

## Стимулятор репарации альфа-глутамил-триптофан в комплексной терапии хронического атрофического гастрита: результаты гистологического исследования

© Н.В. БАРЫШНИКОВА<sup>1–3</sup>, Ю.П. УСПЕНСКИЙ<sup>1,2</sup>, Ю.А. ФОМИНЫХ<sup>1,2</sup>, Е.Ю. КАЛИНИНА<sup>1,4</sup>, Ю.С. КРЫЛОВА<sup>2</sup>, А.А. КРАСНОВ<sup>5</sup>, С.В. ПЕТЛЕНКО<sup>6</sup>, В.А. АПРЯТИНА<sup>7</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет», Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия;

<sup>3</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия;

<sup>4</sup>ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева», Санкт-Петербург, Россия;

<sup>5</sup>Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>6</sup>ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии им. акад. С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия;

<sup>7</sup>Институт трансляционной биомедицины Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия

### РЕЗЮМЕ

**Цель исследования.** Изучить влияние стимулятора репарации альфа-глутамил-триптофана на морфологические характеристики слизистой оболочки желудка и экспрессию CXCL-12 и CDX-2 при хроническом атрофическом гастрите, ассоциированном с *Helicobacter pylori*.

**Материал и методы.** Проанализированы образцы биопсийного материала 116 пациентов с верифицированным диагнозом хронического атрофического гастрита, ассоциированного с *Helicobacter pylori*, в рамках многоцентрового двойного слепого рандомизированного плацебо-контролируемого исследования. При морфологическом исследовании оценивали параметры, характеризующие процесс атрофии: количество желез на 1 мм<sup>2</sup> слизистой оболочки желудка, глубину желез слизистой оболочки желудка, количество обкладочных клеток на 100 эпителиальных клеток слизистой оболочки желудка, наличие признаков кишечной метаплазии. Для постановки иммуногистохимических реакций для верификации экспрессии CXCL-12 и CDX-2 использовали первичные антитела Anti-CXCL-12 (MA5-23759) и Anti-CDX-2 (EP25). Морфологический анализ и иммуногистохимическое исследование биоптатов проводили до начала терапии и после окончания приема исследуемого препарата/плацебо.

**Результаты.** На фоне терапии у пациентов, принимавших исследуемый препарат, выявлено статистически значимое увеличение количества желез на 1 мм<sup>2</sup> слизистой оболочки желудка при сравнении с исходными показателями скрининга на 26,1% ( $p=0,028$ ) и с группой плацебо ( $p=0,026$ ), определена тенденция к уменьшению кишечной метаплазии. Отмечено статистически значимое увеличение относительной площади экспрессии CXCL-12 у пациентов, принимавших плацебо, при сравнении с параметрами исходных данных ( $p=0,045$ ) и отсутствие статистически значимых изменений в основной группе. Выявлено статистически значимое увеличение относительной площади экспрессии CDX-2 в группе принимавших альфа-глутамил-триптофан в сравнении с исходными данными ( $p=0,015$ ), статистически значимой динамики данного показателя в группе плацебо не обнаружено.

**Заключение.** Установлено статистически значимое в сравнении с контролем исходного состояния и плацебо положительное влияние исследуемого препарата на регенераторные механизмы, приводящие к стабилизации и/или улучшению гистологической картины слизистой оболочки желудка. Результаты иммуногистохимического исследования по повышению экспрессии CDX-2 на фоне приема исследуемого препарата также можно расценить как показатель улучшения репаративных процессов.

**Ключевые слова:** альфа-глутамил-триптофан, *Helicobacter pylori*, атрофический гастрит, атрофия, воспаление.

### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

Барышникова Н.В. — <https://orcid.org/0000-0001-7429-0336>

Успенский Ю.П. — <https://orcid.org/0000-0001-6434-1267>

Фоминых Ю.А. — <https://orcid.org/0000-0002-2436-3813>

Калинина Е.Ю. — <https://orcid.org/0000-0001-7077-3584>

Крылова Ю.С. — e-mail: emerald2008@mail.ru

Краснов А.А. — <https://orcid.org/0000-0002-8732-6390>

Петленко С.В. — <https://orcid.org/0000-0002-2752-4598>

Апратина В.А. — <https://orcid.org/0000-0002-9819-6835>

**Автор, ответственный за переписку:** Барышникова Н.В. — e-mail: baryshnikova\_nv@mail.ru

### КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Барышникова Н.В., Успенский Ю.П., Фоминых Ю.А., Калинина Е.Ю., Крылова Ю.С., Краснов А.А., Петленко С.В., Апратина В.А. Стимулятор репарации альфа-глутамил-триптофан в комплексной терапии хронического атрофического гастрита: результаты гистологического исследования. *Архив патологии*. 2023;85(3):54–63. <https://doi.org/10.17116/patol20238503154>

# Repair stimulator alpha-glutamyl-tryptophan in the complex therapy of chronic atrophic gastritis: results of histological examination

© N.V. BARYSHNIKOVA<sup>1-3</sup>, YU.P. USPENSKY<sup>1,2</sup>, YU.A. FOMINYKH<sup>1,2</sup>, E.YU. KALININA<sup>1,4</sup>, YU.S. KRYLOVA<sup>2</sup>, A.A. KRASNOV<sup>5</sup>, S.V. PETLENKO<sup>6</sup>, V.A. APRYATINA<sup>7</sup>

<sup>1</sup>St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russia;

<sup>2</sup>Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia;

<sup>3</sup>Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia;

<sup>4</sup>Smorodintsev research institute of influenza, St. Petersburg, Russia;

<sup>5</sup>The Herzen State Pedagogical University of Russia, St. Petersburg, Russia;

<sup>6</sup>Golikov Research Clinical Center of Toxicology, St. Petersburg, Russia;

<sup>7</sup>Saint-Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, St. Petersburg, Russia

## ABSTRACT

**Objective.** To study the effect of the repair stimulator alpha-glutamyl-tryptophan on the morphological characteristics of the gastric mucosa and the expression of CXCL-12 and CDX-2 in chronic atrophic gastritis associated with *Helicobacter pylori*.

**Material and methods.** Biopsy samples of 116 patients with a verified diagnosis of chronic atrophic gastritis associated with *Helicobacter pylori* were analyzed in a multicenter double-blind randomized placebo-controlled study. During the morphological study, the parameters characterizing the process of atrophy were evaluated: the number of glands per 1 mm<sup>2</sup> of the gastric mucosa, the depth of the gastric mucosa glands, the number of parietal cells per 100 epithelial cells of the gastric mucosa, and the presence of signs of intestinal metaplasia. Primary antibodies Anti-CXCL-12 (MA5-23759) and Anti-CDX-2 (EP25) were used to set up immunohistochemical reactions to verify the expression of CXCL-12 and CDX-2.

**Results.** In patients taking the studied drug, a statistically significant increase in the number of glands per 1 mm<sup>2</sup> of the gastric mucosa was revealed when compared with the initial screening indicators by 26.1% ( $p=0.028$ ) and with the placebo group ( $p=0.026$ ), a tendency to decrease the signs of intestinal metaplasia was determined. There was a statistically significant increase in the expression in the relative area of CXCL-12 expression in patients taking placebo when compared with the parameters of the initial data ( $p=0.045$ ) and the absence of statistically significant changes in the main group. A statistically significant increase in the relative area of the CDX-2 expression was revealed in the group taking alpha-glutamyl-tryptophan in comparison with the baseline data ( $p=0.015$ ), no statistically significant dynamics of this indicator was found in the placebo group.

