

DOI: <https://doi.org/10.60797/BIO.2024.4.4>**ОЦЕНКА УРОВНЕЙ ТРИПТОФАНА И ТРИМЕТИЛАМИН N-ОКСИДА ПРИ НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЯХ LONG COVID-19**

Научная статья

Туребекова Д.М.^{1,*}, Марченко А.Б.²¹ORCID : 0009-0006-6509-3705;^{1,1,2} Научно-исследовательская лаборатория Института наук о жизни, НАО «Карагандинский Медицинский Университет», Караганда, Казахстан

* Корреспондирующий автор (turebekovad00[at]mail.ru)

Аннотация

Целью исследования было изучение уровней триптофана, триметиламин N-оксида в плазме крови у пациентов с неврологическими осложнениями Long COVID-19.

Материалы и методы. Исследование включало в себя анализ клинических данных из медицинских карт пациентов, лабораторное обследование в 3 группах: группа «случай» – 15 человек (пациенты, перенесшие COVID-19 в 2021-2022г и получавшие в период 6-12 месяцев после выздоровления реабилитационную медицинскую помощь, имевшие 2 и более признаков Long COVID-19 с преимущественными нарушениями нервной системы); группа «сравнения» – 15 человек (пациенты, перенесшие COVID-19 в 2021-2022г и получавшие в период 6-12 месяцев после выздоровления реабилитационную медицинскую помощь, не имевшие неврологических проявлений); группа «контроль» – 15 человек (здоровые добровольцы, не имевшие ПЦР подтвержденный случай COVID-19, не имевшие неврологических проявлений). Лабораторные исследования включали измерение уровней триптофана, триметиламин N-оксида с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС.

Результаты и обсуждение. Уровень триптофана в зависимости от возраста составил 5,13 мкмоль/л [3,01; 6,08] в группе «случай», 6,10 мкмоль/л [5,43; 7,03] в группе «сравнения» и имел значимое различие ($p=0,002$). Уровень данной аминокислоты в группе «контроль» был значительно выше – 8,96 мкмоль/л [7,34;12,39] и также имел статистически значимое различие с группой «случай» и «сравнения» ($p=0,000$). В случае с ТМАО его уровень в группе «случай» составил 0,94 мкмоль/л [0,55; 2,09], в группе «сравнения» – 0,55 мкмоль/л [0,40; 0,79] и имел статистически значимое различие ($p=0,025$). Уровень ТМАО в группе «контроль» составил 0,29 мкмоль/л [0,14; 0,39], также имел статистически значимое различие с группой «случай» – ($p=0,01$) и группой «сравнения» – ($p=0,07$).

Выводы. В результате проведенного исследования были обнаружены статистически значимые различия уровней триптофана и триметиламин N-оксида между группами «случай», «сравнения» и «контроль», это позволяет предположить, что данные молекулы принимают участие в патогенезе неврологических осложнений Long COVID-19.

Ключевые слова: long COVID-19, неврологические осложнения, молекулярные механизмы, цитокиновый шторм, триметиламин N-оксид, триптофан.

EVALUATION OF TRYPTOPHAN AND TRIMETHYLAMINE N-OXIDE LEVELS IN NEUROLOGICAL COMPLICATIONS OF LONG COVID-19

Research article

Turebekova D.M.^{1,*}, Marchenko A.B.²¹ORCID : 0009-0006-6509-3705;^{1,1,2} Scientific Research Laboratory of the Institute of Life Sciences, NPJSC "Karaganda Medical University", Karaganda, Kazakhstan

* Corresponding author (turebekovad00[at]mail.ru)

Abstract

The aim of the research was to study plasma levels of tryptophan, trimethylamine N-oxide in patients with neurological complications of Long COVID-19.

Materials and Methods. The study included analysis of clinical data from patients' medical records, laboratory examination in 3 groups: "case" group – 15 people (patients who underwent COVID-19 in 2021-2022 and received rehabilitation medical care in the period of 6-12 months after recovery, who had 2 or more signs of Long COVID-19 with predominant nervous system disorders); "comparison" group – 15 people (patients who underwent COVID-19 in 2021-2022 and received rehabilitation medical care during 6-12 months after recovery, who did not have neurological manifestations); "control" group – 15 people (healthy volunteers who did not have a PCR-confirmed case of COVID-19, who did not have neurological manifestations). Laboratory studies included measurement of tryptophan, trimethylamine N-oxide levels using HPLC-MS/MS method.

