovery in Fluorine in Life Sciences: Pharmaceuticals, Medicinal Diagnostics, and Agrochemicals. eds. G. Haufe, F. R. Leroux. Cambridge: Academic Press. 2019:181-211.
 5. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention / I. Roca [et al.] // *New Microbes New Infect.* – 2015. – Vol. 6. – P. 22–29.
 6. Yssel, A. E. J. Repurposing of nucleoside- and nucleobase-derivative drugs as antibiotics and biofilm inhibitors / A. E. J. Yssel, J. Vanderleyden, H. P. Steenackers // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2017. – Vol. 72, №8. – P. 2156–2170.
 7. De Clercq, E. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years / E. De Clercq, G. Li // *Clin Microbiol Rev.* – 2016. – Vol. 29, №3. – P.695–747.
 8. Kiyoshi, I. Nucleoside antibiotics: structure, biological activity, and biosynthesis / I. Kiyoshi // *The Journal of Antibiotics.* – 1988. – Vol. 41(12). – P.1711–1739.
 9. Puromycins B-E, naturally occurring amino-nucleosides produced by the Himalayan isolate *Streptomyces* sp. PU-14G / M. Abbas [et al] // *J. Nat. Prod.* – 2018. – Vol. 81(11). – P. 2560–2566.
 10. Daptomycin Pore Formation and Stoichiometry Depend on Membrane Potential of Target Membrane / G. Seydlová [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2018. – Vol. 63(1). – e01589–18.
 11. Avoiding Antibiotic Inactivation in Mycobacterium tuberculosis by Rv3406 through Strategic Nucleoside Modification / M.R. Bockman [et al.] // *ACS Infectious Diseases.* – 2018. – Vol. 4(7). – P.1102–1113.
 12. Serpi, M. Nucleoside Derived Antibiotics to Fight Microbial Drug Resistance: New Utilities for an Established Class of Drugs? / M. Serpi, V. Ferrari, F. Pertusati // *J Med Chem.* – 2016. – Vol. 59, №23. – P. 10343–10382.
 13. Synthesis of water-soluble prodrugs of 5-modified 2'-deoxyuridines and their antibacterial activity / S. D. Negrya [et al.] // *J. Antibiot. (Tokyo)*. – 2020. – Vol.73(4). – P. 236–246.
 14. Оценка антибактериальной активности модифицированных арабинозидов пуринового ряда / А. А. Шихад [и др.] // *Веснік Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Серыя 5. Эканоміка. Сацыялогія. Біялогія.* – 2022. – Т. 12, №3. – С. 160–170.
 15. *In vitro* antimicrobial activity profile of modified pyrimidine nucleosides derivatives / A. Shihad [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Research International.* – 2022. – Vol. 34 (38A). – P. 34–45.
 16. Resazurin assay for assessment of antimicrobial properties of electrospun nanofiber filtration membranes / E. Travnickova [et al.] // *AMB Express.* – 2019. – Vol. 9(1). – P. 183.
 17. Case studies of fluorine in drug discovery / L. Xing [et al.] // *Fluorine in Life Sciences: Pharmaceuticals, Medicinal Diagnostics, and Agrochemicals* / eds. G. Haufe, F. R. Leroux. – Cambridge: Academic Press, 2019. – P. 181–211.

Список цитированных источников

1. Davies, J. Origins and evolution of antibiotic resistance / J. Davies, D. Davies // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2010. – Vol. 74 (3). – P. 417–433.
2. Nathan, C. Antibiotic resistance-problems, progress, and prospects / C. Nathan, O. Cars // *N. Engl. J. Med.* – 2014. – Vol. 371 (19). – P.1761–1763.
3. Michael, C. A. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management / C. A. Michael, D. Dominey-Howes, M. Labbate // *Front Public Health.* – 2014. – Vol. 2. – P. 145.
4. Luepke, K. H. The antibiotic pipeline: reviving research and development and speeding drugs to market / K. H. Luepke, J. F. Mohr // *Expert. Rev. Anti-Infect. Ther.* – 2017. – Vol. 15 (5). – P. 425–433.

ПОТЕНЦИАЛ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОЗИДОВ И НУКЛЕОТИДОВ КАК НОВЫХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ АГЕНТОВ: *IN VITRO* ИССЛЕДОВАНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ РОСТА БАКТЕРИЙ И ИНДУКЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

А. Г. Сыса, Е. И. Квасюк, А. Шихад, Е. Р. Грицкевич
Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь

Введение. Чрезмерное использование антибиотиков в здравоохранении привело к росту устойчивости к антибиотикам. Для борьбы с устойчивыми бактериями срочно необходимы новые антибактериальные препараты. Производные нуклеиновых кислот демонстрируют потенциал в качестве противомикробных средств.

Цель исследования. Оценка антибактериальной эффективности модифицированных нуклеозидов и нуклеотидов в условиях *in vitro*.

Материалы и методы. В работе изучались модифицированные нуклеозиды/нуклеотиды на основе пуриновых/пиримидиновых оснований. Использовали бактериальные культуры *P. mirabilis* и *B. cereus*. Скорость роста оценивали по метаболизму резазурина, уровни АФК в бактериальных клетках оценивались с использованием зонда DCFH-DA.

Результаты. Показано, что все исследованные соединения оказывали дозозависимое ингибирующее действие на рост исследованных бактериальных культур. Включение антиоксиданта кверцетина в смесь реагентов не изменяло эффективность соединений в подавлении роста бактериальных клеток. Однако во всех бактериальных культурах, подвергшихся воздействию изучаемых соединений, наблюдалось повсеместное повышение внутриклеточных уровней АФК, что указывает на то, что антибактериальная активность этих соединений может быть связана с их способностью вызывать окислительный стресс в бактериальных клетках.

Заключение. Исследование показало, что модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды обладают потенциальными антибактериальными свойствами и могут быть полезны в качестве новых антибактериальных средств.

Ключевые слова: модифицированные нуклеозиды, нуклеотиды, антибактериальная активность, активные формы кислорода (АФК), окислительный стресс, штаммы бактерий с множественной лекарственной устойчивостью.

Для цитирования. Потенциал модифицированных нуклеозидов и нуклеотидов как новых антибактериальных агентов: *in vitro* исследование ингибирования роста бактерий и индукции окислительного стресса / А. Г. Сыса [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. – 2024. – Т. 3, № 1(4). – С. 211–219.

Поступила 11.04.2024

PROTECTIVE EFFECTS OF TRITERPENOID BETULIN ON TYPE 2 DIABETES MELLITUS IN RATS

A. H. Shlyahun¹, Yu. Z. Maksimchik², A. Zakrzaska³, A. F. Raduta¹, V. Ch. Polubok¹, E. V. Buksha¹,
E. V. Bogdevich¹, P. Kitlas³, M. Tomulewicz³, D. V. Pitsko⁴, I. P. Sutsko¹

¹ Institute of Biochemistry Biologically Active Compounds of the National Academy
of Sciences of Belarus, Grodno, Republic of Belarus

² Applied-Research Laboratory of «DNA-technologies» of Educational Institution
«Grodno State Agrarian University», Grodno, Republic of Belarus

³ University of Medical Sciences in Bialystok, Bialystok, Poland

⁴ Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

Background. Prevalence and incidence of type 2 diabetes mellitus (T2DM) are increasing dramatically across the world, and it is accompanied with severe complications and premature mortality of patients with diabetes. Given the fact that synthetic drugs have disadvantages in view of the side effects, the implementation of naturally occurring compounds for diabetes treatment may be a promising alternative.

Objective. The aim of the present study was to assess biological effects of betulin, a naturally occurring triterpenoid, in T2DM conditions in rats.

Materials and methods. Male Wistar rats with high-fat diet and streptozotocin-induced T2DM were orally administered betulin at doses of 50 and 100 mg/kg/day for 28 consecutive days. At the end of the experiment, the rats were humanely euthanized. Several biomarkers have been determined in the serum, and histopathological examination was conducted for hepatic tissues. The collected data has undergone statistical analysis.

Results. It was shown that long-term administration of betulin to the rats prevented diabetes-associated changes in a body weight, significantly reversed insulin resistance and abolished the impairment of glucose metabolism. It was accompanied with the dose-dependent normalization of serum lipid contents. Histopathological changes and structural abnormalities in the liver of diabetics were restored by the administration of betulin. Also, betulin was able to restrain systemic inflammation detected in diabetic animals according to the altered levels of serum TNF α .

Conclusions. We hypothesized that the ability of betulin to restrain systemic inflammation and to normalize the lipid metabolism can explain improved insulin resistance and glycemic control and it can provide a possible mechanism for the beneficial antidiabetic effects of betulin.

Keywords: betulin, type 2 diabetes mellitus, HFD/STZ protocol, insulin resistance, diabetes management, tumor necrosis factor α .

For citation: Shlyahun AH, Maksimchik YuZ, Zakrzaska A, Raduta AF, Polubok VCh, Buksha EV, Bogdevich EV, Kitlas P, Tomulewicz M, Pitsko DV, Sutsko IP. Protective effects of triterpenoid betulin on type 2 diabetes mellitus in rats. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2024, vol. 3, no 1(4). pp. 220–229.

Introduction

According to current knowledge, type 2 diabetes mellitus (T2DM) is described as a complex metabolic condition that is characterized by long-term hyperglycemia followed by insulin resistance and relative lack of insulin production. It is emphasized that T2DM can cause severe complications, either of microvascular (retinopathy, nephropathy and neuropathy) or macrovascular (coronary heart disease, cardiomyopathy, arrhythmias and sudden death) origin.

Over the past few decades, there has been a significant increase in the prevalence of T2DM, as evidenced by numerous studies. Lifestyle changes as well as low-levels of physical activity and nutrient

imbalances are often mentioned as the main reasons leading to the wide distribution of diabetic pathology. The World Health Organization has recently reported that by the year of 2025 there will be about 250 million people all over the world suffering from diabetes type 2. It is worth mentioning that among the main types of diabetes T2DM already accounts for about 90 % of all observations.

There are lots of obstacles that are encountered in attempting to manage diabetic pathology. At the early stages of the disease, a strict diet and physical exercises are usually prescribed. If adequate blood sugar is not achieved pharmacological correction follows-up to lower blood glucose levels. The list of oral hypoglycemic drugs used to control blood glucose is

extensive enough and includes metformin, sulfonylurea derivatives, dipeptidylpeptidase-4 inhibitors, glucagon-like peptide-1 receptor agonists, sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors, glucosidase inhibitors and pioglitazone. If none of these pharmaceuticals were effective for controlling blood sugar, insulin injections would be used.

Despite the progress that was made in the treatment of T2DM, patients mostly are rare to meet the required glycemic control. Furthermore, contraindications to using some drugs could be the reason to change the usual treatment regimen for patients with high glucose levels and it is owing to the fact that the safety and efficacy of some novel hypoglycemic agents are still under question. On the other hand, severe disorders associated with heart and respiratory failure, the occurrences of ketoacidosis or lactic acidosis, as well as conditions due to pregnancy and lactation could be the reason to postpone the treatment. Ultimately, it is well known that the side effects of commonly used hypoglycemic drugs may affect digestive system (nausea, vomiting, diarrhea), endocrine system (hypoglycemia) and provoke metabolic changes (acidosis) [1].

Taking into account the struggles of diabetes management discussed earlier, it is obvious that an effective strategy for prevention and treatment of T2DM is still required. Given the fact that synthetic drugs have disadvantages in view of the side effects, the implementation of naturally occurring compounds for diabetes treatment may be a promising alternative.

Betulin is natural pentacyclic triterpenoid (lup-20(29)-ene-3 β ,28-diol) (Figure 1) found in nature in several plants. There is a growing interest in betulin accounted for its wide spectrum of biological activities. Betulin is usually extracted from the outer bark of the birch tree and the calculations show that this substance represents about 40 % of dry matter. Pharmacological properties of betulin are being intensively studied *in vivo* and *in vitro*. It has been shown that this substance can exert antitumor, antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, immunomodulatory, and hepatoprotective effects [2].

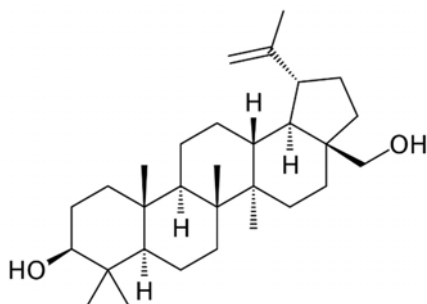


Figure 1 – The chemical structure of botulin

Рисунок 1 – Химическая структура бетулина

Recently, we demonstrated that betulin was effective to normalize lipid metabolism and alleviate oxidative stress in pathological conditions close to T2DM including alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease [3]. Owing to the fact that development of T2DM is usually associated with obesity and impaired lipid turnover, the alleviation of diabetic dyslipidemia is considered to be the important part of therapeutic intervention. It is suggested that the ability of betulin to affect the intensity of lipid exchange may have a favorable effect to ease the severity of complications in T2DM.

Thus, the aim of the present study was to evaluate the effects of betulin on glycemic levels, lipid contents, and histology of liver in rats with experimental T2DM and to elucidate the specific mechanisms by which betulin may improve diabetes management.

Materials and methods

Unless otherwise stated, all chemicals used in the experiment were of reagent-grade quality. Analytical standard of betulin was obtained from Carl Roth (No. 8763.1, Germany). Streptozotocin (STZ) was from Sigma-Aldrich (S0130, USA). Organic solvents were of analytical grade and used without further purification. Merck Millipore Direct Q3 system (USA) was used to produce deionized water to prepare buffer solutions.

Outer bark of birch (*Betula pendula* Roth.) was collected in the forest located around Grodno, Belarus. The origin of the plant materials was confirmed by qualified botanist at Grodno State University, Belarus.

Betulin was isolated from the birch bark by Soxhlet extraction following on the method described earlier [4]. Attenuated total reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy technique was recruited for qualitative analysis of betulin in extracts. The samples were analyzed with the Thermofisher Scientific Nicolet iS 10 IR Fourier spectrometer (USA) with the measurements made in the main absorption region (4000 to 400 cm^{-1}). The purity of betulin obtained during the isolation was 98,9 % as evidenced by reverse-phase chromatography analysis on the Agilent 1200 system using the method described by Zhao et al. [5].

The animal study has been performed according to The ARRIVE guidelines 2.0 [6]. Study was carried out on the 80 male Wistar rats. The animals were kept in the plastic cages containing 8 rats in the cage and had free access to food and water. The temperature, humidity, and a light cycle were controlled in the room where the animals were housed.

In order to develop T2DM in rats, slightly modified standard HFD/STZ protocol was used [7]. A long-term high-fat diet (HFD) induces obesity, dyslipidemia and insulin resistance, while several low-dose STZ

injections lead to pancreatic β -cell impairment in rats. In this protocol, STZ was used selectively to reduce the number of pancreatic β -cells in experimental animals, to mimic human type 2 diabetes. STZ is known to have a specific irreversible cytotoxic effect on rat pancreatic β -cells via several mechanisms, including DNA alkylation, depletion of cellular NAD levels and increased production of reactive oxygen and nitric oxide species [8].

According to the protocol, the rats were provided with the high fat diet for 42 days. The main component of the diet was a mixture of animal fats covering 45 % of nutritional values in nourishment to be provided to the rats. Additionally, to ensure diabetic conditions the animals were injected with STZ two times on the 14th and 28th day since HFD had been started. STZ was dissolved in a 100 mM sodium-citrate buffer with a pH of 4.4 and injected at a dose of 25 mg/kg intraperitoneally. Blood glucose levels (pre-prandial glucose) was measured following the 42 days period of HFD and the animals with glucose more than 12 mmol/l were used for further experimental procedures.

To proceed the experiment, the rats were divided into 5 groups which were labeled as “Control” (12 rats), “Betulin” (12 rats), “T2DM” (12 rats), “T2DM + Betulin 50” (10 rats), “T2DM + Betulin 100” (10 rats).

The animals included in “Control” and “Betulin” groups were kept on the standard diet during the whole time of the experiment duration. Similarly, the rats that belonged to “T2DM”, “T2DM + Betulin 50” and “T2DM + Betulin 100” groups received HFD during the whole duration of the experiment.

The rats included in “T2DM + betulin 50” and “T2DM + betulin 100” groups received betulin intragastrically at the doses of 50 and 100 mg/kg/day, respectively, for consecutive 28 days. The dosage of betulin to be administered was selected based on published literature and previously conducted studies. Based on previous observations, dosages of 50 and 100 mg/kg of betulin once daily appeared to be the most effective, with a dose-dependent mode of action. Owing to low solubility in water, a suspension of betulin in 2 % gelatinized starch was constantly prepared in order to facilitate the administration of the substance to the animals.

During the whole experiment, pre-prandial blood glucose levels were weekly monitored with Accu-Chek Active Blood Glucometer (Roche Diabetes Care, Germany).

The oral glucose tolerance test (OGTT) followed by the evaluation of glucose area under curve (AUC) was done twice as an index of glucose intolerance. First time this test was performed after the formation of the experimental groups. Second time it was carried out at

the end of the experiment to assess the effect of betulin on the development of insulin resistance. To do the test and further calculations, the animals were administered intragastrically with a 40 % glucose solution at a dose of 2 g/kg. Blood glucose levels were assayed immediately after the glucose administration (0 min), 30, 60, and 120 min since the beginning of the test. Based on the glucose measurements AUC was calculated for each of the animals. Calculations were done following the method of trapezoidal approximation of postprandial blood glucose levels with the aid of GraphPad Prism v. 8.0 software (USA) [9].

At the end of the experiment, the rats were euthanized and blood and tissue samples were collected. Blood samples were centrifuged at 2000 g for 10 min to obtain blood serum which was stored in a freezer at -82 °C until analysis. Liver tissues to take into histological study were fixed with 10 % formalin. Samples thus obtained were dehydrated by means of immersing them in a series of alcohols of increasing concentration and embedded in paraffin wax. Following that, histological sections were prepared and on dewaxing them stained with hematoxylin and eosin. For further microscopic analysis, liver sections were imaged with the microscope Leica DM6 B (Germany). Photomicrographs thus prepared were processed with computer software. The intensity of the inflammation process in liver tissues was assessed counting the number of foci of the lymphocytic infiltration. The intensity of inflammatory processes in the liver was assessed by the number of foci of lymphocytic infiltration which is defined as three or more lymphocytes detected in ten fields of view of the microscope.

Serum activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) as well as the levels of total cholesterol (TC), triacylglycerols (TG), and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were estimated with commercially available kits from AnalysX (Belarus). Enzyme-linked immunosorbent assay kits for insulin, and tumor necrosis factor α (TNF α) measurements were purchased from Cusabio (PRC). Free fatty acids (FFA) contents in serum of rats were obtained following the method of Duncombe [10].

The European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes was followed on each step of the study (ETS No.123).

Statistical analysis of the data obtained was carried out with the aid of GraphPad Prism v. 8.0 software (USA). The Shapiro-Wilk test was used to examine whether the data sets were fitted to a normal distribution. To analyze the intragroup dynamics for the metabolic processes being studied, the statistical significance of the changes was evaluated by means

of comparing the average values of the test results obtained at the beginning and at the end of the study using two-tailed Student's t-test. To identify the differences between the experimental groups, the analysis of variance and the post-hoc Tukey test were used. All results were expressed as a mean value followed by standard error ($M \pm m$).

Results and discussion

Feeding the rats with HFD for 42 days and two injections of STZ resulted in significant changes in body weight, fasting blood glucose and AUC when compared to those without STZ injection and kept on a standard diet. It was noticed that HFD and STZ increased body weight of the rats by 17.7 % ($p < 0.05$) including those animals that would later obtain different doses of betulin. We also found the elevation in fasting blood glucose levels (the average value was 12.1 ± 1.7 mmol/l) and impaired glucose tolerance according to results of OGTT (a 53.25 % increase in glucose AUC was observed which corresponded the changes up to 26.7 ± 5.1 mmol \times h/l). To sum up, the data obtained approved that the experimental animals had developed T2DM before administration of betulin was started (Table 1).

In the next stage of the study, the control and diabetic rats were divided and additional experimental groups were formed which followed by the administration of

two doses of betulin for 28 consecutive days. At the end of the experiment before the rats were sacrificed their body weight and blood glucose levels were measured, and OGTT was performed.

As a result, the animals in T2DM group had body weight significantly higher (by 20.5 %, up to 355.8 ± 9.9 g) compared to controls (295.4 ± 10.6 g). Blood glucose was also significantly increased in diabetics reaching the value of 13.4 ± 1.1 mmol/l. In addition to hyperglycemia, diabetic rats had developed insulin resistance as evidenced by 2.6 times increase in AUCs of glucose tolerance test and 2.8 times increase of serum insulin levels in comparison to control rats (Table 2).

The administration of betulin to diabetic rats led to a decrease in the body weight of animals and this effect was dose-dependent. The severity of hyperglycemia as well as insulin resistance estimated by glucose AUCs and serum insulin levels were also alleviated in the same manner. In particular, it was shown that blood glucose levels were lowered by 17.7 % in diabetic animals received 50 mg/kg of betulin per day, and it was 39.8 % decrease in blood glucose of those received 100 mg/kg of betulin daily compared to untreated T2DM group. Similarly, glucose AUC in diabetic rats administered with betulin was found to be declined by 28.0 % and 48.7 % respectively compared to untreated animals with

Table 1 – Animal weight, glycemic levels and OGTT results at the start of experiment

Таблица 1 – Вес животных, уровни глюкозы в крови и результаты орального глюкозотолерантного теста у животных вначале эксперимента

Groups	Parameters		
	Body weight, g	Glucose, mmol/l	AUC, mmol \times h/l
Control	260.8 \pm 8.9	5.88 \pm 0.28	12.30 \pm 0.76
Betulin	268.8 \pm 5.9	5.81 \pm 0.21	11.51 \pm 0.95
T2DM	314.6 \pm 6 ^A	12.61 \pm 1.03 ^A	30.27 \pm 3.09 ^A
T2DM+Betulin 50	308 \pm 7.9 ^A	10.92 \pm 0.61 ^A	25.72 \pm 1.56 ^A
T2DM+Betulin 100	308 \pm 8.7 ^A	13.21 \pm 1.24 ^A	28.42 \pm 2.94 ^A

Note: here and in other tables: A – $p < 0.05$ compared with the control group, B – $p < 0.05$ compared with the T2DM group.

Примечание: здесь и в других таблицах: А – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, В – $p < 0,05$ по сравнению с группой крыс с сахарным диабетом 2 типа

Table 2 – Effect of betulin administration on serum parameters related to glycemic control and insulin resistance in rats with T2DM

Таблица 2 – Влияние бетулина на показатели инсулинорезистентности и уровни глюкозы в сыворотке крови крыс с сахарным диабетом 2 типа

Groups	Glucose, mmol/l	AUC, mmol \times h/l	Insulin, pg/ml
Control	5.96 \pm 0.23	12.28 \pm 0.79	50.5 \pm 2.2
Betulin	5.76 \pm 0.22	11.51 \pm 0.95	69.1 \pm 3.7
T2DM	13.39 \pm 1.08	31.44 \pm 4.47 ^A	141.0 \pm 22.3 ^A
T2DM+Betulin 50	11.02 \pm 0.76	22.64 \pm 1.51 ^{AB}	74.0 \pm 5.2 ^{AB}
T2DM+Betulin 100	8.06 \pm 0.40 ^B	16.14 \pm 1.48 ^B	62.0 \pm 3.3 ^B

T2DM. Finally, the most noticeable changes revealed the data on insulin levels showing that higher dose of betulin not only prevented manifestations of diabetes but reduced this marker of diabetic pathology to normal values.

It is well known that T2DM is followed by specific changes in lipid metabolism which results in severe disturbances of serum lipids and subsequent dyslipidemia [11]. Thus, the key components involved in lipid exchange were measured in blood plasma of experimental animals in order to clarify the effects of betulin on lipid status.

It was shown that the lipid levels in blood plasma of control animals and in non-diabetic rats administered with betulin were within the scopes of physiological ranges attributed to Wistar rats [12].

Rats with T2DM were found to reveal the development of severe dyslipidemia. There was an increase in TC content by 73.8 % and a decrease in HDL levels by 21.5 % compared to control animals. Additionally, TG content in the blood of rats with T2DM was 1.7 times higher than that in the control group. We also found elevated levels of FFA in the diabetic group (Table 3). At our knowledge, long-term exposition to high concentrations of FFA can produce a toxic effect usually referred as lipotoxicity. Increased serum FFA concentrations affect adipocytes, cardiomyocytes, hepatocytes, and pancreatic β -cells leading to impairments of insulin signaling and development of insulin resistance in target tissues [13].

Based on our findings we may suggest that diabetic animals in our study revealed a specific type dyslipidemia found earlier in diabetic patients and referred to as “lipid triad” [14, 15]. The term is used to describe three lipid abnormalities involving an increase in the concentrations of TG and LDL and a decrease in the levels of HDL and currently it is accepted to be a marker of T2DM in humans.

The administration of two different doses of betulin to rats with experimental T2DM was accompanied with the dose-dependent normalization of total cholesterol levels and HDL, TG and FFA contents (Table 3).

It is interesting to note that non-diabetic animals administered with betulin showed a tendency toward increment in serum HDL content (by 36.9 %, $p < 0.1$) while the FFA content was slightly decreased (by 16.7 %, $p = 0.051$) compared to control rats.

Liver is the key metabolic participant in living organisms and it plays an important role in lipid and carbohydrate metabolism. Needless to say, that it is responsible for the synthesis and storage of glycogen in order to maintain normal blood glucose levels. According to clinical reports, T2DM associated liver disorders were found in 35-100 % of observations including the occurrence of non-alcoholic fatty liver disease which ranged between 30–80 % [16].

Following the idea of comprehensive assessment of the betulin influence on hepatic tissues and looking for its hepatoprotective effects, the histological examination of livers of experimental animals was performed.

The histological structure of livers of control rats was typical for this animal species without signs of pathological changes in liver parenchyma. The hepatocytes were polygonal in shape with weakly stained eosinophilic or amphiphilic granular cytoplasm and contained oval nuclei located predominately at the center of the cell. Lymphocytic infiltration was not detected in the livers of the control rats (Figure 2.1, Table 4).

The livers of non-diabetic animals administered with betulin seemed to have the same histological features as control rats. No alterations were observed in the parenchyma, and lymphocytic infiltration was not detected. (Table 4).

