ISSN 2658-6533

НАУЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

RESEARCH RESULTS IN BIOMEDICINE

8(3) 2022

16+

Сайт журнала:
rrmedicine.ru
сетевой научный рецензируемый журнал
online scholarly peer-reviewed journal

НАУЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

RESEARCH RESULTS IN BIOMEDICINE

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)
Свидетельство о регистрации средства массовой информации Эл. № ФС 77-74739 от 29 декабря 2018 г.

The Journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media (Roskomnadzor)
Mass media registration certificate El. № FS 77-74739 of December 29, 2018

Том 8, №3. 2022

СЕТЕВОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
Издается с 2014 г.
ISSN 2658-6533

Volume 8, №3. 2022

ONLINE SCHOLARLY PEER-REVIEWED JOURNAL
First published online: 2014
ISSN 2658-6533

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР: ***Чурносов М.И.,*** *доктор медицинских наук, профессор, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, РФ*
ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА: ***Юров И.Ю.,*** *доктор биологических наук, профессор Российской академии наук, ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, РФ*

ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОЙ КОЛЛЕГИИ:
Александровский Ю.А., *член-корреспондент Российской академии наук, доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского», Москва, РФ*
Ван Т.С.К., *PhD, профессор, госпиталь принца Уэльса Китайского университета Гонконга, Гонконг, Китай*
Галенко-Ярошевский П.А., *член-корреспондент Российской академии наук, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет», Краснодар, РФ*
Жернакова Н.И., *доктор медицинских наук, профессор, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, РФ*
Иллиг Т., *доктор естественных наук, профессор, Ганноверский объединенный биобанк Медицинской школы Ганновера, Ганновер, Германия*
Кубешова Х.М., *MD, PhD, профессор, Масариков университет, Брно, Чехия*
Малерба Дж., *PhD, профессор медицинской генетики, Университет Вероны, Верона, Италия*
Милкович Б., *PhD, профессор, Белградский университет, Белград, Сербия*
Нкенке Э., *MD, DMD, MA, доктор медицинских наук, профессор, Венский медицинский университет, Вена, Австрия*
Покровский М.В., *доктор медицинских наук, профессор, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, РФ*
Полоников А.В., *доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», Курск, РФ*
Прощаев К.И., *доктор медицинских наук, профессор, АНО «Научно-исследовательский медицинский центр «ГЕРОНТОЛОГИЯ»», Москва, РФ*
Радзинский В.Е., *член-корреспондент Российской академии наук, доктор медицинских наук, профессор, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, РФ*
Руженкова В.В., *доктор медицинских наук, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, РФ*
Сорокин А.В., *кандидат медицинских наук, Национальный институт сердца, легких и крови, Бетесда, США*
Степанов В.А., *академик Российской академии наук, доктор биологических наук, профессор, НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, Томск, РФ*

EDITORIAL TEAM:

EDITOR-IN-CHIEF: ***M.I. Churnosov****, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia*
DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF: ***I.Yu. Iourov,*** *Doct. Sci. (Biology), Professor of the Russian Academy of Sciences, Mental Health Research Center, Moscow, Russia*

EDITORIAL BOARD:
Yu.A. Aleksandrovsky, *Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Serbsky State Scientific Center for Social and Forensic Psychiatry, Moscow, Russia*
T.S.K. Wan*, PhD, Professor, Prince of Wales Hospital of the Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China*
P.A. Galenko-Yaroshevsky, *Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia*
N.I. Zhernakova, *Doct. Sci. (Medicine), Professor, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia*
T. Illig, *Dr. rer. nat., Professor, Hanover Unified Biobank of Hannover Medical School, Hannover, Germany*
H.M. Kubeshova, *MD, PhD, Professor, Masaryk University, Brno, Czech Republic*
G. Malerba, *PhD, Professor of Medical Genetics, University of Verona, Verona, Italy*
B. Miljkovic, *PhD, Professor, University of Belgrade, Belgrade, Serbia*
E. Nkenke, *MD, DMD, MA, Dr. rer. medic., Full Professor, Medical University of Vienna, Vienna, Austria*
M.V. Pokrovsky, *Doct. Sci. (Medicine), Professor, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia*
A.V. Polonikov*, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Kursk State Medical University, Kursk, Russia*
K.I. Proshchaev, *Doct. Sci. (Medicine), Professor, Research Medical Center "Gerontology", Moscow, Russia*
V.E. Radzinsky, *Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia*
V.V. Ruzhenkova, *Doct. Sci. (Medicine), Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia*
A.V. Sorokin, *Cand. Sci. (Medicine), National Heart, Lung, and Blood Institute, Bethesda, USA*
V.A. Stepanov, *Academician of the Russian Academy of Sciences, Doct. Sci. (Biology), Professor, Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia*
M.B. Freydin, *Doct. Sci. (Biology), King's College London, London, UK*
M.B. Khamoshina, *Doct. Sci. (Medicine), Professor, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia*
E.K. Khusnutdinova, *Corresponding Member of the Russian Academy of Education, Doct. Sci. (Biology), Professor, Institute of Biochemistry and Genetics of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia*

Фрейдин М.Б., *доктор биологических наук, Королевский колледж Лондона, Лондон, Великобритания*
Хамошина М.Б., *доктор медицинских наук, профессор, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, РФ*
Хуснутдинова Э.К., *член-корреспондент Российской академии образования, доктор биологических наук, профессор, Институт биохимии и генетики Уфимского Федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, РФ*
Цыганков Б.Д., *член-корреспондент Российской академии наук, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова», Москва, РФ*
Эберт А.Д., *PhD, доктор медицинских наук, профессор, Клиника женского здоровья, гинекологии и акушерства, Берлин, Германия*

РЕДАКЦИЯ ЖУРНАЛА:

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ: ***Малютина А.Ю.,*** *кандидат фармацевтических наук, доцент, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, РФ*
РЕДАКТОР АНГЛИЙСКИХ ТЕКСТОВ: ***Ляшенко И.В.,*** *кандидат филологических наук, доцент, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, РФ*
ТЕХНИЧЕСКИЙ СЕКРЕТАРЬ: ***Рудых Н.А.,*** *кандидат биологических наук, доцент, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, РФ*

B.D. Tsygankov, *Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Doct. Sci. (Medicine), Professor, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia*
A.D. Ebert, *PhD, Dr. med. habil., Professor, Practice for Women's Health, Gynecology & Obstetrics, Berlin, Germany*

EDITORIAL BOARD:

EXECUTIVE SECRETARY: ***A.Yu. Malyutina,*** *Cand. Sci. (Pharmacy), Associate Professor, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia*
ENGLISH TEXT EDITOR: ***I.V. Lyashenko,*** *Cand. Sci. (Philology), Associate Professor, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia*
TECHNICAL SECRETARY: ***N.A. Rudykh,*** *Cand. Sci. (Biology), Associate Professor, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia*

Учредитель: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»
Издатель: НИУ «БелГУ». Адрес издателя: 308015 г. Белгород, ул. Победы, 85.
Журнал выходит 4 раза в год

Founder: Federal State Autonomous Educational Establishment of Higher Education «Belgorod State National Research University»
Publisher: Belgorod State National Research University
Address of publisher: 85 Pobeda St., Belgorod, 308015, Russia
Publication frequency: 4 /year

© Белгородский государственный национальный исследовательский университет, 2022
© Belgorod State National Research University, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

ГЕНЕТИКА

GENETICS

Elena Yu. Klyosova Genetic variation of *ERN1* and susceptibility to type 2 diabetes **268**

Ksenia A. Kobzeva, Irina V. Shilenok, Andrey E. Belykh, Denis E. Gurtovoy, Lyubov A. Bobyleva, Anna B. Krapiva, Tatiana A. Stetskaya, Marina A. Bykanova, Anastasiya A. Mezhenskaya, Ekaterina A. Lysikova, Maxim B. Freidin, Olga Y. Bushueva *C9orf16 (BBLN)* gene, encoding a member of Hero proteins, is a novel marker in ischemic stroke risk **274**

Iulia A. Makarova, Elena D. Teplyakova, Maria A. Kazumian, Olga V. Lyangasova, Anzhela A. Aleksandrova, Elena V. Mashkina, Tatiana P. Shkurat Study of the cytokine genes SNPs association with the characteristics of the immunological status of children with recurrent respiratory infection **293**

М.Ю. Абрамова Генетические маркеры тяжелого течения преэклампсии **305**

Elena Yu. Klyosova Genetic variation of *ERN1* and susceptibility to type 2 diabetes **268**

Ksenia A. Kobzeva, Irina V. Shilenok, Andrey E. Belykh, Denis E. Gurtovoy, Lyubov A. Bobyleva, Anna B. Krapiva, Tatiana A. Stetskaya, Marina A. Bykanova, Anastasiya A. Mezhenskaya, Ekaterina A. Lysikova, Maxim B. Freidin, Olga Y. Bushueva *C9orf16 (BBLN)* gene, encoding a member of Hero proteins, is a novel marker in ischemic stroke risk **278**

Iulia A. Makarova, Elena D. Teplyakova, Maria A. Kazumian, Olga V. Lyangasova, Anzhela A. Aleksandrova, Elena V. Mashkina, Tatiana P. Shkurat Study of the cytokine genes SNPs association with the characteristics of the immunological status of children with recurrent respiratory infection **293**

Maria Yu. Abramova Genetic markers of severe preeclampsia **305**

ФАРМАКОЛОГИЯ, КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

PHARMACOLOGY

Svetlana V. Efimenko, Sofia S. Chernyaeva, Anna A. Peresypkina, Anna S. Pobeda, Mikhail V. Korokin, Evgeniya A. Beskhmelnitsyna, Mikhail V. Pokrovskii, Aleksandar M. Ćorac Studies to elucidate the effect and antiapoptotic mechanism of 2-ethyl-3-hydroxy-6-methylpyridine-n-acetyltaurinate in a rat model of retinal ischemia–reperfusion **317**

Adekunle B. Rowaiye, Olukemi A. Onuh, Joy A. Oladimeji-Salami, Doofan Bur, Moses Njoku, Nma H. Ifedilichukwu, Comfort O. John, Olanike Binuyo, Faith P. Udoh *In silico* identification of the potential natural inhibitors of SARS-CoV-2 Guanine-N7 methyltransferase **327**

Svetlana V. Efimenko, Sofia S. Chernyaeva, Anna A. Peresypkina, Anna S. Pobeda, Mikhail V. Korokin, Evgeniya A. Beskhmelnitsyna, Mikhail V. Pokrovskii, Aleksandar M. Ćorac Studies to elucidate the effect and antiapoptotic mechanism of 2-ethyl-3-hydroxy-6-methylpyridine-n-acetyltaurinate in a rat model of retinal ischemia–reperfusion **317**

Adekunle B. Rowaiye, Olukemi A. Onuh, Joy A. Oladimeji-Salami, Doofan Bur, Moses Njoku, Nma H. Ifedilichukwu, Comfort O. John, Olanike Binuyo, Faith P. Udoh *In silico* identification of the potential natural inhibitors of SARS-CoV-2 Guanine-N7 methyltransferase **327**

Д.И. Поздняков Коррекция митохондриальной дисфункции коричными кислотами при экспериментальной гиперцитокинемии	**351**	**Dmitry I. Pozdnyakov** Correction of mitochondrial dysfunction with cinnamic acids in experimental hypercytokinemia	**351**
КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА		**MEDICINE**	
Е.В. Енькова, Е.В. Киселева, О.В. Хоперская, А.В. Хатунцев, И.Д. Тюрина Аномальные маточные кровотечения: этиология и патогенез (описательный обзор)	**365**	**Elena V. Enkova, Elena V. Kiseleva, Olga V. Khoperskaya, Andrey V. Khatuncev, Inga D. Tyurina** Abnormal uterine bleeding: etiology and pathogenesis (descriptive review)	**365**
А.В. Дёмин, А.Н. Ильницкий, К.С. Кореневич Особенности постурального баланса у работающих женщин 60-69 лет	**382**	**Alexander V. Dyomin, Andrei N. Ilnitski, Ksenia S. Korenevich** Features of postural balance in working women aged 60-69	**382**
А.Л. Ясенявская, А.А. Цибизова, Л.А. Андреева, Н.Ф. Мясоедов, О.А. Башкина, М.А. Самотруева Влияние нейропептидов семейства меланокортинов на уровень апоптотических и нейротрофических факторов в условиях «социального» стресса	**398**	**Anna L. Yasenyavskaya, Alexandra A. Tsybizova, Lyudmila A. Andreeva, Nikolay F. Myasoedov, Olga A. Bashkina, Marina A. Samotrueva** Effect of melanocortin neuropeptides on the level of apoptotic and neurotrophic factors under «social» stress	**398**

ГЕНЕТИКА
GENETICS

CC BY

DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-3-0-1 **УДК 575.174.015.3:616.379-008.64**

Genetic variation of *ERN1* and susceptibility to type 2 diabetes

Elena Yu. Klyosova

Kursk State Medical University,
3 Karl Marx St., Kursk, 305041, Russia
Corresponding author: Elena Yu. Klyosova (ecless@yandex.ru)

Abstract

Background: The endoribonuclease *IRE1 (ERN1)* is an important sensor for the endoplasmic reticulum unfolded protein response (UPR), and its activation happens as a result of the accumulation of unfolded and misfolded proteins in the endoplasmic reticulum (ER). The *ERN1* gene may be involved in ER stress, a feature of type 2 diabetes (T2D). **The aim of the study:** To investigate the relationship between common single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *ERN1* gene and T2D risk. **Materials and methods:** The study included 1558 T2D patients (586 males and 972 females) and 1611 (618 males and 993 females) healthy subjects. Two common SNPs, such as rs196914 and rs9911085 located in the regulatory region of the *ERN1* gene, were genotyped by the MassArray Analyzer-4 system. **Results:** Genotypes T/C-C/C rs196914 showed an association with an increased risk of T2D (OR=1.18, 95% CI 1.03-1.36, p=0.017). An associative analysis stratified by sex and BMI revealed that this association occurred in females with a BMI greater than 25 kg/m^2 (OR = 1.20, 95% CI 1.03-1.40, p = 0.02). Furthermore, the genotypes rs9911085 T/C-C/C were linked to T2D risk in females with a BMI greater than 30 kg/m^2 (OR = 1.44, 95% CI 1.02-1.95, p = 0.034). The haplotype rs196914C-rs9911085C was found to be associated (p=0.004) with T2D risk in overweight and obese subjects (i.e. BMI≥25 kg/m^2). **Conclusion:** The present study was the first to show the impact of *ERN1* gene polymorphisms on susceptibility to type 2 diabetes; however, the association was female- and BMI-specific. Further studies are required to confirm the association between *ERN1* and T2D risk.

Keywords: type 2 diabetes mellitus; overweight; obesity; endoplasmic reticulum stress; misfolding; unfolded protein response; *IRE1* pathway; *ERN1*

Acknowledgements: The author expresses her gratitude to Professor Alexey Polonikov and Associate Professor Iuliia Azarova from the Research Institute for Genetic and Molecular Epidemiology (Kursk State Medical University) for their in-depth assistance in this research.

For citation: Klyosova EYu. Genetic variation of *ERN1* and susceptibility to type 2 diabetes. Research Results in Biomedicine. 2022;8(3):268-277. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-3-0-1

Introduction. Diabetes mellitus is one of the global health problems of the 21st century [1]. According to the International Diabetes Federation (IDF), diabetes mellitus will affect 537 million persons aged 20–79 years (prevalence 10.5 %) in 2021, and 783 million (prevalence 12.2 %) by 2045 [1]. At the same time, Russia ranks second among all European countries in terms of diabetes patients, with 90% of patients suffering from type 2 diabetes (T2D) [1].

Type 2 diabetes is a complex condition that involves both hereditary and environmental variables [2]. The pathophysiology of T2D is linked to pancreatic cell dysfunction and insulin resistance in peripheral tissues, however the core cause of these illnesses is unknown. The dysfunction of pancreatic beta-cells in T2D is primary and is detected at the earliest stages of the disease, and the progressive loss of beta-cells due to their apoptosis forms the basis for the progression of the disease and the development of complications [3, 4, 5].

It has been established that oxidative stress (OS), caused by a shift in redox homeostasis towards excessive formation of reactive oxygen and nitrogen species, plays a significant role in the development of dysfunction and apoptosis of beta-cells in T2D, and due to their low antioxidant capacity, beta-cells are extremely sensitive to oxidative damage [6, 7]. Endogenous glutathione deficit, which is pathogenetically related with beta cell malfunction and death, has been established in a number of studies to be the primary disturbance of redox homeostasis and OS formation in diabetes [8, 9, 10]. Many studies [11, 12, 13] show that chronic endoplasmic reticulum stress (ER) is involved in the creation of -cell dysfunction and death in T2D, in addition to oxidative stress.

It is well known that the synthesis and secretion of insulin in beta-cells is related to the ability of the ER to package, process, and move correctly folded insulin protein into the Golgi apparatus and then to the membrane surface for subsequent secretion [12, 14]. The accumulation of misfolded protein chains is the pathophysiological core of ER stress, a general biological phenomenon of functional overload of the protein secretion apparatus. When the maturation of protein molecules is disrupted, the cell loses its ability to function normally and faces death. Eukaryotes have evolved a complicated homeostatic mechanism known as the unfolded protein response (UPR) to restore proteostasis. This mechanism is represented by a triad of proteins – *ERN1*, *PERK*, and *ATF6*, each of which has a regulatory domain embedded in the ER lumen. Under normal physiological conditions, this domain is bound by the binding immunoglobulin protein (BiP) chaperone. The content of free chaperones in the ER lumen naturally decreases as the load on the apparatus grows, and BiP is released to perform its principal job of protecting protein maturation. *ERN1*, *PERK*, and *ATF6* are now anchored in stress signaling pathways after being released from their relationship with BiP. As a result, the ER has a set of sensors that monitor intraluminal chaperone availability [15]. *ERN1* has been identified as one of the key components of the UPR and a key regulator of gene expression. The cytoplasmic C-terminal region of *ERN1* divides into two domains, each containing kinase and endoribonuclease activity. Dimerization happens after BiP separation, arranging kinase domains "face to face" [16]. The autophosphorylation in this case changes the structure of *ERN1*, opening the nuclease centers of its dimers and arranging them "back to back" [17]. As a result, *ERN1* inhibits protein translation in the cytoplasm by selectively degrading a number of mRNAs. The degradation of CD59 mRNA in HeLa cells [18] and mRNA of the microsomal triglyceride transporter factor MTP in the intestinal epithelium, both of which impede chylomicron production [19], are two examples. There is also evidence of *ERN1*-mediated proinsulin mRNA degradation in chronic hyperglycemia [20].