**Conclusion.** A statistically significant positive effect of the study drug on regenerative mechanisms leading to stabilization and/or improvement of the histological picture in the atrophic area of the gastric mucosa was found in comparison with the control of the initial state and with placebo. The results of an immunohistochemical study to increase CDX-2 expression while taking the study drug can also be regarded as an indicator of improvement in reparative processes.

**Keywords:** alpha-glutamyl-tryptophan, *Helicobacter pylori*, atrophic gastritis, atrophy, inflammation

## INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:

Baryshnikova N.V. — <https://orcid.org/0000-0001-7429-0336>

Uspenskiy Yu.P. — <https://orcid.org/0000-0001-6434-1267>

Fominykh Yu.A. — <https://orcid.org/0000-0002-2436-3813>

Kalinina E.Yu. — <https://orcid.org/0000-0001-7077-3584>

Krylova Yu.S. — e-mail: emerald2008@mail.ru

Krasnov A.A. — <https://orcid.org/0000-0002-8732-6390>

Petlenko S.V. — <https://orcid.org/0000-0002-2752-4598>

Apryatina V.A. — <https://orcid.org/0000-0002-9819-6835>

**Corresponding author:** Baryshnikova N.V. — e-mail: baryshnikova\_nv@mail.ru

## TO CITE THIS ARTICLE:

Baryshnikova NV, Uspenskiy YuP, Fominykh YuA, Kalinina EYu, Krylova YuS, Krasnov AA, Petlenko SV, Apryatina VA. Repair stimulator alpha-glutamyl-tryptophan in the complex therapy of chronic atrophic gastritis: results of histological examination. *Archive of Pathology = Arkhiv patologii*. 2023;85(3):54–63. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/patol20238503154>

Хронический гастрит (ХГ) — это хроническое воспаление слизистой оболочки желудка (СОЖ), проявляющееся клеточной инфильтрацией, нарушением физиологической регенерации и вследствие этого атрофией железистого эпителия, кишечной метаплазией, расстройством секреторной, моторной и нередко инкреторной функции желудка [1, 2]. Как видно из данного определения, важными критериями для постановки диагноза ХГ являются измененные гистологические параметры СОЖ, что подтверждается и постулатами Киотского консенсуса: хронический гастрит — это диагноз морфологический [3]. К морфологическим изменениям при ХГ относятся лейкоцитар-

ная и лимфогистиоцитарная инфильтрация, диффузный или очаговый фиброз, наличие или отсутствие атрофии, фолеолярной гиперплазии, кишечной метаплазии (полной или неполной), отека, кровоизлияний и микроэрозий.

В цепочке патологических изменений СОЖ от активного гастрита до аденокарциномы желудка, возникающих под воздействием факторов риска, известной как каскад Корреа, в качестве примера триггерного фактора часто приводится инфицирование *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) [4, 5]. Этот каскад протекает с четко определенными последовательными стадиями: хронический активный гастрит → хронический атрофический гастрит (ХАГ) → кишечная мета-

плазия, сначала полная (тонкокишечная), а затем неполная (толстокишечная) → дисплазия (интраэпителиальная неоплазия) и, наконец, инвазивная карцинома. При проведении гистологического исследования СОЖ крайне важно своевременно выявить такую стадию патологического каскада в развитии ХГ, как атрофия СОЖ, поскольку подобные изменения можно рассматривать не только как конечную стадию воспалительного процесса в желудке, ключевой характеристикой которого является нарушение морфологической структуры и уменьшение количества желез с замещением их фиброзной тканью, но и как первый шаг к развитию рака желудка и своеобразную точку «невозврата» в этом каскаде [6, 7]. Атрофические изменения в СОЖ проявляются в виде следующих процессов: неметапластическая атрофия, характеризующаяся уменьшением глубины и количества желез, что отчасти может быть обусловлено отеком и воспалительной инфильтрацией, которая раздвигает и разобщает железы, создавая эффект уменьшения их количества; метапластическая атрофия — это нарушение процессов регенерации в виде уменьшения количества функционально специализированных клеток.

В комплексной терапии ХГ крайне важно предпринять все усилия для максимально раннего выявления атрофии и назначения лекарственных средств, обеспечивающих ее регресс и способствующих восстановлению функционирования и структуры СОЖ.

## Обоснование использования альфа-глутамил-триптофана

Данные литературы [7—9] свидетельствуют о том, что L-глутамил-L-триптофан оказывает модулирующее влияние на метаболические процессы, стимулирует функциональную активность клеток иммунной системы, дает антиоксидантный эффект, стимулирует процессы регенерации тканей, ускоряет заживление ран. В доклинических исследованиях установлено, что профилактическое введение альфа-глутамил-триптофана заметно препятствовало образованию язвенных поражений желудка, вызванных индометацином, со снижением площади деструкций СОЖ крыс в 5 раз, способствовало уменьшению количества и площади язвенных поражений желудка, вызванных стрессом, в 2,3—2,6 раза, снижению в сыворотке крови концентрации конечного продукта перекисного окисления липидов малонового диальдегида в 2,1 раза, а также повышению активности супероксиддисмутазы в 1,6 раза по сравнению с аналогичными показателями у животных контрольной группы [10]. Применение альфа-глутамил-триптофана у лиц, имеющих различные проявления вторичных иммунодефицитных состояний, наряду с нормализацией структурно-функциональных показателей иммунной системы, приводило к достоверному снижению заболеваемости органов пищеварения в 1,75 раза [11]. При этом данный эффект альфа-глутамил-триптофана был достаточно стойким, так как при кагатмическом наблюдении тенденция к снижению уровня желудочно-кишечной патологии сохранялась у обследованных в течение года после выполнения первичного обследования и применения препарата [11]. Разработка нового пептидного лекарственного препарата на основе альфа-глутамил-триптофана для лечения ХАГ является закономерной, обоснованной и перспективной.

Цель работы — изучить влияние стимулятора репарации альфа-глутамил-триптофана на морфологические характе-

ристики СОЖ и экспрессию CXCL-12 и CDX-2 при ХАГ, ассоциированном с *H. pylori*.

## Материал и методы

В работе использованы образцы биопсийного материала СОЖ от 116 пациентов с верифицированным ранее диагнозом ХАГ, ассоциированного с *H. pylori*. Гистологическое и иммуногистохимическое исследования биоптатов проведены в рамках многоцентрового двойного слепого рандомизированного плацебо-контролируемого исследования. Исследование одобрено Минздравом России, Комитетом по этике при Минздраве России и локальными этическими комитетами исследовательских центров.

Основными критериями включения пациентов в исследование были подписанное информированное согласие (до начала выполнения процедур исследования); возраст пациентов 40—70 лет; установленный ранее диагноз ХАГ; наличие жалоб и симптомов, характерных для ХАГ (тяжесть в желудке, чувство его переполнения после приема пищи, отрыжка воздухом, впоследствии приобретающая горький неприятный привкус, метеоризм, урчание в животе, расстройства стула, запоры, сменяющиеся диареей, ухудшение общего состояния, снижение аппетита, уменьшение массы тела, слабость и головокружение после приема пищи, болевой синдром, возможно, наличие анемии, возникающей вследствие нарушения всасывания витамина В<sub>12</sub>); гипо- или ацидное состояние по данным рН-метрии (рН >5,0).

### Популяция пациентов

Набор пациентов происходил с 22.05.15 по 21.02.19. На этапе скрининга в исследование были включены 152 взрослых пациента с поставленным в анамнезе диагнозом «хронический атрофический гастрит» в трех исследовательских центрах. Средний возраст больных составил 45,9±1,6 года. Полностью завершили исследование 116 человек. Соотношение мужчин и женщин составило 1:4,27 (22:94 соответственно), преобладали женщины старшей возрастной группы (возраст старше 50 лет).