Results and Discussion. The age-dependent tryptophan level was 5.13 $\mu\text{mol/L}$ [3.01;6.08] in the "case" group, 6.10 $\mu\text{mol/L}$ [5.43;7.03] in the "comparison" group and had a significant difference ($p=0.002$). The level of this amino acid was significantly higher in the "control" group, 8.96 $\mu\text{mol/L}$ [7.34;12.39] and also had a statistically significant difference with the "case" and "comparison" groups ($p=0.000$). In case of TMA, its level was 0.94 $\mu\text{mol/L}$ [0.55;2.09] in the "case" group and 0.55 $\mu\text{mol/L}$ [0.40;0.79] in the "comparison" group and had a statistically significant difference ($p=0.025$). TMA level in the

"control" group was 0.29 $\mu\text{mol/l}$ [0.14; 0.39], also had a statistically significant difference with the "case" group – ($p=0.01$) and the "comparison" group – ($p=0.07$).

Conclusions. This study found statistically significant differences in tryptophan and trimethylamine N-oxide levels between the case, comparison and control groups, suggesting that these molecules are involved in the pathogenesis of neurological complications of Long COVID-19.

Keywords: long COVID-19, neurological complications, molecular mechanisms, cytokine storm, trimethylamine N-oxide, tryptophan.

Введение

В Международной классификации болезней (МКБ) Long COVID-19 был записан под кодом U09.9. Данное заболевание внесено как «состояние после COVID-19 неуточненное», которое включает в себя и постковидное состояние. На данный момент происхождение и патогенез симптомов Long COVID-19 остаются неясными. Но очевидно, что это совокупность прямого повреждения, вызванного вирусной инфекцией, сопутствующих заболеваний, иммунологического ответа, психологических и эмоциональных факторов [1].

Стало известно, что из числа пациентов, у которых длительные симптомы COVID-19 сохранялись в течение трех месяцев после первоначального заражения, у 15,1% симптомы сохранялись и по прошествии одного года; однако отдаленные последствия после COVID-19 после двенадцати месяцев еще недостаточно изучены [2].

Неврологические проявления составляют один из наиболее важных вариантов Long COVID-19 [3]. Осложнения, влияющие на центральную нервную систему, включают усталость, затуманивание сознания, головную боль, нарушение сна, когнитивные и эмоциональные расстройства, головокружение и дисавтономию. Осложнения, влияющие на периферическую нервную систему, включают мышечную слабость, миалгию, аносмию, гипосмию, потерю слуха, нарушения восприятия, потерю тактильных ощущений, недомогание и тремор [4].

Вероятность возникновения неврологических осложнений при Long COVID-19 связана с повышенным индексом системного иммунного воспаления. К молекулам воспаления относятся интерлейкины бета-1,2, ФНО-альфа, гамма-интерферон [5].

Указанные провоспалительные цитокины и хемокины приводят к активации фермент индоламин 2,3-диоксигеназы (IDO), что ведет к снижению уровня триптофана и увеличению его метаболита — кинуренина, который является антагонистом серотонина [5]. Серотонин — это гормон, играющий важную роль в различных функциях центральной нервной системы, таких как регуляция сна и настроения. Недостаток серотонина может вызвать расстройства сна и депрессию [6]. Таким образом, активация IDO нарушает синтез серотонина, что может привести к возникновению психоэмоциональных нарушений.

Триптофан и его катаболизм по кинурениновому пути играет важную роль в воспалении и иммунном ответе, также рассматривается как один из предикторов возникновения тревожных и депрессивных расстройств и нарушений сна [7].

Другой молекулой, рассматриваемой в качестве диагностического показателя, для диагностики Long COVID-19, может быть использовано вещество триметиламин N-оксид (ТМАО). Было обнаружено сходство между влиянием ТМАО на иммунный ответ и коронавирусом. Исследователь Shi C. C. и соавт. установлено, что при взаимодействии коронавируса и инфламмосомы NLRP3 происходит усиленный синтез интерлейкина-1 и интерлейкина-18 за счет активации NF- κ B [8].

Согласно недавним исследованиям, ТМАО также способен взаимодействовать с инфламмосомой NLRP3, активируя передачу сигналов NF- κ B и активных форм кислорода, индуцируя высвобождение провоспалительных цитокинов и способствуя развитию гиперинфламмосомных состояний [9].