Furthermore, from the group of genes responsible for UPR, only *ERN1* is highly expressed in the pancreas and is considered a central regulator of ER stress signaling, playing a

crucial role in the regulation of protein and insulin biosynthesis, in particular [21]. In their investigation, K. Haze and co-authors discovered that inhibiting *ERN1* signaling in vitro lowers insulin production at the translation and protein folding levels [22]. When *ERN1* is activated, it cleaves the mRNA for X-box binding protein 1 (*XBP1*), which activates the transcription factor for *XBP1*. Activated *XBP1* starts various transcriptional processes that boost ER growth and biogenesis and increase protein entrance into the ER for maturation and/or cleavage of misfolded proteins after translocation to the nucleus. *XBP1*-deficient animals have poor -cell proliferation, proinsulin processing, and insulin production, as well as *ERN1* hyperactivation, according to Lee et al. [23]. As a result, *ERN1* is essential for optimum insulin production and ER homeostasis. There is no evidence in the literature that polymorphic variants of the *ERN1* gene are linked to the development of type 2 diabetes, which was the premise for this investigation.

The aim of the study. To investigate the relationship between polymorphic variants of the *ERN1* gene and the likelihood of acquiring type 2 diabetes.

Materials and methods. An ethnically homogeneous sample of 3229 unrelated citizens of Central Russia (mostly natives of the Kursk region) of Slavic nationality (self-identification) was used in the study. The KSMU Regional Ethics Committee authorized the study protocol (extract from protocol No. 10 dated 12.12.2016). The study included 1558 patients with T2D (586 men and 972 women) with a mean age of 61.1±6.9 years who were hospitalized at the endocrinology department of the Kursk City Clinical Emergency Hospital from November 2016 to October 2019. The diagnosis of T2D was made using WHO criteria [24, 25]. The control group consisted of 1611 apparently healthy volunteers, 618 men and 993 women with an average age of 60.8±5.7 years, who had previously donated blood to the Regional Blood Transfusion Station [26]. Based on written informed consent, all study participants were given 5 mL of fasting venous blood into vacuum tubes Vacuette with EDTA as an anticoagulant. The genomic DNA was extracted using phenol-chloroform. Two single nucleotide polymorphisms in the *ERN1* gene, rs196914 (T>C) and rs9911085 (T>C), were chosen for molecular genetic investigation because they had a strong regulatory potential and a minor allele frequency of at least 10%. The MassArray Analyzer 4 platform was used to detect *ERN1* gene polymorphisms using laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (Agena Bioscience). The SNPStats web program (https://www.snpstats.net/start.htm) was used to statistically process the collected data. Co-dominant, dominant, recessive, over-dominant, and log-additive genetic models were investigated. The association was considered significant at $P<0.05$. KEGG pathways tools were used to recreate metabolic pathways, and eQTLGen (www.eqtlgen.org) was used to investigate tissue-specific expression of the *ERN1* gene.

Results and discussion. Hardy-Weinberg equilibrium was achieved for *ERN1* genotype frequencies. Table 1 presents the results of the analysis of associations with the risk of developing type 2 diabetes in the general sample, as well as separately in men and women. In the whole sample, T/C-C/C rs196914 genotypes were associated with an increased risk of acquiring the disease (OR=1.18, 95% CI 1.03-1.36, p=0.02, dominant genotypic model). The rs9911085 *ERN1* gene was not linked to the likelihood of acquiring T2D.

Separate comparison of male and female patients with T2D with controls showed that the T/C-C/C rs196914 association of the *ERN1* gene was typical only for women (OR=1.22, 95% CI 1.02-1.45, p=0.03, dominant model), while in in men, an increased risk of the disease with this genotype was not observed (p>0.05).

Table 1

Genotype and allele frequencies of the *ERN1* gene in T2D patients and controls

SNP	Genotype/ allele	Healthy Controls n (%)[1]	Patients with T2D n (%)[1]	OR[2] (95% CI)	*p*-Value[3]
Entire group					
rs196914	T/T	772 (46.5)	664 (42.3)	1.00	**0.02**
	T/C-C/C	888 (53.5)	905 (57.7)	**1.18 (1.03-1.36)**	
	C	31.6	34.1	**1.12 (1.01-1.24)**	**0.004**
rs9911085	T/T	1125 (69.7)	1060 (68)	1.00	0.31
	T/C-C/C	489 (30.3)	498 (32)	1.08 (0.93-1.26)	
	C	16.3	17.3	1.08 (0.95-1.25)	0.24
Males					
rs196914	T/T	281 (45.5)	251 (42.8)	1.00	0.54
	T/C-C/C	336 (54.5)	335 (57.2)	1.12 (0.89-1.40)	
	C	32.7	34.9	1.09 (0.92-1.29)	0.32
rs9911085	T/T	411 (68.5)	406 (70)	1.00	0.58
	T/C-C/C	189 (31.5)	174 (30)	0.93 (0.73-1.19)	
	C	17.3	16.7	0.96 (0.77-1.19)	0.69
Females					
rs196914	T/T	482 (46.8)	413 (42)	1.00	**0.03**
	T/C-C/C	547 (53.2)	570 (58)	**1.22 (1.02-1.45)**	
	C	31.0	34.0	1.14 (1.00-1.40)	**0.047**
rs9911085	T/T	705 (70.5)	654 (66.9)	1.00	0.08
	T/C-C/C	295 (29.5)	324 (33.1)	1.18 (0.98-1.43)	
	C	15.7	17.8	1.17 (0.99-1.38)	0.07

Note: [1] Absolute number and percentage of individuals/chromosomes with a particular genotype/allele. [2] Odds ratio with 95% confidence intervals (crude analysis) with one degree of freedom. [3] *p*-Value – significance level.

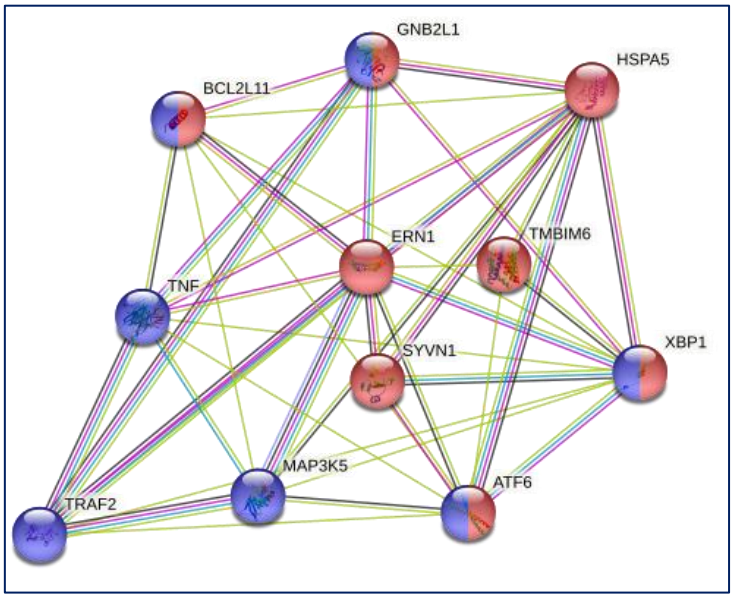
Following that, a stratified analysis by sex and BMI was conducted (Table 2): the association found in the general group was observed only in women with BMI ≥25 kg/m^2, which corresponds to overweight and obesity (OR=1.20, 95% CI 1.03- 1.40, p=0.02, dominant model) and was absent in men (p>0.05). In addition, an association of the rs9911085 T/C-C/C polymorphism in obese women (BMI≥30 kg/m^2) was established: OR=1.44, 95% CI 1.02-1.95, p=0.03, dominant model.

Table 3 shows the results of the distribution of haplotype frequencies in T2D patients and healthy people. Haplotype rs196914C-rs9911085C was associated with an increased risk of developing T2D both in women in the general sample and in women with overweight and obesity (BMI ≥25 kg/m^2): OR=1.36, 95% CI 1.10-1.64, p=0.004.

We used the eQTLGen consortium database to examine the mRNA expression profiles (eQTL) of the studied SNPs, which include data from a thorough transcriptome investigation of 30,847 blood samples from healthy volunteers, the majority of whom are of European origin. The database made it possible to identify significant cis-eQTLs for each studied SNP. Thus, the alleles rs196914-C and rs9911085-C are associated with a significant decrease in the expression of the *ERN1* gene in whole blood (P=5.10×10^{-140} and P=5.17×10^{-138}, respectively, FDR≤0.0001). The alternative alleles rs196914-C and rs9911085-C are related with hypermethylation of the *ERN1* gene, and therefore with a decrease in its expression in childhood and adolescence, according to an analysis of the effects of the examined polymorphisms on gene methylation status (mQTL). According to experimental evidence from K.L. Lipson et al., suppressing *ERN1* expression lowers the amount of cellular insulin [20].

The STRING tool was used to analyze *ERN1* connections with other genes at the level of protein products, and it revealed functional partners of *ERN1* that constitute an interacting

network of 10 proteins (Fig. 1): HSPA5 – belongs to the heat shock protein family 70, glucose-regulated Bip ER chaperone ; XBP1 – X-box-binding protein 1; ANF6 – activating transcription factor 6, initiates UPR during ER stress; TMBIM6 – Bax inhibitor, apoptosis suppressor; SYVN1 – E3 ubiquitin protein ligase synoviolin; GNB2L1 – activated C-kinase 1 receptor; BCL2L11 – Bcl-2-like protein 11, induces apoptosis; MAP3K5 – mitogen-activated protein kinase kinase 5; TNF-tumor necrosis factor; TRAF2 – TNF receptor-associated factor 2. Using the analysis of gene ontology terms enrichment, it was found that 8 proteins are directly involved in the regulation of the cellular response to endoplasmic reticulum stress: HSPA5, ANF6, XBP1, SYVN1, BCL2L11, TMBIM6, GNB2L1 (FDR=5.66*10^{-13}); and 7 proteins are responsible for the positive regulation of apoptosis: ANF6, XBP1, BCL2L11, GNB2L1, MAP3K5, TNF, TRAF2 (FDR=4.86*10^{-6}).



Note: red color – regulation of the cellular response to ER stress, blue – positive regulation of the apoptotic signaling pathway.

Fig. 1. Network of protein partners of the *ERN1* gene

Glucotoxicity and lipotoxicity impede ER stress compensation in the established clinical picture of diabetes mellitus [27, 28]. ER stress plays a key role in the creation of obesity and insulin resistance in adipose and hepatic tissue, in addition to a decrease in insulin production due to a decrease in the population of β-cells. Signaling through the unfolded protein response's *ERN1* pathway has both beneficial and harmful consequences in obesity. Overexpression of the *ERN1*-regulated transcription factor *XBP1* protects cells from metabolic balance abnormalities caused by obesity [28]. However, *ERN1* hyperactivation involves a second mechanism, the dependent breakdown and pro-inflammatory signaling of *TRAF2/JNK*. *TRAF2* is a receptor that signals *TNF* ligation to turn on apoptosis via *MAPK*, *JNK* and *p38* (Fig. 2).

The carriage of the rs196914-C and rs9911085-C alleles is associated with a decrease in the expression of serine/threonine protein kinase/endoribonuclease (*ERN1*), which is a central regulator of ER stress signaling. Reduced *ERN1* expression can result in signaling reduction of the *XBP1* transcription factor, which causes chaperone activation to worsen (Fig. 2), lowering insulin production at the translation and protein folding levels. At the same time, overweight and obesity are two factors that impede protein folding [29]: poorly folded proteins accumulate in the cell due to a decrease in *ERN1* activity, which can lead to the cell's forced death.

Table 2

Genotype and allele frequencies of the *ERN1* gene in T2D patients and controls

SNP	Genotype/ allele	Healthy Controls n (%)[1]	Patients with T2D n (%)[1]	OR[2] (95% CI)	*p*-Value[3]	Healthy Controls n (%)[1]	Patients with T2D n (%)[1]	OR[2] (95% CI)	*p*-Value[3]
	Males					**Females**			
BMI ≤ 25 kg/m^2 norm									
rs196914	T/T	54 (47)	55 (47)	1.00	0.99	100 (51.5)	44 (50.6)	1.00	0.88
	T/C-C/C	61 (53)	62 (53)	1.00 (0.60-1.67)		94 (48.5)	43 (49.4)	1.04 (0.63-1.72)	
	C	27.9	31.3	1.17 (0.72-1.90)	0.60	28.6	28.2	0.98 (0.66-1.45)	0.91
rs9911085	T/T	77 (67.5)	86 (74.1)	1.00	0.27	135 (70.7)	61 (70.9)	1.00	0.97
	T/C-C/C	37 (32.5)	30 (25.9)	0.73 (0.41-1.29)		56 (29.3)	25 (29.1)	0.99 (0.56-1.73)	
	C	31.3	30.8	0.98 (0.66-1.44)	0.90	15.2	15.7	1.04 (0.63-1.71)	0.88
BMI ≥ 25 kg/m^2 overweight and obesity									
rs196914	T/T	221 (45.4)	196 (41.8)	1.00	0.26	380 (46.1)	369 (41.2)	1.00	**0.04**
	T/C-C/C	266 (54.6)	273 (58.2)	1.16 (0.90-1.49)		444 (53.9)	527 (58.8)	**1.22 (1.01-1.48)**	
	C	33.1	35.5	1.11 (0.92-1.35)	0.28	31.5	34.5	1.15 (1.00-1.32)	0.06
rs9911085	T/T	323 (68.6)	320 (69)	1.00	0.90	565 (70.8)	593 (66.5)	1.00	0.06
	T/C-C/C	148 (31.4)	144 (31)	0.98 (0.74-1.30)		233 (29.2)	299 (33.5)	1.22 (0.99-1.50)	
	C	17.5	17.5	1.00 (0.78-1.26)	0.98	15.7	18.0	1.19 (0.99-1.42)	0.07
BMI ≥30 kg/m^2 obesity									
rs196914	T/T	23 (48.9)	115 (40.9)	1.00	0.31	87 (47.3)	269 (40.3)	1.00	0.09
	T/C-C/C	24 (51.1)	166 (59.1)	1.38 (0.74-2.57)		97 (52.7)	398 (59.7)	1.33 (0.96-1.84)	
	C	31.9	36.3	1.21 (0.72-1.92)	0.41	29.6	34.7	1.26 (0.98-1.62)	0.08
rs9911085	T/T	33 (71.7)	191 (68.7)	1.00	0.68	133 (73.9)	432 (65.2)	1.00	**0.02**
	T/C-C/C	13 (28.3)	87 (31.3)	1.16 (0.58-2.31)		47 (26.1)	231 (34.8)	**1.51 (1.05-2.19)**	
	C	15.2	17.4	1.15 (0.63-2.10)	0.71	13.6	18.6	**1.45 (1.04-2.02)**	**0.03**

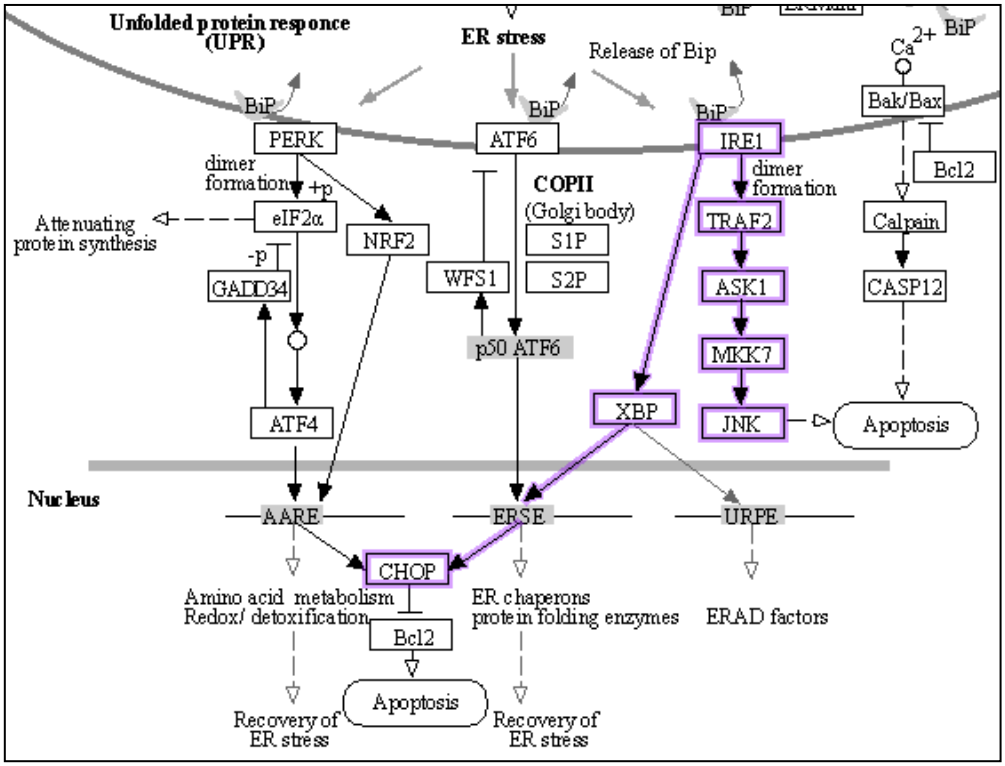
Note: [1] Absolute number and percentage of individuals/chromosomes with a particular genotype/allele. [2] Odds ratio with 95 confidence intervals (crude analysis) with one degree of freedom. [3] *p*-Value – significance level