### Рандомизация и группы лечения

Порядок рандомизации пациентов проходил следующим образом: после завершения скрининга пациентов, соответствующих критериям включения и не имеющих критериев невключения, объединили в две группы: основную и сравнения (плацебо) в соотношении 1:1. При выполнении процедуры рандомизации использовался метод случайных чисел. Рандомизационные конверты, как и таблицы раскодировки, хранились в опечатанном виде. Терапия в исследовании состояла из двух этапов.

1-й этап: курс эрадикационной терапии по единой схеме.

2-й этап: в соответствии с результатами рандомизации назначался исследуемый препарат или плацебо по следующей схеме:

— основная группа: 58 пациентов получали исследуемый препарат альфа-глутамил-триптофан<sup>1</sup> — порошок для приготовления геля для приема внутрь. Состав на 1 г порошка: активное вещество альфа-глутамил-триптофан натрия (в пересчете на альфа-глутамил-триптофан) 0,33 мг и вспомогательные вещества: фруктоза 713 мг; на-

<sup>1</sup>Альфа-глутамил-триптофан (Регастим Гастро) был предоставлен компанией АО «МБНПК «Цитомед».

трия альгинат 166,67 мг; кармеллоза натрия 100 мг; кремния диоксид коллоидный 20 мг. Разовая доза составляла 3 г порошка. Препарат принимали внутрь свежеприготовленным согласно инструкции, 2 раза в сутки, утром за 20—30 мин до приема пищи и вечером перед сном, не ранее чем через 1 ч после приема пищи, в течение 28 дней;

— группа сравнения: 58 пациентов получали плацебо. Разовая доза, приготовленная из 3 г порошка, принималась внутрь свежеприготовленной согласно инструкции, 2 раза в сутки, утром за 20—30 мин до приема пищи и вечером перед сном, не ранее чем через 1 ч после приема пищи, в течение 28 дней. Состав плацебо: фруктоза 713 мг; натрия альгинат 166,67 мг; кармеллоза натрия 100 мг; кремния диоксид коллоидный 20 мг.

### Методы обследования

Всем пациентам, включенным в исследование, выполняли расширенное обследование согласно графику визитов с оценкой следующих показателей: жалобы, анамнез, в том числе аллергологический, физикальный осмотр и измерение показателей основных витальных функций (ЧД, ЧСС, АД), термометрия, оценка качества жизни (опросник SF-36), ЭКГ, фиброгастродуоденоскопия с биопсией (2 биоптата из участков атрофии) и качественным исследованием на наличие *H. pylori* (быстрый уреазный тест), морфологическое, морфометрическое и иммуногистохимическое исследования биоптатов СОЖ, суточная рН-метрия желудочного сока, клинические исследования крови и мочи, биохимический анализ крови, исследование крови с помощью диагностической системы Гастропанель.

### Гистологический метод

Анализ биопсийного материала 116 пациентов проводили до начала терапии и после окончания приема исследуемого препарата/плацебо. При первичном эндоскопическом исследовании выполняли хромокопию для выявления участков атрофии СОЖ с последующим взятием прицельной биопсии СОЖ из участков атрофии (2 биоптата) с обязательной маркировкой материала и регистрацией места взятия биопсии. При проведении эндоскопического исследования после лечения взятие биоптатов осуществляли из тех же участков СОЖ. Всего было проанализировано 464 биоптата (232 — до лечения, 232 — после лечения). Каждый образец фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина в течение 12—24 ч, заливали в парафин по общепринятой методике под контролем правильности ориентации биоптата для исключения возможности поперечных или тангенциальных срезов. Изготавливали серийные парафиновые срезы (от 20 до 30 с каждого биоптата) толщиной 3 мкм. После депарафинизации гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином для оценки признаков воспаления, атрофии и дисплазии в СОЖ; альциановым синим при рН 1,0 для определения кишечной метаплазии эпителия и мукоидного отека собственной пластинки СОЖ; проводили окраску по Романовскому—Гимзе для выявления наличия и степени обсемененности *H. pylori* и тучных клеток. Световую микроскопию, микросъемку и оценку результатов морфометрического исследования проводили с помощью микроскопа Nikon Eclipse 80i (Япония) с цифровой видеокамерой Nikon DS-Fi3 и программным обеспечением для обработки изображений QuPath.

При проведении морфометрии оценивали следующие параметры СОЖ: количество желез на 1 мм<sup>2</sup>, глубину же-

лез (неметапластическая атрофия), количество обкладочных клеток на 100 эпителиальных клеток СОЖ, признаки кишечной метаплазии (метапластической атрофии) — количество бокаловидных клеток на 100 эпителиальных клеток СОЖ.

### Иммуногистохимический метод

Исследование проводили дважды: до назначения исследуемого препарата и после приема курса исследуемого препарата/плацебо, оно включало оценку таких показателей, как фактор пролиферации (фактор стромальных клеток 1 — CXCL-12) и гомеобоксный белок (транскрипционный фактор кишечной дифференциации — CDX-2). Для иммуногистохимического окрашивания были приготовлены серийные срезы толщиной 4—6 мкм, которые помещали на предметные стекла, покрытые поли-L-лизином («Menzel», Германия). Исследования выполняли на депарафинизированных и дегидратированных срезах с использованием авидин-биотинового иммунопероксидазного метода. Для верификации экспрессии использовали первичные антитела Anti-CDX-2 (EP25, «Leica Biosystems», США) и Anti-CXCL-12 (MA5-23759, «ThermoFisher», США). В биоптатах слизистой оболочки анализировали как минимум 5 полей зрения при увеличении в 40 раз с измерением относительной площади экспрессии (в %) исследуемых гистохимических показателей (в у/е).

### Статистический метод

Для проведения статистического анализа был использован пакет статистических программ Statistica 12.0 для Windows. За уровень статистической значимости принято значение  $p < 0,05$ . Данные, распределение которых соответствовало нормальному, были представлены в виде средних арифметических значений с указанием стандартных квадратических отклонений ( $M \pm \sigma$ ). Данные, распределение которых отличалось от нормального, были представлены в виде медианы и квартильных интервалов. Для определения степени отличия распределения от нормального был использован критерий Лиллиефорса.

В связи с небольшим объемом выборки для оценки динамики показателей в большинстве случаев использовали непараметрические критерии. Оценку динамики показателей проводили с использованием критерия Уилкоксона, а также МакНемара. При необходимости была использована поправка Бонферрони на множественность сравнения. Достоверность различий между показателями зависимых групп для параметрических данных с нормальным распределением оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента для зависимых выборок.

Результаты каждой из оценок рассматривали как статистические показатели эффекта. В дальнейшем вычисляли разность долей пациентов с положительным эффектом по параметрам эффективности, строили двусторонний 95% доверительный интервал для этой разности.

Анализ значимости различий показателей морфометрии проводили с использованием плацебо-контроля, включавшего два уровня оценки: оценку различий изменения показателей относительно исходных значений в сравниваемых группах (скрининг — окончание исследования) и оценку межгрупповых различий исхода лечения (сравнение показателей по окончании исследования в обеих группах). При применении контроля исходного состояния проведен сравнительный анализ исследованных показателей до и после лечения, что позволило изучить их динамику

на фоне приема исследуемого альфа-глутамил-триптофана и сравнить с показателями группы принимавших плацебо.