Установлено, что ТМАО участвует в патогенезе COVID-19. Повышенные концентрации ТМАО играют определенную роль в развитии сердечно-сосудистых и хронических респираторных заболеваний, рака и диабета. Эти заболевания также являются факторами риска тяжелого течения COVID-19 [10].

Таким образом, неврологические осложнения Long COVID-19 затрагивают центральную, периферическую, вегетативную нервную систему, приводя тем самым к инвалидизации, снижению социальной адаптации и, как следствие, к снижению трудоспособности, что ведет к отдаленным экономическим последствиям для страны, что делает актуальным продолжение изучения Long COVID-19.

Методы и принципы исследования

Исследование «случай-контроль» проводилось на базе НАО «Карагандинского Медицинского Университета» научно-исследовательской лаборатории института наук о жизни, в соответствии с этическими принципами и после получения информированного согласия пациентов, протокол № 38 от 11.10.2022 года.

В данном исследовании участники были распределены в 3 группы:

I. Группа «случай» – 15 человек.

II. Группа «сравнения» – 15 человек.

III. Группа «контроль» – 15 человек.

Для включения в группу I «случай» ($n=15$) необходимо соответствие следующим критериям:

- госпитализация с диагнозом COVID-19 в течение последних 3 лет;
- наличие двух и более симптомов Long COVID-19, преимущественно с поражением нервной системы;
- отсутствие в анамнезе инфаркта миокарда;
- отсутствие воспалительных заболеваний кишечника в анамнезе;
- отсутствие противопоказаний для забора периферической венозной крови;
- добровольное согласие на участие в исследовании и подписанное информированное согласие.

Для включения в группу II «сравнения» ($n=15$) необходимо соответствие следующим критериям:

- госпитализация с диагнозом COVID-19 в течение последних 3 лет;
- отсутствие двух и более признаков Long COVID-19, особенно связанных с поражением нервной системы;
- отсутствие в анамнезе инсультов, травм головы или другой неврологической патологии;
- отсутствие перенесённого инфаркта миокарда;
- отсутствие воспалительных заболеваний кишечника в анамнезе;
- отсутствие противопоказаний для забора периферической венозной крови;
- добровольное согласие на участие в исследовании и наличие подписанного информированного согласия.

Для включения в группу III «контроль» (n=15) необходимо соответствие следующим критериям:

- отсутствие госпитализации по поводу COVID-19 за последние 3 года;
- отсутствие в анамнезе инсультов, травм головы или других неврологических заболеваний;
- отсутствие перенесённого инфаркта миокарда;
- отсутствие воспалительных заболеваний кишечника в анамнезе;
- отсутствие противопоказаний для забора периферической венозной крови;
- добровольное согласие на участие в исследовании и подписанное информированное согласие.

Критерии исключения:

1. Психические расстройства и тяжёлые неврологические заболевания.
2. Декомпенсированные или серьёзно протекающие соматические болезни.
3. Беременность.

В выборку исследования вошли 45 человек (от 26 до 75 лет). Из них 66,67% – женщин. Деформация структуры выборки по полу в определенной степени обусловлена имеющимся перевесом женского населения по сравнению с мужским, кроме того мужчины чаще отказывались от участия в исследовании.

В группу «случай» вошли пациенты, перенесшие COVID-19 в 2021-2022г и получавшие в период 6-12 месяцев после выздоровления реабилитационную медицинскую помощь, имевшие 2 и более признаков Long COVID-19 с преимущественными нарушениями нервной ткани.

В группу «сравнения» вошли пациенты, перенесшие COVID-19 в 2021-2022г и получавшие в период 6-12 месяцев после выздоровления реабилитационную медицинскую помощь, не имевшие неврологических проявлений. Дополнительно был произведен добор в группу «контроль» здоровых добровольцев, не имевших ПЦР подтвержденный случай COVID-19, без неврологических симптомов в анамнезе.

Биологический материал для ретроспективных групп «случай» и «сравнения» был использован из биологического архива (в глубокой заморозке) проекта BR 11065386-OT-22 «COVID-19: Научно-технологическое обоснование системы реагирования на распространение новых респираторных инфекций, включая коронавирусную инфекцию». Научный руководитель программы – д.м.н., Турмухамбетова А.А. (2021-2023 гг.).