Histological examination of the livers of HFD/STZ rats pointed out on the occurrence of microvesicular steatosis (Figures 2.2-2.4). The severity of this pathological condition varied from mild to moderate. Ballooning degeneration of hepatocytes was spotted and that was accompanied with intralobular multifocal lymphocytic infiltration. In general, the groups of 5-10 cells containing large lipid droplets were observed in the portal areas of the liver tissues. Enlarged size of the hepatic cells led the lumen of sinusoids to be

Table 3 – Indicators of lipid metabolism in serum of rats with T2DM administered with betulin, mmol/l

Таблица 3 – Показатели метаболизма липидов в сыворотке крови крыс с сахарным диабетом 2 типа после введения бетулина, ммоль/л

Groups	Parameters			
	TC	HDL-C	TG	FFA
Control	4.31±0.49	3.12±0.39	0.71±0.05	0.53±0.04
Betulin	5.12±0.57	4.27±0.50 p(control)=0.085	0.72±0.07	0.44±0.02 p(control)=0.051
T2DM	7.49±0.75 ^A	2.45±0.32	1.90±0.11 ^A	0.71±0.06 ^A
T2DM+Betulin 50	5.30±0.57	2.33±0.21	1.20±0.08 ^{AB}	0.69±0.04 ^A
T2DM+Betulin 100	4.32±0.84 ^B	2.71±0.37	0.89±0.14 ^B	0.61±0.03 ^B

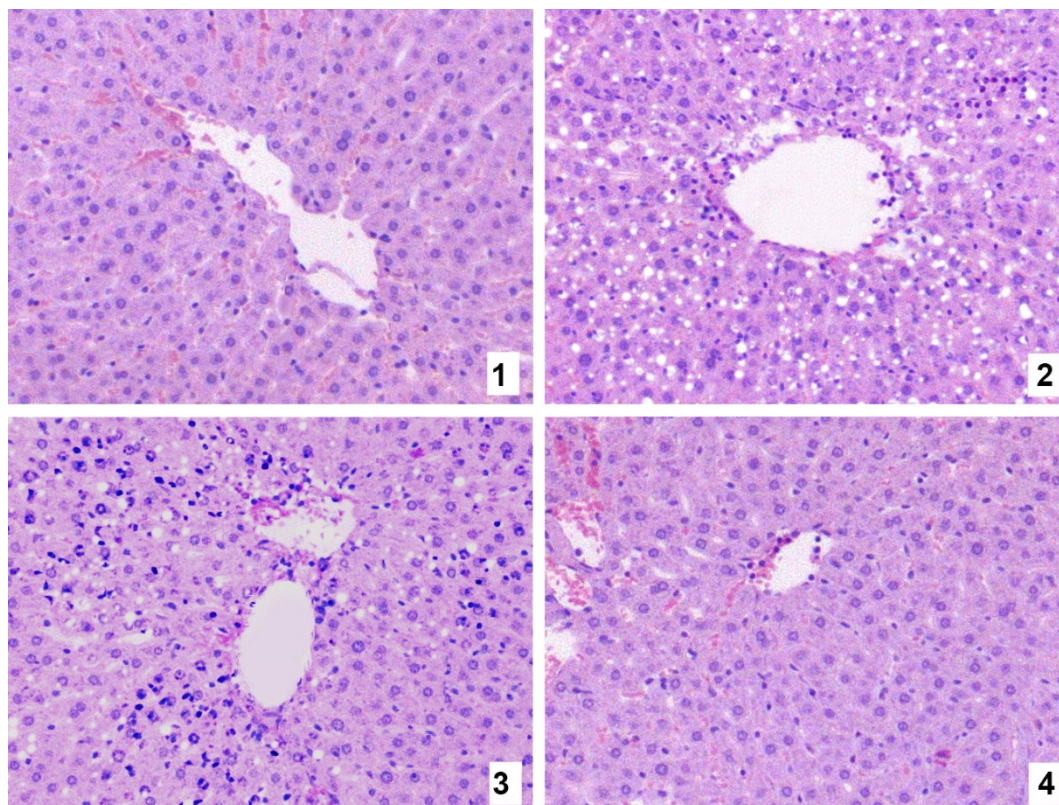


Figure 2 – Photomicrographs of liver parenchyma of rats with T2DM
Designations: 1 – Control group; 2 – T2DM; 3 – T2DM+ Betulin 50; 4 – T2DM+Betulin 100.
Stained with hematoxylin & eosin. Mag. x100

Рисунок 2 – Микрофотографии паренхимы печени крыс с сахарным диабетом 2 типа
Обозначения: 1 – контрольная группа; 2 – сахарный диабет 2 типа; 3 – сахарный диабет 2 типа + бетулин 50 мг/кг/день; 4 – сахарный диабет 2 типа + бетулин 100 мг/кг/день. Окраска гематоксилином и эозином, ув. 100

narrowed. The inflammatory changes in the liver tissues resulted in lymphocytic infiltration, which was mostly seen in the areas close to the lumen of the central hepatic veins (Figure 2.2, Table 4).

Table 4 – The number of inflammatory foci in the liver parenchyma of rats with T2DM administered with betulin

Таблица 4 – Количество очагов воспаления в паренхиме печени крыс с сахарным диабетом 2 типа после введения бетулина

Groups	The number of inflammatory foci
Control	none
Betulin	none
T2DM	12.5±2.1
T2DM+Betulin 50	8.5±2.2
T2DM+Betulin 100	5.4±1.6 ^B

The administration of betulin reduced diabetes-associated liver damage and averted degenerative processes in the liver tissues. The higher dose of betulin was noticeably more effective to prevent pathological manifestations in the livers of diabetic rats. Both doses were able to improve diabetes-induced liver histological changes by gradually decreasing the

severity of liver dystrophy and diminishing areas of ballooning degeneration in hepatic sections. The number of inflammatory foci and lymphocytic infiltration in the liver was mostly unaffected with the administration of betulin at lower dose (Figure 2.3, Table 4), while the higher dose of betulin significantly reduced inflammatory signs in liver parenchyma (Figure 2.4, Table 4).

Thus, the evidence was obtained that the administration of betulin to the rats with T2DM alleviated histopathological changes and structural abnormalities in the liver.

Serum enzymes such as alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) are very sensitive markers of liver injury and toxicity. In our study, the activities of ALT and AST were significantly higher in T2DM rats showing the increase by 51.1 % and 32.7 % respectively. Elevated ALT and AST were lowered with the administration of different doses of betulin to diabetic rats. Furthermore, the higher dose of betulin was more effective to return aminotransferases to control values. Therefore, based on the findings obtained for serum aminotransferases we suggest the beneficial effects of betulin on the livers of T2DM

animals and this observation is in corroboration with recently discussed data on hepatoprotective effects of betulin (Table 5).

Table 5 – Serum aminotransferases activities of rats with T2DM administered with betulin

Таблица 5 – Активность аминотрансфераз в сыворотке крови крыс с сахарным диабетом 2 типа после введения бетулина

Groups	ALT, IU	AST, IU
Control	60.94±4.03	112.20±8.09
Betulin	51.19±2.52	94.07±4.32
T2DM	92.09±6.84 ^A	148.90±12.56 ^A
T2DM+Betulin 50	78.23±4.14	147.01±8.60 ^A
T2DM+Betulin 100	69.13±3.53 ^B	112.30±6.14 ^B

Numerous interrelated pathogenetic mechanisms have been elucidated, contributing to the onset and progression of T2DM. Among them, insulin resistance of target tissues, primarily the liver cells, occupies a central position [17]. Obesity is generally recognized as one of the main reasons for the development of insulin resistance which is subsequently followed by the disturbances in lipid metabolism. This involves further changes including dyslipidemia and adipocyte dysfunctions as well as infiltration of adipose tissues by macrophages leading to the development of systemic inflammation.

The upregulation of inflammatory reactions requires the involvement of pro-inflammatory cytokines and among them TNF α is considered to be the main component involved in the pathogenetic mechanisms of insulin resistance associated with T2DM. It is well known that elevated levels of proinflammatory cytokines make a significant contribution to the development of tissue resistance to insulin at the molecular level. Earlier it was shown that TNF α reduced the expression of glucose transporter type 4 found predominantly in adipocytes, skeletal and cardiac cells. The phosphorylation of serine residues in IRS-1 triggered by the activity of TNF α can act as an inhibitor of insulin receptor and may block signal transduction down-stream of PI3K [18].

Taking into account the information mentioned above, the measurements of serum TNF α were taken in rats with T2DM. As expected, the impact of pathological changes in rats with experimental diabetes manifested itself in a rise of TNF α production. There was a substantial 2.2-fold increase in the serum concentrations of TNF α among non-treated diabetic animals compared to the control group (Table 6). In our opinion, the accumulation of proinflammatory

cytokines detected in serum of diabetic animals displayed the development of systemic inflammation with insulin resistance to be the main attribute of T2DM. As confirmation to the previous statement, our data illustrated a significant correlation between serum levels of TNF α and the results of the OGTT ($r_2 = 0.88$, $p < 0.01$) in a T2DM group.

Table 6 – The effect of betulin on serum TNF α levels in rats with T2DM

Таблица 6 – Влияние бетулина на уровень TNF α в сыворотке крови крыс с сахарным диабетом 2 типа

Groups	TNF α
Control	7.60±0.51
Betulin	5.98±0.65
T2DM	16.77±1.11 ^A
T2DM+Betulin 50	15.01±1.21 ^A
T2DM+Betulin 100	11.35±1.05 ^B

The administration of betulin to diabetic animals did not fully recover high levels of TNF α associated with diabetes-induced inflammation and insulin resistance to the values obtained for non-diabetic rats. The lower dose of betulin (50 mg/kg/day) appeared to be less effective to abolish the accumulation of proinflammatory cytokines in serum of treated animals compared to non-treated diabetics and control animals. Nonetheless, the higher dose of betulin (100 mg/kg/day) partially alleviated diabetic conditions (an increase in pro-inflammatory marker by 49.4 %, $p = 0.0989$) compared to control rats, and resulted in significant decrease of TNF α level when compared to non-treated diabetic controls (Table 6). It should be noted that the administration of betulin to non-diabetic rats was accompanied by a slight decrease in TNF α levels, which was 21.3 % lower than in the control group ($p < 0.1$).

Thus, the results obtained in the current study were found to be in agreement with earlier findings on beneficial effects of betulin in conditions pathogenetically close to T2DM [3, 4, 21]. Betulin has been shown to affect the multiple facets of T2DM by lowering blood glucose levels, reducing serum and liver tissue lipids, and exerting a systemic anti-inflammatory effect.

The protective effect of betulin may involve a number of different signaling pathways and various molecular targets.

One of the key mechanisms of betulin activity is inhibition of sterol regulatory element-binding proteins, which are responsible for reducing the biosynthesis of cholesterol and free fatty acids in the liver [19]. Our previous study showed that betulin can activate one of the key enzymes involved in fatty acid oxidation, specifically carnitine palmitoyl transferase in rat liver,

with potentially beneficial effects on hepatic steatosis and alleviation of insulin resistance [20].

Moreover, within the context of the experimental parameters employed in this study, the hypoglycemic influence of betulin, as previously evidenced in a rat model of type 1 diabetes mellitus, may potentially be linked to a comprehensive impact on enzymes integral to hepatic carbohydrate metabolism, the preservation of pancreatic β -cell functionality, and the structural integrity of pancreatic islets [21].

The inflammatory pathways such as NF- κ B and MAPK, both of which play a key role in the transcription of pro-inflammatory cytokines, when activated in T2DM, ultimately exacerbate diabetes outcomes. Although betulin has been reported to reduce proinflammatory cytokine production by inhibiting NF- κ B and MAPK signaling pathways [22], further studies are needed to elucidate the effects of betulin on these signaling pathways in T2DM models.

Conclusion

It was shown for the first time that long-term administration of betulin to the experimental animals prevented insulin resistance and restored glycemic control in a dose-dependent manner in T2DM related conditions. Abnormal lipids in blood serum and histological changes in the liver tissues of rats were also reduced toward normal values. We suggested that normalization of lipid metabolism and the ability of betulin to restrain systemic inflammation can be accounted for improved insulin resistance and it can provide a possible mechanism for the beneficial antidiabetic effects of betulin.

Acknowledgements

The authors would like to express their gratitude to A. A. Astrowski, Dr. Med. Sci., Prof. (Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus), N. I. Prokopchik, M.D., PhD. (Grodno State Medical University), L. Chyczewski, Dr. Med. Sci., Prof. (University of Medical Sciences in Bialystok) for their valuable help in the histopathological studies. The authors thanks to S. Szycko, M.D., PhD. (Medical University of Gdansk) for providing some of the reagents used in this study.

References

- 1 Davies MJ, Aroda VR, Collins BS, Gabbay RA, Green J, Maruthur NM, Rosas SE, Del Prato S, Mathieu C, Mingrone G, Rossing P, Tankova T, Tsapas A, Buse JB. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2022. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care*. 2022 Nov 1;45(11):2753-2786. doi: 10.2337/dci22-0034.
- 2 Nistor G, Trandafirescu C, Prodea A, Milan A, Cristea A, Ghiulai R, Racoviceanu R, Mioc A, Mioc M, Ivan V, Şoica C. Semisynthetic Derivatives of Pentacyclic Triterpenes Bearing Heterocyclic Moieties with Therapeutic Potential. *Molecules*. 2022 Oct 3;27(19):6552. doi: 10.3390/molecules27196552.
- 3 Buko V, Kuzmitskaya I, Kirko S, Belonovskaya E, Naruta E, Lukivskaya O, Shlyahtun A, Ilyich T, Zakreska A, Zavodnik I. Betulin attenuated liver damage by prevention of hepatic mitochondrial dysfunction in rats with alcoholic steatohepatitis. *Physiol Int*. 2019 Dec 1;106(4):323-334. doi: 10.1556/2060.106.2019.26.
- 4 Buko V, Zavodnik I, Palecz B., Stepniak A., Kirko S., Shlyahtun A., Misiuk W., Belonovskaya E., Lukivskaya O., Naruta E., Kuzmitskaya I., Ilyich T., Erdenebayar B., Rakhmadieva S. Betulin/2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex: physicochemical characterization and hepatoprotective activity. *J Mol Liq*. 2020; 309: 113118. doi: 10.1016/j.molliq.2020.113118.
- 5 Zhao G, Yan W, Cao D. Simultaneous determination of betulin and betulonic acid in white birch bark using RP-HPLC. *J Pharm Biomed Anal*. 2007 Feb 19;43(3):959-62. doi: 10.1016/j.jpba.2006.09.026.
- 6 Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M, Garner P, Holgate ST, Howells DW, Karp NA, Lazic SE, Lidster K, MacCallum CJ, Macleod M, Pearl EJ, Petersen OH, Rawle F, Reynolds P, Rooney K, Sena ES, Silberberg SD, Steckler T, Würbel H. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2020 Jul 14;18(7):e3000410. doi: 10.1371/journal.pbio.3000410.
- 7 Skovsø S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *J Diabetes Investig*. 2014 Jul;5(4):349-58. doi: 10.1111/jdi.12235.
- 8 Nahdi AMTA, John A, Raza H. Elucidation of molecular mechanisms of streptozotocin-induced oxidative stress, apoptosis, and mitochondrial dysfunction in Rin-5F pancreatic β -cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:7054272. doi: 10.1155/2017/7054272.
- 9 Liu KF, Niu CS, Tsai JC, Yang CL, Peng WH, Niu HS. Comparison of area under the curve in various models of diabetic rats receiving chronic medication. *Arch Med Sci*. 2020 Jan 7;18(4):1078-1087. doi: 10.5114/aoms.2019.91471.
- 10 Duncombe WG. The colorimetric micro-determination of non-esterified fatty acids in plasma. *Clin Chim Acta*. 1964 Feb;9:122-5. doi: 10.1016/0009-8981(64)90004-x.
- 11 Himanshu D, Ali W, Wamique M. Type 2 diabetes mellitus: pathogenesis and genetic diagnosis. *J Diabetes Metab Disord*. 2020 Sep 22;19(2):1959-1966. doi: 10.1007/s40200-020-00641-x.
- 12 Diniz MF., Medeiros I, Santos HB, Vasconcelos THC., Aguiar FB., Toscano MG., Ribeiro EAN. Haematological and biochemical parameter standardization of Swiss mice and Wistar rats. *Br J Health Res*. 2006;10(2):171-76.
- 13 DeFronzo RA. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia*. 2010 Jul;53(7):1270-87. doi: 10.1007/s00125-010-1684-1.
- 14 Wang FH, Liu J, Deng QJ, Qi Y, Wang M, Wang Y, Zhang XG, Zhao D. Association between plasma essential amino acids and atherogenic lipid profile in a Chinese population:

- A cross-sectional study. *Atherosclerosis*. 2019 Jul;286:7-13. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.04.225.
- 15 Busquets-Cortés C, López C, Paublíni H, Arroyo Bote S, López-González AA, Ramírez-Manent JI. Relationship between atherogenic dyslipidaemia and lipid triad with different scales of overweight and obesity in 418,343 Spanish workers. *J Nutr Metab*. 2022 Aug 9;2022:9946255. doi: 10.1155/2022/9946255.
 - 16 Kosmalski M, Śliwińska A, Drzewoski J. Non-alcoholic fatty liver disease or type 2 diabetes mellitus-the chicken or the egg dilemma. *Biomedicines*. 2023 Apr 4;11(4):1097. doi: 10.3390/biomedicines11041097.
 - 17 Schwartz SS, Epstein S, Corkey BE, Grant SF, Gavin JR 3rd, Aguilar RB. The time is right for a new classification system for diabetes: rationale and implications of the β -cell-centric classification schema. *Diabetes Care*. 2016 Feb;39(2):179-86. doi: 10.2337/dc15-1585.
 - 18 Akash MSH, Rehman K, Liaqat A. Tumor necrosis factor- α : role in development of insulin resistance and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Cell Biochem*. 2018 Jan;119(1):105-110. doi: 10.1002/jcb.26174.
 - 19 Tang JJ, Li JG, Qi W, Qiu WW, Li PS, Li BL, Song BL. Inhibition of SREBP by a small molecule, betulin, improves hyperlipidemia and insulin resistance and reduces atherosclerotic plaques. *Cell Metab*. 2021 Jan 5;33(1):222. doi: 10.1016/j.cmet.2020.11.013.
 - 20 Shlyahatun AH, Maksimchik YZ, Sutsko IP, Raduta AF. Effect of betulin on carnitine-palmitoyltransferase-I activity in rats' liver. *Bulletin of Palesky state university. Series in Natural Sciences*. 2022;2:57-63.
 - 21 Zakrzewska A., Kitlas P, Shlyahatun A, Szymańska N, Jabłoński R, Tomulewicz M. Hypoglycemic effect of betulin in rats with experimental diabetes. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 2023;80(5): 795-804. doi: 10.32383/appdr/172620.
 - 22 Tuli HS, Sak K, Gupta DS, Kaur G, Aggarwal D, Chaturvedi Parashar N, Choudhary R, Yerer MB, Kaur J, Kumar M, Garg VK, Sethi G. Anti-Inflammatory and anticancer properties of birch bark-derived betulin: recent developments. *Plants (Basel)*. 2021;10(12):2663. doi: 10.3390/plants10122663.
 7. Skovsø, S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin / S. Skovsø // *J. Diabetes Investig.* – 2014. – Vol. 5, №4. – P. 349–358. doi: 10.1111/jdi.12235.
 8. Nahdi, A. M. T. A. Elucidation of molecular mechanisms of streptozotocin-induced oxidative stress, apoptosis, and mitochondrial dysfunction in Rin-5F pancreatic β -cells / A. M. T. A. Nahdi, A. John, H. Raza // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2017. – 7054272. doi: 10.1155/2017/7054272.
 9. Comparison of area under the curve in various models of diabetic rats receiving chronic medication / K. F. Liu [et al.] // *Arch. Med. Sci.* – 2020. – Vol. 18, №4. – P. 1078–1087. doi: 10.5114/aoms.2019.91471.
 10. Duncombe, W. G. The colorimetric micro-determination of non-esterified fatty acids in plasma / W. G. Duncombe // *Clin. Chim. Acta.* – 1964. – Vol. 9. – P. 122–125. doi: 10.1016/0009-8981(64)90004-x.
 11. Himanshu, D. Type 2 diabetes mellitus: pathogenesis and genetic diagnosis / D. Himanshu, W. Ali, M. Wamique // *J. Diabetes. Metab. Disord.* – 2020. – Vol. 19, №2. – P. 1959–1966. doi: 10.1007/s40200-020-00641-x.
 12. Haematological and biochemical parameter standardization of Swiss mice and Wistar rats / M. F. Diniz [et al.] // *Br. J. Health. Res.* – 2006. – Vol. 10, №2. – P. 171–176.
 13. DeFronzo, R. A. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009 / R. A. DeFronzo // *Diabetologia.* – 2010. – Vol. 53, №7. – P. 1270–1287. doi: 10.1007/s00125-010-1684-1.
 14. Association between plasma essential amino acids and atherogenic lipid profile in a Chinese population: A cross-sectional study / F. H. Wang [et al.] // *Atherosclerosis.* – 2019. – Vol. 286. – P. 7–13. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.04.225.
 15. Relationship between atherogenic dyslipidaemia and lipid triad with different scales of overweight and obesity in 418,343 Spanish workers / C. Busquets-Cortés [et al.] // *J. Nutr. Metab.* – 2022. – 9946255. doi: 10.1155/2022/9946255.
 16. Kosmalski, M. Non-alcoholic fatty liver disease or type 2 diabetes mellitus-the chicken or the egg dilemma / M. Kosmalski, A. Śliwińska, J. Drzewoski // *Biomedicines.* – 2023. – Vol. 11, №4. – 1097. doi: 10.3390/biomedicines11041097.

Список цитированных источников

1. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2022. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD) / M. J. Davies [et al.] // *Diabetes Care.* – 2022. – Vol. 45, №11. – P. 2753–2786. doi: 10.2337/dci22-0034.
2. Semisynthetic derivatives of pentacyclic triterpenes bearing heterocyclic moieties with therapeutic potential / G. Nistor [et al.] // *Molecules.* – 2022. – Vol. 27, №19. – 6552. doi: 10.3390/molecules27196552.
3. Betulin attenuated liver damage by prevention of hepatic mitochondrial dysfunction in rats with alcoholic steatohepatitis / V. Buko [et al.] // *Physiol. Int.* – 2019. – Vol. 106, №4. – P. 323–334. doi: 10.1556/2060.106.2019.26.
4. Betulin/2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex: physicochemical characterization and hepatoprotective activity / V. Buko [et al.] // *J. Mol. Liq.* – 2020. – Vol. 309. – 113118. doi: 10.1016/j.molliq.2020.113118.
5. Zhao, G. Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using RP-HPLC / G. Zhao, W. Yan, D. Cao // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2007. – Vol. 43, №3. – P. 959–962. doi: 10.1016/j.jpba.2006.09.026.
6. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research / N. Percie du Sert [et al.] // *PLoS Biol.* – 2020. – Vol. 18, №7. – e3000410. doi: 10.1371/journal.pbio.3000410.
17. The time is right for a new classification system for diabetes: rationale and implications of the β -cell-centric classification schema / S. S. Schwartz [et al.] // *Diabetes Care.* – 2016. – Vol. 39, №2. – P. 179–186. doi: 10.2337/dc15-1585.
18. Akash, M. S. H. Tumor necrosis factor- α : role in development of insulin resistance and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus / M. S. H. Akash, K. Rehman, A. Liaqat // *J. Cell Biochem.* – 2018. – Vol. 119, №1. – P. 105–110. doi: 10.1002/jcb.26174.
19. Inhibition of SREBP by a small molecule, betulin, improves hyperlipidemia and insulin resistance and reduces atherosclerotic plaques / J. J. Tang [et al.] // *Cell Metab.* – 2021. – Vol. 33, №1. – 222. doi: 10.1016/j.cmet.2020.11.013.
20. Effect of betulin on carnitine-palmitoyltransferase-I activity in rats' liver / A. H. Shlyahatun [et al.] // *Bulletin of Palesky state university. Series in Natural Sciences.* – 2022. – Vol. 2. – P. 57–63.
21. Hypoglycemic effect of betulin in rats with experimental diabetes / A. Zakrzewska [et al.] // *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research.* – 2023. – Vol. 80, №5. – P. 795–804. doi: 10.32383/appdr/172620.
22. Anti-Inflammatory and anticancer properties of birch bark-derived betulin: recent developments / H. S. Tuli [et al.] // *Plants (Basel).* – 2021. – Vol. 10, №12. – 2663. doi: 10.3390/plants10122663.

ПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ ТРИТЕРПЕНОИДА БЕТУЛИНА ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА У КРЫС

А. Г. Шляхтун¹, Ю. З. Максимчик², А. Закиэска³, Е. Ф. Радута¹, В. Ч. Полубок¹,
Е. В. Букиша¹, Е. В. Богдевич¹, П. Китлас³, М. Томулевич³, Д. В. Пицко⁴, И. П. Сутько¹

¹ Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси, г. Гродно, Республика Беларусь

² Отраслевая научно-исследовательская лаборатория «ДНК-технологий» учреждения образования «Гродненский государственный аграрный университет», г. Гродно, Республика Беларусь

³ Высшая медицинская школа в Белостоке, Белосток, Республика Польша

⁴ Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Республика Беларусь

Введение. Распространенность и заболеваемость сахарным диабетом 2 типа (СД2) резко возрастают во всем мире. Болезнь сопровождается развитием тяжелых осложнений и преждевременной смертностью пациентов. Учитывая значительное количество побочных эффектов у синтетических лекарственных препаратов, используемых в терапии сахарного диабета 2 типа, интерес представляет поиск природных субстанций, оказывающих протекторное действие при сахарном диабете 2 типа.

Цель исследования заключалась в оценке протекторного действия природного тритерпеноида бетулина при экспериментальном диет-индуцированном сахарном диабете 2 типа у крыс.

Материалы и методы. Крысам-самцам линии Wistar с СД2 перорально вводили бетулин в дозах 50 и 100 мг/кг/сут в течение 28 дней на фоне высоко-жировой диеты. В конце эксперимента животных эвтаназируют. В сыворотке крови определен ряд биомаркеров и проведено гистопатологическое исследование тканей печени. Данные были статистически обработаны.

Результаты. Показано, что введение бетулина сопровождалось нормализацией массы тела животных, снижением гипергликемии, резистентности к инсулину и проявлений дислипидемии. Бетулин также снижал выраженность патологических изменений в печени животных с сахарным диабетом 2 типа. Наблюдаемые эффекты введения бетулина носили дозозависимый характер.

Заключение. Способность бетулина снижать выраженность нарушений метаболизма липидов, а также его системное противовоспалительное действие, вероятно, лежат в основе снижения резистентности к инсулину и улучшению гликемического контроля при сахарном диабете 2 типа.

Ключевые слова: бетулин, сахарный диабет 2 типа, HFD/STZ протокол, инсулинорезистентность, лечение диабета, фактор некроза опухолей α .

Для цитирования. Протективное действие тритерпеноида бетулина при сахарном диабете 2 типа у крыс / А. Г. Шляхтун [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. – 2024. – Т. 3, № 1(4). – С. 220–229.

Поступила 15.03.2024

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ БЕРБЕРИНА В КОМБИНАЦИИ С ДРУГИМИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ: МИНИ-ОБЗОР И СОБСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

И. П. Сутько, А. Г. Шляхтун, О. В. Титко

Институт биохимии биологически активных соединений
Национальной академии наук Беларуси, г. Гродно, Республика Беларусь

Введение. Несмотря на широкий спектр биологической активности и низкую токсичность берберина, низкая биодоступность при пероральном приеме препятствует его широкому клиническому применению. Известно, что многие биологически активные вещества растений могут повышать биодоступность совместно принимаемых лекарственных средств.

Цель исследования – провести анализ современных научных исследований, подтверждающих возможность повышения биодоступности берберина при его применении в комбинации с другими биологически активными соединениями растений.

Материалы и методы. Проведен анализ современных литературных данных об эффективном повышении биодоступности и биоактивности берберина при совместном применении с другими природными соединениями растительного происхождения.