Динамика показателей морфометрии по отношению к исходному состоянию была оценена с использованием критерия Уилкоксона или Стьюдента для зависимых выборок в зависимости от характеристик распределения показателей (сравнение параметров до и после лечения). Межгрупповые различия до и после лечения (группа принимавших исследуемый препарат и группа принимавших плацебо) оценивали с использованием критерия Манна—Уитни.

Большинство исследуемых параметров иммуногистохимического анализа, согласно критерию Лиллиефорса, имело распределение, отличное от нормального. В связи с этим для более корректного описания параметров распределения были использованы квартильные и медианные характеристики.

## Результаты и обсуждение

Распределение пациентов по полу и возрасту представлено в табл. 1.

### Оценка результатов морфометрии

На фоне терапии у пациентов, принимавших исследуемый препарат, выявлено статистически значимое увеличение количества желез на 1 мм<sup>2</sup> СОЖ в биоптатах при сравнении с исходными показателями скрининга на 26,1% ( $p=0,028$ ). В группе пациентов, принимавших плацебо, напротив, отмечалось снижение количества желез на 1 мм<sup>2</sup> СОЖ после терапии в сравнении с показателями скрининга, которое имело статистическую значимость различий ( $p=0,026$ ). Межгрупповое сравнение исходов лечения показало, что после курса терапии у пациентов, принимавших альфа-глутамил-триптофан, количество желез на 1 мм<sup>2</sup> СОЖ было статистически значимо больше в сравнении с результатами в группе принимавших плацебо ( $p=0,013$ ) (рис. 1, 2).

При анализе динамики глубины желез СОЖ (табл. 2) выявлено, что данный параметр содержал наибольшее количество выпадающих значений. Такая значительная доля отсутствующих результатов по данному показателю, помимо случаев, когда глубина биоптата была недостаточной, связана еще и с тем, что в значительном количестве биоптатов срезы проходили тангенциально по отношению к телу желез, вследствие чего не представлялось возможным корректно определить их глубину.

По параметру количества обкладочных клеток (см. табл. 2) не выявлено статистически значимых различий (изменений показателя относительно исходных значений в сравнении с плацебо и межгруппового сравнения с плацебо). Следует учитывать, что популяция обкладочных клеток представлена преимущественно в теле желудка, в то время как биоптаты для первичного анализа данных, соглас-

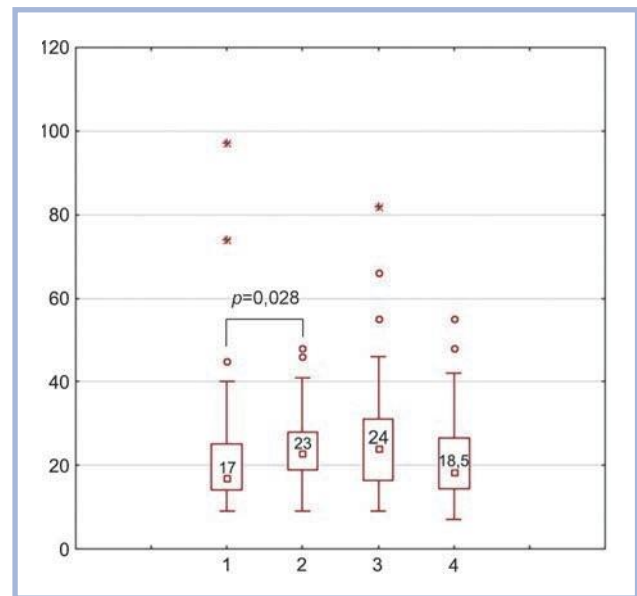


Рис. 1. Динамика количества желез на 1 мм<sup>2</sup> слизистой оболочки желудка при приеме альфа-глутамил-триптофана и плацебо.

Медианы, 25 и 75% квартили, выбросы значений, минимальные и максимальные значения показателя. По оси абсцисс группы лечения: 1 — альфа-глутамил-триптофан до лечения; 2 — альфа-глутамил-триптофан после лечения; 3 — плацебо до лечения; 4 — плацебо после лечения. По оси ординат: количество желез на 1 мм<sup>2</sup> слизистой оболочки желудка.

Fig. 1. Dynamics of the number of glands per 1 mm<sup>2</sup> of the gastric mucosa when taking alpha-glutamyl-tryptophan and placebo.

The medians, 25 and 75% quartiles, outliers of values, minimum and maximum values of the indicator are presented. On the abscissa axis are the treatment groups: 1 — alpha-glutamyl-tryptophan before treatment, 2 — alpha-glutamyl-tryptophan after treatment, 3 — placebo before treatment, 4 — placebo after treatment. On the ordinate axis: number of glands per 1 mm<sup>2</sup> of the gastric mucosa.

но протоколу (для снижения инвазивности исследования), брались из участков атрофии, которая в значительном количестве наблюдений отмечалась в антральном отделе желудка. Следовательно, отсутствие обкладочных клеток в таких биоптатах не означает фактического снижения их количества в СОЖ.

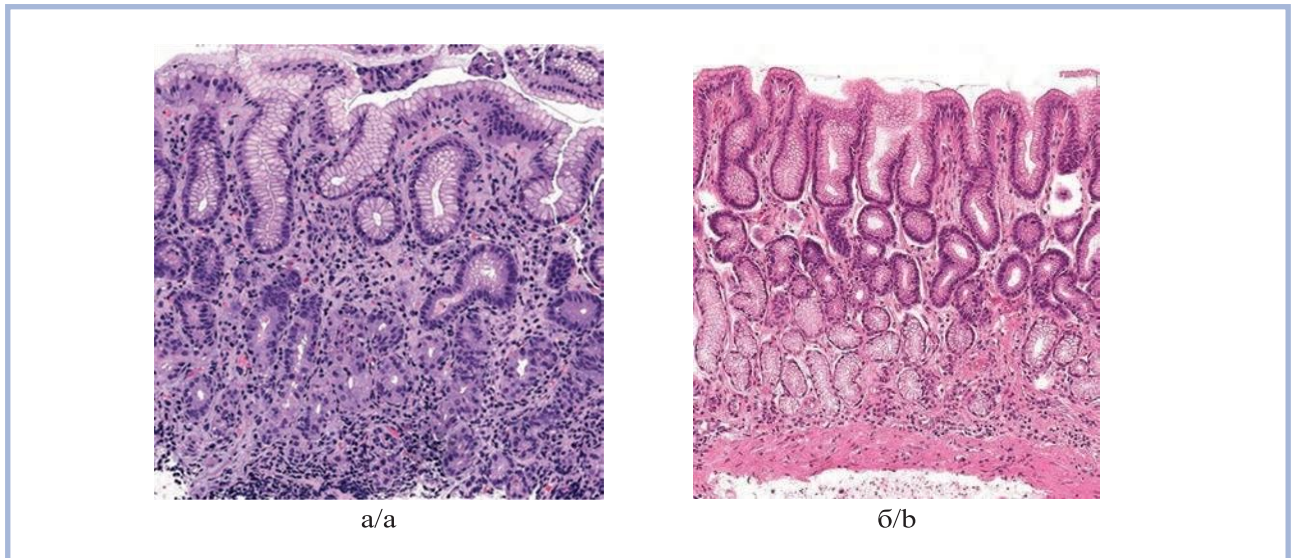
При анализе признаков метапластической атрофии в исследуемых биоптатах (рис. 3) определена тенденция к ее уменьшению.