Образцы плазмы крови были получены от пациентов контрольной группы в объеме 3 мл из вены натощак в пробирки, содержащие EDTA (BD Vacutainer, США). Далее через 15 мин после забора кровь центрифугировали при комнатной температуре в течение 10 мин при 2000 g. Затем 1,5 мл полученной плазмы разливали в пластиковые пробирки типа «Эппендорф», и замораживали при температуре -80°C. До проведения анализа пробирки с образцами хранились при температуре -80°C.

Определение концентраций триптофана и ТМАО в плазме пациентов проводилось с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективной масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС/МС).

Для статистического анализа использовали демоверсию программы STATISTICA. Анализ данных проводили при уровне значимости $\alpha=0,05$. Проверку на нормальное распределение количественных данных осуществляли с использованием критерия Шапиро-Уилка. Описание количественных данных проводили на основе: медианы и квартилей. Для сравнения независимых выборок использовали метод Краскела – Уолиса и U критерий Манна-Уитни. Для оценки взаимосвязи уровней триптофана и ТМАО в группах был использован коэффициент корреляции Спирмена.

Этическое одобрение исследования было получено от этического комитета НАО «медицинского университета Караганды», протокол № 38 от 11.10.2022 года. Все участники исследования были информированы о целях исследования и подписывали письменное информированное согласие. Все данные об участниках были введены в базу, идентификаторы каждого из участников были закодированы.

Результаты и обсуждение

Из основной выборки, были сформированы 3 группы, по возрастному признаку, наличию неврологических симптомов и перенесенного COVID-19.

Группа обследованных лиц была представлена как мужчинами, так и женщинами. После формирования групп медиана возраста в общей популяции составила 59 лет (IQR 48;67).

В возрастных структурах у пациентов групп «случай» и «сравнения» преобладали пациенты пожилого возраста 53,3% и 73,3%. В группе «контроль» преобладали пациенты молодого возраста – 46,7% соответственно. При рассмотрении выборки по половому признаку, среди обследованных преобладали лица женского пола (66,67%).

Был проведен анализ историй болезней пациентов группы «случай», в ходе которого доминировали следующие неврологические симптомы: быстрая утомляемость (69%) и головокружение (22%). Также были обнаружены такие симптомы, как головная боль (15,6%), снижение памяти (9%), нарушение сна (6%), рассеянность внимания, отсутствие обоняния, шум в голове, слабость в мышцах/конечность и сонливость (3%).

Для проведения первичного описательного анализа показателей триптофана и ТМАО в зависимости от группы пациентов было проведено сравнение групп «случай», «сравнения» и «контроль» с использованием непараметрического метода Краскела – Уоллиса.

Таблица 1 - Оценка различий между уровнями триптофана и ТМАО у групп «случай», «сравнения» и «контроль»

DOI: <https://doi.org/10.60797/BIO.2024.4.4.1>

Показатель	Группа «случай»*	Группа «сравнения»*	Группа «контроль»*	p
Триптофан, мкмоль/л	5,13 [3,01; 6,08]	6,10 [5,43; 7,03]	8,96 [7,34;12,39]	0,000
ТМАО, мкмоль/л	0,94 [0,55; 2,09]	0,55 [0,40; 0,79]	0,29 [0,14; 0,39]	0,012

Примечание: *n=15; Me [Q25; Q75]; p — статистическая значимость различий значений между группами, тест Краскела – Уоллиса

В результате проведенного анализа были выявлены статистически значимые различия между уровнями триптофана и ТМАО, и группами «случай», «сравнения» и «контроль». Уровень значимости при сравнении концентраций триптофана составил $p=0,000$.

При сравнении концентраций ТМАО между группами также были обнаружены статистически значимые различия – $p=0,012$.

В связи с этим было проведено попарное сравнение групп «случай», «сравнения» и «контроль» с использованием непараметрического U критерия Манна – Уитни.

Уровень триптофана в зависимости от возраста составил 5,13 мкмоль/л [3,01; 6,08] в группе «случай», 6,10 мкмоль/л [5,43; 7,03] в группе «сравнения» и имел значимое различие ($p=0,002$) (рисунок 1).