Результаты. Представлены данные о повышении эффективности берберина в комбинации с другими биологически активными соединениями растений. Приведены результаты собственных исследований, где установлено, что курсовое введение комбинации берберина с силимарином до интоксикации крыс ацетаминифеном в большей степени препятствует нарушению функциональных способностей гепатоцитов, чем введение каждого соединения в отдельности.

Заключение. Результаты изучения совместного применения берберина с рядом биологически активных веществ растений показали эффективность в повышении биодоступности и биоактивности берберина, что может служить обоснованием дальнейшего изучения эффективности их сочетанного применения и разработки на их основе готовых фитопрепаратов, обладающих повышенной биодоступностью.

Ключевые слова: берберин, биологически активные вещества растений, силимарин, токсический гепатит, ацетаминифен.

Для цитирования: Эффективность применения берберина в комбинации с другими биологически активными соединениями растительного происхождения: мини-обзор и собственные результаты / И. П. Сутько, А. Г. Шляхтун, О. В. Титко // Биохимия и молекулярная биология. – 2024. – Т. 3, № 1(4). – С. 230–237.

Введение

Берберин – четвертичный изохинолиновый алкалоид многих растений, в наибольших количествах содержится у растений семейств *Berberidaceae*, *Papaveraceae*, *Ranunculaceae*, *Rutaceae* и *Annonaceae*. Берберин вызывает большой интерес благодаря своей широкой биологической активности и низкой токсичности. Установлено его антиоксидантное, противовоспалительное, нейропротекторное, противовирусное, антибактериальное, антидиабетическое, антидепрессантное, противодиазейное, противораковое и др. действие [1, 2]. Наиболее изучены гипогликемические и гиполипидемические эффекты берберина. Показано, что берберин оказывает положительное влияние на

жизнеспособность и функциональную активность β -клеток поджелудочной железы, снижает инсулинорезистентность путем повышения экспрессии рецептора инсулина (IR) и влияния на фосфорилирование рецептора инсулина (IR) и субстрата-1 рецептора инсулина (IRS-1), стимулирует поглощение глюкозы клеткой за счет индукции экспрессии транспортных переносчиков глюкозы типа 1 и 4 (GLUT-1, GLUT-4) [2, 3, 4], стимулирует гликолиз в периферических тканях [5], снижает глюконеогенез в печени посредством подавления экспрессии мРНК гепатоцитарного ядерного фактора 4 альфа (HNF-4 α) [6], регулирует кишечную микрофлору (и тем самым снижает уровень моносахаридов и подавляет развитие осложнений сахар-

ного диабета) [7]. Во многом гипогликемические эффекты берберина опосредованы активацией 5'-АМФ-активируемой протеинкиназы (АМРК), контролирующей энергетический баланс клетки [3, 8].

Известно, что берберин снижает уровень общего холестерина, триглицеридов и холестерина липопротеинов низкой плотности [9]. Механизм гиполипидемического действия берберина отличается от такового у статинов: берберин повышает экспрессию рецепторов липопротеинов низкой плотности (LDLR) в печени за счет увеличения стабильности их мРНК [10].

Однако клиническое применение берберина ограничивает его низкая биологическая доступность при пероральном приеме (менее 1 %) [11]. В биофармацевтической классификации (BCS, The Biopharmaceutical Classification System) [12] берберин относится к III классу лекарственных веществ, куда включены гидрофильные лекарственные вещества с плохой проницаемостью через мембраны, что ограничивает их всасывание в кишечнике и приводит к низкой биодоступности. У берберина высок эффект первого прохождения через печень. В печени берберин интенсивно метаболизируется цитохромами P450 [13, 14]. Всасывание берберина в желудочно-кишечном тракте ограничивается в том числе действием АТФ-зависимых белков-транспортеров ABCB1 (также известных как MDR1 или P-гликопротеин – Pgp) и ABCG1 (MRP), которые участвуют в выведении эндогенных и экзогенных веществ из клетки. Берберин при этом является не только субстратом Pgp, но и, в свою очередь, активирует его и тем самым способствует собственному выведению и выведению других субстратов Pgp [15, 16]. На данный момент известные ингибиторы Pgp, применение которых могло бы повысить биодоступность лекарственных средств, не применяются в клинической практике из-за развития нежелательных побочных реакций.

В то же время высокие дозы берберина (0,9–1,5 г в день) из-за его плохого всасывания в кишечнике обычно вызывают побочные эффекты со стороны желудочно-кишечного тракта [17].

Поэтому в настоящее время активно изучаются различные подходы к увеличению биодоступности берберина. Среди них – получение производных берберина, обладающих более выраженными фармакологическими свойствами; комплексобразование, в том числе использование циклодекстринов, которые способны образовывать комплексы включения с берберинем; применение мицелл, липосомальных форм и самоэмульгирующихся систем в качестве систем доставки берберина; использование наночастиц берберина

[14, 18]. Проведено большое количество исследований, направленных на поиск лекарственных средств, способных повышать биодоступность берберина. Установлена большая эффективность совместного применения метформина и берберина в снижении инсулинорезистентности по сравнению с монотерапией [19, 20], описано их синергетическое гиполипидемическое действие на клетки HepG2 [21]. Показана терапевтическая эффективность комбинации берберина и глипизида у пациентов с сахарным диабетом 2 типа [22]. Установлена эффективность берберина и ибупрофена при лечении ожирения и связанных с ним метаболических заболеваний [23]. Описано повышение биодоступности берберина при совместном приеме с капратом натрия [24, 25]. В свою очередь и берберин улучшает фармакокинетику других лекарственных средств: ловастатина, мидозалама, родамина, кетоканазола [14].

Многие биологически активные соединения растений продемонстрировали способность повышать биодоступность берберина при их совместном применении. Так, показано эффективное действие берберина в комбинации со стахиозой, резервным углеводом (тетрасахаридом) растений, в снижении уровня глюкозы в крови и положительном влиянии на микрофлору кишечника [7]. Комбинация берберина с ресвератролом продемонстрировала большие гиполипидемические эффекты у мышей с ожирением, чем каждое соединение в отдельности [26]. Установлено синергетическое действие берберина и полисахарида астрагала *Astragalus membranaceus* в снижении инсулинорезистентности в клетках IR-HepG2 посредством регуляции глюконеогенеза [27], берберина и полисахарида *Coptischinensis* при терапии хронического язвенного колита за счет подавления воспаления кишечника, регуляции микробиоты кишечника и активации пути AhR/IL-22 [28], берберина и экстракта *Andrographis paniculata* у пациентов с колоректальным раком [29], берберина и эводиамина, алкалоида *Evodiarutaecarpa*, в снижении содержания липидов в сыворотке крови и печени крыс [30], берберина и пальмитина при болезни Альцгеймера [31], берберина и байкалина, флаваноида шлемника байкальского *Scutellaria baicalensis* и шлемника обыкновенного *Scutellaria alateriflora*, а также ороксилума *Oroxylum indicum* и тимьяна, при изучении их влияния на поглощение глюкозы в определенном диапазоне доз [32]. В настоящее время получены наноформы комбинации берберина и байкалина, увеличивающие их биодоступность [33], а также берберина и глицирризиновой кислоты, содержащейся в корнях лакрицы [34].

В последние годы проведен ряд исследований по изучению возможности повышения биодоступности берберина «фитобиоэхансерами». Они представляют собой вещества растительного происхождения, способные повышать биодоступность и биоэффективность конкретного лекарственного средства без какой-либо собственной фармакологической активности в используемой дозе. Важно, что «фитобиоэхансеры» безопасны, легкодоступны, не вызывают привыкания, фармакологически инертны и неаллергенны по своей природе. К «фитобиоэхансерам» относят имбирь, тмин, алоэ, кверцетин, глицирризин, пиперин, куркумин и т. д. Использование фитобиоэхансеров является наиболее надежным средством повышения биодоступности [35]. Так, показана способность лизергола, алкалоида некоторых видов грибов и растений семейства *Convolvulaceae* увеличить биодоступность берберина [36]. Выявлена способность низких концентраций кверцетина повышать биодоступность и улучшать терапевтическое действие берберина [37]. Описан синергетический эффект берберина и куркумина у мышей с неалкогольной жировой болезнью печени [38]. Предполагается, что повышение биодоступности берберина при его совместном применении с куркумином опосредовано ингибированием Pgp куркумином и повышением проницаемости мембран для берберина [39].

Показан синергетический эффект комбинации берберина и силимарина, экстракта плодов и семян расторопши пятнистой (*Silybummarianum* L. Gaernt.) в снижении уровня липидов и глюкозы в крови [40]. Предполагается, что способность силимарина повышать биодоступность берберина опосредована его ингибирующим действием на гликопротеин-P. Учитывая то, что берберин проявляет защитное действие при поражениях печени различного генеза [41, 42], а силимарин хорошо известен своими гепатопротекторными свойствами, которые обусловлены его антиоксидантной активностью, способностью стимулировать синтез белка и фосфолипидов в поврежденных клетках, влиять на детоксикационные процессы в печени путем ингибирования цитохромов P450 [43], нами было изучено действие берберина в комбинации с силимарином при интоксикации ацетаминофеном.

Ацетаминофен (АРАР, N-ацетил-*n*-аминофенол, или парацетамол) в терапевтических дозах является безопасным и эффективным анальгетиком/антипиретиком и широко используется во всем мире. Однако однократный прием большой дозы ацетаминофена либо его длительное употребление в меньших дозах при повышенной чувствительности к препарату, злоупотреблении алкого-

лем, неправильном режиме питания или при сочетании с препаратами, влияющими на его метаболизм, приводят к повреждениям печени, прогрессирующим вплоть до печеночной недостаточности, что является главной причиной лекарственных поражений печени [44].

Цель проведенных нами исследований заключалась в оценке гепатопротекторного действия комбинации берберина и силимарина при экспериментальном токсическом гепатите, вызванном ацетаминофеном.

Материалы и методы

В работе использовали взрослых крыс-самцов линии Wistar массой 200–220 г, содержащихся на стандартном рационе вивария Института биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси. Крыс распределяли в равные по количеству животных группы (каждая группа включала 10 особей) методом случайной выборки. Все эксперименты выполнялись в соответствии с этическими нормами, а также правилами проведения научных работ с использованием экспериментальных животных в научных исследованиях согласно рекомендациям и требованиям «Всемирного общества защиты животных (WSPA)» и «Европейской конвенции по защите экспериментальных животных» (Страсбург, 1986).

Острое токсическое поражение печени вызывали однократным внутрижелудочным (в/ж) введением АРАР в крахмальной суспензии в дозе 2 мг/кг массы тела.

Животные экспериментальных групп получали в/ж 0,5 %-й раствор крахмала, либо берберин (0,2 ммоль/кг) в 0,5 %-м растворе крахмала, либо силимарин (0,2 ммоль/кг) в 0,5 %-м растворе крахмала, либо комбинацию берберина (0,1 ммоль/кг) и силимарина (0,1 ммоль/кг) в 0,5 %-м растворе крахмала, из расчета 15 мл/кг массы тела. Животным контрольных групп в/ж вводили 0,5 %-й раствор крахмала из расчета 15 мл/кг массы тела.

Препараты вводили ежедневно один раз в день на протяжении 7 суток до введения АРАР. Через сутки после введения АРАР животных декапитировали, брали образцы печени, собирали кровь и получали сыворотку, готовили гомогенаты печени.

О характере и степени выраженности поражения печени судили по активности в сыворотке крови аланин- и аспартатаминотрансфераз (АлАТ и АсАТ), γ -глутамилтранспептидазы (ГГТП), определение которых проводили с использованием соответствующих сертифицированных наборов реагентов.

Для оценки состояния антиоксидантной системы печени определяли активность глутатионредуктазы (GR, КФ 1.6.4.2) [45], глутатион-S-транс-

феразы (GST, КФ 2.5.1.18) [46]. Содержание свободных сульфгидрильных (SH-) групп определяли по методу Элмана [47]. Величины показателей рассчитывали на 1 мг белка, определяемого по методу Лоури.

Развитие токсического гепатита подтверждали гистологическим исследованием образцов печени (данные не приводятся).

Полученные результаты были обработаны с помощью статистического пакета GraphPadPrism v.8 с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и теста множественного сравнения Тьюки. Полученные данные проверяли на нор-

мальность распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка. Различия между сравниваемыми величинами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Сочетанное действие берберина и силимарина, судя по изменению уровня маркерных показателей патологии печени в сыворотке крови, в большей степени по сравнению с их действием в отдельности способствовало стабилизации мембран гепатоцитов и предотвращало нарушение их целостности (рисунок).

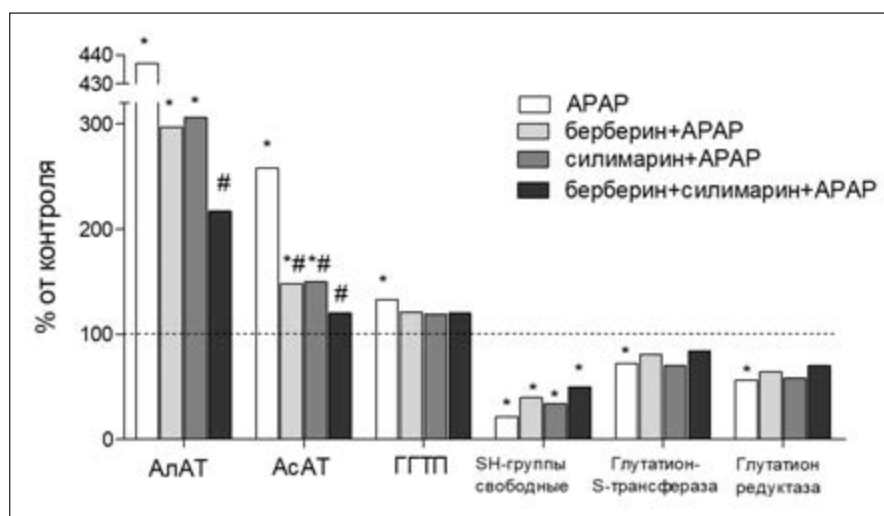


Рисунок – Изменение биохимических показателей крови крыс (в % относительно контрольных значений) при токсическом поражении ацетаминофеном (2 г/кг, однократно) на фоне введения берберина (0,2 ммоль/кг), силимарина (0,2 ммоль/кг) и их комбинации (берберин 0,1 ммоль/кг и силимарин 0,1 ммоль/кг). Достоверность различий ($p < 0,05$): * – относительно контроля, # – относительно группы «АРАР»

Figure – Change in the blood biochemical parameters (in % relative to control values) of rats with toxic damage by acetaminophen (2 g/kg, singly), and pretreated with berberine (0.2 mmol/kg), silymarin (0.2 mmol/kg) and their combinations (berberine 0.1 mmol/kg and silymarin 0.1 mmol/kg). Significance of differences ($p < 0.05$): * - relative to the control, # - relative to the “APAP” group

Как известно, АРАР метаболизируется преимущественно в печени тремя основными путями: глюкуронидацией и сульфатированием с образованием водорастворимых конъюгированных метаболитов, выводимых почками, и микросомальным окислением цитохромом Р450. В последнем случае образуется токсический промежуточный метаболит N-ацетил-n-аминобензохинон, который в норме связывается с глутатионом и затем экскретируется. Повышенное его образование при больших дозах АРАР приводит к истощению запасов глутатиона, а сам метаболит ковалентно связывается с альтернативными мишенями, в особенности с белками, с образованием комплексов, вызывающих некроз [44, 48].

В нашем исследовании содержание свободных SH-групп, представленных в основном восстанов-

ленным глутатионом (GSH), в ткани печени крыс снижалось на 78 % относительно контрольного уровня. Комбинация берберина и силимарина в большей степени предотвращала снижение уровня свободных SH-групп и активности ферментов антиоксидантной системы, с которыми тесно связано функционирование GSH: ГР и GST, в печени крыс в сравнении с животными, получавшими берберин или силимарин в отдельности (рисунок).

Заключение

Таким образом, в ходе эксперимента показано, что совместное действие силимарина и берберина при остром токсическом поражении печени ацетаминофеном в большей степени по сравнению с их действием в отдельности ослабляет гепатотоксическое действие ацетаминофена. Результаты ис-

следований, подтверждающие возможность повышения биодоступности берберина при его применении в комбинации с другими биологически активными соединениями растений, могут слу-

жить основанием дальнейшего изучения эффективности их сочетанного применения и разработки на их основе готовых фитопрепаратов, обладающих повышенной биодоступностью.

Список цитированных источников

1. Pirillo, A. Berberine, a plant alkaloid with lipid- and glucose-lowering properties: From in vitro evidence to clinical studies / A. Pirillo, A. L. Catapano // *Atherosclerosis*. – 2015. – Vol. 243, № 2. – P. 449–461. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.09.032.
2. Cicero, A. F. Berberine and its role in chronic disease / A. F. Cicero, A. Baggioni // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2016. – Vol. 928. – P. 27–45. doi: 10.1007/978-3-319-41334-1_2.
3. Berberine activates GLUT1-mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes / S. H. Kim [et al.] // *Biol. Pharm. Bull.* – 2007. – Vol. 30, № 11. – P. 2120–2125. doi:10.1248/bpb.30.2120.
4. Berberine acutely activates the glucose transport activity of GLUT1 / A. Cok [et al.] // *Biochimie*. – 2011. – Vol. 93, № 7. – P. 1187–1192. doi:10.1016/j.biochi.2011.04.013.
5. Berberine improves glucose metabolism through induction of glycolysis / J. Yin [et al.] // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2008. – Vol. 294, № 1. – P. E148–E156. doi:10.1152/ajpendo.00211.2007.
6. Berberine attenuates development of the hepatic gluconeogenesis and lipid metabolism disorder in type 2 diabetic mice and in palmitate-incubated HepG2 cells through suppression of the HNF-4 α miR122 pathway / S. Wei [et al.] // *PIOS One*. – 2016. – Vol. 11, № 3. – P. e0152097. doi: 10.1371/journal.pone.0152097.
7. Berberine combined with stachyose improves glycometabolism and gut microbiota through regulating colonic microRNA and gene expression in diabetic rats / C. Li [et al.] // *Life Sci.* – 2021. – Vol. 284. – P. 119928. doi:10.1016/j.lfs.2021.119928.
8. Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states / Y. S. Lee [et al.] // *Diabetes*. – 2006. – Vol. 55, № 8. – P. 2256–2264. doi:10.2337/db06-0006.
9. Baska, A. Berberine in the treatment of diabetes mellitus: a review / A. Baska, K. Leis, P. Gałazka // *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets*. – 2021. – Vol. 21, № 8. – P. 1379–1386. doi:10.2174/1568026620666201022144405.
10. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins / W. Kong [et al.] // *Nat. Med.* – 2004. – Vol. 10, № 12. – P. 1344–1351. doi: 10.1038/nm1135.
11. Research progress on berberine with a special focus on its oral bioavailability / C. S. Liu [et al.] // *Fitoterapia*. – 2016. – Vol. 109. – P. 274–282. doi: 10.1016/j.fitote.2016.02.001.
12. Benet, L. Z. The role of BCS (biopharmaceutics classification system) and BDDCS (biopharmaceutics drug disposition classification system) in drug development / L. Z. Benet // *J. Pharm. Sci.* – 2013. – Vol. 102, № 1. – P. 34–42. doi:10.1002/jps.23359.
13. Berberine nanoparticles with enhanced *in vitro* bioavailability: characterization and antimicrobial activity / M. U. K. Sahibzada [et al.] // *Drug. Des. Devel. Ther.* – 2018. – Vol. 12. – P. 303–312. doi: 10.2147/DDDT.S156123.
14. Habtemariam, S. The quest to enhance the efficacy of berberine for type-2 diabetes and associated diseases: Physicochemical modification approaches / S. Habtemariam // *Biomedicines*. – 2020. – Vol. 8, № 4. – P. 90. doi: 10.3390/biomedicines8040090.
15. Intestinal absorption mechanisms of berberine, palmatine, jateorhizine, and coptisine: involvement of P-glycoprotein / X. Zhang [et al.] // *Xenobiotica*. – 2011. – Vol. 41, № 4. – P. 290–296. doi:10.3109/00498254.2010.529180.
16. Human MDR1 and MRP1 recognize berberine as their transport substrate / N. Shitan [et al.] // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2007. – Vol. 71, № 1. – P. 242–245. doi: 10.1271/bbb.60441.
17. Enhancement of sodium caprate on intestine absorption and antidiabetic action of berberine / X. Y. Lv [et al.] // *AAPS PharmSciTech*. – 2010. – Vol. 11, № 1. – P. 372–382. doi: 10.1208/s12249-010-9386-z.
18. Berberine nanoparticles with enhanced *in vitro* bioavailability: characterization and antimicrobial activity / M. U. K. Sahibzada [et al.] // *Drug Des. Devel. Ther.* – 2018. – Vol. 12. – P. 303–312. doi:10.2147/DDDT.S156123.
19. Berberine and metformin in the treatment of type 2 diabetes mellitus: A systemic review and meta-analysis of randomized clinical trials / L. Wang [et al.] // *Health*. – 2021. – Vol. 13, № 11. – P. 1314–1329. doi: 10.4236/health.2021.1311096.
20. Effects of combination treatment with metformin and berberine on hypoglycemic activity and gut microbiota modulation in *db/db* mice / Y. Lyu [et al.] // *Phytomedicine*. – 2022. – Vol. 101. – P. 154099. doi: 10.1016/j.phymed.2022.154099.
21. *In-vitro* synergistic effect of metformin and berberine on high glucose-induced lipogenesis / R. Babaei Khorzoughi [et al.] // *Innov. J. Pharm. Res.* – 2019. – Vol. 18, № 4. – P. e124710. doi: 10.22037/ijpr.2019.15085.12867.
22. Li, Z. Therapeutic efficacy of combined berberine and glipizide on type 2 diabetes / Z. Li, L. H. Liu // *J. Clin. Research*. – 2007. – Vol. 24, № 1. – P. 61–64.
23. A co-crystal berberine-ibuprofen improves obesity by inhibiting the protein kinases TBK1 and IKK ϵ / M. Wang [et al.] // *Commun. Biol.* – 2022. – Vol. 5, № 1. – P. 807. doi: 10.1038/s42003-022-03776-0.
24. Enhancement of sodium caprate on intestine absorption and antidiabetic action of berberine / X.-Y. Lv [et al.] // *AAPS Pharm.* – 2010. – Vol. 11. – P. 372–382.
25. Highly bioavailable berberine formulation improves glucocorticoid receptor-mediated insulin resistance via reduction in association of the glucocorticoid receptor with phosphatidylinositol-3-kinase / Z. Meng [et al.] // *Int. J. Biol. Sci.* – 2020. – Vol. 16, № 14. – P. 2527–2541. doi:10.7150/ijbs.39508.
26. Combination of berberine with resveratrol improves the lipid-lowering efficacy / X. Zhu [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19, № 12. – P. 3903. doi: 10.3390/ijms19123903.
27. Combined use of astragalus polysaccharide and berberine attenuates insulin resistance in IR-HepG2 cells via regulation of the gluconeogenesis signaling pathway / Z. J. Mao [et al.] // *Front. Pharmacol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 1508. doi:10.3389/fphar.2019.01508.
28. Combination of *Coptischinensis* polysaccharides and berberine ameliorates ulcerative colitis by regulating gut microbiota and activating AhR/IL-22 pathway / X. Wang [et al.] // *J. Ethnopharmacol.* – 2023. – Vol. 318 (Pt B). – P. 117050. doi: 10.1016/j.jep.2023.117050.
29. A combined treatment with berberine and andrographis exhibits enhanced anti-cancer activity through suppression of DNA replication in colorectal cancer / Y. Zhao [et al.] // *Phar-*

- maceuticals. – 2022. – Vol. 15, № 3. – P. 262. doi: 10.3390/ph15030262.
30. Combination of berberine and evodiamine inhibits intestinal cholesterol absorption in high fat diet induced hyperlipidemic rats / X. Zhou [et al.] // *Lipids Health Dis.* – 2017. – Vol. 16, № 1. – P. 239. doi: 10.1186/s12944-017-0628-x.
 31. An exosome-based therapeutic strategy targeting neuroinflammation in Alzheimer's disease with berberine and palmitate / X. Zhao [et al.] // *Drug Des. Devel. Ther.* – 2023. – Vol. 17. – P. 2401–2420. doi: 10.2147/DDDT.S417465.
 32. Interaction of baicalin with berberine for glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes and HepG2 hepatocytes / C. H. Zhang [et al.] // *J. Ethnopharmacol.* – 2014. – Vol. 151, № 2. – P. 864–872. doi: 10.1016/j.jep.2013.11.054.
 33. Baicalin-berberine complex nanocrystals orally promote the co-absorption of two components / Z. Li [et al.] // *Drug Deliv. Transl. Res.* – 2022. – Vol. 12, № 12. – P. 3017–3028. doi: 10.1007/s13346-022-01167-w.
 34. A novel berberine-glycyrrhizic acid complex formulation enhanced the prevention effect to doxorubicin-induced cardiotoxicity by pharmacokinetic modulation of berberine in rats / S. Zhang [et al.] // *Front. Pharmacol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 891829. doi: 10.3389/fphar.2022.891829.
 35. A comprehensive review on pharmacotherapeutics of herbal bioenhancers / G. B. Dudhata [et al.] // *Sci. World J.* – 2012. – P. 637953. doi: 10.1100/2012/637953.
 36. Simultaneous quantification of berberine and lysergol by hplc-uv: Evidence that lysergol enhances the oral bioavailability of berberine in rats / S. Patil [et al.] // *Biomed. Chromatogr.* – 2012. – Vol. 26. – P. 1170–1175.
 37. Narade, S. B. Effect of co-administration of quercetin on goat intestinal permeability of berberine chloride / S. B. Narade, Y. V. Pore // *Int. J. Pharm. Sci. Res.* – 2019. – Vol. 10, № 8. – P. 3915–3919. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.10(8).3915-19.
 38. Improving the ameliorative effects of berberine and curcumin combination via dextran-coated bilosomes on non-alcohol fatty liver disease in mice / Y. Chen [et al.] // *J. Nanobiotechnol.* – 2021. – Vol. 19. – P. 230. doi: 10.1186/s12951-021-00979-1.
 39. Assessment of permeability behavior of berberine chloride across goat intestinal membrane in presence of natural bio-potentiator curcumin / S. B. Narade, Y. V. Pore // *Indian Drugs.* – 2021. – Vol. 58, № 4. – P. 23–27. doi: 10.53879/id.58.04.12162.
 40. Metabolic effect of berberine-silymarin association: A meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trials / F. Fogacci [et al.] // *Phytother. Res.* – 2019. – Vol. 33, № 4. – P. 862–870. doi: 10.1002/ptr.6282.
 41. Hasanein, P. Effects of isoquinoline alkaloid berberine on lipid peroxidation, antioxidant defense system, and liver damage induced by lead acetate in rats / P. Hasanein, M. Ghafari-Vahed, I. Khodadadi // *Redox Rep.* – 2017. – Vol. 22. – P. 42–50. doi: 10.1080/13510002.2016.1140406.
 42. Hepatoprotective effects of berberine on liver fibrosis via activation of AMP-activated protein kinase / J. Li [et al.] // *Life Sci.* – 2014. – Vol. 98, № 1. – P. 24–30. doi: 10.1016/j.lfs.2013.12.211.
 43. Federico, A. Silymarin/silybin and chronic liver disease: a marriage of many years / A. Federico, M. Dallio, C. Loguercio // *Molecules.* – 2017. – Vol. 22, № 2. – P. 191–217. doi: 10.3390/molecules22020191.
 44. Acetaminophen-induced liver injury: Molecular mechanism and treatments from natural products / J. Liao [et al.] // *Front. Pharmacol.* – 2023. – Vol. 14. – P. 1122632. doi: 10.3389/fphar.2023.1122632.
 45. Carlberg, I. Glutathione reductase / I. Carlberg, B. Mannervick // *Methods Enzymol.* – 1985. – Vol. 113. – P. 484–490. doi: 10.1016/S0076-6879(85)13062-4.
 46. Habig, W. J. Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation / W. J. Habig, M. J. Pabst, W. B. Jacoby // *J. Biol. Chem.* – 1974. – Vol. 249. – P. 7130–7139.
 47. Ellman, G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* – 1959. – Vol. 82, № 1. – P. 70–77. doi: 10.1016/0003-9861(59)90090-6.
 48. Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and its implications for therapeutic interventions / M. Yan [et al.] // *Redox Biology.* – 2018. – Vol. 17. – P. 274–283. doi: 10.1016/j.redox.2018.04.019.