Полученные результаты позволяют предположить, что исследуемый препарат способствует процессам регене-

Таблица 1. Половозрастные характеристики выборки пациентов

Table 1. Gender and age characteristics of the patients

Характеристика	Группа альфа-глутамил-триптофана (n=58)	Группа плацебо (n=58)	Обе группы (n=116)
Пол:			
мужской, абс. (%)	10 (17,2)	12 (20,7)	22 (19,0)
женский, абс. (%)	48 (82,8)	46 (79,3)	94 (81,0)
Возраст, годы:			
$M \pm m^2$	59,1 ± 1,0	57,1 ± 1,3	58,1 ± 0,8
разброс (мин—макс)	40—71	40—76	40—76



**Рис. 2.** Изменение количества желез слизистой оболочки желудка в биоптатах на фоне приема альфа-глутамил-триптофана.

а — до лечения; б — после лечения. Окраска гематоксилином и эозином, ×100.

**Fig. 2.** Change in the number of glands of the gastric mucosa in biopsy specimens while taking alpha-glutamyl-tryptophan. a — before treatment, b — after treatment. H&E staining, ×100.

**Таблица 2.** Распределение показателей морфометрического анализа у обследованных пациентов

**Table 2.** Distribution of morphometric analysis data in examined patients

Показатель	Среднее	Медиана	Min	Max	Стандартное отклонение	Стандартная ошибка среднего	Критерий Лиллиефорса (p)
Группа альфа-глутамил-триптофана до лечения							
Количество желез	22,3	17,0	9,00	97,0	15,6	2,16	<0,1
Глубина желез (n=38)	182,7	165,4	86,97	456,5	65,27	8,64	<0,1
Количество обкладочных клеток	6,5	0,0	0,00	122,0	17,72	2,34	<0,1
Группа альфа-глутамил-триптофана после лечения							
Количество желез	24,7	23,0	9,00	48,0	9,8	1,37	<0,1
Глубина желез (n=40)	193	190	88,3	489	59,7	7,91	<0,05
Количество обкладочных клеток	10	2	0,0	96	19,0	2,52	<0,1
Группа плацебо до лечения							
Количество желез	26,3	24,0	9,00	82,0	14,5	2,01	<0,1
Глубина желез (n=38)	181,7	185,7	53,97	281,6	51,36	6,68	>0,2
Количество обкладочных клеток	11,8	0,0	0,00	136,0	25,39	3,30	<0,1
Группа плацебо после лечения							
Количество желез	20,9	18,5	7,00	55,0	10,1	1,40	<0,1
Глубина желез (n=38)	208,3	205,1	111,5	311,5	50,88	6,62	<0,2
Количество обкладочных клеток	10,0	0,0	0,0	104,0	25,27	3,29	<0,1

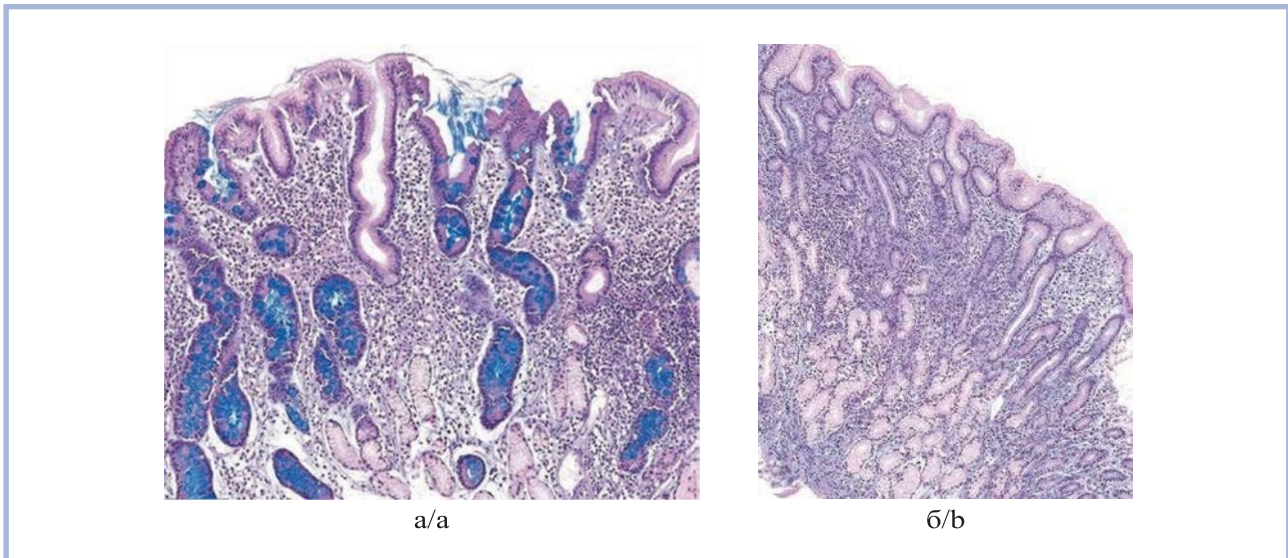
рации и восстановления тканевой структуры СОЖ. Регенераторное действие альфа-глутамил-триптофана может быть объяснено его метаботропным эффектом. В частности, на тест-системе трансфицированных mGluR1a клеток обнаружено, что глутамил-триптофан показывает значительный дозозависимый эффект взаимодействия с mGluR1a, метаботропным рецептором [12]. В другом исследовании [13] на модели неэпителизирующейся раны у кроликов показано усиление процессов регенерации на фоне введения альфа-глутамил-триптофана лабораторным животным. Выявлено, что препарат ингибирует активность матриксных металлопротеаз (ММП) 8 и 9, препятствуя тем самым чрезмерному разрушению тканей на этапе резорбции детрита, снижает актив-

ность ММП-1 и ММП-2 на этапе роста грануляционной ткани, тем самым способствуя более быстрому закрытию раны.

**Оценка результатов иммуногистохимического исследования**

При иммуногистохимическом исследовании атрофического гастрита важное значение придается гену *CXCL-12*, кодирующему так называемый фактор стромальных клеток 1 (Stromal cell-derived factor 1) [14].

При приеме альфа-глутамил-триптофана статистически значимых изменений экспрессии фактора *CXCL-12* при измерении его относительной площади (в %) не отмечалось. Однако установлено статистически значи-



**Рис. 3.** Динамика метапластических изменений в биоптатах слизистой оболочки желудка на фоне приема альфа-глутамил-триптофана.

а — до лечения,  $\times 200$ ; б — после лечения,  $\times 100$ . Окраска альциановым синим.

**Fig. 3.** Dynamics of metaplastic changes of the gastric mucosa in biopsies while taking alpha-glutamyl-tryptophan.

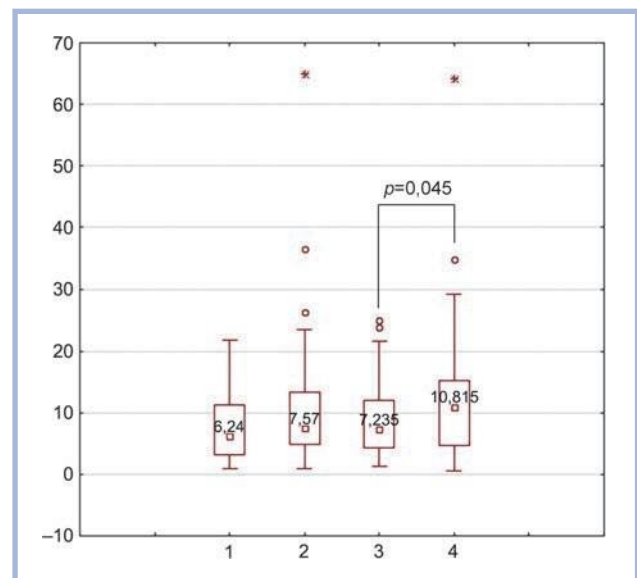
а — before treatment,  $\times 200$ ; б — after treatment. Alcian blue staining,  $\times 100$ .