Table 3

Haplotype frequencies of the *ERN1* gene in T2D patients and controls

N	rs196914	rs9911085	Healthy Controls	Patients with T2D	OR[1] (95 CI)	*p*-Value[2]	Healthy Controls	Patients with T2D	OR[1] (95 CI)	*p*-Value[2]
			Males				**Females**			
Entire group										
1	T	T	0.6359	0.6311	1.00	---	0.6537	0.6326	1.00	---
2	C	T	0.1905	0.2008	1.06 (0.86 – 1.31)	0.59	0.1893	0.1893	1.04 (0.88 – 1.23)	0.62
3	**C**	**C**	0.1361	0.1448	1.08 (0.85 – 1.37)	0.54	0.1215	0.1505	**1.29 (1.07 – 1.57)**	**0.009**
4	T	C	0.0375	0.0234	0.61 (0.35 – 1.07)	0.08	0.0358	0.0277	0.80 (0.53 – 1.21)	0.30
					General p haplotype associations:0.26				General p haplotype associations**: 0.045**	
BMI ≤ 25 kg/m^2 norm										
1	T	T	0.6312	0.6650	1.00	---	0.6891	0.6702	1.00	---
2	C	T	0.1973	0.1966	0.94 (0.58 – 1.53)	0.82	0.1588	0.1720	1.13 (0.67 – 1.91)	0.64
3	**C**	**C**	0.1157	0.1111	0.90 (0.48 – 1.69)	0.75	0.1273	0.1096	0.89 (0.49 – 1.62)	0.70
4	T	C	0.0558	0.0273	0.45 (0.14 – 1.39)	0.17	0.0249	0.0482	2.05 (0.70 – 6.04)	0.19
					General p haplotype associations**:** 0.71				General p haplotype associations**:**0.59	
BMI ≥ 25 kg/m^2 overweight and obesity										
1	T	T	0.6362	0.6225	1.00	---	0.6460	0.6290	1.00	---
2	C	T	0.1885	0.2019	1.09 (0.86 – 1.39)	0.47	0.1971	0.1909	1.01 (0.84 – 1.21)	0.94
3	**C**	**C**	0.1421	0.1531	1.10 (0.85 – 1.43)	0.46	0.1179	0.1545	**1.36 (1.10 – 1.68)**	**0.004**
4	T	C	0.0332	0.0225	0.68 (0.36 – 1.28)	0.23	0.0391	0.0255	0.67 (0.43 – 1.05)	0.08
					General p haplotype associations**:** 0.44				General p haplotype associations**: 0.01**	
BMI ≥30 kg/m^2 obesity										
1	T	T	0.6274	0.6192	0.93 (0.53 – 1.63)	0.81	0.6860	0.6261	1.00	---
2	C	T	0.2195	0.2050	1.71 (0.78 – 3.76)	0.18	0.1772	0.1883	1.19 (0.87 – 1.64)	0.28
3	**C**	**C**	0.0996	0.1580	0.29 (0.08 – 1.07)	0.06	0.1192	0.1588	**1.53 (1.05 – 2.22)**	**0.03**
4	T	C	0.0535	0.0178	0.93 (0.53 – 1.63)	0.81	0.0178	0.0272	1.71 (0.64 – 4.57)	0.29
					General p haplotype associations**:** 0.19				General p haplotype associations**: 0.009**	

Note: [1] Odds ratio with 95 confidence intervals (crude analysis) with one degree of freedom. [2] *p*-Value – significance level.



Note: purple arrows highlight the ERN1 activation pathway during ER stress.

Fig. 2. Metabolic map of UPR activation under ER stress
(KEGG pathways data https://www.genome.jp/kegg/pathway.html)

Conclusion. Thus, the study was the first to show a link between the polymorphic loci rs196914 and rs9911085 in the regulatory area of the *ERN1* gene with an elevated risk of developing T2D, indicating that the endoribonuclease *IRE1* gene may play a role in the disease etiology. The discovered connections are unique to women and are influenced by body mass index. The decreased transcriptional activity of the *ERN1* gene in carriers the of alternative alleles rs196914-C and rs9911085-C of the analyzed polymorphisms can explain the link between the studied loci and illness. To confirm connections between polymorphic variants of the *ERN1* gene and the likelihood of acquiring type 2 diabetes, more research in various communities around the world is needed.

Financial support

The study was supported by the Russian Science Foundation (project №22-25-00585).

Conflict of interests

The author has no conflict of interest to declare.

References

1. Sun H, Saeedi P, Karuranga S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. Diabetes Research and Clinical Practice. 2022;183:109119. DOI: https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109119

2. DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, et al. Type 2 diabetes mellitus. Nature Reviews Disease Primers. 2015;1:15019. DOI: https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.19

3. Weir GC, Bonner-Weir S. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. Diabetes. 2004;53(Suppl.3):16-21. DOI: https://doi.org/10.2337/diabetes.53.suppl_3.S16

4. Ferrannini E, Gastaldelli A, Miyazaki Y, et al. β-Cell function in subjects spanning the range from normal glucose tolerance to overt diabetes: a new analysis. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2004;90(1):493-500. DOI: https://doi.org/10.1210/jc.2004-1133

5. Azarova I, Klyosova E, Polonikov A. The link between type 2 diabetes mellitus and the polymorphisms of glutathione-metabolizing genes suggests a new hypothesis explaining disease initiation and progression. Life. 2021;11(9):886. DOI: https://doi.org/10.3390/life11090886

6. Drews G, Krippeit-Drews P, Düfer M. Oxidative stress and beta-cell dysfunction. Pflugers Archiv European Journal of Physiology. 2010;460(4):703-718. DOI: https://doi.org/10.1007/s00424-010-0862-9

7. Leenders F, Groen N, de Graaf N, et al. Oxidative stress leads to β-cell dysfunction through loss of β-cell identity. Frontiers in Immunology. 2021;12:690379. DOI: https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.690379

8. Furfaro AL, Nitti M, Marengo B, et al. Impaired synthesis contributes to diabetes-induced decrease in liver glutathione. International Journal of Molecular Medicine. 2012;29(5):899-905. DOI: https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.915

9. Zhang J, An H, Ni K, et al. Glutathione prevents chronic oscillating glucose intake-induced β-cell dedifferentiation and failure. Cell Death and Disease. 2019;10(4):321. DOI: https://doi.org/10.1038/s41419-019-1552-y

10. Marselli L, Thorne J, Dahiya S, et al. Gene expression profiles of beta-cell enriched tissue obtained by laser capture microdissection from subjects with type 2 diabetes. PLoS ONE. 2010;5(7):e11499. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011499

11. Costes S, Langen R, GurloT, et al. β-Cell failure in type 2 diabetes: a case of asking too much of too few? Diabetes. 2013;62(2):327-335. DOI: https://doi.org/10.2337/db12-1326

12. Moreno-Gonzalez I, Edwards G, Salvadores N, et al. Molecular interaction between type 2 diabetes and Alzheimer's disease through cross-seeding of protein misfolding. Molecular Psychiatry. 2017;22(9):1327-1334. DOI: https://doi.org/10.1038/mp.2016.230

13. Leyva-García E, Lara-Martínez R, Morán-Zanabria L, et al. Novel insight into streptozotocin-induced diabetic rats from the protein misfolding perspective. Scientific Reports. 2017;7(1):11552. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-017-11776-y

14. Malhi H. MicroRNAs in ER stress: divergent roles in cell fate decisions. Current Pathobiology Reports. 2014;2(3):117-122. DOI: https://doi.org/10.1007/s40139-014-0046-y

15. Marciniak SJ, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. Physiological Reviews. 2006;86(4):1133-1149. DOI: https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2006

16. Papa FR, Zhang C, Shokat K, et al. Bypassing a kinase activity with an ATP-competitive drug. Science. 2003;302(5650):1533-1537. DOI: https://doi.org/10.1126/science.1090031

17. Deng Y, Humbert S, Liu JX, et al. Heat induces the splicing by *IRE1* of a mRNA encoding a transcription factor involved in the unfolded protein response in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2011;108(17):7247-7252. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.1102117108

18. Oikawa D, Tokuda M, Iwawaki T. Site-specific cleavage of CD59 mRNA by endoplasmic reticulum-localized ribonuclease, *IRE1*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2007;360(1):122-127. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.06.020

19. Iqbal R, Anand S, Ounpuu S, et al. Dietary patterns and the risk of acute myocardial infarction in 52 countries: results of the interheart study. Circulation. 2008;118(19):1929-1937. DOI: https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.738716

20. Lipson KL, Fonseca SG, Ishigaki S, et al. Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase *IRE1*. Cell Metabolism. 2006;4(3):245-254. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.07.007

21. Cardozo AK, Ortis F, Storling J, et al. Cytokines downregulate the sarcoendoplasmic reticulum pump Ca^{2+} ATPase 2b and deplete endoplasmic reticulum Ca^{2+}, leading to induction of endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells. Diabetes. 2005;54(2):452-461. DOI: https://doi.org/10.2337/diabetes.54.2.452

22. Haze K, Okada T, Yoshida H, et al. Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response. Biochemical Journal. 2001;355(1):19-28. DOI: https://doi.org/10.1042/bj3550019

23. Lee AH, Heidtman K, Hotamisligil GS, et al. Dual and opposing roles of the unfolded protein response regulated by *IRE1*alpha and *XBP1* in proinsulin processing and insulin secretion. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2011;108(21):8885-8890. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.1105564108

24. World Health Organization: Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications: Report of a WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Geneva: World Health Organization; 1999.

25. World Health Organization. Global report on diabetes: executive summary (No. WHO/NMH/NVI/16.3). World Health Organization; 2016.

26. Azarova I, Bushueva O, Konoplya A, et al. Glutathione S-transferase genes and the risk of type 2 diabetes mellitus: Role of sexual dimorphism, gene–gene and gene–smoking interactions in disease susceptibility. Journal of Diabetes. 2018;10(5):398-407. DOI: https://doi.org/10.1111/1753-0407.12623

27. Back SH, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. Annual Review of Biochemistry. 2012;81:767-793. DOI: https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-072909-095555

28. Madhavan A, Kok BP, Rius B, et al. Pharmacologic *IRE1/XBP1*s activation promotes systemic adaptive remodeling in obesity. Nature Communications. 2022;13:608. DOI: https://doi.org/10.1038/s41467-022-28271-2

29. Sharma NK, Das SK, Mondal AK, et al. Endoplasmic reticulum stress markers are associated with obesity in nondiabetic subjects. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2008;93(11):4532-4541. DOI: https://doi.org/10.1210/jc.2008-1001

Received 8 April 2022
Revised 16 May 2022
Accepted 26 May 2022

Information about the author

Elena Yu. Klyosova, Junior Research Assistant at the Laboratory of Biochemical Genetics and Metabolomics, Research Institute for Genetic and Molecular Epidemiology, Assistant at the Department of Biology, Medical Genetics and Ecology, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, E-mail: ecless@yandex.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1543-9230.

(cc) BY

DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-3-0-2

C9orf16 (BBLN) gene, encoding a member of Hero proteins, is a novel marker in ischemic stroke risk

Ksenia A. Kobzeva[1], Irina V. Shilenok[2], Andrey E. Belykh[1,3], Denis E. Gurtovoy[1], Lyubov A. Bobyleva[1], Anna B. Krapiva[1], Tatiana A. Stetskaya[1], Marina A. Bykanova[1], Anastasiya A. Mezhenskaya[4], Ekaterina A. Lysikova[5], Maxim B. Freidin[6,7], Olga Y. Bushueva[1]

[1] Kursk State Medical University,
3 Karl Marx St., Kursk, 305041, Russia
[2] Kursk City Clinical Emergency Hospital,
14 Pirogova St., Kursk, 305035, Russia
[3] Nencki Institute of Experimental Biology of the Polish Academy of Sciences,
3 Pasteur St., Warsaw, 02-093, Poland
[4] Alekseevskaya Central District Hospital,
2 Nikolskaya St., Alekseevka, 309850, Russia
[5] Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences,
34/5 Vavilov St., Moscow, 119334, Russia
[6] Queen Mary University of London,
Mile End Road, London, E1 4DQ, United Kingdom
[7]Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences,
10 Nabereznaya *Ushaiki* street, *Tomsk*, 634050, Russia
Corresponding author: Olga Y. Bushueva (olga.bushueva@inbox.ru)

Abstract

Background: Ischemic stroke (IS) is the leading cause of death and disability worldwide. Chaperone proteins protect brain cells from the ischemic damage by restoring the structures of damaged proteins. Chaperone C9orf16 (also known as BBLN) belongs to the class of heat-resistant obscure (HERO) proteins, characterized by the ability to stabilize various proteins, suppress neurotoxicity and reduce proteotoxic stress. In this regard, it may play a potentially significant role in the risk of development and clinical manifestations of IS. **The aim of the study:** To investigate an association between a single nucleotide polymorphism rs2900262 in the gene encoding *C9orf16* and predisposition to IS. **Materials and methods:** A total of 897 patients with IS and 1140 healthy controls were recruited for the study. Genotyping was done using a probe-based genotyping assay. Multiple logistic regression analysis was performed to evaluate the associations of the rs2900262 genotypes with the risk of IS and ischemic events. Dominant, recessive and additive models of associations of genotypes were analyzed. Adjustment for sex, age, and smoking was done throughout. Benjamini-Hogberg false-discovery rate was used to correct for multiple comparisons. **Results:** The rs2900262*T allele was found to be associated with the increased risk of IS exclusively in females (dominant model:

OR=1.74, 95% CI=1.07-2.82, $P^{FDR=}$0.042; additive model: OR=1.69, 95% CI=1.06-2.71, $P^{FDR=}$0.042). Additional analysis showed that the rs2900262*T is associated with the increased risk of IS in smokers only (dominant model: OR=1.92, 95% CI=1.09-3.37, $P^{FDR=}$0.042; additive model: OR=1.79, 95%CI=1.04-3.08, $P^{FDR=}$0.042). Also, we demonstrated that C/T-T/T genotype carriers exhibit an earlier manifestation of IS (59.53±1.12 years) compared to the C/C genotype carriers (61.63±0.4 years); mean difference=-1.98; 95% CI=-3.61 – -0.36; P^{FDR}=0.026. **Conclusion:** This study is the first in the world to demonstrate the possible contribution of the rs2900262 *C9orf16* gene polymorphism to the risk of ischemic stroke.
Keywords: ischemic stroke; Hero; heat-resistant obscure; chaperones; rs2900262; *C9orf16; BBLN*

For citation: Kobzeva KA, Shilenok IV, Belykh AE, et al. *C9orf16 (BBLN)* gene, encoding a member of Hero proteins, is a novel marker in ischemic stroke risk. Research Results in Biomedicine. 2022;8(3):278-292. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-3-0-2

Background. Despite the significant efforts made by the world's medical community in the field of prevention and treatment of stroke, this disease remains the second leading cause of death worldwide, and a leading cause of adult disability [1], cognitive decline and dementia [2]. Ischemic stroke (IS) comprises up to 85% of all cases [3]. The risk of IS is determined by a complex interplay of genetic and environmental factors partly acting through modifiable risk factors such as high blood pressure [4, 5].

The previous studies have already revealed genetic markers associated with the development of IS [6, 7, 8], as well as related phenotypes/risk factors, such as hypertension [9, 10, 11], atherosclerosis [12, 13], and thrombosis [14]. However, despite the large number of studies conducted in the world, the molecular mechanisms of IS development remain poorly understood.

One of the most promising fields in this area is the study of chaperone proteins. A critical decrease in perfusion in IS leads to hypoxic damage to brain tissues [15]. Cascades of ischemic and reperfusion damage to neurons and glia include hundreds of individual links that lead to cell death. It is the critical accumulation of damaged enzymes and structural proteins that causes irreversible changes that lead to necrosis or programmed cell death [16]. The main function of chaperones is to restore the native tertiary and quaternary structure of damaged proteins. There is already enough information that confirms the neuroprotective role of chaperones in IS, for example, the HSP class of chaperones ("heat shock" proteins) [17].

Recently, a new class of chaperones, "Hero proteins", has been discovered, which main mechanism of action is the physical shielding of other proteins. Such a function is provided by a flexible structure and a high negative or positive charge of molecules [18]. Moreover, Hero proteins can suppress some forms of pathogenic protein aggregates in cells and in animal models of neurodegenerative diseases in vivo. The described properties of Hero let us suggest their wide involvement in the physiological and pathological processes occurring in cells with ischemic damage.

The aim of this study was to analyze association of the tagger SNP rs2900262 in gene *C9orf16* encoding the member of Hero proteins with the risk and clinical manifestations of ischemic stroke.

Material and methods. A total of 1929 unrelated Russians (861 patients with IS and 1068 healthy individuals) from Central Russia were recruited into the study. The Ethical Review Committee of Kursk State Medical University approved the study protocol. All the participants gave written informed consent before the enrollment in this study, subject to the following inclusion criteria: self-declared Russian descent, a birthplace inside of Central Russia.

Baseline and clinical characteristics of the study population are listed in Table 1. The patients were enrolled in to the study in two periods: from the Regional Vascular Center of Kursk Regional Clinical Hospital between 2015 and 2017 [19, 20] and Neurology Clinics of Kursk Emergency Medicine Hospital Kursk

between 2010 and 2012 [21, 22]. All the patients were examined by qualified neurologists. The diagnosis of IS was made in the acute phase of stroke, according to the results of the neurological examination and computed tomography and/or magnetic resonance imaging of the brain. The patients were recruited consecutively. The IS patients were enrolled under the following exclusion criteria: hepatic or renal failure or endocrine, autoimmune, oncological, or other diseases that can cause an acute cerebrovascular event; intracerebral hemorrhage, hemodynamic or dissection-related stroke, traumatic brain injury. All the patients with IS had a history of hypertension and received antihypertensive therapy.