References

1. Pirillo A, Catapano AL. Berberine, a plant alkaloid with lipid and glucose-lowering properties: From in vitro evidence to clinical studies. *Atherosclerosis.* 2015 Dec;243(2):449-61. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.09.032.
2. Cicero AF, Baggioni A. Berberine and Its Role in Chronic Disease. *Adv Exp Med Biol.* 2016;928:27-45. doi: 10.1007/978-3-319-41334-1_2.
3. Kim SH, Shin EJ, Kim ED, Bayaraa T, Frost SC, Hyun CK. Berberine activates GLUT1-mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Biol Pharm Bull.* 2007 Nov;30(11):2120-5. doi: 10.1248/bpb.30.2120.
4. Cok A, Plaisier C, Salie MJ, Oram DS, Chenge J, Louters LL. Berberine acutely activates the glucose transport activity of GLUT1. *Biochimie.* 2011 Jul;93(7):1187-92. doi: 10.1016/j.biochi.2011.04.013.
5. Yin J, Gao Z, Liu D, Liu Z, Ye J. Berberine improves glucose metabolism through induction of glycolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008 Jan;294(1):E148-56. doi: 10.1152/ajpendo.00211.2007.
6. Wei S, Zhang M, Yu Y, Lan X, Yao F, Yan X, Chen L, Hatch GM. Berberine Attenuates Development of the Hepatic Gluconeogenesis and Lipid Metabolism Disorder in Type 2 Diabetic Mice and in Palmitate-Incubated HepG2 Cells through Suppression of the HNF-4 α miR122 Pathway. *PLoS One.* 2016 Mar 24;11(3):e0152097. doi: 10.1371/journal.pone.0152097.
7. Li C, Cao H, Huan Y, Ji W, Liu S, Sun S, Liu Q, Lei L, Liu M, Gao X, Fu Y, Li P, Shen Z. Berberine combined with stachyose improves glycometabolism and gut microbiota through regulating colonic microRNA and gene expression in diabetic rats. *Life Sci.* 2021 Nov 1;284:119928. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119928.
8. Lee YS, Kim WS, Kim KH, Yoon MJ, Cho HJ, Shen Y, Ye JM, Lee CH, Oh WK, Kim CT, Hohnen-Behrens C, Gosby A, Kraegen EW, James DE, Kim JB. Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states. *Diabetes.* 2006 Aug;55(8):2256-64. doi: 10.2337/db06-0006.
9. Baska A, Leis K, Gałazka P. Berberine in the Treatment of Diabetes Mellitus: A Review. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2021;21(8):1379-1386. doi: 10.2174/1568026620666201022144405.
10. Kong W, Wei J, Abidi P, Lin M, Inaba S, Li C, Wang Y, Wang Z, Si S, Pan H, Wang S, Wu J, Wang Y, Li Z, Liu J, Jiang JD. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins. *Nat Med.* 2004 Dec;10(12):1344-51. doi: 10.1038/nm1135.
11. Liu CS, Zheng YR, Zhang YF, Long XY. Research progress on berberine with a special focus on its oral bioavailability.

- Fitoterapia*. 2016 Mar;109:274-82. doi: 10.1016/j.fitote.2016.02.001.
12. Benet LZ. The role of BCS (biopharmaceutics classification system) and BDDCS (biopharmaceutics drug disposition classification system) in drug development. *J Pharm Sci*. 2013 Jan;102(1):34-42. doi: 10.1002/jps.23359.
 13. Sahibzada MUK, Sadiq A, Faidah HS, Khurram M, Amin MU, Haseeb A, Kakar M. Berberine nanoparticles with enhanced in vitro bioavailability: characterization and antimicrobial activity. *Drug Des Devel Ther*. 2018 Feb 14;12:303-312. doi: 10.2147/DDDT.S156123.
 14. Habtemariam S. The Quest to Enhance the Efficacy of Berberine for Type-2 Diabetes and Associated Diseases: Physicochemical Modification Approaches. *Biomedicines*. 2020 Apr 18;8(4):90. doi: 10.3390/biomedicines8040090.
 15. Zhang X, Qiu F, Jiang J, Gao C, Tan Y. Intestinal absorption mechanisms of berberine, palmatine, jateorhizine, and coptisine: involvement of P-glycoprotein. *Xenobiotica*. 2011 Apr;41(4):290-6. doi: 10.3109/00498254.2010.529180.
 16. Shitan N, Tanaka M, Terai K, Ueda K, Yazaki K. Human MDR1 and MRP1 recognize berberine as their transport substrate. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007 Jan;71(1):242-5. doi: 10.1271/bbb.60441.
 17. Lv XY, Li J, Zhang M, Wang CM, Fan Z, Wang CY, Chen L. Enhancement of sodium caprate on intestine absorption and antidiabetic action of berberine. *AAPS PharmSciTech*. 2010 Mar;11(1):372-82. doi: 10.1208/s12249-010-9386-z.
 18. Sahibzada MUK, Sadiq A, Faidah HS, Khurram M, Amin MU, Haseeb A, Kakar M. Berberine nanoparticles with enhanced in vitro bioavailability: characterization and antimicrobial activity. *Drug Des Devel Ther*. 2018 Feb 14;12:303-312. doi: 10.2147/DDDT.S156123.
 19. Wang L, Liu D, Wei G, Ge H. Berberine and metformin in the treatment of type 2 diabetes mellitus: A systemic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Health*. 2021;13(11):1314-1329. doi: 10.4236/health.2021.1311096.
 20. Lyu Y, Li D, Yuan X, Li Z, Zhang J, Ming X, Shaw PC, Zhang C, Kong APS, Zuo Z. Effects of combination treatment with metformin and berberine on hypoglycemic activity and gut microbiota modulation in *db/db* mice. *Phyto-medicine*. 2022 Jul;101:154099. doi: 10.1016/j.phymed.2022.154099.
 21. Babaei Khorzoughi R, Namvarjah F, Teimouri M, Hosseini H, Meshkani R. *In-vitro* Synergistic Effect of Metformin and Berberine on High Glucose-induced Lipogenesis. *Iran J Pharm Res*. 2019 Fall;18(4):1921-1930. doi: 10.22037/ijpr.2019.15085.12867.
 22. Li Z, Liu LH. Therapeutic efficacy of combined berberine and glipizide on type 2 diabetes. *Journal of Clinical Research*. 2007;24(1):61-64.
 23. Wang M, Xu R, Liu X, Zhang L, Qiu S, Lu Y, Zhang P, Yan M, Zhu J. A co-crystal berberine-ibuprofen improves obesity by inhibiting the protein kinases TBK1 and IKK ϵ . *Commun Biol*. 2022 Aug 12;5(1):807. doi: 10.1038/s42003-022-03776-0.
 24. Lv XY, Li J, Zhang M, Wang CM, Fan Z, Wang CY, Chen L. Enhancement of sodium caprate on intestine absorption and antidiabetic action of berberine. *AAPS PharmSciTech*. 2010 Mar;11(1):372-82. doi: 10.1208/s12249-010-9386-z.
 25. Meng Z, Yu Y, Zhang Y, Yang X, Lv X, Guan F, Hatch GM, Zhang M, Chen L. Highly bioavailable Berberine formulation improves Glucocorticoid Receptor-mediated Insulin Resistance via reduction in association of the Glucocorticoid Receptor with phosphatidylinositol-3-kinase. *Int J Biol Sci*. 2020 Jul 19;16(14):2527-2541. doi: 10.7150/ijbs.39508.
 26. Zhu X, Yang J, Zhu W, Yin X, Yang B, Wei Y, Guo X. Combination of Berberine with Resveratrol Improves the Lipid-Lowering Efficacy. *Int J Mol Sci*. 2018 Dec 6;19(12):3903. doi: 10.3390/ijms19123903.
 27. Mao ZJ, Lin M, Zhang X, Qin LP. Combined Use of Astragalus Polysaccharide and Berberine Attenuates Insulin Resistance in IR-HepG2 Cells via Regulation of the Gluconeogenesis Signaling Pathway. *Front Pharmacol*. 2019 Dec 23;10:1508. doi: 10.3389/fphar.2019.01508.
 28. Wang X, Liang F, Dai Z, Feng X, Qiu F. Combination of *Coptis chinensis* polysaccharides and berberine ameliorates ulcerative colitis by regulating gut microbiota and activating AhR/IL-22 pathway. *J Ethnopharmacol*. 2024 Jan 10;318(Pt B):117050. doi: 10.1016/j.jep.2023.117050.
 29. Zhao Y, Roy S, Wang C, Goel A. A Combined Treatment with Berberine and Andrographis Exhibits Enhanced Anti-Cancer Activity through Suppression of DNA Replication in Colorectal Cancer. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022 Feb 22;15(3):262. doi: 10.3390/ph15030262.
 30. Zhou X, Ren F, Wei H, Liu L, Shen T, Xu S, Wei J, Ren J, Ni H. Combination of berberine and evodiamine inhibits intestinal cholesterol absorption in high fat diet induced hyperlipidemic rats. *Lipids Health Dis*. 2017 Dec 11;16(1):239. doi: 10.1186/s12944-017-0628-x.
 31. Zhao X, Ge P, Lei S, Guo S, Zhou P, Zhao L, Qi Y, Wei X, Wu W, Wang N, Guo R, Yang N, Xiao Q, Zhang Q, Zhu H. An Exosome-Based Therapeutic Strategy Targeting Neuroinflammation in Alzheimer's Disease with Berberine and Palmatine. *Drug Des Devel Ther*. 2023 Aug 17;17:2401-2420. doi: 10.2147/DDDT.S417465.
 32. Zhang CH, Yu RY, Liu YH, Tu XY, Tu J, Wang YS, Xu GL. Interaction of baicalin with berberine for glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes and HepG2 hepatocytes. *J Ethnopharmacol*. 2014 Feb 3;151(2):864-72. doi: 10.1016/j.jep.2013.11.054.
 33. Li Z, Liu Y, Wang J, Feng X, Nwafor EO, Zhang Y, Liu R, Dang W, Zhang Q, Yu C, Pi J, Liu Z. Baicalin-berberine complex nanocrystals orally promote the co-absorption of two components. *Drug Deliv Transl Res*. 2022 Dec;12(12):3017-3028. doi: 10.1007/s13346-022-01167-w.
 34. Zhang S, Zhao Y, Tan L, Wu S, Zhang Q, Zhao B, Li G. A Novel Berberine-Glycyrrhizic Acid Complex Formulation Enhanced the Prevention Effect to Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Pharmacokinetic Modulation of Berberine in Rats. *Front Pharmacol*. 2022 Jul 22;13:891829. doi: 10.3389/fphar.2022.891829.
 35. Dudhatra GB, Mody SK, Awale MM, Patel HB, Modi CM, Kumar A, Kamani DR, Chauhan BN. A comprehensive review on pharmacotherapeutics of herbal bioenhancers. *Scientific World Journal*. 2012;2012:637953. doi: 10.1100/2012/637953.
 36. Patil S, Dash RP, Anandjiwala S, Nivsarkar M. Simultaneous quantification of berberine and lysergol by HPLC-UV: evidence that lysergol enhances the oral bioavailability of berberine in rats. *Biomed Chromatogr*. 2012 Oct;26(10):1170-5. doi: 10.1002/bmc.2674.
 37. Narade SB, Pore YV. Effect of co-administration of quercetin on goat intestinal permeability of berberine chloride. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2019;10(8):3915-3919. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.10(8).3915-19.
 38. Chen Y, Jiang Z, Xu J, Zhang J, Sun R, Zhou J, Lu Y, Gong Z, Huang J, Shen X, Du Q, Peng J. Improving the ameliorative effects of berberine and curcumin combination via dextran-coated bilosomes on non-alcohol fatty liver disease in mice. *J Nanobiotechnology*. 2021 Aug 4;19(1):230. doi: 10.1186/s12951-021-00979-1.
 39. Narade SB, Pore YV. Assessment of Permeability Behavior of Berberine Chloride Across Goat Intestinal Membrane in

- Presence of Natural Biopotentiator Curcumin. *Indian Drugs*. 2021;58(4);23-27. doi: 10.53879/id.58.04.12162
40. Fogacci F, Grassi D, Rizzo M, Cicero AFG. Metabolic effect of berberine-silymarin association: A meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trials. *Phytother Res*. 2019 Apr;33(4):862-870. doi: 10.1002/ptr.6282.
41. Hasanein P, Ghafari-Vahed M, Khodadadi I. Effects of isoquinoline alkaloid berberine on lipid peroxidation, antioxidant defense system, and liver damage induced by lead acetate in rats. *Redox Rep*. 2017 Jan;22(1):42-50. doi: 10.1080/13510002.2016.1140406.
42. Li J, Pan Y, Kan M, Xiao X, Wang Y, Guan F, Zhang X, Chen L. Hepatoprotective effects of berberine on liver fibrosis via activation of AMP-activated protein kinase. *Life Sci*. 2014 Mar 7;98(1):24-30. doi: 10.1016/j.lfs.2013.12.211.
43. Federico A, Dallio M, Loguercio C. Silymarin/Silybin and Chronic Liver Disease: A Marriage of Many Years. *Molecules*. 2017 Jan 24;22(2):191. doi: 10.3390/molecules22020191.
44. Liao J, Lu Q, Li Z, Li J, Zhao Q, Li J. Acetaminophen-induced liver injury: Molecular mechanism and treatments from natural products. *Front Pharmacol*. 2023 Mar 27;14:1122632. doi: 10.3389/fphar.2023.1122632.
45. Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol*. 1985;113:484-90. doi: 10.1016/s0076-6879(85)13062-4.
46. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*. 1974 Nov 25;249(22):7130-9.
47. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 1959 May;82(1):70-7. doi: 10.1016/0003-9861(59)90090-6.
48. Yan M, Huo Y, Yin S, Hu H. Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and its implications for therapeutic interventions. *Redox Biol*. 2018 Jul;17:274-283. doi: 10.1016/j.redox.2018.04.019.

EFFICIENCY OF USE OF BERBERINE IN COMBINATIONS WITH OTHER BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS OF PLANT ORIGIN: A MINI REVIEW AND OWN RESULTS

I. P. Sutsko, A. H. Shlyahntun, O. V. Titko

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

Background. Despite the wide spectrum of biological activity and low toxicity of berberine, its low oral bioavailability hinders its widespread clinical use. It is known that many biologically active plant substances can increase the bioavailability of co-administered drugs.

The objective of the study is to analyze modern scientific studies confirming the possibility of increasing the bioavailability of berberine when it is used in combination with other biologically active plant compounds.

Materials and methods. An analysis of modern literature data on the effective increase in the bioavailability and bioactivity of berberine when used together with other natural compounds of plant origin was carried out.

Results. Data on the increase in the effectiveness of berberine in combination with other natural plant compounds, their synergistic interaction with berberine are presented. The results of our own studies, indicating that the course administration of a combination of berberine with silymarin before intoxication of rats with acetaminophen prevents the violation of the functional abilities of hepatocytes to a greater extent than the administration of each compound separately, are shown.

Conclusions. The results of the study of the combined use of berberine with a number of biologically active substances of plants showed the effectiveness in increasing the bioavailability and bioactivity of berberine, which can serve as a rationale for further study of the effectiveness of their combined use and the development of herbal preparations with increased bioavailability.

Keywords: berberine, biologically active plant substances, silymarin, toxic hepatitis, acetaminophen.

For citation: Sutsko IP, Shlyahntun AH, Titko OV. Efficiency of use of berberine in combinations with other biologically active compounds of plant origin: a mini review and own results. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2024, vol. 3, no. 1(4). pp. 230–237 (in Russian).

Поступила 11.09.2023

СОВРЕМЕННЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ПРИКЛАДНЫХ ЗАДАЧ В АКУШЕРСТВЕ И ГИНЕКОЛОГИИ

С. А. Костюк, Л. Ф. Можейко, О. С. Полуян, Т. В. Пинчук

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Введение. Успехи исследований в области генетики человека повысили интерес к изучению генетических аспектов распространенности ряда заболеваний, включая и гинекологические заболевания. С применением современных молекулярных методов проводятся исследования с целью определения роли генетических факторов в нарушениях репродуктивной функции, в этиологии спонтанных аборт и врожденных аномалий.

Цель исследования – оценить возможности молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики для решения прикладных вопросов в акушерстве и гинекологии.

Материалы и методы. Проведен анализ научных публикаций по использованию молекулярных методов лабораторной диагностики для решения прикладных вопросов в акушерстве и гинекологии.

Результаты. Приведены данные по проблеме применения в акушерстве и гинекологии современных генетических методов, таких как хромосомный микроматричный анализ, ПЦР, секвенирование. Представлены данные по изучению генетических факторов, ассоциированных с акушерской патологией и гинекологическими заболеваниями.

Заключение. Генетические методы позволяют диагностировать широкий спектр гинекологических заболеваний, проводить выявление ДНК возбудителей инфекций, передающихся половым путем, что имеет актуальное значение как для пациентов гинекологического профиля, так и определения тактики ведения беременности и родов, устанавливать ассоциации полиморфизмов генов с развитием гинекологических заболеваний и патологий акушерского профиля.

Ключевые слова: гинекологические заболевания, гены-кандидаты, ПЦР, хромосомный микроматричный анализ, секвенирование

Для цитирования: Современные генетические методы для решения прикладных задач в акушерстве и гинекологии / С. А. Костюк, Л. Ф. Можейко, О. С. Полуян, Т. В. Пинчук // Биохимия и молекулярная биология. – 2024. – Т. 3, № 1(4). – С. 238–246.

Введение

Успехи исследований в области генетики человека повысили интерес к изучению генетических аспектов распространенности ряда заболеваний, включая и гинекологические заболевания. С применением современных методов проводятся исследования с целью определения роли генетических факторов в нарушениях репродуктивной функции, в этиологии спонтанных аборт и врожденных аномалий. Внедрение методов антенатальной диагностики обязывает акушеров знать характер наследования различных заболеваний, а также возможности их диагностики [1, 2].

Проект «Геном человека» – первая идентификация и картирование полной последовательности ДНК человека – завершен в 2003 г. В рамках этого проекта составлена подробная карта генов вдоль каждой хромосомы. Текущими и потенциальными преимуществами проекта «Геном человека» и в целом геномики человека (области изучения взаимодействия генов человека друг с другом и с окружающей средой) стали разработка генетического скрининга и диагностических тестов, а также но-

вых профилактических методов лечения, технологий и стратегий [2, 3].

ДНК человека включает порядка 25 000–30 000 генов. В комплексе с белками ДНК формирует хроматин. Когда клетка входит в профазу клеточного цикла, хроматин конденсируется до тех пор, пока не принимает структуру метафазных хромосом. Каждая хромосома состоит из плотно упакованной нетранскрибируемой ДНК вблизи центромер, называемой гетерохроматином, и менее плотно упакованной транскрибируемой ДНК, называемой эухроматином. Современные молекулярно-генетические и цитогенетические методы позволяют изучать генетические изменения на уровне хромосом и глубже: на уровне ДНК [2, 4, 5, 6].

Семьдесят пять процентов генома представляет собой уникальную однокопийную ДНК. Остальная часть генома состоит из повторяющихся ДНК, содержащих маркеры, которые идентифицируют каждого человека и могут использоваться для изучения генетической изменчивости между людьми [2, 7, 8].

Единицей наследственности является ген, которому соответствует определенный участок хромосомы. Ген представляет собой серию из четырех пуриновых и пиримидиновых оснований, которая в конечном итоге определяет последовательность аминокислот в полипептидной цепи белка. Альтернативные формы гена, расположенные в одинаковых позициях на парных хромосомах и являющиеся вариантами нормы в популяции, носят название аллелей гена. Например, гены, определяющие группу крови и статус резус-фактора (Rh), имеют несколько аллелей. Наличие в одной и той же популяции более одного аллеля гена в одном и том же локусе хромосомы носит название полиморфизма [2, 3, 5].

Напротив, патогенный вариант гена (именуемый мутацией) представляет собой изменение последовательности ДНК, приводящее к изменению структуры или функции белка, которое может иметь неблагоприятные последствия. Наряду с широко распространенными терминами «мутация» и «полиморфизм» с 2015 г. Американский колледж медицинской генетики и геномики (англ. American College of Medical Genetics and Genomics – ACMG) и с 2017 Российское общество медицинской генетики рекомендуют использовать термин «вариант нуклеотидной последовательности» со следующими пятью характеристиками: патогенный (pathogenic); вероятно патогенный (likely pathogenic); неопределенного значения (uncertain significance); вероятно доброкачественный (likely benign); доброкачественный (benign) [9, 10].

Среди патогенных вариантов возможны замены одиночных пуриновых или пиримидиновых оснований (миссенс- и нонсенс-варианты), делеции и вставки одного или нескольких оснований, а также большие хромосомные делеции и дупликации, видимые в метафазных хромосомах [9, 10].

Заболевания, вызванные исключительно изменениями в одном гене, являются относительно редкими. На фенотип многих моногенных заболеваний влияют модифицирующие гены, окружающая среда. Так при аутосомно-доминантных заболеваниях патогенный вариант гена (мутантный) проявляется не с одинаковой силой у различных индивидов, то есть обладает различной пенетрантностью, которая оценивается количественно. Фенотипическая экспрессия доминантного гена может быть отложенной во времени, требовать присутствия второго мутантного гена или участия эпигенетических механизмов. В подобных случаях генетические методы позволяют уточнить диагноз у пациента. Примером является исследование высокопенетрантных генов белков BRCA1 и

BRCA2 и умеренно пенетрантных генов белков CHEK2, PALB2, ATM, NBN, мутации в которых приводят к наследственному раку молочной железы и раку яичника [2, 11, 12].

Генетические методы незаменимы для выявления гетерозиготного носительства у фенотипически здоровых родителей при оценке риска аутосомно-рецессивного заболевания у потомства. Если делеции и дупликации размером 5–10 млн п.н. могут быть идентифицированы с помощью рутинного цитогенетического анализа, то микроделеции и дупликации, которые слишком малы для обнаружения с помощью традиционных цитогенетических методов, часто распознаются с помощью молекулярных цитогенетических методов, таких как флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) и хромосомный микроматричный анализ (ХМА, микрочипы) [2, 13, 14].

Хромосомный микроматричный анализ основан на использовании генетических чипов, представляющих собой определенным образом обработанные стекла, в каждую лунку которых нанесено миллионы ДНК-зондов, что позволяет расшифровать генетический код пациента. Генетический код пациента сравнивается с генетическим кодом референсной ДНК, в которой отсутствуют мутации. В случае обнаружения несовпадений специальный аппарат анализирует, на какой хромосоме, в каком локусе локализуется выявленное несовпадение, сколько нуклеотидов затронуто. ХМА – эффективный способ обнаружения хромосомных аномалий, таких как: вариации числа копий генов, микроделеции, микродупликации, участки отсутствия гетерозиготности.

Каждая микроматрица может содержать более 6 миллионов олигонуклеотидных маркеров, в том числе полиморфных, которые соответствуют клинически значимым участкам генома, что позволяет точнее, быстрее, эффективнее определить хромосомную патологию, чем кариотипирование и метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Для анализа методом ХМА пригодны любые виды биологического материала, содержащие ДНК (кровь, буккальный эпителий, амниотическая жидкость) [13, 15, 16].

Сравнительная оценка ХМА и анализа кариотипа при пренатальной диагностике проведена в нескольких крупномасштабных исследованиях. Особенно полезным использование ХМА оказалось при наличии пороков развития плода, выявленных с помощью УЗИ. В 2012 году мультицентровое исследование показало, что при беременностях с установленными ультразвуковыми аномалиями и нормальным кариотипом у плода в 6 % случаев при проведении ХМА обнаружены

клинически значимые делеции и дупликации, а при отсутствии ультразвуковых маркеров хромосомных аномалий структурные перестройки хромосом выявлены у 1,7 % плодов из тех, чей кариотип был в норме [2, 17].

ХМА имеет ограничения в применении: метод не обнаруживает сбалансированные хромосомные перестройки (сбалансированные транслокации, инверсии), небольшие изменения в последовательности отдельных генов (точечные мутации), крошечные дупликации и делеции сегментов ДНК в одном гене (например, синдром ломкой X-хромосомы), изменение метилирования, мозаицизм менее 20 %. При подозрении на присутствие изменений в геноме, находящихся за границей разрешающей способности ХМА применяют методы генодиагностики, такие как ПЦР и секвенирование нового поколения (NGS) [2, 18, 19, 20].

Метод ПЦР позволяет идентифицировать генетические полиморфизмы и мутации в генах, являясь незаменимым инструментом во время диагностики таких сложных генетических заболеваний, как муковисцидоз, фенилкетонурия, спинальная мышечная атрофия и др. [21, 22]. При этом диагностика генетических заболеваний – только одна из сфер применения метода ПЦР в акушерстве и гинекологии.

Для выявления возбудителей инфекций, передающихся половым путем (ИППП), являющихся этиологическими факторами воспалительных заболеваний органов малого таза, занимающих первое место в структуре гинекологической патологии, все более популярными становятся молекулярно-генетические методы. ПЦР-диагностика обладает рядом преимуществ: высокими специфичностью и чувствительностью, позволяющими выявить не только острые, но и латентные инфекции. Применение ПЦР-технологии позволяет диагностировать присутствие даже единичных возбудителей [23, 24, 25].

К возбудителям ИППП, согласно данным ВОЗ, относят более 30 видов различных бактерий, вирусов и паразитов, из которых многие патогены являются труднокультивируемыми микроорганизмами. В качестве примеров можно привести *Chlamydia trachomatis* (возбудитель хламидийных болезней, передающихся половым путем, классифицируемых по МКБ 10 под шифром А56) и *Mycoplasma genitalium* (возбудитель урогенитальных заболеваний, классифицируемых по МКБ 10 под шифром А63.8). Культуральные исследования, являясь золотым стандартом выявления ряда микроорганизмов, не нашли своего применения для обнаружения *Chlamydia trachomatis* и *Mycoplasma genitalium* в клинической практике. Получение

культур данных патогенов – чрезвычайно трудоемкий и длительный процесс. Результат серологического исследования носит ретроспективный характер, также вероятность обнаружения специфических противомикоплазменных антител зависит в целом от особенностей образования антител. Активное внедрение генетических методов диагностики в практическое здравоохранение привело к росту числа выявляемых случаев урогенитального хламидиоза и микоплазмоза [26, 27].