мое увеличение экспрессии фактора CXCL-12 у пациентов, принимавших плацебо, при сравнении с параметрами исходных данных ( $p=0,045$ ) (рис. 4, 5).

Фактор стромальных клеток 1, кодирующийся геном *CXCL-12*, является хемоаттрактантом, активным по отношению к Т-лимфоцитам и моноцитам, способствуя миграции и задержке клеток в тканях и поддерживая тем самым хроническое воспаление, являющееся ключевым моментом в формировании атрофии СОЖ [15]. Активирование хемокинового рецептора CXCR4 (CXCR4 является рецептором для хемокина CXCL-12) индуцирует быстрое и кратковременное увеличение уровня внутриклеточных ионов кальция и хемотаксиса. Из всего спектра активностей продуктов данного гена (связывает атипичный хемокиновый рецептор ACKR3, активирует бета-аррестинный путь, связывается с аллостерическим центром интегринов и активирует интегрины ITGA5:ITGB3, ITGA4:ITGB, ITGA5:ITGB1, снижает адгезию моноцитов через LYN киназу и т.д.) наибольшее значение для патогенеза атрофического гастрита имеет связывание с поверхностными клеточными протеогликанами, сохраняя высокий уровень локальной активности, что особенно ярко проявляется при мультифокальном атрофическом гастрите.

Увеличение уровня экспрессии CXCL-12 на фоне приема плацебо является косвенным свидетельством продолжающегося хронического воспаления с повышением хемоаттрактантной активности. Отсутствие увеличения экспрессии CXCL-12 на фоне приема исследуемого препарата может говорить о наличии механизмов, влияющих на взаимосвязанные процессы, способствующие уменьшению хронического воспаления СОЖ при атрофическом гастрите.

Такое предположение основано на изложенных ранее данных [7], где в сравнении с исходным состоянием на фоне приема альфа-глутамил-триптофана на  $1 \text{ мм}^2$  СОЖ выявлено статистически значимое ( $p<0,05$ ) снижение лейкоцитарной инфильтрации эозинофилами в 3 раза, макро-

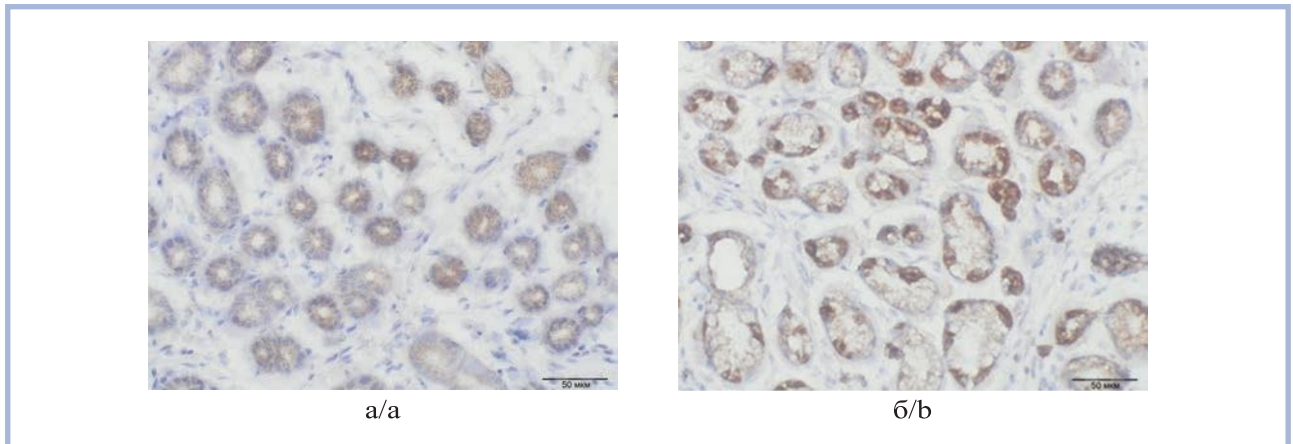


**Рис. 4.** Экспрессия CXCL-12 при приеме альфа-глутамил-триптофана и плацебо.

Представлены медианы, 25 и 75% квартили, выбросы значений, минимальные и максимальные значения показателя. По оси абсцисс группы лечения: 1 — альфа-глутамил-триптофан до лечения; 2 — альфа-глутамил-триптофан после лечения; 3 — плацебо до лечения; 4 — плацебо после лечения. По оси ординат: относительная площадь фактора CXCL-12 (%).

**Fig. 4.** Expression of CXCL-12 when taking alpha-glutamyl-tryptophan and placebo.

The medians, 25 and 75% quartiles, outliers of values, minimum and maximum values of the indicator are presented. On the abscissa axis of the treatment group: 1 — alpha-glutamyl-tryptophan before treatment, 2 — alpha-glutamyl-tryptophan after treatment, 3 — placebo before treatment, 4 — placebo after treatment. On the ordinate axis: relative area of factor CXCL-12 (%).



**Рис. 5.** Экспрессия CXCL-12 в слизистой оболочке желудка пациента, принимавшего плацебо.

а — до лечения; б — после лечения. Иммуногистохимическая реакция с антителами Anti-CXCL-12 — MA5-23759,  $\times 40$ .

**Fig. 5.** Expression of CXCL-12 in the gastric mucosa of a patient taking placebo.

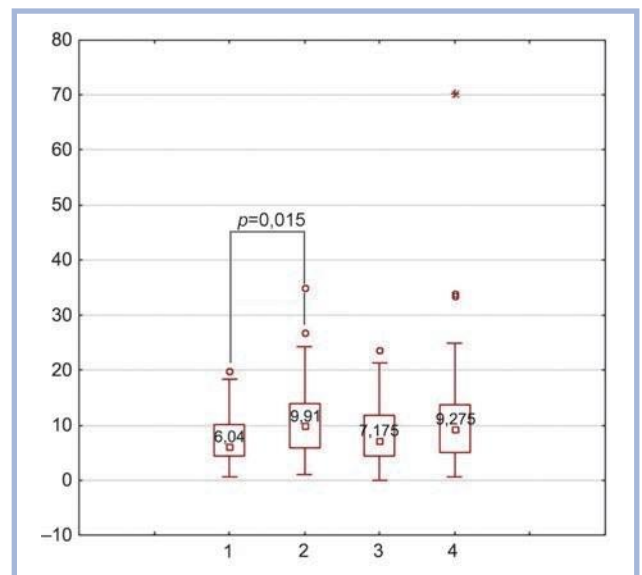
a — before treatment, b — after treatment. Immunohistochemical reaction with Anti-CXCL-12 — MA5-23759 antibodies,  $\times 40$ .

фагами в 1,5 раза, нейтрофилами в 4 раза, лимфоцитами на 28,2%, плазмочитами почти на 30% и отсутствие подобных различий в группе плацебо.

В работе отмечено статистически значимое увеличение относительной площади (в %) фактора CDX-2 в группе принимавших альфа-глутамил-триптофан в сравнении с исходными данными ( $p=0,015$ ). При этом статистически значимой динамики данного показателя в процессе приема плацебо не выявлено (рис. 6, 7).