The control group was compiled from healthy volunteers with no clinical evidence of cerebrovascular, cardiovascular, or other chronic diseases and with normal blood pressure without antihypertensive therapy. Healthy individuals were included in control group if they had a systolic blood pressure less than 130 mm Hg and/or a diastolic blood pressure less than 85 mm Hg on at least 3 separate measurements. Control subjects were enrolled from Kursk hospitals during periodic medical examinations at public institutions and industrial enterprises of Kursk region. This group was recruited from the same population and during the same period [23, 24].

Table 1

Baseline and clinical characteristics of the studied groups

Baseline and clinical characteristics		**IS patients (n=897)**	**Controls (n=1140)**	**p_{raw}**
Age, Me [Q1; Q3]		63 [55; 70]	57 [53; 64]	**<0.001**
Gender	Males, N(%)	498 (55.5%)	508 (44.6%)	**<0.001**
	Females, N(%)	399 (44.5%)	632 (55.4%)	
Smoking	Yes, N (%)	442 (49.3%)	308 (27%)	**<0.001**
	No, N (%)	455 (50.7%)	832 (73%)	
Coronary artery disease	Yes, N (%)	113 (13.2%)	-	
	No, N (%)	746 (86.8%)	-	
Type 2 diabetes mellitus	Yes, N (%)	103 (12.1%)	-	
	No, N (%)	747 (87.9%)	-	
Family history of cerebrovascular diseases	Yes, N (%)	306 (35.9%)	ND	
	No, N (%)	546 (64.1%)	ND	
Age at onset of stroke, Me [Q1; Q3]		61 [54; 70], n=869	-	
Number of strokes including event in question	1, N (%)	774 (89.1%)	-	
	2, N (%)	82 (9.4%)	-	
	3, N (%)	13 (1.5%)	-	
Stroke localization	Right/left middle cerebral artery basin, N (%)	723 (83.2%)	-	
	Vertebrobasilar basin, N (%)	146 (16.8%)	-	
Area of lesion in stroke, mm^2, Me [Q1; Q3]		104 [30; 468], n=850	-	
Total cholesterol, mmol/L, Me [Q1; Q3]		5.2 [4.4; 5.9], n=583	ND	
Triglycerides, mmol/L, Me [Q1; Q3]		1.3 [1.1; 1.8], n=575	ND	
Glucose level, mmol/L, Me [Q1; Q3]		4.8 [4.3; 5.5], n=861	ND	
Prothrombin time, seconds, Me [Q1; Q3]		10.79 [10.14; 11.7], n=845	ND	
International normalized ratio, Me [Q1; Q3]		1 [0.93; 1.09], n=566	ND	
Activated partial thromboplastin time, seconds, Me [Q1; Q3]		32.6 [29; 37], n=569	ND	

Note: statistically significant differences between groups are indicated in bold; ND – no data.

The following criteria were used in the selection of SNPs: the SNP must be tagging, have a minor allele frequency of at least 0.05 in the European population and be characterized by a high regulatory potential. According to the bioinformatic tool GenePipe (https://snpinfo.niehs.nih.gov/snpinfo/selegene.html), which was used to select SNPs based on the reference haplotypic structure of the Caucasian population (CEU) of the project HapMap, the only tag SNP in the gene *C9orf16* (also known as *BBLN*, ID:79095) is rs2900262. This genetic variant is localized in the intron. Several bioinformatic resources were used to assess the regulatory potential of this SNP. Bioinformatic resource HaploReg (v4.1) established a connection of rs2900262 *C9orf16* with modifications of histones marking promoters in 15 different tissues; it established the localization of this SNP in the regions of hypersensitivity to deoxyribonuclease in 7 issues, regions of 4 regulatory motifs (https://pubs.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php). According to rSNPBase (http://rsnp.psych.ac.cn/index.do), it is characterized by distal transcriptional regulation, the regulation mediated by RNA-binding proteins and regulation mediated by microRNA. The instrument RegulomeDB allowed to reveal that rs2900262 *C9orf16* is characterized by a regulatory coefficient of 1b (eQTL + TF binding + any motif + DNase Footprint + DNase peak) (http://regulome.stanford.edu/). According to the date presented in Ensembl genome browser, this genetic variant is characterized by an average frequency of the minor T allele in European populations of 0.057 (https://www.ensembl.org/). Thus, rs2900262 *C9orf16* was selected for this study, which meets the necessary criteria for inclusion in the study.

Genetic Analysis. DNA analysis was carried out at the Laboratory of Genomic Research of Research Institute for Genetic and Molecular Epidemiology of Kursk State Medical University (Kursk, Russia). Approximately 5 mL of venous blood was collected from the cubital vein of each participant into EDTA-coated tubes and maintained at −20◦C until processed. Genomic DNA was extracted from thawed blood samples by the standard procedure of phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. Genotyping of the SNP was done using Taq-Man–based real-time polymerase chain reaction assays according to the protocol designed in the Laboratory of Genomic Research, Research Institute for Genetic and Molecular Epidemiology. Primers and probes were designed (http://primer3.ut.ee/) using the Primer3 online program [25], and then synthesized by the Syntol company (Moscow, Russia). The 2 flanking primers such as forward 5′- ATATACCATGAGGGGGTTGGA -3′ and reverse 5′- GAGGAGCTGGAGGAGCGTAT-3′ and also allele-specific probes T-5′-FAM-CCTTTCCCAGAACACARTQ1-3′ and 5′-ROX-CCTTTCCTAGAACACA-BHQ2-3′ were used for genotyping of the polymorphism. A real-time PCR was done in a 25-mL reaction mixture containing 1.5 U of Hot Start Taq DNA polymerase (Biolabmix, Novosibirsk, Russia), about 1 μg of DNA, 0.25 μM each primer, 250 μM dNTPs, 3.0 mM $MgCl_2$, 1xPCR buffer [67 mM Tris-HCl, pH 8.8, 16.6 mM $(NH4)_2SO_4$, 0.01% Tween-20]. The amplification reaction consisted of an initial denaturation for 10 minutes at 95°C, followed by 39 cycles of 92°C for 30 seconds and 58°C for 1 minute. Figure 1 shows allelic discrimination plot for SNP rs2900262 *C9orf16* assay designed for this study. The plot shows clear separation between the signals derived from allele 1 (rs2900262-C, FAM fluorescent dye) or allele 2 rs2900262-T, ROX fluorescent dye). Genotypes CC, CT, and TT are shown as circles, triangles and squares, respectively. Primer sequences used for genotyping are available upon request. To ensure quality control, 10% of DNA samples were genotyped in duplicates blinded to the case-control status. The concordance rate was >99%.

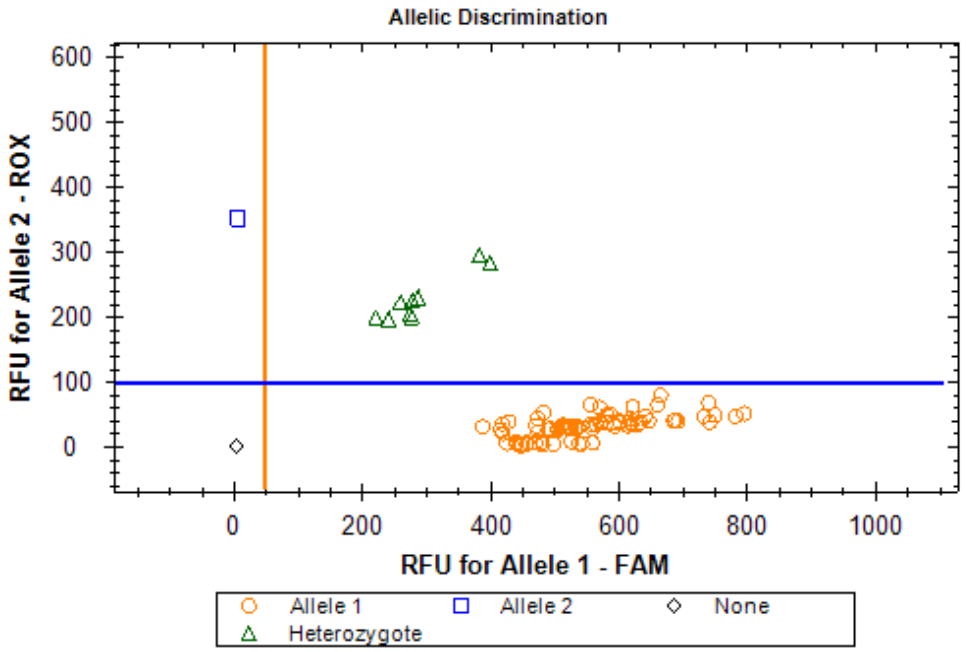


Fig. 1. Allelic discrimination plot for SNP rs2900262 *C9orf16* assay designed for this study.

Allele and genotype frequencies in the case and control groups were counted and compared by the Fisher exact test to identify significant departures from Hardy–Weinberg equilibrium. Genotype frequencies in the study groups and their associations with disease risk were analyzed using the SNPStats software (https://www.snpstats.net/start.htm) [26]. For the analysis of associations of genotypes, dominant, recessive, and additive models were considered; taking into account the number of models of associations, a correction for multiple testing was applied using Benjamini-Hogberg false-discovery rate approach.

Multiple logistic regression analysis was performed to evaluate the associations of rs2900262 *C9orf16* genotypes with the risk of ischemic events. Continuous variables were analyzed for normal distribution by the Kolmogorov–Smirnov test. Linear regression analysis was used to evaluate the association between rs4644832 and age of ischemic events, which was previously transformed to a normal variable through the procedure of inverse transformation of ranks. All associations were adjusted for age, gender and smoking status.

The following bioinformatics recourses were used for analysis of regulatory potential of rs2900262 *C9orf16*:

- The rSNPBase tool (http://rsnp.psych.ac.cn/index.do) was used to evaluate the effect of SNPs on proximal transcriptional regulation, distal transcriptional regulation, RNA-binding protein-mediated regulation, and miRNA-mediated regulation (accessed on 7 May 2022) [27].

- RegulomeDB (Version 1.1) (http://regulome.stanford.edu/) was used to estimate the regulatory coefficient of SNP (accessed on 7 May 2022) [28].

- GTExportal (http://www.gtexportal.org/) was used to analyze the expression levels of the studied genes in brain, whole blood, and blood vessels, as well as to analyze the binding of SNPs to quantitative expression trait loci (eQTLs) (accessed on 7 May 2022) [29].

- Additionally, to analyze the binding of rs2900262 *C9orf16* to quantitative expression trait loci (eQTL) in peripheral blood, the eQTLGen resource was used (https://www.eqtlgen.org/) (accessed on 7 May 2022) [30].

- Bioinformatics resource HaploReg (v4.1) (http://archive.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php) was used to assess the association of rs2900262 *C9orf16* with histone modifications marking promoters and enhancers: mono-methylation at the 4th lysine residue of the histone H3 protein (H3K4me1),

tri-methylation at the 4th lysine residue of the histone H3 protein (H3K4me3), the acetylation at the 9th lysine residues of the histone H3 protein (H3K9ac), acetylation of the lysine residues at N-terminal position 27 of the histone H3 protein (H3K27ac). This resource has also been used to analyze the localization of SNPs in regions of DNase hypersensitivity, regions of regulatory motifs, and sites binding with regulatory proteins (accessed on 7 May 2022) [31].

- To assess the effect of rs2900262 *C9orf16* on the binding of transcription factors (TFs) to DNA, depending on the carriage of the reference/alternative alleles, the atSNP Function Prediction online tool was used (http://atsnp.biostat.wisc.edu/search; accessed on 14 May 2022) [32]. TFs were included in the analysis only under the condition of a high and very high degree of influence of SNP on the interaction of TFs with DNA, calculated on the basis of a positional weight matrix. The subsequent analysis of the possible joint participation of TFs associated with the reference/SNP alleles in common biological processes directly related to the pathogenesis of IS was carried out using the Enrichr online tool (https://maayanlab.cloud/Enrichr/) [33]. Biological functions controlled by transcription factors associated with SNP rs2900262 *C9orf16* were used as functional groups (accessed on 14 May 2022). The level of significance of gene ontologies, taking into account multiple tests, was assessed by the Benjamini–Hochberg method (False Discovery Rate) [34].

- For bioinformatics analysis of interactions between the *C9orf16* gene and cigarette smoke components, the Comparative Toxicogenomics Database resource (CTD) available online, was used (http://ctdbase.org) (accessed on 16 May 2022) [35]. CTD provides the ability to analyze specific interactions between genes and chemicals in vertebrates and invertebrates based on data obtained from published scientific studies worldwide. This tool was used to analyze binary interactions involving one chemical and one gene/protein.

The Cerebrovascular Disease Knowledge Portal (CDKP) (https://cd.hugeamp.org/) was used for bioinformatic analyze of the associations of rs2900262 *C9orf16* with atherosclerosis-associated diseases, intermediate phenotypes, and risk factors for ischemic stroke (such as blood pressure, the level of triglycerides, the level of low density lipoproteins, etc.) (accessed on 18 May 2022) [36].

Results and discussion. The allele frequencies in the study patients according to the data published in the 1000 Genomes Project, Phase 3 (http://www.ensembl.org (accessed on 30 May 2022)) were comparable with those reported in following European populations: British in England and Scotland (GBR), Iberian populations in Spain (IBS), Toscani in Italy (TSI) (Table 2).

Table 2

Comparative analysis of allele frequencies between the population investigated in the present study and other European populations

Population	Minor allele	Present study (control)	European populations	χ^2	P-level
CEU	T	0.038	0.071	4.94	**0.03**
FIN	T	0.038	0.076	6.53	**0.01**
GBR	T	0.038	0.060	2.19	0.14
IBS	T	0.038	0.047	0.38	0.54
TSI	T	0.038	0.033	0.16	0.69

Note: Data on the frequency of the minor allele in European populations were obtained using the Ensembl genome browser (https://www.ensembl.org/index.html); statistically significant differences in the frequency of the minor allele are indicated in bold

The genotype frequencies of rs2900262 *C9orf16* in study groups are presented in Table 3. The distribution of genotypes frequencies corresponded to the Hardy-Weinberg equilibrium both in the group of patients and in the control group (P>0.05).

Analysis of the general group of patients/controls did not show an association of rs2900262 *C9orf16* with the risk of IS (Table 3).

Table 3

Genetic models of associations of rs2900262 *C9orf16* with the risk of ischemic stroke

M[1]	Genotypes	Controls (N=1140)	Patients (N=897)	corOR (95% CI)[2]	Padj[3]	P[FDR]
D	C/C	1054 (92.5%)	817 (91.1%)	1.00	0.33	0.44
	C/T-T/T	86 (7.5%)	80 (8.9%)	1.18 (0.84-1.66)		
R	C/C-C/T	1139 (99.9%)	895 (99.8%)	1.00	0.44	0.44
	T/T	1 (0.1%)	2 (0.2%)	2.52 (0.22-28.50)		
A	-	---	---	1.19 (0.86-1.65)	0.29	0.44

Note: 1 – genetic models of associations of genotypes: D – dominant; R – recessive; A-additive; 2 – odds ratio and 95% confidence interval adjusted by sex, age, smoking; 3-P – level adjusted by sex, age, smoking; P^{FDR} – P-level, after the correction on the number of models (calculated by the Benjamini-Hochberg method); All calculations were performed relative to the minor allele T; Statistically significant differences are marked in bold.

Due to a possible sex dimorphism in the associations of genetic variants with the risk of IS, an analysis of the relationship of rs2900262 *C9orf16* with the development of IS separately in males and females was carried out. It turned out that this genetic variant does not affect the risk of the disease in males. As shown in Table 4, SNP rs2900262 *C9orf16* was found to be associated with a increased risk of IS in females. In particular, according to the dominant model, genotypes C/T-T/T was associated with an increased risk of IS (corOR=1.74, 95%CI 1.07–2.82, Padj=0.025, P^{FDR}=0.042). According to the additive model, the rs2900262 genotypes were also associated with an increased risk of IS (corOR=1.69, 95%CI 1.06–2.71, Padj=0.028, P^{FDR}=0.042).

Table 4

Sex-specific associations of rs2900262 *C9orf16* with the development of ischemic stroke

Males						
M[1]	**Genotypes**	**Controls (N=508)**	**Patients (N=498)**	**corOR (95% CI)[2]**	**Padj[3]**	**P[FDR4]**
D	C/C	461 (90.8%)	457 (91.8%)	1.00	0.57	0.65
	C/T-T/T	47 (9.2%)	41 (8.2%)	0.88 (0.57-1.36)		
R	C/C-C/T	508 (100%)	497 (99.8%)	1.00	0.24	0.65
	T/T	0 (0%)	1 (0.2%)	NA (0.00-NA)		
A	-	-	-	0.91 (0.59-1.39)	0.65	0.65
Females						
M[1]	**Genotypes**	**Controls (N=632)**	**Patients (N=399)**	**corOR (95% CI)[2]**	**P[3]**	**P[FDR]**
D	C/C	593 (93.8%)	360 (90.2%)	1.00	0.025	**0.042**
	C/T-T/T	39 (6.2%)	39 (9.8%)	1.74 (1.07-2.82)		
R	C/C-C/T	631 (99.8%)	398 (99.8%)	1.00	0.83	0.83
	T/T	1 (0.2%)	1 (0.2%)	1.40 (0.06-32.79)		
A	-	-	-	1.69 (1.06-2.71)	0.028	**0.042**

Note: 1 – genetic models of associations of genotypes: D – dominant; R – recessive; A-additive; 2 – odds ratio and 95% confidence interval adjusted by age, smoking; 3-P – level adjusted by age, smoking; P^{FDR} – P-level, after the correction on the number of models (calculated by the Benjamini-Hochberg method); All calculations were performed relative to the minor allele T; Statistically significant differences are marked in bold.