Значимость использования ПЦР в акушерстве и гинекологии для выявления возбудителей ИППП трудно переоценить, особенно для диагностики субклинических форм инфекций. К возбудителям ИППП, ассоциированным с онкогенным риском, относится вирус папилломы человека (ВПЧ). Молекулярно-генетические методы детекции вирусной ДНК широко применяют при субклинической и латентной форме инфекции, обусловленной ВПЧ. В отличие от клинической формы инфекции без дополнительных методов диагностики, в частности ПЦР-диагностики, трудно диагностировать субклиническую форму и невозможно – латентную, при которой слизистая оболочка шейки матки представляется клинически и морфологически здоровой [28, 29].

Распространенность ВПЧ среди женщин репродуктивного возраста составляет 24–78 % [30, 31]. Согласно современным представлениям организм порядка 80 % женщин, инфицированных ВПЧ, элиминирует вирус, персистенция ВПЧ и развитие серьезных осложнений в 20 % случаев связано с наличием дополнительных факторов, предрасполагающих к ВПЧ-ассоциированной дисплазии шейки матки, среди которых особенности генома и иммунного статуса пациентки, ко-инфекция другими возбудителями ИППП, генотип ВПЧ [32]. Предрасполагающими к развитию рака шейки матки служат, как полагают, различия по II классу гаплотипов HLA. Наиболее устойчивая связь с раком установлена для гаплотипов DQW3 и DR15/DQ6. DR15/DQ6 связан с персистенцией ВПЧ 16, дисплазией и раком шейки матки. Общее снижение иммунитета при беременности предрасполагает к персистенции ВПЧ [32].

По данным скринингового обследования беременных (n=700), проведенного в Московском областном НИИ акушерства и гинекологии, с использованием метода ПЦР ВПЧ выявлен у 67 % беременных, при этом у беременных с дисплазией шейки матки ВПЧ определялся в 95,5 % случаев, при неизменной шейке матки ВПЧ выявлялся у 34 % беременных [32]. По данным отечественных авторов значимыми факторами риска развития и прогрессирования дисплазии шейки матки у бере-

менных являются инфицирование ВПЧ 16 и наличие экспрессии онкогенов E6/E7 генотипов 16, 18, 31, 33, 39, 58 [33, 34]. Результаты ряда исследований свидетельствуют об ассоциации ВПЧ с нарушениями течения беременности и осложнениями в родах. Среди основных факторов риска – высокий уровень вирусной нагрузки, а также наличие экспрессии онкогенов E6/E7 в цервикальных соскобах, оцененные с применением метода ПЦР [35, 36, 37].

В настоящее время особый интерес исследователей вызывает изучение генетических факторов, ассоциированных с акушерской патологией и гинекологическими заболеваниями. Одними из таких факторов являются гены-кандидаты (гены предрасположенности). Гены-кандидаты – полиморфные гены, продукты которых участвуют в метаболических циклах патогенеза конкретного заболевания. Выявление генов-кандидатов и определение роли их полиморфизмов позволяет в дальнейшем оценивать риски развития заболеваний [38–44].

В последние годы отмечается тенденция к увеличению частоты мультифакторных гинекологических заболеваний. Такие патологии, как гиперпролиферативные заболевания репродуктивной системы и синдром поликистозных яичников становятся причиной нарушений менструальной и генеративной функций женщины. В качестве генов-кандидатов, ассоциированных с гиперпролиферативными заболеваниями репродуктивной системы, изучают гены, продукты которых участвуют в таких биологических процессах, как клеточная пролиферация, дифференцировка и миграция (гены белков XRCC1, p27, PLA2G2A, LAMA, KAZN), подавление роста опухоли (гены белков TP53, p53, PTEN), апоптоз (гены белков системы Fas), детоксикация ксенобиотиков (гены цитохромов P450, такие как CYP17A1, CYP1A, CYP19, CYP1B1, CYP2C19, гены ферментов суперсемейства глутатион-S-трансфераз (GST); ген белка NAT2); ангиогенез (гены белков VEGF, PLGF, FGFR2), воспаление (гены белков IL-1A, IL-10, IL12B, IL-16, COX-2, ICAM-1, HLA-G, LILRB1, LILRB2, MUC2, MUC4, TYK2), а также гены гормональной системы (гены белков ESR1, FSHR). Синдром поликистозных яичников (СПКЯ) представляет собой многофакторное полигенное заболевание. Все гены, которые прямо или косвенно влияют на функционирование яичников, связаны с СПКЯ. Среди них выделяют основные группы генов-кандидатов: гены, вовлеченные в стероидогенез в яичниках и надпочечниках (гены цитохромов P450, такие как CYP11a, CYP17, CYP19, CYP21), гены, участвующие в передаче сигналов

стероидных гормонов (гены белков AR, SHBG), гены, участвующие в регуляции эффектов гонадотропных гормонов (гены белков LH, LHR, AMH, FSHR), гены, участвующие в регуляции секреции инсулина и проявлении его действия (гены белков INS, IRS-1, IRS-2, CAPN10). На сегодняшний день существует большое количество данных, подтверждающих роль полиморфизмов данных генов-кандидатов в развитии гиперпролиферативных заболеваний органов репродуктивной системы и синдрома поликистозных яичников. Представленные в литературе результаты оценки роли полиморфизмов генов-кандидатов отличаются в различных популяциях, что является закономерным, так как вероятность реализации генетических факторов зависит от характеристик популяций. Применение современного метода полногеномного секвенирования в больших по объему выборках пациентов, последующие мета-анализы полученных результатов позволяют наиболее точно оценить генетический риск патологического процесса, связанный с носительством определенных аллелей генов-кандидатов [41, 42, 45, 46].

Доступность метода секвенирования ДНК сыграло решающую роль в успешном завершении проекта «Геном человека». Метод секвенирования позволяет «прочитать» геном. Знание полной последовательности гена несет в себе много преимуществ, особенно для прогнозирования заболевания [2, 47, 48]. Так при оценке риска развития рака молочной железы и/или яичников проводится выявление мутаций в генах белков BRCA 1 и BRCA 2 методом секвенирования с анализом обеих цепей двойной спирали ДНК для обнаружения и подтверждения гетерозиготности. Также метод секвенирования применяется в случае подозрения на наличие патологии, когда рутинное молекулярно-генетическое тестирование не выявляет ни одного общеизвестного патогенного варианта нуклеотидной последовательности [49, 50].

Преимущества использования секвенирования следует сопоставлять с таким ограничением метода, как вероятность открытия генетических вариантов неопределенного значения. Кроме того, в случаях делеции или дупликации одного аллеля метод секвенирования не всегда позволяет обнаружить данные изменения, в таком случае клинически значимые вариации, связанные с изменением числа копий отдельных фрагментов генома, могут быть пропущены [51, 52].

Появление метода высокопроизводительного секвенирования (также известного как секвенирование следующего поколения, англ. Next generation sequencing – NGS) привело к быстрому снижению затрат и расширению применения секвенирова-

ния. С использованием данной технологии разработан скрининг анеуплоидии плода на основе бесклеточной ДНК [47, 53].

Заключение

Знания о генетике человека существенно расширились, и врачи гинекологи, как и врачи других специальностей все чаще обращаются к методам генетического тестирования для диагностики заболеваний и определения тактики терапии. Успехи в понимании молекулярных основ наследственных заболеваний привели к разработке тестов на основе ДНК, которые можно использовать для пренатальной и постнатальной диагностики. Данные методы позволяют диагностировать широкий спектр генетических заболеваний: от анеуплоидий до нарушений структуры гена. Как только патогенный вариант нуклеотидной последовательности идентифицирован, становится возможным прямое выявление данного варианта с применением генетических тестов. Правильная интерпретация результатов генетического тестирования в значительной степени зависит от точного клинического

диагноза, чувствительности теста, этнической принадлежности и распространенности заболевания, генетической гетерогенности, степени пенетрантности и фенотипической изменчивости. ПЦР-анализ как один из методов генетического тестирования приобрел огромное значение для выявления возбудителей ИППП. Метод ПЦР, а также метод секвенирования применяются для анализа полиморфизмов генов, ассоциированных с гинекологическими заболеваниями и акушерской патологией, что позволяет с одной стороны лучше понять причины и механизмы развития заболеваний, а с другой стороны использовать генетические тесты для оценки риска заболеваний, ранней диагностики и персонализации лечения на основе генотипа. Поскольку генетика становится все более неотъемлемой частью повседневной медицинской практики, важно, чтобы врачи акушер-гинекологи и другие медицинские работники были осведомлены о возможностях генетической диагностики, которые постоянно расширяются и оказывают влияние на выбор стратегий терапии и профилактики.

Список цитированных источников

1. Симпсон, Дж. Л. Генетика в акушерстве и гинекологии: монография / Дж. Л. Симпсон [и др.]. – Москва: Медицина. – 1985. – 349 с.
2. Vora, N. ACOG Technology Assessment in Obstetrics and Gynecology No. 14: Modern Genetics in Obstetrics and Gynecology / N. Vora, S. Ralston // *Obstet. Gynecol.* – 2018. – Vol. 132, № 3. – P. 143–168.
3. Баранов, В. С. Геном человека, эпигенетика многофакторных болезней и персонализированная медицина / В. С. Баранов, Е. В. Баранова // *Биосфера.* – 2012. – Т. 4, № 1. – С. 76–85.
4. Бекиш, О.-Я. Л. Медицинская биология: учеб. пособ. для студентов мед. вузов / О.-Я. Л. Бекиш. – Минск: Ураджай. – 2000. – 520 с.
5. Заяц, Р. Г. Основы общей и медицинской генетики / Р. Г. Заяц, И. В. Рачковская. – Мн.: Выш. шк. – 2003. – 225 с.
6. Слюсарев, А. А. Биология / А. А. Слюсарев, С. В. Жукова. – Киев: Вища школа. – 1987. – 415 с.
7. Liehr, T. Repetitive Elements in Humans / T. Liehr // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22. – P. 2072.
8. Liao, X. Repetitive DNA sequence detection and its role in the human genome / X. Liao [et al.] // *Communications Biology.* – 2023. – Vol. 6. – P. 954.
8. Richards, S. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology / S. Richards [et al.] // *Genet. Med.* – 2015. – Vol. 17, № 5. – P. 405–424.
10. Рыжкова О. П. Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) / О. П. Рыжкова [и др.] // *Медицинская генетика.* – 2017. – Т. 16, № 7. – С. 4–17.
11. Любченко, Л. Н. Наследственный рак молочной железы и яичников / Л. Н. Любченко [и др.] // *Злокачественные опухоли.* – 2013. – Т. 2. – С. 53–61.
12. Любченко, Л. Н. Медико-генетическое консультирование и ДНК-диагностика при наследственной предрасположенности к раку молочной железы и раку яичников. Пособие для врачей / Л. Н. Любченко, Е. И. Батенева. – Москва: ИГ РОНЦ. – 2014. – 64 с.
13. Григорьева, К. Н. Вопрос о необходимости и показаниях к проведению генетического скрининга в акушерско-гинекологической практике / К. Н. Григорьева [и др.] // *Акушерство, Гинекология и Репродукция.* – 2022. – Т. 16, № 6. – С. 706–716.
14. Чуканов, А. Н. Возможности молекулярно-генетического анализа для пренатальной диагностики / А. Н. Чуканов [и др.] // *Медицинский журнал.* – 2022. – Т. 82, № 4. – С. 25–32.
15. Dugoff, L. The use of chromosomal microarray for prenatal diagnosis / L. Dugoff, M. E. Norton, J. A. Kuller // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2016. – Vol. 215, № 4. – P. 2–9.
16. Кудрявцева, Е. В. Использование хромосомного микроматричного анализа в пренатальной диагностике в России / Е. В. Кудрявцева [и др.] // *Уральский медицинский журнал.* – 2017. – Т. 155, № 11. – С. 12–15.
17. Armengol, L. Clinical utility of chromosomal microarray analysis in invasive prenatal diagnosis / L. Armengol [et al.] // *Hum. Genet.* – 2012. – Vol. 131, № 3. – P. 513–523.
18. Narayanan, D. L. Genomic testing for diagnosis of genetic disorders in children: Chromosomal microarray and next-generation sequencing / D. L. Narayanan, K. M. Girisha // *Indian Pediatrics.* – 2020. – Vol. 57. – P. 549–557.
19. Zhang, Y. Chromosomal mosaicism detected by karyotyping and chromosomal microarray analysis in prenatal diagnosis / Y. Zhang, M. Zhong, D. Zheng // *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* – 2021. – Vol. 25, № 1. – P. 358–366.
20. Liu, X. Potentials and challenges of chromosomal microarray analysis in prenatal diagnosis / X. Liu [et al.] // *Front. Genet.* – 2022. – Vol. 13. – Article 938183.
21. Иващенко, Т. Э. Молекулярная диагностика моногенных болезней в ФМГЦ ГУ НИИ акушерства и гинекологии

- им. Д. О. Отта РАМН / Т. Э. Иващенко // Журнал акушерства и женских болезней. – 2007. – Т. 56, № 1. – С. 96–103.
22. Kiseleva, A. Cystic Fibrosis Polymorphic Variants in a Russian Population / A. Kiseleva [et al.] // Pharmacogenomics and Personalized Medicine. – 2020. – Vol. 13. – P. 679–686.
 23. Костюк, С. А. Лабораторная диагностика воспалительных процессов репродуктивных органов, обусловленных наличием возбудителей урогенитальных инфекций / С. А. Костюк [и др.] // Медицинские новости. – 2009. – № 8. – С. 69–72.
 24. Костюк, С. А. Молекулярно-биологические методы в медицине: монография / С. А. Костюк. – Минск: БелМАПО. – 2013. – 327 с.
 25. Костюк, С. А. Теоретические и прикладные вопросы применения методов анализа нуклеиновых кислот: монография / С. А. Костюк [и др.]. – Минск: БелМАПО. – 2014. – 272 с.
 26. Гомберг, М. А. Репродуктивное здоровье и инфекции, вызванные *C. trachomatis* / М. А. Гомберг // Гинекология. – 2011. – Т. 13, № 1. – С. 13–16.
 27. Руденкова, Т. В. *Mycoplasma genitalium*: биологические особенности и возможности диагностики инфекций / Т. В. Руденкова // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2016. – Т. 17, № 1. – С. 53–64.
 28. Костюк С. А., Кулага О. К., Полещук Н. Н., и др. Папилломавирусная инфекция // Современные проблемы инфекционной патологии человека (эпидемиология, клиника, вирусология, микробиология и иммунология). Материалы НИИ эпидемиологии и микробиологии по итогам выполнения ГНТП «Инфекции и медицинские биотехнологии» 2001-2005 гг. – 2005. – С. 161–165.
 29. Костюк, С. А. Применение новых методик ПЦР в раннем выявлении и прогнозировании исхода генитальной ВПЧ-инфекции и заболеваний шейки матки / С. А. Костюк [и др.] // ARS medica (акушерство и гинекология). – 2010. – №3. – С. 129–135.
 30. Guan, P. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer / P. Guan [et al.] // Int. J. Cancer. – 2012. – Vol. 131. – P. 2349–2359.
 31. Вергейчик, Г. И. Эпидемиология генитальной папилломавирусной инфекции на территории различных регионов РБ / Г. И. Вергейчик [и др.] // Медицинские новости. – 2010. – № 11. – С. 69–75.
 32. Краснополский, В. И. Роль папилломавирусной инфекции в патологии беременности и исходе для новорожденного (современные представления) / В. И. Краснополский [и др.] // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2016. – Т. 16, № 2. – С. 30–36.
 33. Кравченко, С. С. Клиническое значение качественных и количественных маркеров папилломавирусной инфекции при различных формах ВПЧ-ассоциированной патологии гениталий у беременных / С. С. Кравченко, Г. И. Вергейчик // Охрана материнства и детства. – 2013. – Т. 22, № 2. – С. 13–17.
 34. Кравченко, С. С. Определение экспрессии онкогенов e6/E7 вируса папилломы человека у беременных пациенток с генитальной папилломавирусной инфекцией / С. С. Кравченко, И. Н. Северин, Г. И. Вергейчик // Медицинские новости. – 2015. – № 9. – С. 63–66.
 35. Кравченко, С. С. Особенности течения беременности, родов, послеродового периода и состояние новорожденных у женщин с генитальной папилломавирусной инфекцией / С. С. Кравченко, Т. Н. Захаренкова, О. А. Теслова // Проблемы экологии и медицины. – 2016. – № 3. – С. 59–65.
 36. Wu, D. Systematic review and meta-analysis on influence of human papillomavirus infection during pregnancy on premature rupture of membranes and premature delivery / D. Wu [et al.] // Ann Palliat Med. – 2021. – Vol. 10, № 10. – P. 10735–10743.
 37. Popescu, S. D. Maternal HPV Infection and the Estimated Risks for Adverse Pregnancy Outcomes – A Systematic Review / S. D. Popescu [et al.] // Diagnostics. – 2022. – Vol. 12. – Article 1471.
 38. Третьякова, Т. Б. Генетические предикторы акушерских осложнений: межгенные ассоциации / Т. Б. Третьякова, Н. В. Башмакова, Н. С. Демченко // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2012. – Т. 12, № 6. – С. 18–20.
 39. Третьякова, Т. Б. Взаимодействие генов подверженности заболеваниям человека как фактор риска акушерских осложнений / Т. Б. Третьякова, Н. В. Башмакова, Н. С. Демченко // Акушерство и гинекология. – 2013. – № 12. – С. 41–45.
 40. Костюк, С. А. Предиктивная медицина и методы генетического тестирования / С. А. Костюк // Медицинские новости. – 2016. – № 4. – С. 11–14.
 41. Khan, M. J. Genetic Basis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Current Perspectives / M. J. Khan, A. Ullah, S. Basit // Appl. Clin. Genet. – 2019. – Vol. 12. – P. 249–260.
 42. Vassilopoulou, L. Defining the genetic profile of endometriosis (Review) / L. Vassilopoulou [et al.] // Exp. Ther. Med. – 2019. – Vol. 17, № 5. – P. 3267–3281.
 43. Костюк, С. А. Гены предрасположенности к мультифакторным заболеваниям и генетический полиморфизм: что это такое? / С. А. Костюк // Медицинские новости. – 2020. – № 7. – С. 42–46.
 44. Головченко, И. О. Генетические факторы развития эндометриоза. (Данные полногеномных исследований) / И. О. Головченко, И. В. Пономаренко, М. И. Чурносос // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2022. – Т. 22, № 4. – С. 30–36.
 45. Найдукова, А. А. Генетические аспекты формирования синдрома поликистозных яичников / А. А. Найдукова [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2016. – № 3. – С. 16–22.
 46. Пономарева, Т. А. Роль генетических факторов в формировании эндометриодных поражений / Т. А. Пономарева [и др.] // Акушерство, Гинекология и Репродукция. – 2023. – Т. 17, № 4. – С. 443–454.
 47. Аникаев, А. Ю. Применение секвенирования нового поколения (NGS) в клинической практике / А. Ю. Аникаев, А. М. Ломоносов // Лабораторная служба. – 2014. – Т. 3, № 1. – С. 32–36.
 48. Аракелян, А. С. Секвенирование экзома для диагностики и прогнозирования рисков развития аномалий матки и влагалища / А. С. Аракелян [и др.] // Акушерство и Гинекология. – 2021. – № 12. – С. 120–127.
 49. Стеценко, И. Ф. Идентификация BRCA1/2-мутаций при раке молочной железы с применением технологии высокопроизводительного секвенирования / И. Ф. Стеценко [и др.] // Вестник РГМУ. – 2018. – № 6. – С. 183–189.
 50. Nicolussi, A. Identification of novel BRCA1 large genomic rearrangements by a computational algorithm of amplicon-based Next-Generation Sequencing data / A. Nicolussi [et al.] // PeerJ. – 2019. – Vol. 7. – P. 7972.
 51. Шагам, Л. И. Возможности и ограничения высокопроизводительного секвенирования в диагностике моногенных заболеваний / Л. И. Шагам, В. Ю. Воинова // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2016. – Т. 61, № 2. – С. 105–109.
 52. Abbasi, A. Significance and limitations of the use of next-generation sequencing technologies for detecting mutational signatures / A. Abbasi, L. B. Alexandrov // DNA Repair. – 2021. – Vol. 107. – P. 103200.

53. Сухих, Г. Т. Неинвазивный пренатальный ДНК-скрининг анеуплоидий плода по крови матери методом высокопроизводительного секвенирования / Г. Т. Сухих [и др.] // Акушерство и Гинекология. – 2016. – № 6.

References

- Cimpson DzhL, Golbus MS, Martin JeO, Sarto GE. Genetika v akusherstve i ginekologii: monografija. Moskva: Medicina. 1985:349 s. (in Russian)
- Vora N, Ralston S. ACOG Technology Assessment in Obstetrics and Gynecology No. 14: Modern Genetics in Obstetrics and Gynecology. *Obstet Gynecol.* 2018;132(3):143-168. DOI: 10.1097/aog.0000000000002831.
- Baranov VS, Baranova EV. Genom cheloveka, jepigenetika mnogofaktornyh boleznej i personificirovannaja medicina. *Biosfera.* 2012;4(1):76-85. (in Russian)
- Bekish O-JaL. Medicinskaja biologija: ucheb. posob. dlja studentov med. vuzov. Minsk: Uradzhaj. 2000:520 s. (in Russian)
- Zajac RG., Rachkovskaja IV. Osnovy obshhej i medicinskoj genetiki. Mn.: Vysh. shk. 2003:225 s. (in Russian)
- Sljusarev AA, Zhukova SV. Biologija. Kiev: Vishha shkola. 1987:415 s. (in Russian)
- Liehr T. Repetitive Elements in Humans. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021;22(4):2072. DOI: 10.3390/ijms22042072.
- Liao X, Zhu W, Zhou J, Li H, Xu X, Zhang B, Gao X. Repetitive DNA sequence detection and its role in the human genome. *Commun. Biol.* 2023;6:954. DOI: 10.1038/s42003-023-05322-y.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* 2015 May;17(5):405-24. DOI: 10.1038/gim.2015.30.
- Ryzhkova OP, Kardymon OL, Prohorchuk EB, Konovalov FA, Maslennikov AB, Stepanov VA, Afanas'ev AA, Zakljaz'minskaja EV, Rebrikov DV, Savost'janov KV, Glotov AS, Kostareva AA, Pavlov AE, Golubenko MV, Poljakov AV, Kucev SI. Rukovodstvo po interpretacii dannyh, poluchennyh metodami massovogo parallel'nogo sekvenirovanija (MPS). *Medicinskaja genetika.* 2017;16(7):4-17. (in Russian)
- Ljubchenko LN, Bateneva EI, Abramov IS, Emel'janova MA, Budik JuA, Tjuljandina AS, Krohina OV, Vorotnikov IK, Sobolevskij VA, Nasedkina TV, Portnoj SM. Nasledstvennyj rak molochnoj zhelezy I jaichnikov. *Zlokachestvennyje opuholi.* 2013;(2):53-61. (in Russian)
- Ljubchenko LN, Bateneva EI. Mediko-geneticheskoe konsul'tirovanie i DNK-dagnostika pri nasledstvennoj predraspolozhennosti k raku molochnoj zhelezy i raku jaichnikov. Posobie dlja vrachej. Moskva: IG RONC. 2014:64 s. (in Russian)
- Grigor'eva KN, Dem'janovskaja EG, Bicadze VO, Hizroeva DH, Gashimova NR, Sluhanchuk EV, Kalashnikova IS. Vopros o neobhodimosti i pokazanijah k provedeniju geneticheskogo skrininga v akushersko-ginekologicheskoj praktike. *Akusherstvo, Ginekologija i Reprodukcija.* 2022;16(6):706-716. (in Russian)
- Chukanov AN, Kostjuk SA, Tihonenko IV, Rudenkova TV, Polujan OS. Vozmozhnosti molekularno-geneticheskogo analiza dlja prenatal'noj diagnostiki. *Medicinskij zhurnal.* 2022;82(4):25-32. (in Russian)
- Dugoff L, Norton ME, Kuller JA. The use of chromosomal microarray for prenatal diagnosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2016;215(4):2-9.
- Kudrjavceva EV, Kovalev VV, Kanivec IV, Kievskaja JuK, Korostelev SA. *Ural'skij medicinskij zhurnal.* 2017;155(11):12-15. (in Russian)
- Armengol L, Nevado J, Serra-Juhé C, Plaja A, Mediano C, García-Santiago FA, García-Aragónés M, Villa O, Mansilla E, Preciado C, Fernández L, Ángeles Mori M, García-Pérez L, Lapunzina PD, Pérez-Jurado LA. Clinical utility of chromosomal microarray analysis in invasive prenatal diagnosis. *Hum. Genet.* 2012;131(3):513-23. DOI: 10.1007/s00439-011-1095-5.
- Narayanan DL, Girisha KM. Genomic testing for diagnosis of genetic disorders in children: Chromosomal microarray and next-generation sequencing. *Indian Pediatr.* 2020;57:549-554.
- Zhang Y, Zhong M, Zheng D. Chromosomal mosaicism detected by karyotyping and chromosomal microarray analysis in prenatal diagnosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 2021;25(1):358-366. DOI: 10.1111/jcmm.16080.
- Liu X, Liu S, Wang H, Hu T. Potentials and challenges of chromosomal microarray analysis in prenatal diagnosis. *Front. Genet.* 2022;13:938183. DOI: 10.3389/fgene.2022.938183.
- Ivashhenko TJe. Molekuljarnaja diagnostika monogennyh boleznej v FMGC GU NII akusherstva i ginekologii im. D. O. Otta RAMN. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh boleznej.* 2007;56(1):96-103. (in Russian)
- Kiseleva A, Klimushina M, Sotnikova E, Skirko O, Divashuk M, Kurilova O, Ershova A, Khlebus E, Zharikova A, Efimova I, Pokrovskaya M, Slominsky PA, Shalnova S, Meshkov A, Drapkina O. Cystic Fibrosis Polymorphic Variants in a Russian Population. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine.* 2020;13:679-686.
- Kostjuk SA, Kolomic ND, Poleshuk NN, Rudenkova TV. Laboratornaja diagnostika vospalitel'nyh processov reproduktivnyh organov, obuslovlennyh nalichiem vzbuditelej urogenital'nyh infekcij. *Medicinskie novosti.* 2009;8:69-72. (in Russian)
- Kostjuk SA. Molekuljarno-biologicheskie metody v medicine: monografija. Minsk: BelMAPO. 2013:327 s. (in Russian)
- Kostjuk SA, Kolomic ND, Rudenkova TV, Polujan OS. Teoreticheskie i prikladnye voprosy primeneniya metodov analiza nukleinovyyh kislot: monografija. Minsk: BelMAPO. 2014:272 s. (in Russian)
- Gomberg MA. Reproaktivnoe zdorov'e i infekcii, vyzvannye C. trachomatis. *Ginekologija.* 2011;13(1):13-16. (in Russian)
- Rudenkova TV. Mycoplasma genitalium: biologicheskie osobennosti i vozmozhnosti diagnostiki infekcij. *Laboratornaja diagnostika. Vostochnaja Evropa.* 2016;17(1):53-64. (in Russian)
- Kostjuk SA, Kulaga OK, Poleshuk NN. Pappilomavirusnaja infekcija. Covremennye problemy infekcionnoj patologii cheloveka (jepidemiologija, klinika, virusologija, mikrobiologija i immunologija). Materialy NII jepidemiologii i mikrobiologii po itogam vypolnenija GNTP «Infekcii i medicinskie biotehnologii» 2001–2005 gg. 2005:161-165. (in Russian)
- Kostjuk SA, Bur'jak DV, Rudenkova TV, Badygina NA, Polujan OS, Glinkina TV. Primenenie novyyh metodik PCR v rannem vyjavlenii i prognozirovanii ishoda genital'noj VPCh-infekcii i zabozevanij shejki matki. *ARS medica (akusherstvo i ginekologija).* 2010;3:129–135. (in Russian)
- Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, de Sanjosé S, Franceschi S, Clifford GM. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. *Int. J. Cancer.* 2012;131(10):2349-2359. DOI: 10.1002/ijc.27485.