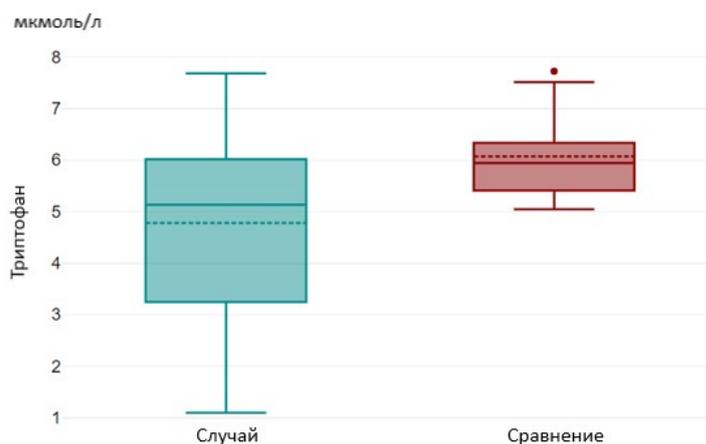


Рисунок 1 - Уровни триптофана в группах «Случай» и «Сравнение»

DOI: <https://doi.org/10.60797/BIO.2024.4.4.2>

Уровень данной аминокислоты в группе «контроль» составил 8,96 мкмоль/л [7,34;12,39] и также имел статистически значимое различие с группой «случай» и «сравнения» ($p=0,000$) (рисунок 2, 3).

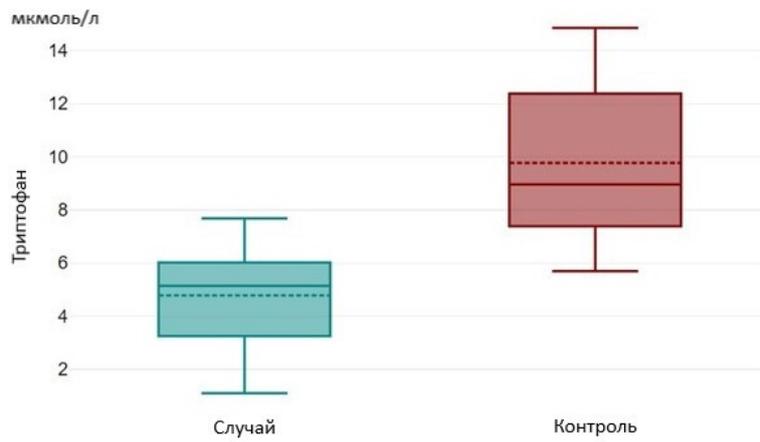


Рисунок 2 - Уровни триптофана в группах «Случай» и «Контроль»
DOI: <https://doi.org/10.60797/ВІО.2024.4.4.3>

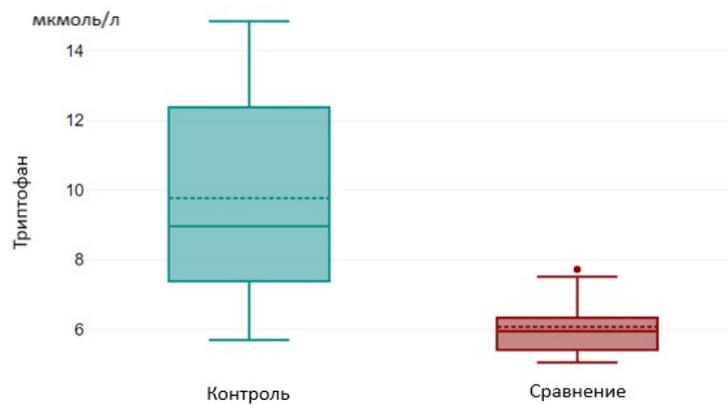


Рисунок 3 - Уровни триптофана в группах «Контроль» и «Сравнение»
DOI: <https://doi.org/10.60797/ВІО.2024.4.4.4>

Уровень ТМАО в группе «случай» составил 0,94 мкмоль/л [0,55; 2,09], в группе «сравнения» – 0,55 мкмоль/л [0,40; 0,79] и имел статистически значимое различие ($p=0,025$) (рисунок 4).