The analysis of associations of rs2900262 *C9orf16* with of IS risk depending on the smoking status revealed that this genetic variant is associated with an increased risk of IS exclusively in smoking individuals according to the dominant model (OR=1.92, 95%CI 1.09–3.37, Padj=0.019, P^{FDR}=0.042). Analysis of the log-additive model also revealed the association of rs2900262 *C9ORF16* with the increased risk of IS in smokers (OR=1.79, 95%CI 1.04–3.08, Padj=0.028, P^{FDR}=0.042) (Table 5).

Table 5

The effect of smoking on the association of rs2900262 *C9orf16* with the risk of ischemic stroke

Non-smokers						
M[1]	**Genotypes**	**Controls (N=832)**	**Patients (N=455)**	**OR (95% CI)[2]**	**Padj[3]**	**P[FDR]**
D	C/C	764 (91.8%)	422 (92.8%)	1.00	0.56	0.66
	C/T-T/T	68 (8.2%)	33 (7.2%)	0.88 (0.57-1.35)		
R	C/C-C/T	832 (100%)	454 (99.8%)	1.00	0.15	0.45
	T/T	0 (0%)	1 (0.2%)	NA (0.00-NA)		
A	-	-	-	0.91 (0.59-1.39)	0.66	0.66
Smokers						
M[1]	**Genotypes**	**Controls (N=308)**	**Patients (N=442)**	**OR (95% CI)[2]**	**P[3]**	**P[FDR]**
D	C/C	290 (94.2%)	395 (89.4%)	1.00	0.019	**0.042**
	C/T-T/T	18 (5.8%)	47 (10.6%)	1.92 (1.09-3.37)		
R	C/C-C/T	307 (99.7%)	441 (99.8%)	1.00	0.8	0.8
	T/T	1 (0.3%)	1 (0.2%)	0.70 (0.04-11.17)		
A	-	-	-	1.79 (1.04-3.08)	0.028	**0.042**

Note: 1 – genetic models of associations of genotypes: D – dominant; R – recessive; A-additive; 2 – odds ratio and 95% confidence interval adjusted by sex, age; 3-P – level adjusted by sex, age; P^{FDR} – P-level, after the correction on the number of models (calculated by the Benjamini-Hochberg method); All calculations were performed relative to the minor allele T; Statistically significant differences are marked in bold.

Analysis of the effects of rs2900262 *C9orf16* on clinical manifestations of IS revealed that in carriers of genotypes C/T-T/T, ischemic stroke manifests on average 2 years earlier than in those of genotype C/C (Recessive model: Padj=0.017; Difference= -1.98, 95% CI=-3.61 – -0.36, Padj= 0.017, $P^{FDR=}$0.026). According to the additive model, rs2900262 *C9ORF16* is also associated with a decrease in the age of manifestation of IS (Difference= -1.82, 95% CI=-3.38 – -0.26, Padj= 0.015, $P^{FDR=}$0.026) (Table 6).

Table 6

Analysis of the impact of rs2900262 *C9orf16* on the age of ischemic stroke manifestation

M[1]	**Genotypes**	**N**	**Response mean (s.e.)**	**Difference (95% CI)**	**Padj**	**P[FDR]**
D	C/C	792	61.63 (0.4)	0.00	**0.017**	**0.026**
	C/T-T/T	78	59.53 (1.12)	-1.98 (-3.61 – -0.36)		
R	C/C-C/T	868	61.45 (0.37)	0.00	0.9	0.9
	T/T	2	60 (19)	0.59 (-9.11 – 10.29)		
A	-	---	---	-1.82 (-3.38 – -0.26)	**0.015**	**0.026**

Note: 1 – genetic models of associations of genotypes: D – dominant; R – recessive; A – additive; Padj – P-level adjusted by sex, age, smoking; P^{FDR} – P-level, after the correction on the number of models (calculated by the Benjamini-Hochberg method); All calculations were performed relative to the minor allele T; Statistically significant differences are marked in bold.

The *C9orf16* gene is expressed in brain tissues, blood vessels, and whole blood (Figure 2). In brain tissues, MeTPM varies from 50.20 to 172.2; in blood vessels – from 64.62 to 79.12; in whole blood MeTPM=50.32 (Fig. 2).

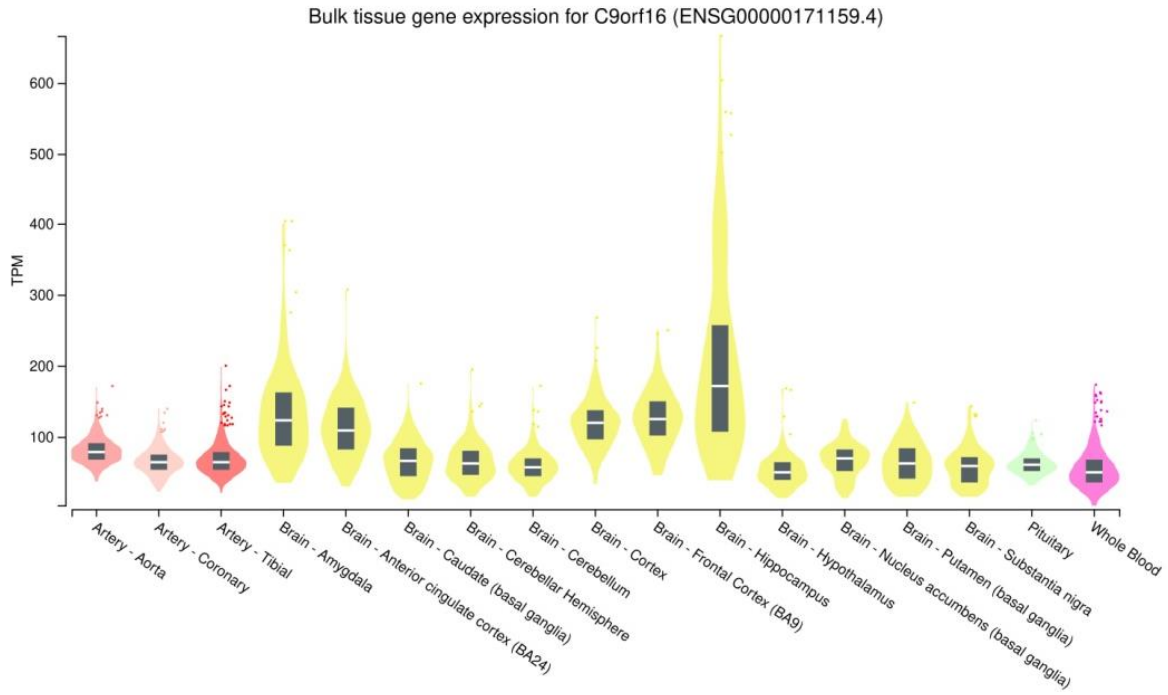


Fig. 2. Level of the expression of the *C9orf16* gene in brain, whole blood, and vessels (https://gtexportal.org)

C9orf16 (also known as *BBLN*), a gene with unknown functions, has not been investigated for the risk of IS. However, in a previous study, a change in the expression of this gene in the blood of patients with Parkinson's Disease was found, which indicates a possible significant role of this gene in neuroprotection [37].

Due to the fact that the use of PubMed and Google Scholar search resources did not allow us to detect studies aimed at studying the associations of the studied Tag SNP rs2900262 *C9orf16* with the development of IS, we used the bioinformatic resource Cardiovascular Disease Knowledge Portal to interpret the phenotypic effects of this genetic variant (CVDKP), (https://cvd.hugeamp.org), which combine and analyze the results of genetic associations of the largest consortia for the study of cardio- and cerebrovascular diseases, as well as their intermediate phenotypes. It was found that the protective C allele is associated with a decrease in BMI, Body fat percentage, Systolic blood pressure, Diastolic blood pressure, Mean arterial pressure, Pulse pressure, Creatine kinase. At the same time, this allele is associated with an increase in levels of HDL cholesterol и AF-SNP hypertension interaction (Table 7).

Table 7

Results of aggregated analyzes of associations between Tag SNP rs2900262 *C9orf16* cardiovascular diseases and their and their intermediate phenotypes (https://cvd.hugeamp.org/)

N	SNP	Phenotype	P-Value	Beta (OR)	Sample Size
1.	rs2900262 *C9orf16* (T/C)	BMI	6.38×10^{-5}	$_{Beta}$▼-0.0122	3 133 750
2.		Systolic blood pressure	5.44×10^{-4}	$_{Beta}$▼-0.0102	1 269 390
3.		Pulse pressure	0.001	$_{Beta}$▼-0.0097	858 587
4.		Creatine kinase	0.008	$_{Beta}$▼-0.0122	111 424
5.		HDL cholesterol	0.02	$_{Beta}$▲0.0052	1 726 890
6.		Diastolic blood pressure	0.02	$_{Beta}$▼-0.0079	1 282 710
7.		Mean arterial pressure	0.03	$_{Beta}$▼-0.0086	136 482
8.		AF-SNP hypertension interaction	0.04	$_{OR}$▲1.2460	20 050
9.		Body fat percentage	0.047	$_{Beta}$▼-0.0800	26 639

Note: Data obtained using the bioinformatic resource Cardiovascular Disease Knowledge Portal (https://cvd.hugeamp.org/); All presented calculations were performed with respect to the C allele.

Thus, this genetic variant may play an important role in the regulation of blood pressure, lipid metabolism, and may also influence the association of SNPs with the development of atrial fibrillation. Taking into account that atrial fibrillation acts as a significant risk factor for ischemic stroke of cardioembolic type, the influence of rs2900262 *C9orf16* on the risk of IS may include a range of molecular mechanisms involved in various links in the pathogenesis of the disease.

Bioinformatic analysis was additionally performed to interpret the functional effects of rs2900262 *C9orf16*. The use of the GTEx Portal resource and the eQTL Calculator search query showed that the C allele (with a protective effect on the risk of IS development established in our study) affects an increase in gene expression in blood vessels. At the same time, the C allele is characterized by multidirectional effects relative to the effect on the level of expression in brain tissues: carriers of the C allele showed an increase in the expression of the *C9orf16* gene in Brain – Caudate (basal ganglia) and Brain – Cerebellum and, conversely, a decrease in gene expression in Brain – Cortex и Brain – Frontal Cortex (BA9) (Table 8).

Table 8

Impact of rs2900262 on *C9orf16* expression by cis-eQTL-effects (GTEx Portal data)

Tissue	P-Value	NES	T-statistic
Brain – Caudate (basal ganglia)	0.024	0.17	2.03
Brain – Cerebellum	0.0062	0.22	2.04
Brain – Cortex	0.018	-0.19	-2.4
Brain – Frontal Cortex (BA9)	0.037	-0.18	-2.1
Artery – Tibial	0.00059	0.13	3.05

Note: effective allele – C

Resource eQTLGen Consortium (https://www.eqtlgen.org/cis-eqtls.html) showed that the risk allele T affects the decrease in expression of gene *URM1* (Z-score = -10.6884, P =1.15×10^{-26}) and *DNM1* (Z-score = -4.67, P = 2.9×10^{-6}), as well as an increase in gene expression *SH3GLB2* (Z-score = 4.44, P = 8.8×10^{-6}) и *RP11-395P17.3* (Z-score = 5.78, P = 7.41×10^{-9}) through cis-eQTL effects in blood cells. Gene *URM1* acts as a ubiquitin-like protein (UBL) that is covalently conjugated via an isopeptide bond to lysine residues of target proteins such as MOCS3, ATPBD3, CTU2, USP15 and CAS. The thiocarboxylated form serves as substrate for conjugation and oxidative stress specifically induces the formation of UBL-protein conjugates (https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=URM1&keywords=URM1). *DNM1* gene encodes a member of the dynamin subfamily of GTP-binding proteins. The encoded protein possesses unique mechanochemical properties used to tubulate and sever membranes, and is involved in clathrin-mediated endocytosis and other vesicular trafficking processes. Actin and other cytoskeletal proteins act as binding partners for the encoded protein, which can also self-assemble leading to stimulation of GTPase activity (https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DNM1&keywords=DNM1). *SH3GLB2* is a Protein Coding gene. Enables identical protein binding activity (https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SH3GLB2&keywords=SH3GLB2).

Subsequent analysis revealed a significant effect of rs2900262 *C9orf16* on histone modifications. According to the HaploReg database (v4.1), this genetic variant is located in the region of DNA binding to histone H3, characterized by mono-methylation at the 4th lysine residue of the histone H3 protein (H3K4me1) and marking enhancers in all brain tissues represented by HaploReg (v4.1), peripheral blood cells, as well as tri-methylation at the 4th lysine residue of the histone H3 protein (H3K4me3) and marking promoters in the brain tissues and blood. The effect of this histone mark is enhanced by acetylation of the lysine residues at N-terminal position 27 of the histone H3 protein (H3K27ac), marking enhancers in peripheral blood cells and all brain tissues, as well as the acetylation at the 9th lysine residues of the histone H3 protein (H3K9ac), marking promoters in blood cells and all brain tissues, except Brain Hippocampus Middle (Table 9).

Table 9

Tissue-specific effects of rs2900262 *C9orf16* on histone modifications (https://pubs.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php**)**

Histone marks / Tissues	H3K4me1	H3K4me3	H3K27ac	H3K9ac
Brain Hippocampus Middle	Enh	Pro	Enh	-
Brain Substantia Nigra	Enh	-	Enh	Pro
Brain Anterior Caudate	Enh	-	Enh	Pro
Brain Cingulate Gyrus	Enh	Pro	Enh	Pro
Brain Inferior Temporal Lobe	Enh	Pro	Enh	Pro
Brain Angular Gyrus	Enh	Pro	Enh	Pro
Brain_Dorsolateral_Prefrontal_Cortex	Enh	Pro	Enh	Pro
Cells from peripheral blood (any)	Enh	Pro	Enh	Pro

Note: H3K4me1 – mono-methylation at the 4th lysine residue of the histone H3 protein; H3K4me3 – tri-methylation at the 4th lysine residue of the histone H3 protein; H3K9ac – the acetylation at the 9th lysine residues of the histone H3 protein; H3K27ac – acetylation of the lysine residues at N-terminal position 27 of the histone H3 protein; Enh – histone modification in the enhancer region; Pro – histone modification at the promoter region.

Table 10

Analysis of the impact of rs2900262 *C9ORF16* on the binding of transcription factors with DNA

Ref/SNP allele[1]	TF[2]	GAIN /LOSS[3]	Motif[4]	P-Value SNP impact[5]	P-Value Ref[6]	P-Value SNP[7]
T/C	NFKB	GAIN	NFKB_disc2	$<1\times10^{-5}$	4.71×10^{-6}	0.18
T/C	IKZF2	GAIN	IKZF2_2	2.09×10^{-3}	1.11×10^{-2}	0.40
T/C	RAD21	GAIN	RAD21_disc10	2.28×10^{-3}	1.99×10^{-2}	0.28
T/C	SMC3	GAIN	SMC3_disc3	2.53×10^{-3}	3.10×10^{-2}	0.35
T/C	NR3C1	GAIN	NR3C1_disc6	3.27×10^{-3}	1.22×10^{-2}	0.14
T/C	HAND1	GAIN	HAND1_2	5.87×10^{-3}	1.99×10^{-2}	0.48
T/C	BCL	GAIN	BCL_disc9	7.63×10^{-3}	4.01×10^{-2}	0.30
T/C	MGA	GAIN	MGA_3	9.46×10^{-3}	3.52×10^{-2}	0.30
T/C	NANOG	GAIN	NANOG_1	1.00×10^{-2}	2.40×10^{-2}	0.71
T/C	ZNF410	GAIN	ZNF410_1	1.45×10^{-2}	2.67×10^{-2}	0.29
T/C	MZF1_5-13	GAIN	MA0057.1	1.50×10^{-2}	4.93×10^{-2}	0.46
T/C	THAP1	GAIN	MA0597.1	1.53×10^{-2}	2.31×10^{-2}	0.35
T/C	RFX1	GAIN	RFX1_4	1.84×10^{-2}	3.83×10^{-2}	0.40
T/C	SOX2	GAIN	SOX2_1	2.02×10^{-2}	9.14×10^{-3}	6.18×10^{-2}
T/C	NR2C2	GAIN	MA0504.1	4.40×10^{-2}	4.67×10^{-2}	0.23
T/C	NR1H	LOSS	NR1H_3	2.37×10^{-5}	0.15	1.09×10^{-4}
T/C	IKZF2	LOSS	IKZF2_3	3.91×10^{-3}	0.38	1.10×10^{-2}
T/C	ETS1	LOSS	ETS1_2	6.90×10^{-3}	4.20	4.23×10^{-2}
T[8]	-					
C[9]	regulation of leukocyte adhesion to vascular endothelial cell (GO:1904994; Padj=0.02); regulation of vasculature development (GO:1901342; Padj=0.02); regulation of blood vessel endothelial cell migration (GO:0043535; Padj=0.02); positive regulation of defense response (GO:0031349; Padj=0.03); regulation of angiogenesis (GO:0045765; Padj=0.045); regulation of inflammatory response (GO:0050727; Padj=0.045)					

Note: 1 – reference (Ref) / alternative (SNP) allele; 2 – TF – transcription factor; 3 – TF binding to the reference (GAIN) / alternative (LOSS) allele; 4 – binding sites with high affinity for TF; 5 – p value, statistically confirming the potential increase or loss of function of the genomic region with SNP in terms of transcription factor binding; 6 – p-value for assessing the binding of TF to the Ref allele; 7 – p-value for assessing the binding of TF to the SNP allele; 8 – biological processes in which TFs that bind to the reference allele are jointly involved (data from the Enrichr resource; https://maayanlab.cloud/Enrichr/); 9 – biological processes in which TFs that bind to an alternative allele are jointly involved (data from the Enrichr resource; https://maayanlab.cloud/Enrichr/)

The analysis of TFs using atSNP source revealed that TFs binding to the protective allele C, are involved in joint regulation of leukocyte adhesion to vascular endothelial cell (GO:1904994; Padj=0.02), regulation of vasculature development (GO:1901342; Padj=0.02), regulation of blood vessel endothelial cell migration (GO:0043535; Padj=0.02), positive regulation of defense response (GO:0031349; Padj=0.03), regulation of angiogenesis (GO:0045765; Padj=0.045), regulation of inflammatory response (GO:0050727; Padj=0.045) (Table 10).