31. Vergejchik GI, Stribuk ZhA, Eremin VF, Shelkovich SE, Semenov DM, Shelepen' KG, Zajceva TP, Lysov AI, Tomchina AV, Sharf IN. Jepidemiologija genital'noj papillomavirusnoj infekcii na territorii razlichnyh regionov RB. *Medicinskie novosti*. 2010;11:69-75. (in Russian)
32. Krasnopol'skii VI, Zarochentseva NV, Mikaelyan AV, Keshchyan LV, Lazareva IN. Role of papillomavirus infection in pregnancy pathology and outcome for the newborn: Current ideas. *Rossiiskii vestnik akushera-ginekologa*. 2016;16(2):30-36. DOI: 10.17116/rosakush201616230-36. (in Russian)
33. Kravchenko SS, Vergejchik GI. Klinicheskoe znachenie kachestvennyh i kolichestvennyh markerov papillomavirusnoj infekcii pri razlichnyh formah VPCh-associirovannoj patologii genitalij u beremennyh. *Ohrana materinstva i detstva*. 2013;22(2):13-17. (in Russian)
34. Kravchenko SS, Severin IN, Vergejchik GI. Opredelenie jekspressii onkogenov e6/E7 virusa papillomy cheloveka u beremennyh pacientok s genital'noj papillomavirusnoj infekciej. *Medicinskie novosti*. 2015;9:63-66. (in Russian)
35. Kravchenko SS, Zaharenkova TN, Teslova OA. Osobennosti techenija beremennosti, rodov, poslerodovogo perioda i sostojanie novorozhdenykh u zhenshin s genital'noj papillomavirusnoj infekciej. *Problemy zdorov'ja i jekologii*. 2016;(3):59-65. (in Russian)
36. Wu D, Chen L, Zhen J, Jin X. Systematic review and meta-analysis on influence of human papillomavirus infection during pregnancy on premature rupture of membranes and premature delivery. *Ann. Palliat. Med.* 2021;10(10):10735-10743. DOI: 10.21037/apm-21-2497.
37. Popescu SD, Boiangiu AG, Sima R-M, Bilteanu L, Vladareanu S, Vladareanu R. Maternal HPV Infection and the Estimated Risks for Adverse Pregnancy Outcomes – A Systematic Review. *Diagnostics*. 2022;12(6):1471. DOI: 10.3390/diagnostics12061471.
38. Tret'jakova TB, Bashmakova NV, Demchenko NS. Geneticheskie prediktory akusherskih oslozhnenij: mezhgennye asociacii. *Rossiiskij vestnik akushera-ginekologa*. 2012;12(6):18-20. (in Russian)
39. Tret'jakova TB, Bashmakova NV, Demchenko NS. Vzaimodejstvie genov podverzhennosti zabolevanijam cheloveka kak faktor riska akusherskih oslozhnenij. *Akusherstvo i ginekologija*. 2013;12:41-45. (in Russian)
40. Kostjuk SA. Prediktivnaja medicina i metody geneticheskogo testirovanija. *Medicinskie novosti*. 2016;4:11-14. (in Russian)
41. Khan MJ, Ullah A, Basit S. Genetic Basis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Current Perspectives. *Appl. Clin. Genet.* 2019;12:249-260. DOI: 10.2147/TACG.S200341.
42. Vassilopoulou L, Matalliotakis M, Zervou MI, Matalliotaki C, Krithinakis K, Matalliotakis I, Spandidos DA and Goulielmos GN. Defining the genetic profile of endometriosis (Review). *Exp. Ther. Med.* 2019;17(5):3267-3281. DOI: 10.3892/etm.2019.7346.
43. Kostjuk SA. Geny predispolozhennosti k mul'tifaktornym zabolevanijam i geneticheskij polimorfizm: chto jeto takoe? *Medicinskie novosti*. – 2020;7:42-46. (in Russian)
44. Golovchenko IO, Ponomarenko IV, Churnosov MI. Geneticheskie faktory razvitija jendometrijoza. (Dannye polnogenomnyh issledovanij). *Rossiiskij vestnik akushera-ginekologa*. 2022;22(3):30-36. DOI: 10.17116/rosakush20222203130. (in Russian)
45. Najdukova AA, Kaprina EK, Donnikov AE, Chernuha GE. Geneticheskie aspekty formirovanija sindroma polikistoznyh jaichnikov. *Akusherstvo i ginekologija*. 2016;3:16-22. (in Russian)
46. Ponomareva TA, Altuhova OB, Ponomarenko IV, Churnosov MI. Rol' geneticheskikh faktorov v formirovanii jendometrioidnyh porazhenij. *Akusherstvo, Ginekologija i Reprodukcija*. 2023;17(4):443-454. (in Russian)
47. Anikaev AJu, Lomonosov AM. Primenenie sekvenirovanija novogo pokolenija (NGS) v klinicheskoj praktike. *Laboratornaja sluzhba*. 2014;3(1):32-36. (in Russian)
48. Arakeljan AS, Shubina E, Poprjaduhin AJu, Gol'cov AJu, Trofimov DJu, Adamjan LV. Sekvenirovanie jekzoma dlja diagnostiki i prognozirovanija riskov razvitija anomalij matki i vlagalishha. *Akusherstvo i Ginekologija*. 2021;12:120-127. DOI: 10.18565/aig.2021.12.120-127. (in Russian)
49. Stecenko IF, Krasnenko AJu, Stanoevich US, Meshherjakov AA, Vorotnikov IK, Druzhilovskaja OS, Belova VA, Churov AV. Identifikacija BRCA1/2-mutacij pri rake molochnoj zhelezy s primeneniem tehnologii vysokoproizvoditel'nogo sekvenirovanija. *Vestnik RGMU*. 2018;6:183-189. DOI: 10.24075/vrgmu.2018.074. (in Russian)
50. Nicolussi A, Belardinilli F, Silvestri V, Mahdavian Y, Valentini V, D'Inzeo S, Petroni M, Zani M, Ferraro S, Di Giulio S, Fabretti F, Fratini B, Gradilone A, Ottini L, Giannini G, Coppa A, Capalbo C. Identification of novel BRCA1 large genomic rearrangements by a computational algorithm of amplicon-based Next-Generation Sequencing data. *PeerJ*. 2019;7:7972. DOI: 10.7717/peerj.7972.
51. Shagam LI, Voinova VJu. Vozmozhnosti i ogranichenija vysokoproizvoditel'nogo sekvenirovanija v diagnostike monogennyh zabolevanij. *Rossiiskij vestnik perinatologii i pediatrii*. 2016;61(2):105-109. DOI: 10.21508/1027-4065-2016-61-2-105-109. (in Russian)
52. Abbasi A, Alexandrov LB. Significance and limitations of the use of next-generation sequencing technologies for detecting mutational signatures. *DNA Repair*. 2021;107:103200. DOI: 10.1016/j.dnarep.2021.103200.
53. Suhij GT, Trofimov DJu, Barkov IJu, Donnikov AE, Shubina ES, Korostin DO, Ekimov AN, Gol'cov AJu, Baharev VA, Karetnikova NA, Borovikov PI, Tetruashvili NK, Kim LV, Gata AS, Pavlovich SV, Skrbabin KG, Prohorchuk EB, Mazur AM, Pantjuh KS. Novye podhody k provedeniju prenatal'nogo skringinga hromosomnoj patologii: DNK-skrining po krovi materi. *Akusherstvo i Ginekologija*. 2016;6. DOI: 10.18565/aig.2016.6.recomendations. (in Russian)

MODERN GENETIC METHODS FOR SOLVING APPLIED PROBLEMS IN OBSTETRICS AND GYNECOLOGY

S. A. Kostiuk, L. F. Mozheiko, O. S. Poluyan, T. V. Pinchuk

Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Background. Advances in human genetics research have increased interest in studying the genetic aspects of the prevalence of a number of diseases, including gynecologic diseases. Using modern molecular techniques, research is being conducted to determine the role of genetic factors in reproductive disorders, in the etiology of spontaneous abortions and congenital anomalies.

Objective. To evaluate the possibilities of molecular genetic methods of laboratory diagnostics for solving applied issues in obstetrics and gynecology.

Materials and methods. Scientific publications on the use of molecular methods of laboratory diagnostics for solving applied issues in obstetrics and gynecology were analyzed.

Results. The data on the problem of application of modern genetic methods such as chromosomal microarray analysis, PCR, sequencing in obstetrics and gynecology are presented. The data on the study of genetic factors associated with obstetric pathology and gynecologic diseases are presented.

Conclusions. Genetic methods make it possible to diagnose a wide range of gynecological diseases, identify the DNA of pathogens of sexually transmitted infections, which is of current importance both for gynecological patients and to determine the tactics of pregnancy and childbirth, to establish associations of gene polymorphisms with the development of gynecological diseases and obstetric pathologies.

Keywords: gynecological diseases, candidate genes, PCR, chromosomal microarray analysis, sequencing.

For citation: Kostiuk SA, Mozheiko LF, Poluyan OS, Pinchuk TV. Modern genetic methods for solving applied problems in obstetrics and gynecology. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2024, vol. 3, no. 1(4). pp. 238–246 (in Russian).

Поступила 09.04.2024

К ЮБИЛЕЮ ПРОФЕССОРА КАМЫШНИКОВА ВЛАДИМИРА СЕМЕНОВИЧА



1 августа 2023 года отметил свой 80-летний юбилей заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики БелГИУВ/БелМАПО/ИП-КиППКЗ УО БГМУ (1999–2024), главный редактор международного научно-практического журнала «Лабораторная диагностика. Восточная Европа» (2011–2024), врач клинической лабораторной диагностики высшей квалификационной категории, доктор медицинских наук, профессор Владимир Семёнович Камышников.

Профессор Камышников В. С. широко известен в Беларуси и за пределами страны как ученый в области клинической биохимии и лабораторной медицины, а также как автор многочисленных книг (в том числе учебников и учебных пособий), ставших настольными руководствами по клинической лабораторной диагностике для специалистов клиничко-диагностической лабораторной службы и врачей клинических специальностей.

Владимир Семёнович родился в городе Александровск-Сахалинский Сахалинской области (о. Сахалин, Россия) в семье врача-пограничника. После средней школы, которую он окончил с отличием, поступил в Минский государственный медицинский институт, на протяжении пяти лет обучения в котором (со второго курса), являлся Ленинским стипендиатом в области научных исследований.

В 1967 г. с отличием окончил лечебный факультет медицинского института и был избран по конкурсу на должность ассистента кафедры общей

химии Минского государственного медицинского института, членом научного студенческого кружка при которой был все предшествующие годы обучения в институте. В апреле 1970 г. после досрочного завершения (в течение 1,5 лет) аспирантуры при той же кафедре был избран по конкурсу на должность ассистента только что открытой (на основании Приказа Министра МЗ СССР от 25.01.1968 г. «О мерах по дальнейшему развитию и совершенствованию лабораторной клиничко-диагностической службы в СССР»), ранее вовсе не существовавшей в стране кафедры клинической лабораторной диагностики в Белорусском государственном институте усовершенствования врачей (БелГИУВ) и принял участие в становлении образовательной, научной, организационно-методической и других видов ее деятельности.

После защиты в 1971 г. кандидатской диссертации «К методам исследования биогенных аминов и состоянию их обмена при лейкозах» по специальности 03.00.04–биохимия, стал первым в истории института председателем Совета Молодых Ученых БелГИУВ (1971–1976 гг.).

В 1974 г. избран на должность старшего преподавателя, а в 1981 г. – доцента кафедры клинической лабораторной диагностики БелГИУВ.

В период с ноября 1977 по июль 1981 г. заведовал организованной с его участием лабораторией биохимии и биофизики впервые созданного в стране (в 1977 г.) БелНИИ кардиологии МЗ БССР (первой категории). Возглавлявшаяся им лаборатория

внесла существенный вклад в выполнение биохимических исследований по Международной советско-американской программе в области изучения эпидемиологии неинфекционных сердечно-сосудистых заболеваний.

20 марта 1991 г. защитил в Университете Дружбы Народов им. Патриса Лумумбы (г. Москва) докторскую диссертацию на тему «Особенности холестеринопатии и атерогенеза при легочной патологии» по специальности «патологическая физиология» и в 1992 г. был избран на должность профессора кафедры клинической лабораторной диагностики; 15 июня 1993 г. получил ученое звание «профессор».

В 1993–1997 гг. являлся Председателем комиссии по лабораторной технике и лабораторно-диагностическим системам созданного в республике Комитета по новой медицинской технике МЗ РБ.

В 1996–1999 гг. был секретарем первого экспертного совета по здравоохранению ГКНТ, а также членом Правления научно-технической ассоциации Республики Беларусь «Оптика и лазеры» («Фотоника») при Институте Физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси.

С 1999 г. по июнь 2024 г. включительно (в течение 25 лет) являлся заведующим кафедрой клинической лабораторной диагностики БелГИУВ (БелМАПО, ИПК и ППКЗ УО БГМУ).

На протяжении 10 лет – с января 1997 г. по июль 2007 г. был проректором по научной работе БелГИУВ/Белорусской медицинской академии последиplomного образования, а в период с июня 2004 г. по июль 2007 г. одновременно – заместителем руководителя по идеологической работе БелМАПО.

В течение 18 лет активно участвовал в деятельности Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (БРФФИ): в 1996–2003 гг. был членом экспертного совета секции «Медико-биологические науки», с 2004 по 2008 г. – членом Бюро Совета, с 2009 по 2014 г. – председателем секции «Медицина и фармация» БРФФИ.

С 2000 г. был членом советов по защите диссертаций: специальность «эндокринология», «клиническая лабораторная диагностика», «общественное здоровье и здравоохранение».

Владимир Семёнович опубликовал около 700 научных работ, в том числе 57 книг (выдержавших более 90 изданий) по клинической лабораторной диагностике (из них 12 учебников и учебных пособий с грифом Министерства образования Республики Беларусь, 45 монографий, справочников, 28 учебно-методических пособий), материал кото-

рых охватил различные области лабораторной медицины: многие из них претерпели до 11 переизданий – общим тиражом 202 550 экз.

Профессор Камышников В. С. обладает весьма высоким (среди медиков) Российским индексом научного цитирования (РИНЦ): на период 2024 г. – 5650.

Владимир Семёнович внес существенный вклад в развитие клинической лабораторной диагностики, подготовку кадров высшей научной квалификации по этой специальности, в организацию деятельности национальной клинической лабораторной службы.

Подготовил 3 докторов и 26 кандидатов наук, завершили работу по выполнению кандидатских диссертаций еще 3 соискателя.

Автор 26 изобретений (патентов). Осуществлял научное руководство выполнением 27-ми тем НИР, финансировавшихся целевым назначением, в том числе 5 инновационных проектов, 13 заданий Государственных научно-технических программ, 6-ти заданий Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, основным результатом выполнения которых явились разработка, создание и освоение отечественного производства 54 видов импортозамещающих и инновационных лабораторно-диагностических тест-систем на базе НТПК «Анализ Х» БГУ и Хозрасчетного опытного предприятия Института биоорганической химии (ХОП ИБОХ) НАН Беларуси.

За выдающийся вклад в социально-экономическое развитие страны Владимиру Семёновичу дважды присваивались гранты Президента Республики Беларусь, Министерства здравоохранения РБ (2006), Министерства образования РБ (2011). Он награжден знаками «Отличник здравоохранения Республики Беларусь» и «Отличник образования Республики Беларусь».

Высокие профессиональные качества Владимира Семёновича, его широчайший круг интересов и знаний, организованность и колоссальная трудоспособность, желание познавать новое и постоянная готовность учиться – позволяют ему успешно трудиться на благо дальнейшего развития отечественной клинической лабораторной диагностики.

Члены редакционной коллегии журнала «Биохимия и молекулярная биология» от всей души поздравляют Владимира Семеновича с юбилеем, желают ему крепкого здоровья, творческого долголетия и благополучия!

*Редакционная коллегия журнала
«Биохимия и молекулярная биология»*

IN MEMORIAM
ЧЛЕН-КОРРЕСПОНДЕНТ НАН БЕЛАРУСИ
ШКУМАТОВ ВЛАДИМИР МАКАРОВИЧ
(30.05.1952 – 09.03.2024)



Оборвалась жизнь ученого-биохимика, члена-корреспондента НАН Беларуси, заведующего лабораторией биохимии лекарственных препаратов НИИ физико-химических проблем БГУ, профессора, доктора биологических наук, члена Президиума ОО «Белорусское общество биохимиков и молекулярных биологов», члена редакционной коллегии журнала «Биохимия и молекулярная биология» Владимира Макаровича Шкуматова.

Владимир Макарович родился на Гомельщине в д. Братское Наровлянского района. Рано проявились его склонности к биологическим наукам, которые были реализованы во время его учебы в БГУ и который он окончил с отличием в 1974 г. Как профессиональный исследователь он сложился во время работы в Институте биоорганической химии АН БССР, где он работал с 1974 по 1987 гг. на должностях стажера-исследователя, младшего, старшего, ведущего научного сотрудника, заместителя заведующего лабораторией химии белка. В 1980 году защитил кандидатскую диссертацию на тему «Выделение, физико-химические характеристики и структурная организация 20s, 22R-холестерингидрирующего цитохрома P-450 из митохондриальной коры надпочечника быка». В 1991 году – защитил докторскую диссертацию на тему «Цитохром P-450-зависимые пути биосинтеза физиологически активных веществ». Благодаря его академическим исследованиям была обоснована и разработана технология применения ферментативных микрореакторов для биотехно-

логического получения радиоактивно-меченых стероидов, созданы трансгенные микроорганизмы для первичного тестирования лекарственных препаратов.

С 1987 года В. М. Шкуматов работает во вновь создаваемой биотехнологической промышленности, вначале на должности заместителя генерального директора Белорусского ГНПО «Белбиотехнология», а в последующем, директором научного отделения НИИ ПК медико-биологического института. Им разработаны новые композиции высокоочищенных ферментов для получения лекарственных средств комбинированного действия, сконструированные композиции рекомбинантных микроорганизмов для получения стероидов, предложена оригинальная биотехнология получения лекарственных препаратов и производство иммуноферментных наборов для диагностики заболеваний человека. Он был активным участником ГП «Инновационная биотехнология» и ГНТП «Малотоннажная химия». В сотрудничестве с Институтом биохимии НАН Беларуси разработал проект программы по развитию витаминной промышленности в Республике Беларусь.

Начиная с 1996 года, он был одним из руководителей ВУЗовской науки, работая в БГУ на должности заведующего лабораторией биохимии лекарственных препаратов и профессора кафедры высокомолекулярных соединений, активно развивал научные связи с учеными МГУ имени М. В. Ломоносова и Европейской лаборатории мо-

лекулярной биологии, а также немецкими исследовательскими центрами. Являлся руководителем 5 международных проектов и членом международных научных советов в ближнем и дальнем зарубежье, в 2010–2013 гг. принимал участие в процедурах выдвижения кандидатов на присвоение Нобелевской премии.

Неоценим вклад Владимира Макаровича в подготовку научных кадров. Являясь членом Президиума ВАК Республики Беларусь и выполняя обширный спектр научно-педагогических работ, он пользовался заслуженным авторитетом научного сообщества, педагогического коллектива и студенчества, а также коллег по биохимическому обществу нашей страны. Был докладчиком пленарных заседаний Белорусских биохимических конгрессов, редактором публикаций и членом редакционных советов и коллегий профильных изданий, в т.ч. «ОА Biochemistry» (Великобритания), «Биомедицинская химия» (Россия).

Перу Владимира Макаровича принадлежит более 300 научных публикаций, включая авторство в 7 коллективных монографиях в дальнем зарубежье. Его журнальные публикации последнего десятилетия характеризуется высоким рейтингом, а практические разработки обладают мировым приоритетом. Активная и результативная научно-пе-

дагогическая и научно-организационная деятельность В. М. Шкуматова отмечена ведомственными и международными наградами и почетными знаками. В 2008 году ему присвоено ученое звание профессора по специальности «биология», в 2014 году – избран членом-корреспондентом НАН Беларуси по специальности «биотехнология». Он имел большие творческие планы, работал над новыми проектами, несмотря на тяжелые испытания, подвергшие его здоровье в период ковидной пандемии и ее последствий. К несчастью, его здоровье было подорвано, но не остановило его работы до последних дней жизни.

Биохимическая наука и научное сообщество Республики Беларусь с утратой талантливого и эффективно работающего ученого понесли тяжёлую утрату, глубина которой еще не полностью осознана его товарищами и учениками, но творческое наследие члена-корреспондента В. М. Шкуматова безусловно является ярким примером беззаветного служения науке и использованию ее результатов на благо общества и страны.

*Мойсеёнок А. Г.,
Кузнецов О. Е.,
Демидчик В. В.,
Сутько И. П.*

IN MEMORIAM
АКАДЕМИК КУЛЬЧИЦКИЙ ВЛАДИМИР АДАМОВИЧ
(06.03.1948 – 11.04.2024)



Ушел из жизни наш коллега и товарищ по биохимической работе, лидер и новатор медико-биологических исследований в Республике Беларусь, руководитель центра изучения мозга при НАН Беларуси, многолетний работник Института физиологии НАН Беларуси, член президиума ОО «Белорусское общество биохимиков и молекулярных биологов», академик, профессор, доктор биологических наук Кульчицкий Владимир Адамович.

Родом Владимир Адамович из Забайкалья, где будущий известный ученый рос в семье военнослужащего и проявил незаурядные склонности к медицинским знаниям. Учился и блестяще окончил в 1972 г. Куйбышевский медицинский институт, в котором проявил себя как потенциальный исследователь. По распределению работал травматологом в Костромской области, а в 1975 г. вернулся в *alma mater* на преподавательскую работу. Одновременно трудился в качестве врача «Скорой помощи», что в немалой степени способствовало формированию его научных идей и медицинского опыта. Еще в студенческое время испытал влечение к нейрохирургической деятельности, привитое ему авторитетным профессором Л. Нестеровым, и вместе с учителем стал участником I съезда нейрохирургов СССР. Но с 1975 г. он стал подопечным члена-корреспондента АМН СССР М. В. Сергиевского, под руководством которого изучал сосуды и рецепторы, обеспечивающие функционирование дыхательного центра в ответ на динамику углекислого газа в кровообращении. Работа молодого ученого отмечена премией ВЛКСМ (1979 г.)

и стала темой кандидатской диссертации «Изменение электрической активности нейронов дыхательного центра и артериального давления при охлаждении центральных хемочувствительных структур» (1980).

Во время физиологических форумов 80-х годов интересовался родственными исследованиями белорусских нейрофизиологов, в т.ч. с недавно изданным членом-корреспондентом АН БССР В. М. Гуриным, разрабатывающим проблемы терморегуляции и системной регуляции обмена веществ (с 1984 г. – директор института физиологии АН БССР). Принял решение о работе в Беларуси, которое оказалось безошибочным: с 1989 г. он научный сотрудник, с 1991 г. – заведующий лабораторией, с 2006 г. – заместитель директора, с 2023 г. – заведующий Центром мозга – весь научный и творческий путь в Институте физиологии.

Основные вехи научного пути: докторская диссертация на тему «Органная макро- и микрогемодинамика при активации или блокаде вентральных отделов продолговатого мозга» (1989), в 1998 г. получил звание профессора, в 2000 г. – избран членом-корреспондентом НАН Беларуси, в 2017 г. – действительным членом (академиком).

Результаты научной деятельности В. А. Кульчицкого находятся в области экспериментальной и клинической нейрофизиологии. Изучены механизмы формирования ноцицептивных рефлексов, реорганизации нейронных сетей мозга, генерации дыхательного ритма и формирования симпатотонизирующих влияний, регулирующих тонус кро-

веносных сосудов и сердца. Им установлена роль популяции нервных клеток продолговатого мозга для инициации цикла дыхания и поддержания тонуса кровеносных сосудов, а также регуляция болевой чувствительности. Совместно с немецкими учеными обосновал концепцию роли простагландинов в термочувствительности нейронов гипоталамуса и участия в механизмах нейропластичности.

Широко и доброжелательно открытый к сотрудничеству с коллегами в институтах физиологии, биохимии, РНПЦ неврологии и нейрохирургии, оториноларингологии, академик Кульчицкий В. А. разработал методы предотвращения деструктивных процессов после повреждения тройничного и блуждающего нервов, моделирования межнейронных коммуникаций, интраназального периневрального транспорта мезенхимальных стволовых клеток при травме головного мозга. Выдвинуто новое положение о механизмах обструктивного апноэ во сне, выяснены центральные механизмы синдрома внезапной смерти.

В сотрудничестве с гродненскими биохимиками провел апробацию нейропротекторных соединений из группы пантотеновой кислоты на модели изолированного гиппокампа и, тем самым, сделал пионерское исследование в кофермент-зависимых механизмах развития нейродегенеративной патологии. Был консультантом проекта по изучению редокс-соединений в качестве протекторов поражения гиппокампа при травме головного мозга, а также научным руководителем и координатором проекта по оценке безопасности пальмового масла в питании населения. Актив-

ный участник белорусских биохимических конгрессов, инициатор и координатор международной конференции «Границы биологических наук. Сигналинг и метаболизм» (2018). В течение последнего десятилетия являлся членом президиума ОО «Белорусское общество биохимиков и молекулярных биологов».

Перу В. А. Кульчицкого принадлежит более 400 научных работ, включая 21 монографию. Большую популярность приобрели монографии Владимира Адамовича «Синдром смерти» (1999), «Синдром жизни» (2002), «Механизмы действия лечебных физических факторов» (2007), его монографии «Ствол головного мозга: клинические и патофизиологические соответствия» (2016) суждено стать настольной книгой нейрофизиологов и неврологов. Он автор более 50 патентов на изобретения и полезные модели. Его научная школа включает 3 докторов и более 20 кандидатов наук. Научное сообщество Беларуси признает его выдающийся вклад в укрепление внутриакадемической связи ученых, развитие контактов академической и университетской науки, практического здравоохранения и международного сотрудничества. Память об академике Владимире Адамовиче Кульчицком, ученом, организаторе науки, разностороннем и высококвалифицированном исследователе сохранится в истории белорусской науки и нашей памяти.