Продуктом гена *CDX-2* является транскрипционный фактор кишечной дифференциации (caudal type homeobox 2). Кишечно-специфический ген *CDX-2* регулирует пролиферацию и дифференцировку преимущественно в эпителиальных клетках кишечника. Ряд авторов [16, 17] показали, что экспрессия CDX-2 часто обнаруживалась в образцах СОЖ как с метаплазией, так и без нее у пациентов, инфицированных *H. pylori*. Известно, что экспрессия CDX-2 уменьшается по мере прогрессирования опухолей, это подтверждает вывод исследователей [18] о том, что атрофический гастрит связан с изменением экспрессии CDX-2 еще до появления дисплазии и метаплазии. CDX-2 участвует также в трансдифференцировке эпителиальных клеток желудка и может увеличиваться при пролиферации эпителиальных клеток. Ранее изложенные данные [7] согласуются с полученными морфологическими и иммуногистохимическими показателями. Сохранение и статистически значимое увеличение экспрессии CDX-2 связано с увеличением количества и функциональной активности элементов СОЖ.

Железистые структуры имеют более высокий потенциал к дифференцировке, а так как CDX-2 является транскрипционным фактором, он может сохраняться в дифференцирующихся структурах. Полученные данные согласуются с результатами ряда авторов [19, 20], которые также обнаружили длительное сохранение высоких цифр экспрессии CDX-2 в течение 12 мес после эрадикационной терапии у пациентов без признаков метаплазии СОЖ. Согласно другим данным [21], после эрадикации *H. pylori* экспрессия CDX-2 имеет тенденцию к редукции только в зоне привратника, сохраняясь практически неизменной в других отделах СОЖ. Эти данные свидетельствуют, что и нормальные клет-



**Рис. 6.** Экспрессия CDX-2 при приеме альфа-глутамил-триптофана и плацебо.

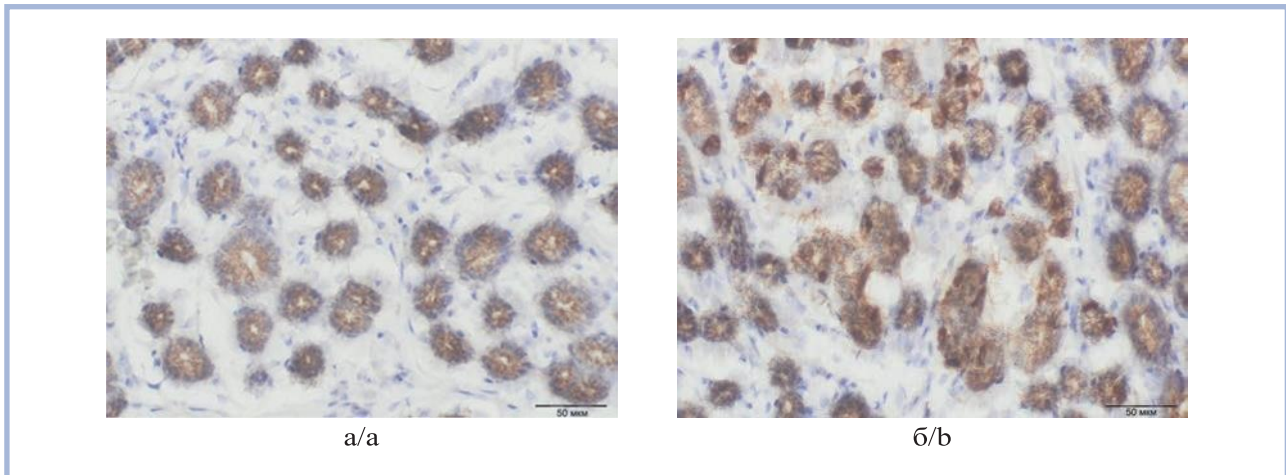
Представлены медианы, 25% и 75% квантили, выбросы значений, минимальные и максимальные значения показателя. По оси абсцисс группы лечения: 1 — альфа-глутамил-триптофан до лечения; 2 — альфа-глутамил-триптофан после лечения; 3 — плацебо до лечения; 4 — плацебо после лечения. По оси ординат: относительная площадь фактора CDX-2 (%).

**Fig. 6.** CDX-2 expression when taking alpha-glutamyl-tryptophan and placebo.

The medians, 25 and 75% quartiles, outliers of values, minimum and maximum values of the indicator are presented. On the abscissa axis of the treatment group: 1 — alpha-glutamyl-tryptophan before treatment, 2 — alpha-glutamyl-tryptophan after treatment, 3 — placebo before treatment, 4 — placebo after treatment. On the ordinate axis: the relative area of the factor CDX-2 (%).

ки железистого аппарата СОЖ могут экспрессировать молекулы CDX-2, которые, как считалось ранее, являются характерными только для структур тонкокишечного эпителия.





**Рис. 7.** Экспрессия CDX-2 в слизистой оболочке желудка пациента, принимающего альфа-глутамил-триптофан. а — до лечения; б — после лечения. Иммуногистохимическая реакция с антителами к CDX-2 — EP25,  $\times 40$ .

**Fig. 7.** CDX-2 expression in the gastric mucosa of a patient taking alpha-glutamyl-tryptophan. а — before treatment, б — after treatment. Immunohistochemical reaction with antibodies to CDX-2 — EP25,  $\times 40$ .

Увеличение экспрессии CDX-2 часто индуцируется состояниями, связанными с необходимостью гиперпродукции слизи. Повышение исходно сниженной кислотности желудочного содержимого под влиянием терапии исследуемым препаратом альфа-глутамил-триптофан, по-видимому, явилось пусковым механизмом компенсаторного увеличения продукции слизи с защитной целью. Резистентность СОЖ от действия соляной кислоты обеспечивается выработкой бикарбонатов, диффундирующих в слой слизи, от величины которого во многом зависит ощелачивающий эффект, что на уровне клеточных механизмов и нашло отражение в усилении экспрессии CDX-2, являющегося маркером клеток, продуцирующих муцин.

## Заключение

В результате анализа данных проведенного клинического исследования установлено статистически достоверное в сравнении с контролем исходного состояния и с плацебо положительное влияние исследуемого препарата на регенераторные механизмы, приводящие к стабилизации и/или улучшению гистологической картины и морфофункционального состояния СОЖ.

С учетом данных литературы о том, что нормальные клетки железистого аппарата СОЖ могут экспрессировать молекулы CDX-2, результаты иммуногистохимического исследования по повышению экспрессии CDX-2 на фоне приема исследуемого препарата можно расценить как показатель улучшения репаративных процессов. В целом можно сделать вывод, что исследуемый препарат альфа-глутамил-триптофан проявляет терапевтическую активность, заключающуюся в частичной редукции основных патофизиологических процессов, приводящих к формированию атрофии

СОЖ, и за счет стимуляции регенераторных механизмов и противовоспалительной активности способствует стабилизации состояния и восстановлению некоторых параметров СОЖ. Это может служить основанием для использования данного лекарственного средства в терапии атрофического гастрита, в том числе ассоциированного с *H. pylori*. Применение альфа-глутамил-триптофана у лиц с потенциально предраковым состоянием — ХАГ — является не только эффективным в отношении уменьшения фактора воспаления и предупреждения прогрессирования атрофии, но и перспективным методом профилактики рака желудка.

*Материал подготовлен на основании данных III фазы клинического исследования при финансовой поддержке компании АО «МБНПК «Цитомед». При подготовке рукописи авторы сохранили независимость мнений.*

*This study was supported by JSC «CYTOMED» based on data from a phase III clinical trial. During the preparation of the manuscript, the authors maintained their independence of opinion.*

## Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования — Н.В. Барышникова, Ю.П. Успенский  
Сбор и обработка материала — А.А. Краснов, Е.Ю. Калинина, Ю.С. Крылова, Ю.А. Фоминых  
Статистическая обработка данных — А.А. Краснов  
Написание текста — Н.В. Барышникова, Е.Ю. Калинина, Ю.С. Крылова  
Редактирование — В.А. Апрятина, С.В. Петленко, А.А. Краснов

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
The authors declare no conflicts of interest.**

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ruge M, Genta RM, Graham DY, Di Mario F, Vaz Coelho LG, Kim N, Malfertheiner P, Sugano K, Tsukanov V, Correa P. Chron-

icles of a cancer foretold: 35 years of gastric cancer risk assessment. *Gut*. 2016;65(5):721-725.