It is noteworthy that the association of rs2900262 *C9orf16* with the risk of IS was found in women and was not found in men. Previously, Smith et al. showed that *C9orf16* expression may be negatively regulated by estradiol [38]. Thereby decreased expression of *C9orf16* in T allele carriers may manifest female-specifically being more impeded in women.

Similarly, in contrast to non-smokers, smoking patients were characterized by more strong association between mutant allele and the risk of ischemic stroke. This finding may have the same ground since some tobacco components apparently may decrease *C9orf16* expression. Using bioinformatic resourse Comparative Toxicogenomics Database we revealed that tobacco smoke and its components are able to down-regulate expression of *C9orf16* as well as up-regulate methylation of *C9orf16* promoter (Table 11).

Table 11

Proven mechanisms of interaction between the gene *C9orf16* and cigarette smoke (data obtained using a bioinformatics resource Comparative Toxicogenomics Database)

N	Interacting chemical	Interactiong	References
1.	Tobacco Smoke Pollution	Tobacco Smoke Pollution results in increased methylation of *BBLN* promoter	[39]
2.	Tobacco tar	Tobacco tar results in decreased expression of *BBLN* mRNA	[40]
3.	Benzo(a)pyrene	Benzo(a)pyrene results in decreased expression of *BBLN* mRNA	[41]
4.	Benzo(a)pyrene	Benzo(a)pyrene results in increased methylation of *BBLN* promoter	[42]

Considering that an increase in methylation leads to a decrease in gene expression, studies conducted in this direction provide additional evidence of the effect of smoking on a decrease in the expression of the *C9orf16* gene and an increase in "risk" effects regarding the development of IS in carriers of variant genotypes C/C-C/T.

Conclusion. To the best of our knowledge, this is the first study that showed the association of rs2900262 *C9orf16* with the risk of IS, sex-specific effect in this association, and the trigger effect of smoking on the association of this genetic variant with the development of the disease. Bioinformatic analysis revealed a high regulatory potential of rs2900262 *C9orf16*, particular cis-eQTL-mediated effects on the regulation of gene expression in blood, blood vessels and brain, binding to transcription factors involved in biological processes with significant role in the pathogenesis of IS, as well as epigenetic regulation of this SNP. Future studies have yet to accumulate the data disclosing detailed networks of its probable implication in ischemic stroke risk and course.

Financial support

This research was funded by Russian Science Foundation (No. 22-15-00288, https://rscf.ru/en/project/22-15-00288/).

Conflict of interests

The authors have no conflict of interest to declare.

References

1. Young MJ, Regenhardt RW, Leslie-Mazwi TM, et al. Disabling stroke in persons al-

ready with a disability: Ethical dimensions and directives. Neurology. 2020;94(7):306-310. DOI: https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000008964

2. Johansen, MC, Langton-Frost N, Gottesman RF. The role of cardiovascular disease in cognitive impairment. Current Geriatrics Reports. 2020;9(1):1-9. DOI: https://doi.org/10.1007/s13670-020-00309-7

3. Murphy SJX, Werring DJ. Stroke: causes and clinical features. Medicine. 2020;48(9):561-566. DOI: https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2020.06.002

4. Abraham G, Malik R, Yonova-Doing E, et al. Genomic risk score offers predictive performance comparable to clinical risk factors for ischaemic stroke. Nature Communications. 2019;10:5819. DOI: https://doi.org/10.1038/s41467-019-13848-1

5. Wang C, Du Z, Ye N, et al. Hyperlipidemia and hypertension have synergistic interaction on ischemic stroke: insights from a general population survey in China. BMC Cardiovascular Disorders. 2022;22:47. DOI: https://doi.org/10.1186/s12872-022-02491-2

6. Appunni S, Rubens M, Ramamoorthy V, et al. Stroke Genomics: Current Knowledge, Clinical Applications and Future Possibilities. Brain Sciences. 2022;12(3):302. DOI: https://doi.org/10.3390/brainsci12030302

7. Polonikov A, Bocharova I, Azarova I, et al. The Impact of Genetic Polymorphisms in Glutamate-Cysteine Ligase, a Key Enzyme of Glutathione Biosynthesis, on Ischemic Stroke Risk and Brain Infarct Size. Life. 2022;12(4):602. DOI: https://doi.org/10.3390/life12040602

8. Bushueva O, Barysheva E, Markov A, et al. DNA Hypomethylation of the MPO Gene in Peripheral Blood Leukocytes Is Associated with Cerebral Stroke in the Acute Phase. Journal of Molecular Neuroscience. 2021;71:1914-1932. DOI: https://doi.org/10.1007/s12031-021-01840-8

9. Cipolla MJ, Liebeskind DS, Chan SL. The importance of comorbidities in ischemic stroke: Impact of hypertension on the cerebral circulation. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 2018;38(12):2129-2149. DOI: https://doi.org/10.1177/0271678X18800589

10. Bushueva O, Solodilova M, Ivanov V, et al. Gender-specific protective effect of the -463G>A polymorphism of myeloperoxidase gene against the risk of essential hypertension in Russians. Journal of the American Society of Hypertension. 2015;9(11):902-906. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jash.2015.08.006

11. Moskalenko MI. The involvement of genes of matrix metalloproteinases in the development of arteial hypertension and its complication (review). Research Result. Medicine and Pharmacy. 2018;4(1):53-69. Russian. DOI: https://doi.org/10.18413/2313-8955-2018-4-1-53-69

12. Song X, Zhao X, Liebeskind DS, et al. Incremental value of plaque enhancement in predicting stroke recurrence in symptomatic intracranial atherosclerosis. Neuroradiology. 2020;62:1123-1131. DOI: https://doi.org/10.1007/s00234-020-02418-8

13. Sorokin A, Kotani K, Bushueva O, et al. The cardio-ankle vascular index and ankle-brachial index in young russians. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis. 2015;22(2):211-218. DOI: https://doi.org/10.5551/jat.26104

14. Nimjee SM, Akhter AS, Zakeri A, et al. Sex differences in thrombosis as it affects acute ischemic stroke. Neurobiology of Disease. 2022;165:105647. DOI: https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105647

15. Dong S, Maniar S, Manole MD, et al. Cerebral Hypoperfusion and Other Shared Brain Pathologies in Ischemic Stroke and Alzheimer's Disease. Translational Stroke Research. 2018;9:238-250. DOI: https://doi.org/10.1007/s12975-017-0570-2

16. Datta A, Sarmah D, Mounica L, et al. Cell Death Pathways in Ischemic Stroke and Targeted Pharmacotherapy. Translational Stroke Research. 2020;11:1185-1202. DOI: https://doi.org/10.1007/s12975-020-00806-z

17. Demyanenko S, Nikul V, Rodkin S, et al. Exogenous recombinant Hsp70 mediates neuroprotection after photothrombotic stroke. Cell Stress and Chaperones. 2021;26:103-114. DOI: https://doi.org/10.1007/s12192-020-01159-0

18. Tsuboyama K, Osaki T, Matsuura-Suzuki E, et al. A widespread family of heat-resistant obscure (Hero) proteins protect against protein instability and aggregation. PLoS Biology. 2020;18(3):e3000632. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000632

19. Polonikov A, Rymarova L, Klyosova E, et al. Matrix metalloproteinases as target genes for gene regulatory networks driving molecular and cellular pathways related to a multistep pathogenesis of cerebrovascular disease. Journal of Cellular Biochemistry. 2019;120(10):16467-16482. DOI: https://doi.org/10.1002/jcb.28815

20. Bushueva OY, Stetskaya TA, Polonikov AV, et al. The relationship between polymorphism 640A>G of the CYBA gene with the risk of

ischemic stroke in the population of the Central Russia. Zhurnal Nevrologii i Psikhiatrii imeni S.S. Korsakova. 2015;115(9 Pt 2):38-41. Russian. DOI: https://doi.org/10.17116/jnevro20151159238-41

21. Polonikov A, Vialykh E, Vasil'eva O, et al. Genetic variation in glutathione S-transferase genes and risk of nonfatal cerebral stroke in patients suffering from essential hypertension. Journal of Molecular Neuroscience. 2012;47(3):511-3. DOI: https://doi.org/10.1007/s12031-012-9764-y

22. Vialykh EK, Solidolova MA, Bushueva OIu, et al. Catalase gene polymorphism is associated with increased risk of cerebral stroke in hypertensive patients. Zhurnal Nevrologii i Psikhiatrii imeni S.S. Korsakova. 2012;112(8 Pt 2):3-7. Russian.

23. Bushueva OY, Bulgakova IV, Ivanov VP, et al. Association of Flavin Monooxygenase Gene E158K Polymorphism with Chronic Heart Disease Risk. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2015;159(6):776-778. DOI: https://doi.org/10.1007/s10517-015-3073-8

24. Bushueva OYu. Single nucleotide polymorphisms in genes encoding xenobiotic metabolizing enzymes are associated with predisposition to arterial hypertension. Research Results in Biomedicine. 2020;6(4):447-456. DOI: https://doi.org/10.18413/2658-6533-2020-6-4-0-1

25. Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. Bioinformatics. 2007;23(10):1289-1291. DOI: https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm091

26. Solé X, Guinó E, Valls J, et al. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. Bioinformatics. 2006;22(15):1928-1929. DOI: https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl268

27. Guo L, Wang J. rSNPBase 3.0: an updated database of SNP-related regulatory elements, element-gene pairs and SNP-based gene regulatory networks. Nucleic Acids Research. 2018;46(D1):D1111-D1116. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkx1101

28. Dong S, Boyle AP. Predicting functional variants in enhancer and promoter elements using RegulomeDB. Human Mutation. 2019;40(9):1292-1298. DOI: https://doi.org/10.1002/humu.23791

29. GTEx Consortium. The GTEx Consortium atlas of genetic regulatory effects across human tissues. Science. 2020;369(6509):1318-1330. DOI: https://doi.org/10.1126/science.aaz1776

30. Võsa U, Claringbould A, Westra HJ, et al. Large-scale cis- and trans-eQTL analyses identify thousands of genetic loci and polygenic scores that regulate blood gene expression. Nature Genetics. 2021;53:1300-1310. DOI: https://doi.org/10.1038/s41588-021-00913-z

31. Ward LD, Kellis M. HaploReg v4: systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease. Nucleic Acids Research. 2016;44(D1):D877-81. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkv1340

32. Shin S, Hudson R, Harrison C, et al. atSNP Search: a web resource for statistically evaluating influence of human genetic variation on transcription factor binding. Bioinformatics. 2019;35(15):2657-2659. DOI: https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty1010

33. Xie Z, Bailey A, Kuleshov MV, et al. Gene Set Knowledge Discovery with Enrichr. Current Protocols. 2021;1(3):e90. DOI: https://doi.org/10.1002/cpz1.90

34. Jafari M, Ansari-Pour N. Why, When and How to Adjust Your P Values? Cell Journal. 2019;20(4):604-607. DOI: https://doi.org/10.22074/cellj.2019.5992

35. Davis AP, Grondin CJ, Johnson RJ, et al. Comparative Toxicogenomics Database (CTD): update 2021. Nucleic Acids Research. 2021;49(D1):D1138-D1143. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkaa891

36. Crawford KM, Gallego-Fabrega C, Kourkoulis C, et al. Cerebrovascular Disease Knowledge Portal: An Open-Access Data Resource to Accelerate Genomic Discoveries in Stroke. Stroke. 2018;49(2):470-475. DOI: https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.018922Stroke

37. Pantaleo E, Monaco A, Amoroso N, et al. A Machine Learning Approach to Parkinson's Disease Blood Transcriptomics. Genes. 2022;13(5):727. DOI: https://doi.org/10.3390/genes13050727

38. Smith LC, Moreno S, Robertson L, et al. Transforming growth factor beta1 targets estrogen receptor signaling in bronchial epithelial cells. Respiratory Research. 2018;19:160. DOI: https://doi.org/10.1186/s12931-018-0861-5

39. Howe CG, Zhou M, Wang X, et al. Associations between Maternal Tobacco Smoke Exposure and the Cord Blood CD4+ DNA Methylome. Environmental Health Perspectives. 2019;127(4):47009. DOI: https://doi.org/10.1289/EHP3398

40. Hu YC, Yang ZH, Zhong KJ, et al. Alteration of transcriptional profile in human bronchial epithelial cells induced by cigarette smoke condensate. Toxicology Letters. 2009;190(1):23-31. DOI: https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.06.860

41. Jennen DGJ, Magkoufopoulou C, Ketelslegers HB, et al. Comparison of HepG2 and HepaRG by whole-genome gene expression analysis for the purpose of chemical hazard identification. Toxicological Sciences. 2010;115(1):66-79. DOI: https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq026

42. Jiang CL, He SW, Zhang YD, et al. Air pollution and DNA methylation alterations in lung cancer: A systematic and comparative study. Oncotarget. 2017;8(1):1369-1391. DOI: https://doi.org/10.18632/oncotarget.13622

Received 11 June 2022
Revised 19 July 2022
Accepted 25 July 2022

Information about the authors

Ksenia A. Kobzeva, Student, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, E-mail: kseniya.kobzeva.0246@gmail.com, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0652-2219.

Irina V. Shilenok, Neurologist, Kursk City Clinical Emergency Hospital, Kursk, Russia, E-mail: irinka.zharikova.96@mail.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7894-8385.

Andrey E. Belykh, Cand. Sci. (Medicine), Associate Professor at the Department of Pathophysiology, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, Postdoctoral Researcher at the Dioscuri Centre for Metabolic Diseases, Nencki Institute of Experimental Biology of the Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland, E-mail: and-white@yandex.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9766-2104.

Denis E. Gurtovoy, Student, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, E-mail: dne.ar@mail.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8632-4708.

Lyubov A. Bobyleva, Student, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, E-mail: labobuleva@mail.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2014-5827.

Anna B. Krapiva, Student, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, E-mail: anny1999.10@mail.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5163-575X.

Tatiana A. Stetskaya, Cand. Sci. (Medicine), Junior Researcher at the Laboratory of Statistical Genetics and Bioinformatics, Research Institute for Genetic and Molecular Epidemiology, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, E-mail: steckaya_tatiana@mail.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4729-4654.

Marina A. Bykanova, Researcher at the Laboratory of Genomic Research, Research Institute for Genetic and Molecular Epidemiology, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, E-mail: marina.bickanova@yandex.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5420-3557.

Anastasiya A. Mezhenskaya, General Practitioner, Alekseevskaya Central District Hospital, Alekseevska, Russia, E-mail: mezhenskaya_a.a@mail.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5811-2537.

Ekaterina A. Lysikova, Research Scientist at the Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, E-mail: lysikova_katerina@mail.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0001-6521-3793.

Maxim B. Freidin, Doct. Sci. (Biology), Lecturer at the Department of Biology, School of Biological and Behavioural Sciences, Queen Mary University of London, London, United Kingdom, Senior Researcher at the Laboratory of Population Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia, E-mail: m.freydin@qmul.ac.uk, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1439-6259.

Olga Y. Bushueva, Cand. Sci. (Medicine), Associate Professor at the Department of Biology, Medical Genetics and Ecology, Head of the Laboratory of Genomic Research, Research Institute for Genetic and Molecular Epidemiology, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, E-mail: olga.bushueva@inbox.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3333-0623.

(cc) BY

DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-3-0-3 **УДК 578.76**

Study of the cytokine genes SNPs association with the characteristics of the immunological status of children with recurrent respiratory infection

Iulia A. Makarova[1], Elena D. Teplyakova[2], Maria A. Kazumian[3], Olga V. Lyangasova[1], Anzhela A. Aleksandrova[1], Elena V. Mashkina[1], Tatiana P. Shkurat[1]

[1] Southern Federal University,
105/42 Bolshaya Sadovaya St., Rostov-on-Don, 344006, Russia
[2] Rostov State Medical University,
29 Nakhichevansky Ave., Rostov-on-Don, 344022, Russia
[3] Medical College,
16A Warsaw Highway, Moscow, 117105, Russia
Corresponding author: Iulia A. Makarova (alex774makarov@mail.ru)

Abstract
Background: Herpesvirus infections are one of the most common human infections that play a special role in children with recurrent respiratory infection cohort formation. The immunological status of such children is characterized by an imbalance in all links of immunity. **The aim of the study:** To study the immunological status of RRI children and to analyze the association of SNP *-330T>G* in *IL2* and *-1082G>A* in *IL10* with the relative and absolute values of the main subpopulations of lymphocytes. **Materials and methods:** In our study, we enrolled 76 children between 10 and 17 years old who had acute respiratory infections at least 5 times a year. Flow cytometry was used for lymphocyte subpopulations analysis. Polymorphic variants were determined by allele-specific PCR. **Results:** In anti-NA EBV IgG and anti-CMV IgG positive children with *AA* genotype for the *-1082G>A IL10* polymorphism the average relative number of B-lymphocytes was 9.6%, which is below normal values (p=0.01). The average number of B-lymphocytes for heterozygotes was 12.4% (p=0.01). In the subgroup children with *GG* genotype, the average number of B-lymphocytes was 16.7% (p=0.01). In children with *AA* genotype the average level of NK cells was 19.3% (p=0.04). Children with *GG* genotype had lower level of NK cells (10.9%) (p=0.04). **Conclusion:** Our studies revealed a relationship between the immune status indicators and the genotypes for the *-1082G>A IL10* polymorphism in anti-NA EBV IgG and anti-CMV IgG positive RRI children group. The *-1082AA* genotype of the *IL10* is associated with a decrease in the relative and absolute number of B-lymphocytes, as well as with an increase in the relative number of NK cells. RRI children with *-1082GG* genotype tend to increase the relative and absolute number of B-lymphocytes, and to decrease the relative number of NK-cells.