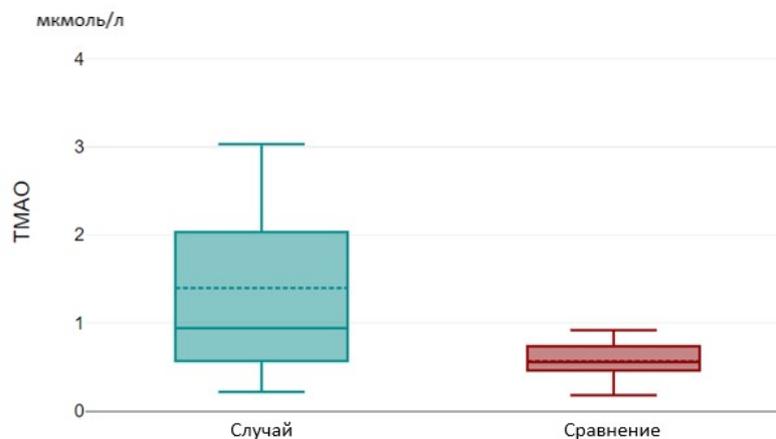


Рисунок 4 - Уровни ТМАО в группах «Случай» и «Сравнение»
DOI: <https://doi.org/10.60797/ВІО.2024.4.4.5>

Уровень ТМАО в группе «контроль» составил 0,29 мкмоль/л [0,14; 0,39], также имел статистически значимое различие с группой «случай» – ($p=0,01$) и группой «сравнения» – ($p=0,07$) (рисунок 5, 6).

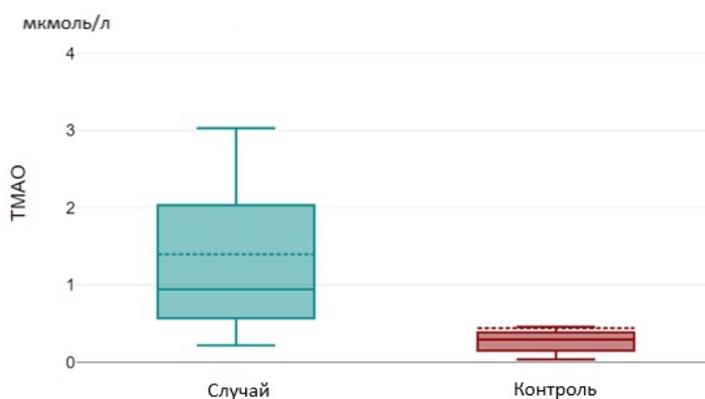


Рисунок 5 - Уровень ТМАО в группах «Случай» и «Контроль»
DOI: <https://doi.org/10.60797/BIO.2024.4.4.6>

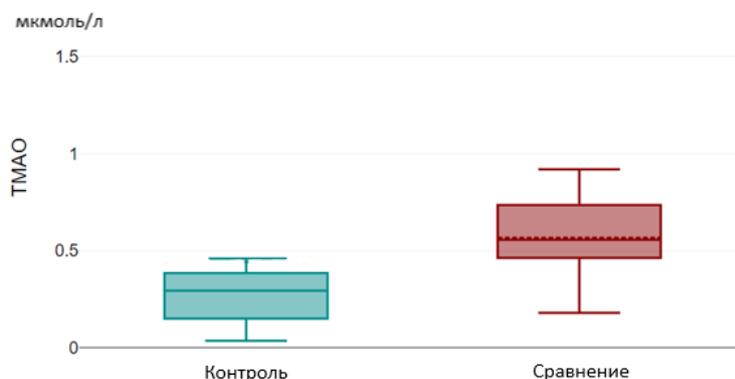


Рисунок 6 - Уровень ТМАО в группах «Контроль» и «Сравнение»
DOI: <https://doi.org/10.60797/BIO.2024.4.4.7>

Установлено, статистически значимое различие уровней триптофана в зависимости от возраста в группе «случай» и в группе «сравнения» ($p=0,002$), что указывает на то, что повышенный уровень цитокинов и хемокинов способствует активации фермента индоламин 2,3-диоксигеназы, который приводит к ингибированию триптофана и увеличению его метаболита кинуренина – антагониста серотонина [11].

Также лица группы «случай» имели статистически более высокий уровень ТМАО по сравнению с группой «сравнения» ($p = 0,025$) и группой «контроль» ($p=0,01$), что обусловлено способностью ТМАО высвобождать провоспалительные цитокины [12] и приводить к развитию гиперинфламмосомных состояний, повышать активность тромбоцитов, усиливать окислительный стресс и эндотелиальную дисфункцию, также снижать уровень оксида азота и нарушать синтез белков, обеспечивающих межклеточный контакт эндотелия, тем самым повышая проницаемость гематоэнцефалического барьера [12].