*Мойсеёнок А. Г.,
Кузнецов О. Е.,
Демидчик В. В.,
Сутько И. П.*

Адзерихо Игорь Эдуардович – д-р. мед. наук, профессор, Государственное учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет» (пр. Дзержинского, 83, 220083, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: adzerikhoigor@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-6572-8842>.

Igor E. Adzerikho – PhD, MD (Medicine), Professor, Professor at the Department of Clinical Pharmacology and Therapy, Belarusian State Medical University (Dzerzhinsky Ave, 83, 220083, Minsk, Belarus); e-mail: adzerikhoigor@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-6572-8842>.

Амаэбери Надежда Викторовна – канд. биол. наук, доцент кафедры радиационной химии и химико-фармацевтических технологий химического факультета БГУ (пр-т. Независимости, 4, 220030 г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: n.amaegberi@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-8907-867X>.

Nadezda V. Amaegberi – PhD (Biology), Associate Professor at the Department of Radiation Chemistry and Chemical-Pharmaceutical Technologies, Faculty of Chemistry, Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Belarus); e-mail: n.amaegberi@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-8907-867X>.

Алехнович Лариса Игоревна – кандидат мед. наук, доцент, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики, Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения БГМУ (220013, г. Минск ул. П. Бровки, 3); e-mail: larial@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0003-4080-1975>.

Larysa I. Aliakhnovich – PhD (Medicine), Associate Professor, Associate Professor of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel, Belarusian State Medical University (220013 Minsk, str. P. Brovki, 3); e-mail: larial@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0003-4080-1975>.

Бабарико Дарья Викторовна – магистр биол. наук, научный сотрудник, учреждение здравоохранения «Национальная антидопинговая лаборатория» (Боровлянский с/с, 106-1, район аг. Лесной, 223040, Минский р-н, Республика Беларусь); e-mail: rlab@antidoping.by.

Darya V. Babaryko – M.Sc. (Biology), Researcher, National Anti-Doping Laboratory (Borovlyansky s/s, 106 - 1, Lesnoy district, 223040 Minsk reg., Republic of Belarus); e-mail: rlab@antidoping.by.

Бадун Елена Генриховна – научный сотрудник, отдел медико-биологических проблем алкоголизма, Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси (пл. Ан. Тызенауза, 7, 230023, г. Гродно, Республика Беларусь), e-mail: eshydowska@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-3922-5050>.

Alena G. Badun – Researcher, Department of Medical and Biological Problems of Alcoholism, Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (Sq. An. Tyzenauza, 7, 230023, Grodno, Republic of Belarus); e-mail: eshydowska@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-3922-5050>.

Бакакина Юлия Сергеевна – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник, учреждение здравоохранения «Национальная антидопинговая лаборатория» (Боровлянский с/с, 106-1, район аг. Лесной, 223040, Минский р-н, Республика Беларусь); e-mail: rlab@antidoping.by; <https://orcid.org/0000-0002-2948-4200>.

Yulia S. Bakakina – PhD (Biology), Leading Researcher, National Anti-Doping Laboratory (Borovlyansky s/s, 106 - 1, Lesnoy district, 223040 Minsk reg., Republic of Belarus); e-mail: rlab@antidoping.by; <https://orcid.org/0000-0002-2948-4200>.

Балаева-Тихомирова Ольга Михайловна – канд. биол. наук, доцент, заведующая кафедрой химии и естественнонаучного образования, Витебский государственный университет имени П.М. Машерова (пр-т Московский, 33, 210038, г. Витебск, Республика Беларусь); e-mail: olgabal.tih@tut.by; <https://orcid.org/0000-0002-2130-1932>.

Olga M. Balaeva-Tikhomirova – PhD. (Biology), Associate Professor, Head of the Department of Chemistry and Natural Science Education, Vitebsk State P.M. Masherov University (Moskovsky Ave., 33, 210038, Vitebsk, Republic of Belarus); e-mail: olgabal.tih@tut.by; <https://orcid.org/0000-0002-2130-1932>.

Басалай Анастасия Александровна – научный сотрудник, Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: anastasiya.basalay@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-1878-9623>

Anastasiya A. Basalai – Researcher, Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: anastasiya.basalay@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-1878-9623>

Белевцев Михаил Владимирович – канд. биол. наук., доцент, заместитель директора по научной работе, Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская 43, 223053, д. Боровляны, Минская обл и р-н, Республика Беларусь); e-mail: belevtsev_m@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9533-4705>.

Mikhail V. Belevtsev – PhD (Biology), Associate Professor, Deputy Director for Science, Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya str., Borovlyany village, Minsk region, Republic of Belarus); e-mail: belevtsev_m@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9533-4705>.

Богданова Анастасия Валерьевна – м.н.с. сектора биофизических исследований ЛНЭМ НИИ-ЯП БГУ (ул. Бобруйская, 11, 220030, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: bahdanavanastasya@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-2586-8151>.

Anastasya V. Bahdanava – Junior researcher of the biophysical sector of LNEM INP BSU (Bobruiskaya str., 11, 220030, Minsk, Republic of Belarus); e-mail: bahdanavanastasya@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-2586-8151>.

Богдевич Евгений Валерьянович – аспирант, Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси» (пл. А. Тызенгауза, д. 7, 230023, г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: yauhenibogdevich@gmail.com; <https://orcid.org/0009-0003-9825-098X>.

Yauheni V. Bahdzevich – PhD student, The Republican Scientific Research Unitary Enterprise “The Institute of Biochemistry Biologically Active Compounds, The National Academy of Sciences of Belarus” (7, A. Tyzenhauz Sq., 230023, Grodno, Republic of Belarus); e-mail: yauhenibogdevich@gmail.com; <https://orcid.org/0009-0003-9825-098X>.

Букша Екатерина Витальевна – мл. науч. сотр., Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси» (пл. А. Тызенгауза, д. 7, 230023, г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: kasper@ibiochemistry.by; <https://orcid.org/0009-0001-0236-9691>.

Ekaterina V. Buksha – Junior research fellow, The Republican Scientific Research Unitary Enterprise “The Institute of Biochemistry Biologically Active Compounds, The National Academy of Sciences of Belarus” (7, A. Tyzenhauz Sq., 230023, Grodno, Republic of Belarus); e-mail: kasper@ibiochemistry.by; <https://orcid.org/0009-0001-0236-9691>.

Велеменчук Дарья Николаевна – магистрант МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, биолог, Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, Минский р-н, д. Боровляны, Республика Беларусь); e-mail: Velemenchuk_DN@rambler.ru. (8029 8778703)

Darya N. Velemianchuk – master course student International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, biologist, Republican Scientific and Practical Center of Children’s Oncology, Hematology and Immunology (Frunzenskaya str., 43, 223053, Minsk district, D. Borovlyany, Republic of Belarus); e-mail: Velemenchuk_DN@rambler.ru.

Виноградов Владимир Викторович – доктор биол. наук, профессор; <http://orcid.org/0000-0001-8009-1843>

Vladimir V. Vinogradov – D. Sc. (Biology), Professor; <http://orcid.org/0000-0001-8009-1843>

Владимирская Татьяна Эрнстовна – канд. биол. наук, доцент, ведущий научный сотрудник НИЛ НИИ ЭиКМ БГМУ (пр. Дзержинского, 83, 220083, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: tan_2304@inbox.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0777-192X>.

Tatyana E. Vladimirskaia – PhD (Biology), Head of the Department of General Pathology, Leading Researcher, Belarusian State Medical University (Dzerzhinsky Ave, 83, 220083, Minsk, Belarus); e-mail: tan_2304@inbox.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0777-192X>.

Гармаза Юлия Михайловна – канд. биол. наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии антител и цитокинов ГУ “Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий” (Долгиновский тракт 160, 220053 г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: garmaza@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3964-0585>.

Yuliya M. Harmaza – PhD (Biology), Associate Professor, Leading researcher, Laboratory of Biotechnology of Antibody and Cytokines, Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies (Dolginovsky tr. 160, 220053 Minsk, Republic of Belarus); e-mail: garmaza@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3964-0585>.

Гилеп Андрей Александрович – канд. хим. наук, ведущий научный сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, 220084 г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: agilep@yahoo.com; <https://orcid.org/0000-0002-3621-6482>.

Andrey A. Gilep – PhD (Chemistry), Leading Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, (5, Academician V.F. Kuprevich st., building 2, 220084 Minsk, Republic of Belarus); e-mail: agilep@yahoo.com; <https://orcid.org/0000-0002-3621-6482>.

Гмошинский Иван Всеволодович – доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории пищевой токсикологии и оценки безопасности нанотехнологий. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи (2/14 Устьинский проезд, г. Москва, 109240, Россия). E-mail: gmosh@ion.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3671-6508>

Ivan V. Gmshinski – Ph.D., D. Sc., Chief Researcher of the Laboratory of Food Toxicology and Nanotechnology Safety Assessment. Federal State Budgetary Scientific Institution Federal Research Center of Nutrition, Biotechnology and Food Safety (2/14 Ustinsky Proezd, Moscow, 109240, Russia). E-mail: gmosh@ion.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3671-6508>

Горбич Юрий Леонидович – канд. мед. наук, доцент, заместитель министра здравоохранения, Министерство здравоохранения Республики Беларусь (ул. Мясникова, 39, г. Минск, 220030, Республика Беларусь); e-mail: y.gorbich@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-4870-6948>.

Yury L. Gorbich – PhD (Medicine), Associate Professor, Deputy Minister of Health of the Republic of Belarus, Ministry of Health of the Republic of Belarus (39, Myasnikova st., 220030, Minsk, Republic of Belarus); e-mail: y.gorbich@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-4870-6948>.

Готько Оксана Владимировна – старший научный сотрудник диагностической лаборатории с группой лучевой диагностики, РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова. 223040 аг. Лесной, Минский район; e-mail: babuka_05@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0001-8083-0861>.

Oksana V. Gotko – Senior Researcher, Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical Radiology. 223040 ag. Lesnoy, Minsk district. e-mail: babuka_05@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0001-8083-0861>.

Грицкевич Евгений Ростиславович – канд. биол. наук, доцент, Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А.Д.Сахарова БГУ (ул. Долгобродская, 23/1, 220070 Минск, Республика Беларусь); e-mail: gritskevitch@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4497-8399>.

Evgeniy R. Gritskevitch – PhD (Biology), Associate Professor, Belarusian State University, ISEI BSU (23/1, Dolgobrodskaya str., 220070 Minsk, Republic of Belarus); e-mail: gritskevitch@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4497-8399>.

Джаббар Мустафа Салех – аспирант, Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (пл. А. Тызенгауза, 7, 230023 г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: mustafasaleh340@gmail.com.

Jabbar Mustafa Saleh – PhD student at the Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (A. Tyzengauz Square, 7, 230023 Grodno, Republic of Belarus); e-mail: mustafasaleh340@gmail.com.

Дорошенко Евгений Михайлович – канд. биол. наук, доцент, ведущий научный сотрудник НИЧ, Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, г. Гродно 230009, Республика Беларусь); e-mail: dgi03@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9939-8749>

Yevgeny M. Doroshenko – PhD (Biology), Associate Professor, Leading Researcher of Research Department, Grodno State Medical University (Gorky str. 80, Grodno 230009, Republic of Belarus); e-mail: dgi03@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9939-8749>

Дубовик Ольга Сергеевна – младший научный сотрудник лаборатории иммунологических исследований, Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская 43, 223053, д. Боровляны, Минская обл и р-н, Республика Беларусь); e-mail: kupchinskayaa@gmail.com.

Volha S. Dubovik – Junior Researcher of the Laboratory of Immunological Research, Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya st., Borovlyany village, Minsk region, Republic of Belarus); e-mail: kupchinskayaa@gmail.com.

Дубо Юлия Владимировна – старший преподаватель кафедры молекулярной биологии биологического факультета Белорусского государственного университета (ул. Курчатова, 10, 220030 г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: yuliyadiubo@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-3161-1560>.

Yuliya V. Diubo – Senior Lecturer, Department of Molecular Biology, Belarusian State University (10 Khurchatova st., Minsk 220030, Belarus); e-mail: yuliyadiubo@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-3161-1560>.

Жилкевич Алёна Вячеславовна – младший научный сотрудник НИЛ НИИ ЭИКМ БГМУ (пр. Дзер-

жинского, 83, 220083, г. Минск, Республика Беларусь). e-mail: alenazhilkevich@mail.ru

Aliona V. Zhilkevich – Junior researcher, Belarusian State Medical University (Dzerzhinsky Ave, 83, 220083, Minsk, Belarus); e-mail: alenazhilkevich@mail.ru

Агнешка Закрэска – д-р мед. наук, проректор по науке и международному сотрудничеству, Высшая медицинская школа в Белостоке (ул. Краковская, д. 9, 15-875, г. Белосток, Республика Польша); e-mail: a.zakrzaska@wsmed.pl; <https://orcid.org/0000-0001-5321-9186>.

Agnieszka Zakrzaska – Dr. Med. Sci., Vice-rector for science and international cooperation, University of Medical Sciences in Bialystok (9, Krakowska st., 15-875, Bialystok, Poland); e-mail: a.zakrzaska@wsmed.pl; <https://orcid.org/0000-0001-5321-9186>.

Зверко Владимир Леонтьевич – канд. мед. наук., доцент, главный врач, Гродненский областной клинический перинатальный центр (ул. Горького 77, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: perinatalcenter@roddom.by.

Uladzimir L. Zverko – PhD (Medicine), Associate Professor, Chief physician, Grodno Regional Clinical Perinatal Center (77, Gorky str., 230009, Grodno, Republic of Belarus); e-mail: perinatalcenter@roddom.by.

Казинец Екатерина Олеговна – младший научный сотрудник, отдел медико-биологических проблем алкоголизма, Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси (пл. Ан. Тызнауза, 7, 230023, г. Гродно, Республика Беларусь), e-mail: ekaterina.lichick@mail.ru.

Ekaterina O. Kazinets – Junior Researcher, Department of Medical and Biological Problems of Alcoholism, Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (Sq. An. Tyzenauza, 7, 230023, Grodno, Republic of Belarus); e-mail: ekaterina.lichick@mail.ru.

Камышников Владимир Семенович – доктор мед. наук, профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики, Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения БГМУ (220013, г. Минск ул. П. Бровки, 3); kafdiag@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0003-1966-3939>.

Vladimir S. Kamyshnikov – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Clinical Laboratory Diagnostics Department, Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel, Belarusian State Medical University (220013 Minsk, str. P. Brovki, 3); e-mail: kafdiag@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0003-1966-3939>.

Кацнельсон Екатерина Иосифовна – старший преподаватель кафедры химии и естественнонаучного образования, Витебский государственный университет имени П.М. Машерова (пр-т Московский, 33, 210038, г. Витебск, Республика Беларусь); e-mail: kate_kaznelson@tut.by; <https://orcid.org/0000-0002-2435-0027>

Ekaterina I. Katsnelson – senior lecturer of the Department of Chemistry and Natural Science Education, Vitebsk State P.M. Masherov University (Moskovsky Ave., 33, 210038, Vitebsk, Republic of Belarus); e-mail: kate_kaznelson@tut.by; <https://orcid.org/0000-0002-2435-0027>

Квасюк Евгений Иванович – д-р хим. наук, профессор, Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А.Д.Сахарова БГУ (ул. Долгобродская, 23/1, 220070 Минск, Республика Беларусь); e-mail: ekvasyuk@inbox.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4029-8289>.

Evgeniy I. Kvasyuk – DSc (Chemistry), Professor, Belarusian State University, ISEI BSU (23/1, Dolgobrodskaya str., 220070 Minsk, Republic of Belarus); e-mail: ekvasyuk@inbox.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4029-8289>.

Кисель Мария Сергеевна – научный сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В.Ф.Купревича, д.5, корп.2, 220084 г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: marusen.kee@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-3432-0064>.

Mariya S. Kisel – Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, (5, Academician V.F. Kuprevich st., building 2, 220084 Minsk, Republic of Belarus); e-mail: marusen.kee@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-3432-0064>.

Павел Китлас – д-р мед. наук, проректор по делам студентов, Высшая медицинская школа в Белостоке (ул. Краковская, д. 9, 15-875, г. Белосток, Республика Польша); e-mail: p.kitlas@wsmed.pl; <https://orcid.org/0000-0002-5636-7624>.

Pawel Kitlas – Dr. Med. Sci., Vice-rector for students, University of Medical Sciences in Bialystok (9, Krakowska st., 15-875, Bialystok, Poland); e-mail: p.kitlas@wsmed.pl; <https://orcid.org/0000-0002-5636-7624>.

Ковганко Николай Николаевич – кандидат химических наук, доцент кафедры биологической химии, УО «Белорусский государственный медицинский университет», 220116 Минск проспект Дзержинского, 83; e-mail: mikalai44@tut.by. <https://orcid.org/0000-0002-3193-5955>.

Mikalai M. Kauhanka – PhD (Chemistry), Associate Professor, Belarusian State Medical

University (83, Dzerzhynski Ave., 220116 Minsk, Republic of Belarus); e-mail: mikalai44@tut.by. <https://orcid.org/0000-0002-3193-5955>.

Колб Александр Владимирович – кандидат биологических наук, доцент кафедры биологической химии, УО «Белорусский государственный медицинский университет», 220116 Минск проспект Дзержинского, 83; e-mail: sanya.kolb@yandex.by. <https://orcid.org/0000-0003-1224-2878>.

Alexander V. Kolb – PhD (Biology), Associate Professor, Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynski Ave., 220116 Minsk, Republic of Belarus); e-mail: sanya.kolb@yandex.by. <https://orcid.org/0000-0003-1224-2878>.

Костюк Светлана Андреевна – д-р мед. наук, профессор, главный научный сотрудник Научно-исследовательской лаборатории Научно-исследовательского института экспериментальной и клинической медицины учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» (220083, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83); e-mail: s.kostiuk@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3252-2626>.

Svetlana A. Kostiuk – PhD, MD (Medicine), Professor, Chief researcher of Research Laboratory, Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Belarusian State Medical University (Dzerzhynski Ave., 83, Minsk, Republic of Belarus, 220083); e-mail: s.kostiuk@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3252-2626>.

Кузнецов Олег Евгеньевич – кандидат биологических наук, доцент, директор Института биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (пл. А. Тызенгауза, 7, 230023 г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: olegkuznetsov@inbox.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1348-8688>

Aleh E. Kuzniatsou – PhD (Biology), Associate Professor, Director of the Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (7, A. Tyzengauz square, 230023 Grodno, Republic of Belarus); e-mail: olegkuznetsov@inbox.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1348-8688>

Кулагова Татьяна Александровна – канд. биол. наук, доцент, зав. сектором биофизических исследований ЛНЭМ НИИЯП БГУ (ул. Бобруйская, 11, 220030, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: tatyana.kulagova@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-1113-7323>.

Tatsiana A. Kulahava – PhD (Biology), Head of the biophysical sector of LNEMINPBSU (Bobruiskaya str., 11, 220030, Minsk, Republic of Belarus); e-mail: tatyana.kulagova@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-1113-7323>.

Купчинская Александра Николаевна – научный сотрудник лаборатории иммунологических исследований, Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская 43, 223053, д. Боровляны, Минская обл и р-н, Республика Беларусь); e-mail: kupchinskayaa@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-1931-7716>.

Aliaksandra H. Kupchynskaya – Researcher of the Laboratory of Immunological Research, Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya st., Borovlyany village, Minsk region, Republic of Belarus); e-mail: kupchinskayaa@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-1931-7716>.

Лукьянова Карина Андреевна – студентка 5-го курса кафедры радиационной химии и химико-фармацевтических технологий химического факультета БГУ (пр-т. Независимости, 4, 220030 г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: Karina2002792@gmail.com

Karina A. Lukyanava – 5th year student, Faculty of Chemistry, Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Belarus); e-mail: Karina2002792@gmail.com

Лис Руслан Евгеньевич – доцент кафедры гистологии цитологии и эмбриологии УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, улица Горького, д. 80.

Lis Ruslan Evgenievich – Associate Professor of the Department of Histology, Cytology and Embryology, Grodno State Medical University, Grodno, Gorky Street, 80.; e-mail: r.lis@mail.ru/

Ляликов Сергей Александрович – д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики и иммунологии, Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: lalikov@tut.by; <https://orcid.org/0009-0007-0085-0661>.

Siarhey. A. Lialikau – Doctor of Sciences (Medicine), Professor, Professor of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics and Immunology, Grodno State Medical University (80, Gorky str., 230009, Grodno, Republic of Belarus); e-mail: lalikov@tut.by; <https://orcid.org/0009-0007-0085-0661>.

Максимчик Юрий Зигмундович – ст. науч. сотр., Отраслевая научно-исследовательская лаборатория «ДНК-технологий» учреждения образования «Гродненский государственный аграрный университет» (ул. Академическая, д. 10, 230023, г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: yurym979@gmail.by; <https://orcid.org/0009-0004-6132-230X>.

Yuri Z. Maksimchyk – Senior Researcher, Applied-Research Laboratory of «DNA-technologies» of Educational Institution «Grodno State Agrarian University» (10, Akademicheskaya St., 230030, Grodno, Republic of Belarus); e-mail: yurym979@gmail.by; <https://orcid.org/0009-0004-6132-230X>.

Маркевич Елена Боходировна – старший преподаватель кафедры дерматовенерологии Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009 г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: elenamarkevich056@gmail.com; <https://orcid.org/0009-0008-7431-2003>

Elena B. Markevich – teacher, Grodno State Medical University (Gorky St., 80, 230009 Grodno, Republic of Belarus); e-mail: elenamarkevich056@gmail.com; <https://orcid.org/0009-0008-7431-2003>.

Марчик Анна Ивановна – Младший научный сотрудник, Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси (пл. А. Тызенгауза, д. 7, 230023, г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: rcula.25@gmail.com

Hanna I. Marchik – Junior researcher, The Institute of Biochemistry Biologically Active Compounds, The National Academy of Sciences of Belarus (7, A. Tyzenhauz Sq., 230023, Grodno, Republic of Belarus); e-mail: rcula.25@gmail.com

Мельникова Екатерина Андреевна – магистрантка кафедры радиационной химии и химико-фармацевтических технологий химического факультета БГУ (пр-т Независимости, 4, 220030 г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: katerinamelnikova999@gmail.com

Ekaterina A. Melnikova – Master student, Faculty of Chemistry, Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Belarus); e-mail: katerinamelnikova999@gmail.com

Мигун Диана Сергеевна – студентка, Белорусский государственный университет (ул. Курчатова 10, 220000 г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: dianamigun01@gmail.com.

Diana S. Migun – student, Belarusian State University (Kurchatova st. 10, 220000 Minsk, Republic of Belarus); e-mail: dianamigun01@gmail.com.

Миколай Томулевич – канцлер, Высшая медицинская школа в Белостоке (ул. Краковска, д. 9, 15-875, г. Белосток, Республика Польша); e-mail: m.tomulewicz@wsmed.pl; <https://orcid.org/0009-0004-4308-3157>.

Mikołaj Tomulewicz – Chancellor, University of Medical Sciences in Białystok (9, Krakowska st., 15-875, Białystok, Poland); e-mail: m.tomulewicz@wsmed.pl; <https://orcid.org/0009-0004-4308-3157>.

Митюкова Татьяна Алексеевна – кандидат биологических наук, доцент, главный научный сотрудник, Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: mityukovat@gmail.com. <https://orcid.org/0009-0009-7503-6634>.

Tatyana A. Mityukova – Ph.D. (Biology), Associate Professor, Chief Researcher, Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mityukovat@gmail.com. <https://orcid.org/0009-0009-7503-6634>

Можейко Людмила Федоровна – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» (220083, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83); e-mail: lfmozheiko@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-5549-6099>.

Ludmila F. Mozheiko – PhD, MD (Medicine), Professor, Chief of Department of Obstetrics and Gynecology, Belarusian State Medical University (Dzerzhinski Ave., 83, Minsk, Republic of Belarus, 220083); e-mail: lfmozheiko@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-5549-6099>.

Надольник Лилия Ивановна – доктор биол. Наук, доцент, заведующий отделом доклинического и экспериментального исследования, Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси, 230023, Гродно, площадь Антония Тызенгауза, д. 7, e-mail: lnadolnik@mail.ru; <http://orcid.org/000-0002-0363-7969>

Liliya I. Nadolnik – D. Sc. (Biology), Associate Professor, Head of the Department of Preclinical and Experimental Research, Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, 230023, Grodno, Antonia Tyzengauz Square, 7, e-mail: lnadolnik@mail.ru; <http://orcid.org/000-0002-0363-7969>

Николайчик Евгений Артурович – PhD, доцент, заведующий кафедрой молекулярной биологии биологического факультета Белорусского государственного университета (ул. Курчатова, 10, 220030 г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: nikolaichik@bsu.by; <https://orcid.org/0000-0002-6718-9309>.

Yevgeny A. Nikolaichik – PhD (Molecular Biology), Head, Department of Molecular Biology, Belarusian State University (10 Kurchatova st., Minsk 220030, Belarus); e-mail: nikolaichik@bsu.by; <https://orcid.org/0000-0002-6718-9309>.

Никольская Алена Константиновна – врач акушер-гинеколог, заведующий акушерско-физиологическим отделением, Городская клиническая

больница скорой медицинской помощи г. Гродно (ул. Советских Пограничников 115, 230027, г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: klochkonat@mail.ru.

Alena K. Nikolskaya – obstetrician-gynecologist, Head of the Obstetric Physiological Department, City Clinical Emergency Hospital of Grodno (115, Sovetskih Pogranichnikov str., 230027, Grodno, Republic of Belarus); e-mail: klochkonat@mail.ru.

Орешко Ольга Владимировна – студентка 5-го курса кафедры радиационной химии и химико-фармацевтических технологий химического факультета БГУ (пр-т Независимости, 4, 220030 г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: totohha01@gmail.com

Olga V. Oreshko – 5th year student, Faculty of Chemistry, Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Belarus); e-mail: totohha01@gmail.com

Островская Оксана Борисовна – канд. биол. наук, доцент, старший научный сотрудник, Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, д. 80, , 230009, г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: astrowskaja@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-3513-2014>

Aksana B. Astrowskaja – PhD (Biology), Associate Professor, Senior Researcher. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). e-mail: astrowskaja@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-3513-2014>

Островский Александр Александрович – доктор биол. наук, профессор, Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси (пл. А. Тызенгауза, д. 7, 230023, г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: astrowski@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-8647-3922>

Alexander A. Astrowski. D. Sc. (Medicine), Professor, The Institute of Biochemistry Biologically Active Compounds, The National Academy of Sciences of Belarus (7, A. Tyzenhauz Sq., 230023, Grodno, Republic of Belarus); e-mail: astrowski@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-8647-3922>

Пинчук Татьяна Васильевна – ассистент кафедры акушерства и гинекологии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» (220083, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83); e-mail: dr.tania.pinchuk@gmail.com; <https://orcid.org/0009-0008-4922-2591>.

Tatsiana V. Pinchuk – Assistant of Department of Obstetrics and Gynecology, Belarusian State Medical University (Dzerzhinski Ave., 83, Minsk, Republic of Belarus, 220083); e-mail: dr.tania.pinchuk@gmail.com; <https://orcid.org/0009-0008-4922-2591>.

Пицко Дмитрий Викторович – канд. мед. наук, доцент кафедры общей врачебной практики и поликлинической терапии, Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, г. Гродно 230009, Республика Беларусь); e-mail: medmen@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6642-2498>.