2. Кононов А.В., Мозговой С.И., Ливзан М.А., Предвечная И.К., Новикова Л.Д. Морфология поверхностного и атрофического хронического гастрита при эрадикации *Helicobacter pylori*. *Архив патологии*. 2005;3:17-21.  
Kononov AV, Mozgovoi SI, Livzan MA, Predvechnaya IK, Novikova LD. Morphology of superficial and atrophic chronic gastritis during *Helicobacter pylori* eradication. *Arkhiv Patologii*. 2005;(3):17-21. (In Russ.).
3. Sugano K, Tack J, Kuipers EJ, Graham DY, El-Omar EM, Miura S, Naruma K, Asaka M, Uemura N, Malfertheiner P; faculty members of Kyoto Global Consensus Conference. Kyoto global consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis. *Gut*. 2015;64(9):1353-1367. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309252>
4. Correa P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *Am J Surg Pathol*. 1995;19(suppl 1):37-43.
5. Correa P. Gastric cancer: overview. *Gastroenterol Clin North Am*. 2013;42(2):211-217. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2013.01.002>
6. Ливзан М.А., Гаус О.В., Мозговой С.И. Хронический атрофический гастрит: тактика курации пациента. *РМЖ. Медицинское обозрение*. 2021;5(6):427-432.  
Livzan MA, Gaus OV, Mozgovoi SI. Chronic atrophic gastritis: tactics of patient curation. *RMJ. Medical Review*. 2021;5(6):427-432. (In Russ.). <https://doi.org/10.32364/2587-6821-2021-5-6-427-432>
7. Барышникова Н.В., Фоминых Ю.А., Иванов С.В., Гнутов А.А., Соусова Я.В. Комитет по здравоохранению Правительства Санкт-Петербурга. *Использование альфа-глутамил-триптофана для профилактики рака желудка у пациентов с хроническим атрофическим гастритом*. Методические рекомендации. СПб. 2022.  
Baryshnikova NV, Fominykh YuA, Ivanov SV, Gnutow AA, Sousova YaV. The Health Committee of the Government of St. Petersburg. *The use of alpha-glutamyl-tryptophan for the prevention of stomach cancer in patients with chronic atrophic gastritis*. Guidelines. SPb. 2022. (In Russ.).
8. Chalisova NI, Khavinson V, Nozdrachev AD. Modulating and protective effects of thymic peptides in lymphoid tissue culture. *Dokl Biol Sci*. 2001;379:316-318. <https://doi.org/10.1023/a:1011683609587>
9. Хавинсон В.Х., Кузник Б.И., Рыжак Г.А. Пептидные биорегуляторы — новый класс геропротекторов. Сообщение 2. Результаты клинических исследований. *Успехи геронтологии*. 2013;26(1):20-37.  
Khavinson VKh, Kuznik BI, Ryzhak GA. Peptide bioregulators: the new class of geroprotectors. Message 2. Clinical studies results. *Advances in Gerontology*. 2013;26(1):20-37. (In Russ.).
10. Петленко И.С., Егорова Т.Ю., Петленко С.В., Безгодков Ю.А., Воронцова Т.Н. Экспериментальное изучение специфической активности L-Глутамил-L-Триптофана. *Современные проблемы науки и образования*. 2019;3. [Электронный ресурс].  
Petlenko IS, Egorova TYu, Petlenko SV, Bezgodkov YuA, Vorontsova TN. Experimental study of the specific activity of L-Glutamyl-L-Tryptophan. *Modern Problems of Science and Education*. 2019;(3). [Electronic resource]. (In Russ.). <https://science-education.ru/ru/article/view?id=28988&ysclid=l-g4ut60640101254054>
11. Петленко С.В., Головачева Е.Г., Афанасьева О.И. Возможности иммунокоррекции для снижения уровня заболеваемости людей в районах с неблагоприятными профессиональными и экологическими факторами. *Медицинская иммунология*. 2020;22(6):1097-1110.  
Petlenko SV, Golovacheva EG, Afanas'eva OI. Opportunities for immunocorrection aiming for reduction of morbidity in the areas with adverse occupational and environmental conditions. *Medical Immunology*. 2020;22(6):1097-1110. (In Russ.). <https://doi.org/https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-178-6-4-4110.15789/1563-0625-OFI-2055>
12. Ohashi H, Maruyama T, Higashi-Matsumoto H, Nomoto T, Nishimura S, Takeuchi Y. A novel binding assay for metabotropic glutamate receptors using [<sup>3</sup>H] L-quisqualic acid and recombinant receptors. *Z Naturforsch C J Biosci*. 2002;57(3-4):348-355. <https://doi.org/10.1515/znc-2002-3-425>
13. Shevtsov MA, Smagina LV, Kudriavtceva TA, Petlenko SV, Voronkina IV. Glu-Trp-ONa or its acylated analogue (R-Glu-Trp-ONa) administration enhances the wound healing in the model of chronic skin wounds in rabbits. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:1717-1727. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S79665>
14. Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, Arenzana-Seisdedos F, Thelen M, Bachelier F. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem*. 2005;280(42):35760-35766. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508234200>
15. Fujita M, Davari P, Takada YK, Takada Y. Stromal cell-derived factor-1 (CXCL12) activates integrins by direct binding to an allosteric ligand-binding site (site 2) of integrins without CXCR4. *Biochem J*. 2018;475(4):723-732. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170867>
16. Bonner CA, Loftus SK, Wasmuth JJ. Isolation, characterization, and precise physical localization of human CDX1, a caudal-type homeobox gene. *Genomics*. 1995;28(2):206-211. <https://doi.org/10.1006/geno.1995.1132>
17. Silberg DG, Swain GP, Suh ER, Traber PG. Cdx1 and cdx2 expression during intestinal development. *Gastroenterology*. 2000;119(4):961-971. <https://doi.org/10.1053/gast.2000.18142>
18. Ahn SY, Lee SY, Hong SN, Kim JH, Sung IK, Park HS, Shim CS, Jin CJ, Han HS. Endoscopic diagnosis of open-type atrophic gastritis is related to the histological diagnosis of intestinal metaplasia and Cdx2 expression. *Dig Dis Sci*. 2011;56(4):1119-1126. <https://doi.org/10.1007/s10620-010-1531-8>
19. Satoh K. New triple therapy for *Helicobacter pylori* infection in Japan. *Nihon Rinsho*. 2003;61(1):109-112. (In Japanese).
20. Eda A, Osawa H, Yanaka I, Satoh K, Mutoh H, Kihira K, Sugano K. Expression of homeobox gene CDX2 precedes that of CDX1 during the progression of intestinal metaplasia. *J Gastroenterol*. 2002;37(2):94-100. <https://doi.org/10.1007/s005350200002>
21. Vauhkonen M, Vauhkonen H, Sipponen P. *Helicobacter pylori* infection induces a reversible expression of the CDX-2 transcription factor protein in human gastric epithelium. *Scand J Gastroenterol*. 2008;43(8):915-921. <https://doi.org/10.1080/00365520802014841>

Поступила 04.04.2023

Received 04.04.2023

Принята в печать 19.04.2023

Accepted 19.04.2023