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что изучаемые молекулы – триптофан и ТМАО принимают участие в патогенезе неврологических осложнений Long COVID-19 и перспективны для дальнейших исследований в области диагностики поражения неврологической ткани, в том числе по части возможных терапевтических воздействий.

Заключение

Были выявлены статистически значимые различия между уровнями триптофана и ТМАО, и группами «случай», «сравнения» и «контроль». Уровень значимости при сравнении концентраций триптофана составил $p=0,000$. При сравнении концентраций ТМАО между группами также были обнаружены статистически значимые различия – $p=0,012$. Уровень триптофана имел статистически значимое различие ($p=0,002$) между группами «случай» и «сравнения». Также уровень данной аминокислоты имел статистически значимое различие между группой «контроль» и группами «случай» и «сравнения» ($p=0,000$). Уровень ТМАО имел статистически значимое различие между

«случай» и «сравнения» ($p=0,025$). В группе «контроль» TMAO также имел статистически значимое различие между группой «контроль» и группами «случай» – ($p=0,01$) и «сравнения» – ($p=0,07$).

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Conflict of Interest

None declared.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы на английском языке / References in English

1. ICD 10 – International Classification of Diseases of the 10th revision. — 2022. — URL: <https://mkb-10.com/index.php?pid=23014> (accessed: 08.11.2024).
2. Hanson S.W. Estimated global proportions of individuals with persistent fatigue, cognitive, and respiratory symptom clusters following symptomatic COVID-19 in 2020 and 2021 / S.W. Hanson // JAMA. — 2022. — Vol. 16. DOI: 10.1001/jama.2022.18931.
3. Guillemin G.J. Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection / G.J. Guillemin, S.J. Kerr, G.A. Smythe // Journal of Neurochemistry. — 2001. — Vol. 4. — DOI: 10.1046/j.1471-4159.2001.00498.x.
4. Jaglin M. Indole, a signaling molecule produced by the gut microbiota, negatively impacts emotional behaviors in rats / M. Jaglin, M. Rhimi, C. Philippe // Frontiers in Neuroscience. — 2018. — Vol. 12. — DOI: 10.3389/fnins.2018.00216.
5. Guarnieri T. Hypothesis: Emerging Roles for Aryl Hydrocarbon Receptor in orchestrating CoV-2-Related / T. Guarnieri // Inflammation. Cells. — 2022. — Vol. 11. — DOI: 10.3390/cells11040648.
6. Schwarcz R. The kynurenine pathway and the brain: Challenges, controversies and promises / R. Schwarcz // Neuropharmacology. — 2017. — Vol. 112. — DOI: 10.1016/j.neuropharm.2016.08.003.
7. Hajsl M. Tryptophan metabolism, inflammation, and oxidative stress in patients with neurovascular disease / M. Hajsl, A. Hlavackova, K. Broulikova // Metabolites. — 2020. — Vol. 5. — DOI: 10.3390/metabo10050208.
8. Lopez-Leon S. More than 50 long-term effects of COVID-19: a systematic review and meta-analysis / S. Lopez-Leon, T. Wegman-Ostrosky, C. Perelman // Scientific Reports. — 2021. — Vol. 1. — URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-95565-8> (accessed: 08.11.2024).
9. Mohr A. Cardiopulmonary exercise pattern in patients with persistent dyspnoea after recovery from COVID-19 / A. Mohr, L. Dannerbeck, T. J. Lange // Multidisciplinary Respiratory Medicine. — 2021. — Vol. 1. — DOI: 10.4081/mrm.2021.732.
10. Terruzzi I. Does intestinal dysbiosis contribute to an aberrant inflammatory response to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in frail patients? / I. Terruzzi, P. Senesi // Nutrition. — 2020. — Vol. 79. — DOI: 10.1016/j.nut.2020.110996.
11. Krishnan K. Multidisciplinary approach to brain fog and related persisting symptoms post COVID-19 / K. Krishnan, Y. Lin, M. Prewitt // Journal of Health Service Psychology. — 2022. — Vol. 1. — DOI: 10.1007/s42843-022-00056-7.
12. Singh G.B. High mobility group box 1 mediates TMAO-induced endothelial dysfunction / G.B. Singh, Y. Zhang, K.M. Boini // International Journal of Molecular Sciences. — 2019. — Vol. 14. — DOI: 10.3390/ijms20143570.