Dzmitry V. Pitsko – PhD (Medicine), Associate Professor of the Department of General Medical Practice and Polyclinic Therapy, Grodno State Medical University (Gorky str. 80, Grodno 230009, Republic of Belarus); e-mail: medmen@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6642-2498>.

Полубок Вячеслав Чеславович – науч. сотр., Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси» (пл. А. Тызенгауза, д. 7, 230023, г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: slavapolubok@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9418-7069>.

Vyacheslav Ch. Polubok – Researcher, The Republican Scientific Research Unitary Enterprise “The Institute of Biochemistry Biologically Active Compounds, The National Academy of Sciences of Belarus” (7, A. Tyzenhauz Sq., 230023, Grodno, Republic of Belarus); e-mail: slavapolubok@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9418-7069>.

Полукошко Елена Федоровна – старший научный сотрудник, Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси (220072, Беларусь, Минск, ул. Академическая, 28), e-mail: efpoluko@list.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2460-5242>.

Alena F. Palukoshka – senior researcher, Institute of physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya str., 220072 Minsk, Belarus); e-mail: efpoluko@list.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2460-5242>.

Полулях Ольга Евгеньевна – старший научный сотрудник, Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: oilipol@yandex.ru. <https://orcid.org/0009-0004-9884-2122>

Olga Y. Poluliakh – Senior Researcher, Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: oilipol@yandex.ru. <https://orcid.org/0009-0004-9884-2122>

Полуян Ольга Сергеевна – канд. биол. наук, доцент, ведущий научный сотрудник Научно-исследовательской лаборатории Научно-исследовательского института экспериментальной и клинической медицины учреждения образования «Белорусский государственный медицинский уни-

верситет» (220083, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83); e-mail: olga.poluyan@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-7130-2776>.

Olga S. Poluyan – PhD (Biology), Associate Professor, Leading researcher of Research Laboratory, Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Belarusian State Medical University (Dzerzhynski Ave., 83, Minsk, Republic of Belarus, 220083); e-mail: olga.poluyan@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-7130-2776>.

Походня Юрий Георгиевич – канд. биол. наук, доцент, директор учреждения здравоохранения «Национальная антидопинговая лаборатория» (Боровлянский с/с, 106-1, район аг. Лесной, 223040, Минский р-н, Республика Беларусь); e-mail: director@antidoping.by.

Yuri G. Pokhodnya – PhD (Biology), Associate Professor, director of the National Anti-Doping Laboratory (Borovlyansky s/s, 106 - 1, Lesnoy district, 223040 Minsk reg., Republic of Belarus); e-mail: director@antidoping.by.

Прохорова Виолетта Игоревна – доктор медицинских наук, профессор, заведующий диагностическим отделом с группой лучевой диагностики, РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова. 223040 аг. Лесной, Минский район; e-mail: vprohorova@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-6078-4447>.

Violetta I. Prokhorova – PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Researcher, Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical Radiology. 223040 ag. Lesnoy, Minsk district. e-mail: vprohorova@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-6078-4447>.

Радута Елена Францевна – ст. науч. сотр., Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси» (пл. А. Тызенгауза, д. 7, 230023, г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: iraduta@ibiochemistry.by; <https://orcid.org/0000-0001-8020-1838>.

Alena F. Raduta – Senior Researcher, The Republican Scientific Research Unitary Enterprise “The Institute of Biochemistry Biologically Active Compounds, The National Academy of Sciences of Belarus” (7, A. Tyzenhauz Sq., 230023, Grodno, Republic of Belarus); e-mail: e.raduta@ibiochemistry.by; <https://orcid.org/0000-0001-8020-1838>.

Разводовский Юрий Евгеньевич – кандидат биологических наук, заведующий отделом медико-биологических проблем алкоголизма, Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси (пл. Ан.

Тызенгауза, 7, 230023, г. Гродно, Республика Беларусь), e-mail: razvodovsky@tut.by

Yuri Y. Razvodovsky – PhD (Biology), Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (Sq. An. Tyzenauza, 7, 230023, Grodno, Republic of Belarus); e-mail: razvodovsky@tut.by.

Рубинская Мария Александровна – младший научный сотрудник, Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси (220072, Беларусь, Минск, ул. Академическая, 28), e-mail: masharubinskayaone@gmail.com; <https://orcid.org/0009-0008-8267-3036>.

Mariya A. Rubinskaya – Junior Researcher, Institute of physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Academicheskaya str., 220072 Minsk, Belarus); e-mail: masharubinskayaone@gmail.com; <https://orcid.org/0009-0008-8267-3036>.

Руденкова Татьяна Владимировна – канд. биол. наук, доцент, Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского 83, 220083 Минск Республика Беларусь); e-mail: t.rudenkova@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8917-6816>.

Tatiana V. Rudenkova – PhD (Biology), Associate Professor, leading researcher at the research laboratory, Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynski Ave., 220083 Minsk, Republic of Belarus); e-mail: t.rudenkova@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8917-6816>.

Рутковская Жанна Александровна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры биологической химии, УО «Белорусский государственный медицинский университет», 220116 Минск проспект Дзержинского, 83; e-mail: rutkovskayazh@yandex.ru. <https://orcid.org/0009-0001-7878-7937>.

Zhanna A. Rutkovskaya – PhD (Medicine), Associate Professor, Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynski Ave., 220116 Minsk, Republic of Belarus); e-mail: rutkovskayazh@yandex.ru. <https://orcid.org/0009-0001-7878-7937>.

Савицкая Татьяна Владимировна – канд. биол. наук, доцент, врач лабораторной диагностики, Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, Минский р-н, д. Боровляны, Республика Беларусь); e-mail: more_mensk@mail.ru.

Tatyana V. Savitskaya – Ph. D. (Biology), Associate Professor, the doctor of laboratory diagnostics, Republican Scientific and Practical Center of Children’s Oncology, Hematology and Immunology (Frunzenskaya str., 43, 223053, Minsk district, D. Borovlyany, Republic of Belarus); e-mail: tat_savitskaya@mail.ru.

Свирид Андрей Васильевич – канд. хим. наук, доцент, старший научный сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, 220084 г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: svirid.andrei@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-9035-1661>.

Andrey V. Svirid – PhD (Chemistry), Associate Professor, Senior Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, (5, Academician V.F. Kuprevich st., building 2, 220084 Minsk, Republic of Belarus); e-mail: svirid.andrei@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-9035-1661>.

Семенкова Галина Николаевна – канд. биол. наук, доцент, ведущий научный сотрудник НИЛ НИИ ЭИКМ БГМУ (пр. Дзержинского, 83, 220083, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: galina_semenkova@yahoo.com; <https://orcid.org/0000-0001-6048-4383>.

Galina N. Semenкова – PhD (Biology), Associate Professor, Leading Researcher Belarusian State Medical University (Dzerzhinsky Ave, 83, 220083, Minsk, Belarus); e-mail: galina_semenkova@yahoo.com; <https://orcid.org/0000-0001-6048-4383>.

Седова Татьяна Ивановна – врач клинико-диагностической лаборатории МОКБ, Минская областная клиническая больница (223041, Минская область, Минский район, а/г Лесной, 1).

Tatsiana I. Siadova – Doctor of the Clinical Diagnostic Laboratory, Minsk Regional Clinical Hospital (223041, Minsk region, Minsk district, a/g Lesnoy, 1).

Солнцева Анжелика Викторовна – д-р мед. наук, профессор, директор, Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, 43, 223053, Минский р-н, д. Боровляны, Республика Беларусь).

Angelika V. Solntseva – D. Sc. (Medicine), Professor, director of the Republican Scientific and Practical Center of Children's Oncology, Hematology and Immunology (Frunzenskaya str., 43, 223053, Minsk district, D. Borovlyany, Republic of Belarus).

Станько Эдуард Павлович – доктор мед. наук, доцент, Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009 г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: edk_st@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-1902-5577>

Eduard P. Stanko – PhD (Medicine), Associate Professor, Grodno State Medical University (Gorky St., 80, 230009 Grodno, Republic of Belarus); e-mail: edk_st@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-1902-5577>

Степанова Юлия Игоревна – кандидат мед. наук, доцент, ведущий научный сотрудник, Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины БГМУ (223041, Минская область, Минский район, а/г Лесной, 31); e-mail: st.juli@tut.by; <https://orcid.org/0000-0002-5771-0965>.

Julia I. Stepanova – PhD (Medicine), Associate Professor, Leading Researcher, Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Belarusian State Medical University (223041, Minsk region, Minsk district, a/g Lesnoy, 31); e-mail: st.juli@tut.by; <https://orcid.org/0000-0002-5771-0965>.

Сутько Ирина Петровна – канд. биол. наук, доцент, ст. науч. сотр., Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие «Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси» (пл. А. Тызенгауза, д. 7, 230023, г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: irina_sutsko@list.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9599-6944>.

Irina P. Sutsko – PhD in Biology, Associate Professor, Senior Researcher, The Republican Scientific Research Unitary Enterprise “The Institute of Biochemistry Biologically Active Compounds, The National Academy of Sciences of Belarus” (7, A. Tyzenhauz Sq., 230023, Grodno, Republic of Belarus); e-mail: irina_sutsko@list.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9599-6944>.

Сыса Алексей Григорьевич – канд. хим. наук, доцент, Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А.Д. Сахарова БГУ (ул. Долгобродская, 23/1, 220070 Минск, Республика Беларусь); e-mail: aliaksei.sysa@iseu.by; <https://orcid.org/0000-0001-8881-5973>.

Aliaksei G. Sysa – PhD (Biochemistry), Associate Professor, Belarusian State University, ISEI BSU (23/1, Dolgobrodskaya str., 220070 Minsk, Republic of Belarus); e-mail: aliaksei.sysa@iseu.by; <https://orcid.org/0000-0001-8881-5973>.

Сяхович Виталий Эдуардович – заведующий научно-исследовательской лабораторией, учреждение здравоохранения «Национальная антидопинговая лаборатория» (Боровлянский с/с, 106-1, район аг. Лесной, 223040, Минский р-н, Республика Беларусь); e-mail: rlab.head@antidoping.by.

Vitaly E. Syakhovich – Head of the Research Laboratory, National Anti-Doping Laboratory (Borovlyansky s/s, 106 - 1, Lesnoy district, 223040 Minsk reg., Republic of Belarus); e-mail: rlab.head@antidoping.by.

Таганович Анатолий Дмитриевич – доктор мед. наук, профессор, зав. кафедрой биологической химии, УО «Белорусский государственный медицинский университет» (ул. Дзержинского, 83, 220083, г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: taganovich.a@bgu.by; <https://orcid.org/0000-0001-9599-6944>.

ский университет», 220116 Минск проспект Дзержинского, 83; e-mail: ataganovich@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-0668-2888>.

Anatoly D. Tahanovich – PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Department of Biological Chemistry, Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynski Ave., 220116 Minsk, Republic of Belarus); e-mail: ataganovich@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-0668-2888>.

Тамашевский Александр Владимирович – канд. биол. наук, докторант ГУ “Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий” (Долгиновский тракт 160, 220053 г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: tayzoe@gmail.com.

Alexander V. Tamashevski – PhD (Biology), Doctoral student, Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies (Dolginovsky tr. 160, 220053 Minsk, Republic of Belarus); e-mail: tayzoe@gmail.com.

Терпинская Татьяна Ильинична – кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник, Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси (220072, Беларусь, Минск, ул. Академическая, 28), e-mail: terpinskayat@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4536-3580>.

Tatiana I. Terpinskaya – PhD (Biology), Associate Professor, Leading Researcher, Institute of physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya str., 220072 Minsk, Belarus); e-mail: terpinskayat@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4536-3580>.

Титко Оксана Викторовна – научный сотрудник, Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (пл. А. Тызенгауза, 7, 230023 г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: o.titko@mail.ru;

Oksana V. Titko – Reseach Associate, Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (7, A. Tyzengauz square, 230023 Grodno, Republic of Belarus); e-mail: o.titko@mail.ru; УДК 618.1/.2:577.21

Тихон Наталья Михайловна – канд. мед. наук., доцент, заведующий 1-й кафедрой детских болезней, Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: tsikhannat@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-7803-5460>.

Natallia M. Tsikhan – PhD (Medicine), Associate Professor, Head of the Pediatric Department I, Grodno State Medical University (80, Gorky str., 230009, Grodno, Republic of Belarus); e-mail: tsikhannat@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-7803-5460>.

Трусов Никита Вячеславович – научный сотрудник лаборатории энзимологии питания. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи. (2/14 Устьинский проезд, г. Москва, 109240, Россия). E-mail: nikkitosu@yandex.ru <https://orcid.org/0000-0002-1919-9297>. *Nikita V. Trusov* – researcher of the Laboratory of Nutritional Enzymology. Federal State Budgetary Scientific Institution Federal Research Center of Nutrition, Biotechnology and Food Safety. (2/14 Ust’insky proezd, Moscow, 109240, Russia). E-mail: nikkitosu@yandex.ru <https://orcid.org/0000-0002-1919-9297>.

Туманов Александр Вениаминович – канд. биол. наук, заведующий отраслевой лабораторией, Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси (пл. А. Тызенгауза, д. 7, 230023, г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: shurik00885@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-9877-0350>

Aliaksandr V. Tumanov – PhD (Biology), Head of the Applied-Research Laboratory, The Institute of Biochemistry Biologically Active Compounds, The National Academy of Sciences of Belarus (7, A. Tyzenhauz Sq., 230023, Grodno, Republic of Belarus); e-mail: shurik00885@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-9877-0350>

Тумилович Анастасия Михайловна – научный сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, 220084 г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: tumilovicham@gmail.com.

Anastasiya M. Tumilovich – Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, (5, Academician V.F. Kuprevich st., building 2, 220084 Minsk, Republic of Belarus); e-mail: tumilovicham@gmail.com.

Устемчук Алла Михайловна – научный сотрудник НИЛ НИИ ЭиКМ БГМУ (пр. Дзержинского, 83, 220083, г. Минск, Республика Беларусь). e-mail: ustealla@yandex.ru

Alla M. Ustiamchuk – Researcher, Belarusian State Medical University (Dzerzhinsky Ave, 83, 220083, Minsk, Belarus); e-mail: ustealla@yandex.ru

Хворик Дмитрий Федорович – доктор мед. наук, профессор, Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009 г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: chvorik@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6017-3013>

Dmitry F. Khvorik – PhD (Medicine), Professor, Head of the Department, Grodno State Medical University (Gorky St., 80, 230009 Grodno, Republic of Belarus); e-mail: chvorik@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6017-3013>.

Цыркунов Владимир Максимович – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры инфекционных болезней УО «Гродненский государственный медицинский университет» (ул. Горького, 80, 230009 г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: tvml11@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9366-6789>

Vladimir M. Tsyrkunov – D. Sc. (Medicine), Professor, Professor of the Department of Infectious Diseases, Grodno State Medical University (Gorkogo str., 80, 230009 Grodno, Republic of Belarus); e-mail: tvml11@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9366-6789>

Чиркин Александр Александрович – д-р биол. наук, профессор, профессор кафедры химии и естественнонаучного образования, Витебский государственный университет имени П.М. Машерова (пр-т Московский, 33, 210038, г. Витебск, Республика Беларусь); e-mail: chir@tut.by; <https://orcid.org/0000-0003-4345-4136>.

Alexander A. Chirkin – PhD (Biology), Professor, Professor of the Department of Chemistry and Natural Science Education, Vitebsk State P.M. Masherov University (Moskovsky Ave., 33, 210038, Vitebsk, Republic of Belarus); e-mail: chir@tut.by; <https://orcid.org/0000-0003-4345-4136>.

Чудиловская Екатерина Николаевна – научный сотрудник, Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: e.chudilovskaya@gmail.com. <https://orcid.org/0009-0001-5563-2473>

Katerina N. Chudilovskaya – Researcher, Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: e.chudilovskaya@gmail.com. <https://orcid.org/0009-0001-5563-2473>

Шарангович Максим Андреевич – преподаватель-стажер кафедры молекулярной биологии биологического факультета Белорусского государственного университета (ул. Курчатова, 10, 220030 г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: msharangovichus@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-9832-7161>.

Maxim A. Sharangovich – Trainee Teacher, Department of Molecular Biology, Belarusian State University (10 Khurchatova st., Minsk 220030, Belarus); e-mail: msharangovichus@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-9832-7161>.

Шипелин Владимир Александрович – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории пищевой токсикологии и оценки безопасности нанотехнологий. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федераль-

ный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи. (2/14 Устьинский проезд, г. Москва, 109240, Россия). E-mail: v.shipelin@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0015-8735>

Vladimir A. Shipelin – Ph.D., D. Med, senior researcher of the Laboratory of Food Toxicology and Nanotechnology Safety Assessment. Federal State Budgetary Scientific Institution Federal Research Center of Nutrition, Biotechnology and Food Safety. (2/14 Ust'insky proezd, Moscow, 109240, Russia). E-mail: v.shipelin@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0015-8735>

Шихад Аршед Абд Али Шихад – аспирант, Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А.Д.Сахарова БГУ (ул. Долгобродская, 23/1, 220070 Минск, Республика Беларусь); e-mail: arshedalmnasori@gmail.com.

Shihad Arshed AbdAli Shihad – PhD student, Belarusian State University, ISEI BSU (23/1, Dolgobrodskaya str., 220070 Minsk, Republic of Belarus); e-mail: arshedalmnasori@gmail.com.

Шляхтун Алексей Генрихович – заведующий отраслевой лабораторией, Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (пл. А. Тызенгауза, 7, 230023 г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: a.shlyahtun@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-7618-9589>

Alexey H. Shlyahtun – Head of the Laboratory, Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (7, A. Tyzengauz square, 230023 Grodno, Republic of Belarus); e-mail: a.shlyahtun@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-7618-9589>

Шульга Андрей Васильевич – канд. мед. наук, доцент кафедры патологической анатомии УО «ГрГМУ» (Бульвар Ленинского комсомола, 54а, 230017, г. Гродно, Республика Беларусь), e-mail: grodnopat@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-1917-1101>

Andrey V. Shulga – PhD (Medicine), Associate Professor Department of Pathological Anatomy of Grodno State Medical University (BLK str., 54a, 230017, Grodno, Republic of Belarus); e-mail: grodnopat@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-1917-1101>.

Шуриберко Алексей Владимирович – руководитель сектора молекулярной биологии отдела медико-биологических проблем алкоголизма, Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси (пл. Ан. Тызенауза, 7, 230023, г. Гродно, Республика Беларусь), e-mail: the_chemistry@tut.by; <https://orcid.org/0000-0001-7271-1600>.

Aliaksei V. Shuriberko – Head of the Sector of Molecular Biology of the Department of Medical and Biological Problems of Alcoholism, Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (Sq. An. Tyzenauza, 7, 230023, Grodno, Republic of Belarus); e-mail: the_chemistry@tut.by; <https://orcid.org/0000-0001-7271-1600>.

Цыбрук Татьяна Владимировна – канд. хим. наук, старший научный сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В.Ф. Купревича, д.5, корп.2, 220084 г. Минск, Республика Беларусь); e-mail: tvshkel@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-9239-0437>.

Tatsiana V. Tsybruk – PhD (Chemistry), Senior Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, (5, Academician V.F. Kuprevich st., building 2, 220084 Minsk, Republic of Belarus); e-mail: tvshkel@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-9239-0437>.

Цыркунов Владимир Максимович – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры

инфекционных болезней УО «Гродненский государственный медицинский университет» (ул. Горького, 80, 230009 г. Гродно, Республика Беларусь); e-mail: tvm111@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9366-6789>

Vladimir M. Tsyrkunov – D. Sc. (Medicine), Professor, Professor of the Department of Infectious Diseases, Grodno State Medical University (Gorkogo str., 80, 230009 Grodno, Republic of Belarus); e-mail: tvm111@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9366-6789>

Янченко Татьяна Леонидовна – научный сотрудник, Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси (220072, Беларусь, Минск, ул. Академическая, 28), e-mail: tanyaya190@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-9577-1013>.

Tatsiana L. Yanchanka – Researcher, Institute of physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya str., 220072 Minsk, Belarus); e-mail: tanyaya190@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-9577-1013>.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Авторы подтверждают, что материалы представленных статей ранее нигде не были опубликованы и не представлены на рассмотрение для публикации в другом журнале.

The authors have no conflicts of interest to declare.

The authors confirm that the materials of the presented papers have not been published elsewhere and have not been under consideration for publication in other journal.

**ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ ЖУРНАЛА
«БИОХИМИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ» /
INFORMATION FOR AUTHORS OF THE
«BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY» JOURNAL**

Журнал «Биохимия и молекулярная биология» публикует оригинальные результаты исследований в области медицины и биологии, клинические исследования, научные обзоры и лекции, посвященные актуальным проблемам биохимии и биохимическим аспектам молекулярной биологии, биоорганической химии, микробиологии, иммунологии, физиологии и биомедицинских наук, хроники событий научной жизни, юбилеи. Статьи публикуются на белорусском, русском и английском языках.

В своей редакционной политике журнал «Биохимия и молекулярная биология» следует принципам и правилам международных ассоциаций Committee on Publication Ethics (COPE), Council of Science Editors (CSE), International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), World Association of Medical Editors (WAME), European Association of Science Editors (EASE), а также требованиям Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь.

Редакция журнала «Биохимия и молекулярная биология» просит авторов руководствоваться приведенными ниже правилами. Если рукопись им не соответствует, статья не будет принята к рассмотрению.

1. Текст статьи должен быть набран в редакторе Microsoft Word шрифтом Times New Roman, размером 14 пунктов с одинарным межстрочным интервалом без переносов. Ширина поля слева – 3 см, сверху и снизу – 2 см, справа – 1,5 см; абзацный отступ – 1 см, выравнивание – по ширине. Все страницы должны быть пронумерованы.

2. Объем научной статьи должен составлять не менее 0,35 авторского листа (14 000 знаков с пробелами). Общий объем оригинальных статей не должен превышать 10 страниц, включая рисунки, таблицы, список использованных источников, научных обзоров и лекций – 15 страниц.

3. Статья должна иметь следующую структуру:

- индекс по Универсальной десятичной классификации (УДК);
- название статьи (до 10–12 слов, без аббревиатур);
- инициалы и фамилия автора (авторов);
- полное наименование учреждений, где работают авторы, с указанием города и страны;
- резюме (не более 1500 знаков с пробелами), которое должно быть структурировано (введение, цель исследования, материалы и методы, результаты, заключение, ключевые слова от 3 до 9) и кратко представлять результаты работы и быть понятным, в том числе и в отрыве от основного текста статьи;
- информация о статье на английском языке (для статей, предоставленных на белорусском (русском) языках): название статьи, фамилия и инициалы автора (авторов), полное наименование учреждений, где работают авторы, с указанием города и страны, резюме (англоязычная версия резюме статьи должна по смыслу и структуре (Background, Objective, Material and Methods, Results, Conclusions, Keywords) полностью соответствовать русскоязычной и быть грамотной с точки зрения английского языка (статья, представленные на английском языке, должны содержать информацию о статье на белорусском (русском) языке);
- основной текст статьи;
- благодарности: если присутствует информация о финансировании (поддержке грантами проектов и т. п.), ее следует давать на русском (белорусском) и английском языках под заголовками «Благодарности» («Падзякі»), «Acknowledgements»;
- конфликт интересов (в случае его отсутствия необходимо указать: «Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов»),
- список использованных источников;
- список цитированных источников в романском алфавите («References»);
- сведения об авторах на русском и английском языках: для каждого автора следует указать фамилию, имя и отчество (полностью), звание, должность, место работы с указанием полного адреса, адрес электронной почты, личный идентификатор ORCID (Open Researcher and Contributor ID). Для оперативной связи с редакцией указывается контактный номер телефона ответственного автора (в журнале не публикуется). Образец оформления статьи размещен на сайте журнала.

4. Основной текст статьи должен быть четко структурированным: введение, цель исследования, материалы и методы, результаты, заключение (выводы). В русско- и белорусскоязычных статьях подрисуночные подписи, заголовки и примечания таблиц следует делать на двух языках – русском (белорусском) и английском. В подрисуночных подписях не должно быть аббревиатур. Внутрисуночные обозначения подписываются цифрами или латинскими буквами. Если рисунки ранее уже публиковались, необходимо указать оригинальный источник и представить письменное разрешение на их воспроизведение от держателя прав на публикацию. Рисунки представляются отдельными файлами (.tif, .jpg) с разрешением не менее 300 dpi.

5. Список использованных источников (для оригинальных статей – не более 25 источников, для обзоров – не более 50 источников) оформляется в соответствии с требованиями Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь, предъявляемых к диссертационным работам (приказ ВАК от 25.06.2014 № 159 (в редакции приказа ВАК 08.09.2016 № 206)). Цитируемая литература приводится общим списком по мере упоминания, ссылки в тексте даются порядковым номером в квадратных скобках (напр., [1]); ссылки на неопубликованные работы не допускаются.

6. Список цитированных источников в романском алфавите («References»). Библиографическое описание оформляется в соответствии со стандартом National Library of Medicine (<http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>). Статья, опубликованная на латинице (английском, немецком и др.) описывается на оригинальном языке, статья, опубликованная на кириллице (русский, белорусский, украинский язык) транслитерируется: <http://translit.net>. Название цитируемой работы указывается в транслитерации, а затем на английском языке (если есть официальный перевод) в квадратных скобках. Название цитируемого издания (журнала) указывается в транслитерации, а затем на английском языке (если есть официальный перевод) в квадратных скобках. Не допускается сокращение названия русскоязычного журнала. Названия иностранных журналов могут представляться в сокращенном варианте в соответствии с каталогом названий базы данных MEDLINE (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>). Если журнал не индексируется в MEDLINE, необходимо указывать его полное название. В описании статьи приводятся фамилии и инициалы всех (!) авторов. При наличии у цитируемого источника DOI (цифрового идентификатора объекта), его в обязательном порядке необходимо указать в конце библиографической ссылки.

7. Статья должна иметь сопроводительное письмо (образец размещен на сайте журнала), подписанное руководителем учреждения, в котором выполнена работа, а также экспертное заключение о возможности опубликования материалов в печати.

8. Статья и сопроводительные документы могут быть направлены на бумажном носителе в 2-х экземплярах в адрес редакции (230009, Республика Беларусь, г. Гродно, пл. Тызенгауза, 7, Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии Наук Беларуси, редакции журнала «Биохимии и молекулярная биология»). Электронный вариант статьи обязателен и направляется по адресу journal@ibiochemistry.by с пометкой «Статья в журнал «Биохимии и молекулярная биология» и указанием фамилии первого автора. Статья должна быть подписана всеми авторами.

9. Направление в редакцию ранее опубликованных или уже принятых к печати в других изданиях работ не допускается. За направление в редакцию уже ранее опубликованных статей или статей, принятых к печати другими изданиями, ответственность несут авторы. Не принимаются статьи с нарушением правил и норм гуманного обращения с биологическими объектами исследований.

10. Все научные статьи, поступившие в редакцию журнала, проходят обязательное рецензирование.

Правила для авторов подробно изложены на сайте издателя ibiochemistry.by в разделе «Журнал».

Том / Vol. 3 • № 1(4)/2024

Биохимия и молекулярная биология • Biochemistry and Molecular Biology

Подписные индексы:
для индивидуальных подписчиков 00990
для ведомственных подписчиков 009902

Subscription indexes
For individuals 00990
For legal entities 009902