Keywords: Epstein-Barr virus; cytomegalovirus; RRI children; IL10; IL2; B-cell; NK-cell

For citation: Makarova IA, Teplyakova ED, Kazumian MA, et al. Study of the cytokine genes SNPs association with the characteristics of the immunological status of children with recurrent respiratory infection. Research Results in Biomedicine. 2022;8(3):293-304. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-3-0-3

Introduction. Herpesvirus infections are one of the most common human infections that play a special role in children with recurrent respiratory infection cohort formation. Children with recurrent respiratory infection (RRI) have a higher incidence of acute respiratory disease (ARI) than the general population of children of the same age group. According to some authors, the category of RRI children includes those who have acute respiratory infections more than 5 times during the year; according to other authors – 8 or more times [1, 2, 3]. The practice of classifying children as RRI depending on age and disease relapses number has become widespread. According to this practice the presence of eight or more relapses of infections per year in children under three years of age, or six or more cases in children over three years of age allows to classify children as with RRI [4].

The prevalence of Epstein-Barr viral infection and cytomegalovirus infection both in the adult population and in children remains high not only in Russia, but also worldwide. Specific immunoglobulins for the Epstein-Barr virus and cytomegalovirus are detected in the vast majority of the adult population, in some regions this indicator reaches 90% and higher [5, 6, 7]. The percentage of children infected with the Epstein-Barr virus and cytomegalovirus depends on age, but on average remains quite high, about 70% for the Epstein-Barr virus infection [7, 8].

Studies have shown a higher frequency and duration of acute respiratory infections, as well as their severity when infected with herpes viruses, in comparison with uninfected children. The immunological status of such children is characterized by an imbalance in all links of immunity [9, 10].

Herpesvirus infections are capable to diminish the antiviral immune response of the body, namely, they are able to evade T-cell recognition or stimulate the mutual destruction of T-cytotoxic lymphocytes, induce a decrease in their number, including by apoptosis; inhibit the action of the complement system, dendritic cells, antibodies; disrupt the transcription of interferon-stimulated genes and the presentation of viral antigens by HLA-I molecules; cause an imbalance of both cellular and humoral immunity [11-16]. One of the mechanisms contributing to the human body immune response inhibition to the herpes virus penetration is a host cytokine profile change due to the viral expression of cytokine-like proteins, such as IL-10 or IL-6 (EBV, CMV) [6, 17, 18].

Cytokines regulate intercellular interactions between human immune system cells during the immune response to virus penetration, including herpes viruses [19]. Allelic variants of cytokine genes determine the level of these molecules in human blood, which can affect the body's immune response, the clinical course and outcome of the disease, as well as the body's resistance to various viruses, including herpes viruses [20, 21].

IL10 is an immunosuppressive anti-inflammatory cytokine produced by activated T lymphocytes, including Th2, B lymphocytes, and monocyte / macrophage cells [17]. IL10 suppresses the macrophages, monocytes, and dendritic cell`s function, reducing their production of pro-inflammatory cytokines, decreases the expression of HLA-II genes, and indirectly suppresses the activity of T-lymphocytes. Although IL10 stimulates the proliferation and differentiation of B-lymphocytes, its overall effect is usually immunosuppressive [6, 22, 23, 24].

At the same time, the effect of IL-10 in the antiviral immune response can be more complex and depend on such factors as the place of virus penetration and the infectious process stage. For example, high plasma levels of IL-10 may play a protective role in early responses to human immunodeficiency virus, but persistent expression may contribute to chronic infections. In persistent infection, IL10 expression affects the antigen-presenting ability of

dendritic cells and causes T cells depletion and inhibition of their functions [17].

Promoter region of the *IL10* gene has several single nucleotide substitutions (*-592A>C, -819T>C, -1082G>A*), which are associated with increased expression of this cytokine. Homozygotes for the G allele of the *-1082G>A* polymorphism have an increased IL10 expression level, heterozygotes have an average expression level, and homozygotes for the *A* allele demonstrate a low expression level [22, 25].

IL2 or T cell growth factor refers to cytokines produced predominantly by Th1, as well as by T cytotoxic, NK cells and dendritic cells. IL2 stimulates the proliferation and differentiation of B and T cells, NK lymphocytes, and can promote induced cell death [26]. There is one SNP (*-330T>G*) in the promoter region of the *IL2* gene. The *T* allele and the *TT* genotype are associated with increased IL2 production and a possible protective effect against herpesvirus infections [27, 28].

Thus, IL2 and IL10 regulate the intensity and duration of the immune response, form the characteristics of the immune response and the susceptibility to viral infections. SNP *-330T>G* in the *IL2* gene and *-1082G>A* in the *IL10* gene affect the levels of genes transcription [29,30,31]. There are no studies concerning the analysis of the association of *IL2* and *IL10* genes genotypes with changes in lymphocyte subpopulations in CMV and EBV mix infections. In this regard, **the aim of this work** was to study the immunological status of RRI children and to analyze the association of SNP *-330T>G* in the *IL2* gene and *-1082G>A* in the *IL10* gene with the relative and absolute values of the main subpopulations of lymphocytes (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19).

Materials and methods. Samples for this study were collected at the Child Health Center No. 4 and Diagnostic Laboratory «Nauka», Rostov-on-Don (Russia). A total of 76 children, 56% boys and 44% girls, between 10 and 17 years old who had acute respiratory infections at least 5 times a year were enrolled in the study. Children with chronic respiratory diseases or children who demonstrated immunodeficiency were ruled out.

All the patients (for patients under 15 years old, the consent of legal representatives was obtained) gave their informed consent to the participation in the study, which was approved by the local Ethical Committee. All procedures were in accordance with the Declaration of Helsinki as revised in 2013.

Whole peripheral blood stabilized with K2-EDTA was used for immunological and molecular genetic studies. Blood serum was obtained for enzyme-linked immunosorbent assay.

IgG to cytomegalovirus and IgG to the nuclear antigen NA of the Epstein-Barr virus were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay with VektorCMV-IgG and VectorVEB-NA-IgG reagent kits (Vector-Best, Russia). Measurement of optical density in the wells was performed on a semi-automatic ELISA analyzer Infinite F50 (Tecan, Austria) at a wavelength of 450 nm.

Flow cytometry was used for lymphocyte subpopulations (B-lymphocytes, T-lymphocytes (T-helpers, T-cytotoxic), and NK cells) analysis. The analysis was performed on the Navios flow cytometer (Beckman Coulter, USA) using a mixture of tetraCHROME ™ CD45 / CD4 / CD8 / CD3 antibodies (Beckman Coulter, USA) and a mixture of tetraCHROME ™ CD45 / CD56 / CD19 / CD3 antibodies (Beckman Coulter, USA).

DNA was isolated from blood cells by the thermocoagulation method with the "DNA-Express-Blood" reagent kit (Lytech, Russia). Polymorphic variants *-300T>A* of the *IL2* gene and *-1082G>A* of the *IL10* gene were determined by allele-specific PCR using the SNP-Express reagent kit (Lytech, Russia).

Amplification products were separated in 2% agarose gel by horizontal electrophoresis. The results were visualized using a Gel Doc XR + UV transilluminator (Bio-Rad, USA).

Allele and genotype frequencies for the studied polymorphisms were calculated using free software (http://www.husdyr.kvl.dk/htm/kc/popgen/genetik/applets/kitest.htm). Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and comparisons among

groups were evaluated by the Chi-square (χ^2) test with a 95% confidence interval.

Quantitative variables were expressed as median and interquartile range or as percentage. The interquartile range is indicated as 25% and 75% percentiles. Comparisons of quantitative variables were made using the appropriate non-parametric Mann – Whitney test.

To conduct a correlation analysis between genotypes and indicators of the immunological status of RRI children, the Spearman correlation coefficient was used. Differences were considered statistically significant at a significance level of $p < 0.05$.

Results. Of the 76 RRI children the CMV IgG test was positive in 65 (85.5% cases). IgG to the NA EBV nuclear antigen were detected in 68 (89.54%) cases. At the same time, 61 children (80.3%) had both IgG to CMV and IgG to the nuclear antigen NA EBV, and 4 children (5.3%) did not have both tested IgGs (Table 1).

Table 1

IgG to cytomegalovirus and / or Epstein-Barr virus detection frequency in RRI children

IgG	Registration frequency, number (% ± m)
IgG to CMV	65 (85.5±4.04)
IgG toNA EBV	68 (89.5±3.52)
IgG to CMV and IgG to NA EBV	61 (80.3±4.56)
IgG to CMV or IgG to NA EBV	11 (14.5±4.04)
None	4 (5.3±2.57)

The content of B-lymphocytes, T-lymphocytes, NK-cells in RRI children corresponds to the normative parameters of the immunogram (Table 2). Immunological study did not reveal significant differences in the relative and absolute number of B-lymphocytes, T-lymphocytes (CD4 +, CD8 +), NK-cells between groups of RRI children (Table 2).

The genotype distribution of the *IL2* and *IL10* gene polymorphisms were in accordance with the Hardy-Weinberg equilibrium in all studied groups of children (Table 3).

Table 2

Distribution of immune cells in peripheral blood of RRI children`s subgroups

Parameter	Normal level in 7-17 age group*	All children (n = 76)	Anti-NA EBV IgG + Anti-CMV IgG positive children (n=61)	Anti-NA EBV IgG or Anti-CMV IgG positive children (n=11)	Anti-NA EBV IgG and Anti-CMV IgG negative children (n=4)
CD3+, %,	66-76	71.7 (65.0;76.8)	71.5 (64.5;75.5)	70.5 (65;78.9)	77.7 (73.8;79.1)
CD3+, 10^9/л	1.4-2.0	1.64 (1.34;2.19)	1.60 (1.32;2.21)	1.89 (1.28;2.32)	1.68 (1.62;1.75)
CD19+, %	12-22	12.1 (9.1;15.2)	12.4 (9.4;15.5)	10.2 (4.9;11.6)	14.4 (8.7;18.0)
CD19+, 10^9/л	0.3-0.5	0.29 (0.17;0.43)	0.30 (0.18;0.43)	0.23 (0.10;0.38)	0.36 (0.19;0.46)
CD16+, %	9-16	13.1 (8.4;20.2)	12.7 (8.4;20.9)	14.8 (10.9;24.2)	8.3 (7.1;12.1)
CD4+, %	33-41	39.8 (35.0;45.4)	39.7 (34.9;45.2)	39.1 (32.3;49.1)	40.4 (39.9;48.9)
CD8+, %	23-29	24.2 (20.4;28.0)	24.3 (20.4;27.7)	22.9 (19.3;25.9)	28.4 (23.3;31.3)

Note: * – Immunogram interpretation [32]

Relative and absolute number of B-lymphocytes in the general group of subjects and among RRI anti-NA EBV IgG and anti-CMV IgG positive children was associated with *-1082G>A IL10* genotype (Table 4). In anti-NA EBV IgG and anti-CMV IgG positive children with *AA* genotype the average relative number of B-lymphocytes was 9.6%, which is below normal values (Fig. 1). Only 35.7% blood samples of anti-NA EBV IgG and anti-CMV IgG positive children with *AA* genotype corresponded to the reference values of B-lymphocytes number. At the same time, in heterozygotes for the *-1082G>A IL10* gene polymorphism, 52.8% of anti-NA EBV IgG and anti-CMV IgG positive children were characterized by normal B-cell levels. The average number of B-lymphocytes for heterozygotes was 12.4% (Fig. 1). In the subgroup anti-NA EBV IgG and anti-CMV IgG positive children with

GG genotype, the average number of B-lymphocytes was 16.7%. Only in this subgroup were children with B-cell levels exceeding the reference values (Fig. 1). Thus, it was found that in anti-NA EBV IgG and anti-CMV IgG positive children, the level of B-lymphocytes correlates with the genotype for the *-1082G>A* polymorphism of the *IL10* gene.

Table 3

Genotypes and alleles frequency for *IL2* and *IL10* genes polymorphisms in RRI children with IgG to NA EBV and CMV, seronegative children and children only with IgG to NA EBV or only IgG to CMV

Genotype, allele	All children (n = 76)	(1) Anti-NA EBV IgG + Anti-CMV IgG positive children (n=61)	(2) Anti-NA EBV IgG or Anti-CMV IgG positive children (n=11)	χ^2_1(p)	(3) Anti-NA EBV IgG and Anti-CMV IgG negative children (n=4)	χ^2_2(p)	χ^2_3(p)
IL10 -1082G>A							
A/A	0.25 (19)	0.229 (14)	0.273 (3)	1.95 (0.38)	0.500 (2)	1.9 (0.37)	4.32 (0.12)
A/G	0.59 (45)	0.590 (36)	0.727 (8)		0.250 (1)		
G/G	0.16 (12)	0.181 (11)	0 (0)		0.250 (1)		
PXB (χ^2)	2.87 (p=0.09)	2.05 (p=0.15)	3.59 (p=0.06)		0.87 (p=0.35)		
A	0.546	0.525	0.636	0.94 (0.33)	0.625	0.3 (0.58)	0 (0.96)
G	0.454	0.475	0.364		0.375		
IL2 -330T>G							
T/T	0.39 (30)	0.393 (24)	0.364 (4)	3.56 (0.17)	0.500 (2)	1.81 (0.41)	0.23 (0.88)
T/G	0.49 (37)	0.525 (32)	0.364 (4)		0.250 (1)		
G/G	0.12 (9)	0.082 (5)	0.272 (3)		0.250 (1)		
PXB (χ^2)	0.22 (p=0.64)	1.59 (p=0.21)	0.78 (p=0.38)		0.87 (p=0.35)		
T	0.638	0.656	0.545	0.98 (0.32)	0.625	0.03 (0.86)	0.15 (0.69)
G	0.362	0.344	0.455		0.375		

Note: χ^2_1 -group 1 compared to 2; χ^2_2 – group 1 compared to 3; χ^2_3 – group 2 compared to 3. HWE – Hardy-Weinberg equilibrium.

Table 4

Correlation between immunological status and *IL2, IL10* SNP genotypes in anti-NA EBV IgG and anti-CMV IgG positive RRI children

Parameter	All children (n = 76)		Anti-NA EBV IgG + Anti-CMV IgG positive children (n=61)		Anti-NA EBV IgG or Anti-CMV IgG positive children (n=11)		Anti-NA EBV IgG and Anti-CMV IgG negative children (n=4)	
	-330T>G IL2	***-1082G>A IL10***	***-330T>G IL2***	***-1082G>A IL10***	***-330T>G IL2***	***-1082G>A IL10***	***-330T>G IL2***	***-1082G>A IL10***
CD3+, %,	0.01	-0.01	0.02	0.05	0.10	0	-0.63	-0.63
CD3+, 10^9/л	0.01	0.02	0.05	0.08	-0.16	0.19	-0.94	-0.32
CD19+, %	-0.19	0.28* (p=0.01)	-0.12	0.41* (p=0.01)	-0.34	0.06	0.32	0.95
CD19+, 10^9/л	-0.14	0.23* (p=0.04)	-0.06	0.28* (p=0.03)	-0.33	0.06	0.31	0.95
CD16+, %	0.13	-0.20	0.08	-0.28* (p=0.04)	0.33	0.07	0.74	-0.31
CD4+, %	-0.18	0.05	-0.13	0.05	-0.49	-0.03	-0.32	-0.94
CD8+, %	0.08	-0.04	0.05	-0.002	0.29	0.39	-0.21	0.63

Note: * – $p<0.05$

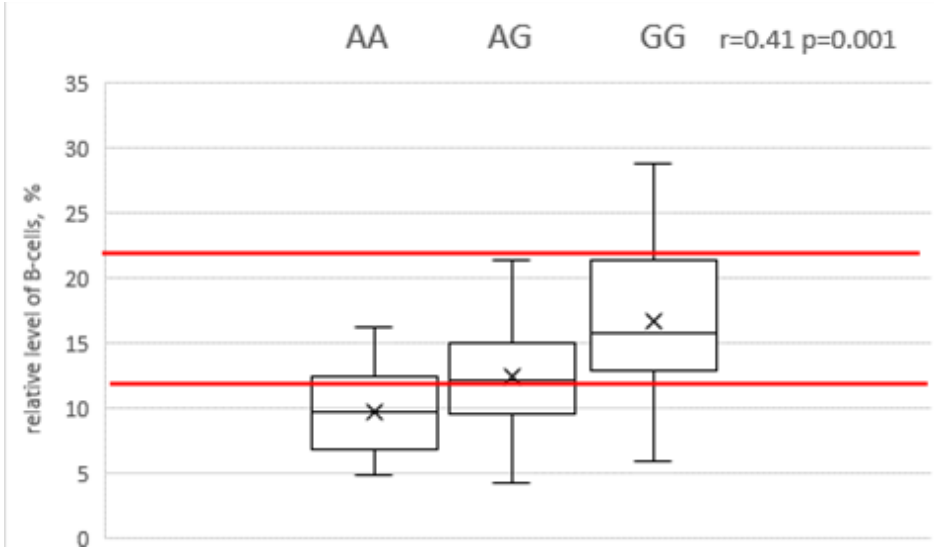


Fig. 1. The average relative level of B-lymphocytes in anti-NA EBV IgG and anti-CMV IgG positive children with different *IL10 -1082G>A* genotype. Two horizontal lines indicate reference values

In addition, in the group of anti-NA EBV IgG and anti-CMV IgG positive RRI children an inverse relationship was found between *-1082G>A IL10* polymorphism and the relative number of NK cells ($p < 0.05$) (Fig. 2). In children with *AA* genotype the average level of NK cells was 19.3% (Fig. 2). In 57.2% of cases the relative number of NK cells was higher than the reference values, in 21.4% cases children with the *AA* genotype had normal and reduced values of NK cells. In heterozygotes the average level of NK cells was 15.3%. Children with *GG* genotype had even lower average level of NK cells (10.9%) (Fig. 2). At the same time, only in 18.1% of cases the relative number of NK cells was above reference values (Fig. 2).

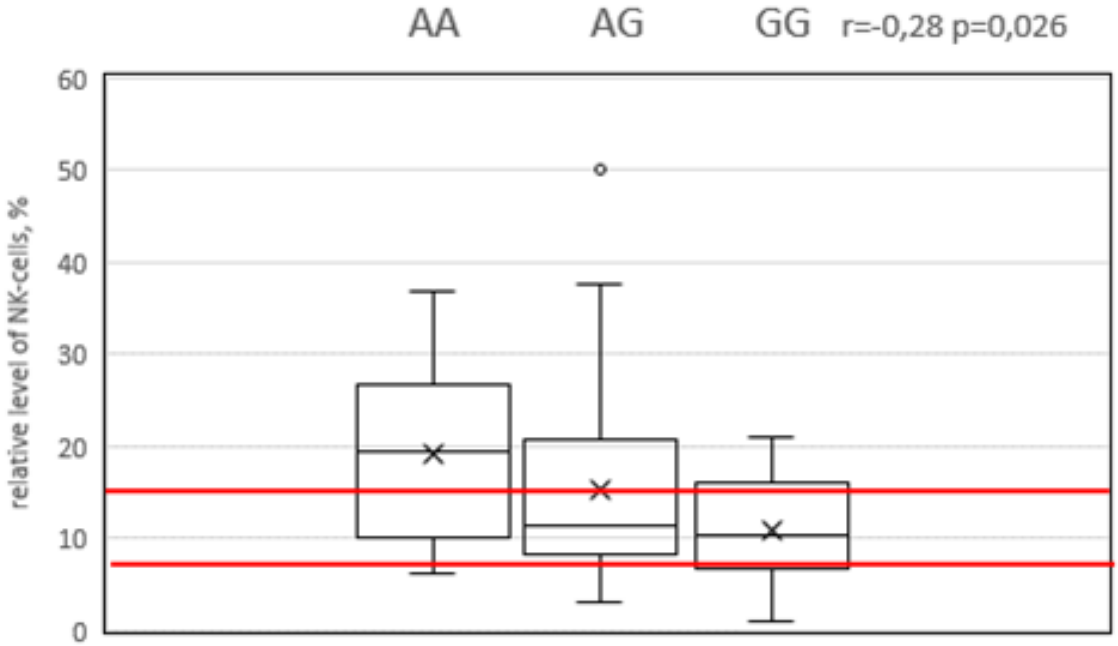


Fig. 2. The average relative level of NK-cells in anti-NA EBV IgG and anti-CMV IgG positive children with different *IL10 -1082G>A* genotype. Two horizontal lines indicate reference values

The highest correlation coefficients were found for a subgroup of Anti-NA EBV IgG and Anti-CMV IgG negative children. However, the small size of this subgroup does not allow us to speak about the significance of this correlation. Still, there are several facts worth paying attention to. First, the age of children in this subgroup ranged from 11 to 17 years. Secondly, three out of 4 children are homozygous for both studied SNPs of cytokine genes (1 child has the *-330AA IL2 / -1082GG IL10* genotype; 2 children have the *-330TT IL2 / -1082AA IL10* genotype). Further research is required to investigate the possible relationship between the immunological status of RRI seronegative children and their genotype for allelic variants of cytokines genes and other immune system factors.

Discussion. Persistent viruses, including herpes viruses, affect all components of the body's immune defense. Herpes viruses disrupt the immune cells balance, providing an opportunity not only to penetrate the human body, thereby causing an acute infection, but also have passive and active self-defense systems that cause long-term latent or chronic infections. Persistence of herpes viruses is often characterized by immune cells imbalance and their functional insufficiency [33]. It is known that viral IL-10 synthesized by EBV and CMV exhibits inhibitory activity identical to human IL-10 [17, 34, 35]. However, viral IL-10 lacks immunostimulating properties [36, 37].

Viruses are eliminated from the human body through the mechanism of NK cell activation [38]. Latent cytomegalovirus and Epstein-Barr viral infections are associated with a reduced level of NK cell production, which is one of the factors in establishing viral persistence [39,40,41]. In addition, the Epstein-Barr viral infection is often characterized by suppression of the T-cell link of immunity, T-lymphocytes and T-helpers number decrease, T-cytotoxic cells increase, as well as an IRI index decrease [40]. The data on the immunological status of cytomegalovirus infected children are contradictory, but there is animbalance in the cellular component of immunity. Cytomegalovirus infected RRI children significantly differ incellular immunity indicators fromRRI children without confirmed cytomegalovirus disease [39].

In the framework of our study, the levels of T cells, B lymphocytes, and NK cells detected were not specific for Anti-NA EBV IgG or Anti-CMV IgG positive RRI children, but observed in RRI children, regardless of their serological status. We have not revealed any strictly specific changes caused by the transferred cytomegalovirus and Epstein-Barr viral infections.

The relationships between the genetic component immune system and the immune status of RRI children in connection with CMV or EBV infection seem to be insufficiently studied. There are very few works devoted to this topic, most of them are aimed at studying certain aspects of the immune status of children with CMV or EBV, without studying the genetic component [29, 31]. There are no studies concerning the analysis of the association of IL2 and IL10 genes genotypes with changes in lymphocyte subpopulations in CMV and EBV mix infections.

Our studies revealed a certain relationship between the immune status indicators and the genotypes for the *-1082G>A IL10* gene polymorphism in anti-NA EBV IgG and anti-CMV IgG positive RRI children group.

IL10 is a key anti-inflammatory cytokine produced by activated immune cells. The effects of IL10 on different immune cells are varied. It inhibits the expression of proinflammatory cytokines by T-helper type 1, NK-cells, monocytes, macrophages and dendritic cells and inhibits the activation of T-helpers. At the same time, IL10 activates the proliferation and differentiation of T-cytotoxic, B-lymphocytes and antibodies production [6, 22, 23, 24, 42, 43, 44]. The level of interleukin 10 content, in turn, can influence the body's resistance to infection by a number of viruses, including herpes viruses, as well as the possibility of developing latent infection, its chronicity and reactivation [22, 23, 43].

Polymorphism *-1082G>A* (rs 1800896) *IL10* affects the gene expression level. Thus, the *GG* genotype is associated with increased

cytokine production, a more distinct dysregulationin the humoral link of immunity and a decrease in the antiviral defense of the body as a whole [6, 23, 24, 44].

Increased IL10 production can help prevent infection. The explanation for persistent seronegativeness in some subjects is the destruction of the virus at the onset of infection [17, 22, 45, 46]. With a later course of infection, increased secretion of IL10, in turn, is one of the factors in the development of persistence and disease chronicity, since an IL10 excess leads to a decrease in the body's anti-infective defense [23, 43].

The RRI children immune status and SNP genotypes correlation analysis showed that the *-1082AA* genotype of the *IL10* is associated with a decrease in the relative and absolute number of B-lymphocytes, as well as with an increase in the relative number of NK cells in anti-NA EBV IgG and anti-CMV IgG positive RRI children group. At the same time, RRI children with *-1082GG* genotype tend to increase the relative and absolute number of B-lymphocytes, and to decrease the relative number of NK-cells.

IL10 regulates the survival, proliferation and differentiation of B cells (by stimulating the expression of hTERT, activating telomerase in B cells, stimulating the differentiation of plasma cells due to memory B cells) [17, 35, 47, 48]. Thus, it can be assumed that the increased production of *IL10* in the *-1082GG* genotype may contribute to an increase in the total number of B-lymphocytes.

According to the literature, it is known that IL10 promotes the proliferation of NK cells and can act as a survival factor for activated NK cells [17, 49]. At the same time, some authors have noted the ability of IL10 to suppress the activation of NK cells and their production of proinflammatory cytokines, including IFNγ [50, 51].

It can be assumed that cytokine-like proteins of viral origin, or rather the ratio of concentrations and activity of human and viral molecules, play a certain role in the spectrum formation and level of immune cells in RRI children. The correlations we revealed between the SNP genotype of the *IL10*, and the number of B lymphocytes and NK cells are characteristic for the subgroup of children with IgG to CMV and NA EBV. These viruses can produce cytokine-like compounds that affect human immune system functioning. Researchers note a short-term effect of CMV IL-10 on human NK cells leading to a significant increase in their cytotoxicity [52]. CMV IL-10 and EBV IL-10 stimulate the survival and proliferation of B-lymphocytes [17, 53].

A relative change in the subpopulation composition of lymphocytes, namely, a decrease in the number of NK cells and a simultaneous increase in the number of B lymphocytes, can probably contribute to the chronicity of the inflammatory process. An imbalance in the production of cytokines between Th1 and Th2 towards the predominance of Th2 production, an increase in the population of B cells, and the production of antibodies contributes to a shift towards the humoral link of immunity, as well as viral persistence and the transition of the disease to the chronic stage [6]. In addition, the lack of NK cells, as one of the most important components of the innate defense of the body, designed to control the penetration of viruses, their destruction and elimination from the body leads to a decrease in the antiviral defense of the body at the early stages of the development of infection [17, 51, 54, 55].

Conclusion. The results of the present study found no significant difference between the *-1082G>A IL10* gene polymorphism and the *-330T>G IL2* gene polymorphism allele and genotype frequencies distribution for the studied groups of children. However, a correlation has been established between the immune status indicators of Anti-NA EBV IgG and Anti-CMV IgG positive RRI children, namely, the number of B cells and NK cells, and genotypes for the *-1082G>A* (rs 1800896) *IL10* polymorphism. The revealed correlations require verification, confirmation on large samples. It is also necessary to analyze the presence of such correlations with the presence of antibodies to other infectious agents.

Financial support

This study was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian

Federation № 0852-2020-0028 and was performed with the equipment of the Center of collective use «High technologies» (Southern Federal University).

Conflict of interests

The authors have no conflict of interest to declare.

References

1. Avezova GS, Qosimova SM. Frequently affecting children: prevalence and risk factors. European research. 2017; 5(28). Russian.

2. Morozov SL. Frequently ill children: state-of-the-art. Russian medical journal. Medical review. 2019;3(8):7-9. Russian.

3. Munteanu AN, Surcel M, Huică RI, et.al. Peripheral immune cell markers in children with recurrent respiratory infections in the absence of primary immunodeficiency. Experimental and Therapeutic Medicine. 2019;18(3):1693-1700. DOI: https://doi.org/10.3892/etm.2019.7714

4. Schaad UB, Esposito S, Razi CH. Diagnosis and management of recurrent respiratory tract infections in children: a practical guide. Archives of Pediatric Infectious Diseases. 2016;4(1):e31039. DOI: https://doi.org/10.5812/pedinfect.31039

5. Shcherbak VA, Popova NG, Stepanova NN. Cytomegalovirus infection in newborns: a need to challenge long-established ideas. Clinical Practice in Pediatrics. 2015;10(1):46-53. Russian.

6. Popov MM, Liadova TI, Sorokina OG. Features of cytokine production in different forms of Epstein-Barr virus infection. Actual Problems of the Modern Medicine: Bulletin of Ukrainian Medical Stomatological Academy. 2018;(1):69-76. Russian. DOI: https://doi.org/10.26565/2617-409X-2018-1-12

7. Smatti MK, Al-Sadeq DW, Ali NH, et al. Epstein–Barr virus epidemiology, serology, and genetic variability of LMP-1 oncogene among healthy population: an update. Frontiers in Oncology. 2018;8:211. DOI: https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00211

8. Dowd JB, Palermo T, Brite J, et al. Seroprevalence of Epstein-Barr virus infection in US children ages 6-19, 2003-2010. PLoS ONE. 2013;8(5):e64921. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064921

9. Smilianska M, Volianskyi A, Peremot S. et al. Effect of herpesvirus persistence on the formation of a specific immune response in children. Annals of Mechnikov's Institute. 2018;(3):52-56. DOI: https://doi.org/10.5281/zenodo.1456560

10. Solomay TV, Semenenko TA, Karazhas NV, et al. Features of change of immune status indicators in individuals with active and latent forms of herpesvirus infections. Perm Medical Journal. 2021;38(1):46-63. Russian. DOI: https://doi.org/10.17816/pmj38146%63

11. Ivanova ON. Features of the immune status in children with virus infection Epstein-Barr. Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. 2016;(5):79. Russian.

12. Shamsheva OV, Kharlamova FS, Egorova NYu, et al. The Results of Long-term Study of Herpesvirus Infection at the Department of Infectious Diseases in Children of Russian National Research Medical University. Children infections. 2017;16(2):5-12. Russian. DOI: https://doi.org/10.22627/2072-8107-2017-16-2-5-12

13. Berezhniy VV, Bondarets YI. Persistence of herpes virus infection in children and its role in juvenile rheumatoid arthritis (a literature review). Sovremennaya pediatriya. 2018;6(94):59-69. Russian. DOI: https://doi.org/10.15574/SP.2018.59

14. Ivanova ON. The study of immunity in children with herpetic infection. Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. 2018;(5):9. Russian.

15. Soloveva IL, Shalunova LA, Soloveva AA, et al. The peculiarities of immune response in children with recurrent respiratory diseases, infected with the virus Epstein-Barr. Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. 2019;(3):171. Russian.

16. Jackson SE, Sedikides GX, Okecha G, et al. Generation, maintenance and tissue distribution of T cell responses to human cytomegalovirus in lytic and latent infection. Medical Microbiology and Immunology. 2019;208(3):375-389. DOI: https://doi.org/10.1007/s00430-019-00598-6

17. Rojas JM, Avia M, Martín V, et al. IL-10: a multifunctional cytokine in viral infections. Journal of Immunology research 2017. 2017;2017:6104054. DOI: https://doi.org/10.1155/2017/6104054

18. Clement M, Humphreys IR. Cytokine-mediated induction and regulation of tissue damage during cytomegalovirus infection. Frontiers in Immunology. 2019;10:78. DOI: https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00078

19. O'Connor CM, Sen GC. Innate Immune Responses to Herpesvirus Infection. Cells. 2021:10(8):2122. DOI: https://doi.org/10.3390/cells10082122

20. Usychenko EN, Usychenko EM, Bazhora YI. Immune status and gene polymorphism of cytokines IL-10, IL-4, TNF in patient with chronic hepatitis C depending on degree of fibrosis. Vestnik VGMU. 2017;16(1):50-58. Russian. DOI: https://doi.org/10.22263/2312-4156.2017.1.50

21. Ovsyannikova IG, Haralambieva IH, Crooke SN, et al. The role of host genetics in the immune response to SARS-CoV-2 and COVID-19 susceptibility and severity. Immunological Reviews. 2020;296(1):205-219. DOI: https://doi.org/10.1111/imr.12897

22. Hurme M, Haanpää M, Nurmikko T, et al. IL-10 gene polymorphism and herpesvirus infections. Journal of Medical Virology. 2003;70(S1):S48-S50. DOI: https://doi.org/10.1002/jmv.10320

23. Ragimova ND, Guliev ND. Clinical and immunogenetic features of neonates with perinatal infections. Kazan Medical Journal. 2017;98(3):362-369. Russian.

24. Li Q, He H, Guo Y, et al. Impact of IL-10-1082A/G gene polymorphism on the severity of EV71 infection in Chinese children. Archives of Virology. 2018;163(2):501-508. DOI: https://doi.org/10.1007/s00705-017-3626-4

25. Jafarova TS. Single nucleotide polymorphism at position -1082 (a/g) in interleukin-10 gene promoter region in the newborns with necrotic enterocolitis. Journal of New Medical Technologies. 2020;3:38-41. Russian. DOI: https://doi.org/10.24411/1609-2163-2020-16645

26. Salloom DF. Interleukin-2 serum level, genetic polymorphism (rs2069763), anti-rubella antibody and risk of multiple sclerosis among Iraqi patients. Meta Gene. 2020;23:100642. DOI: https://doi.org/10.1016/j.mgene.2019.100642

27. Cano P, Han FS, Wang HL, et al. Cytokine gene polymorphisms affect reactivation of cytomegalovirus in patients with cancer. Cytokine. 2012;60(2):417-422. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.07.018

28. Lin R, Fan Z, Zhao K, et al. Cytokine gene polymorphisms and Epstein-Barr virus infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Blood. 2015;126(23):3125. DOI: https://doi.org/10.1182/blood.V126.23.3125.3125

29. Van Den Heuvel D, Jansen MAE, Dik WA, et al. Cytomegalovirus-and Epstein-Barr Virus–induced T-cell expansions in young children do not impair naive t-cell populations or vaccination responses: The Generation R Study. Journal of Infectious Diseases. 2016;213(2):233-242. DOI: https://doi.org/10.1093/infdis/jiv369

30. Fu DH, Deng WJ, Yang Z, et al. Association between polymorphisms in the interleukin-10 gene and susceptibility to human immunodeficiency virus-1 infection: A systematic review and meta-analysis. Medicine. 2020;99(48). DOI: https://doi.org/10.1097/MD.0000000000023069

31. Lam JK, Azzi T, Hui KF, et al. Co-infection of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus diminishes the frequency of CD56dimNKG2A+ KIR− NK cells and contributes to suboptimal control of EBV in immunosuppressed children with post-transplant lymphoproliferative disorder. Frontiers in Immunology. 2020;11:1231. DOI: https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01231

32. Yarets YuI. Interpretation of immunogram results. Gomel: GU «RNPTS RMiECH»; 2020. Russian.

33. Trebukhov AV, Zhizheleva VYu, Maltseva MV, et al. Features of the immune status of often and long-term sick children — residents of the Altai Territory. Journal of Siberian Medical Sciences. 2019;4:30-40. DOI: https://doi.org/10.31549/2542-1174-2019-4-30-40

34. Hsu DH, de Waal Malefyt R, Fiorentino DF, et al. Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1. Science. 1990;250(4982):830-832. DOI: https://doi.org/10.1126/science.2173142

35. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annual Review of Immunology. 2001;19(1):683-765. DOI: https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.683

36. Suzuki T, Tahara H, Narula S, et al. Viral interleukin 10 (IL-10), the human herpes virus 4 cellular IL-10 homologue, induces local anergy to allogeneic and syngeneic tumors. Journal of Experimental Medicine. 1995;182(2):477-486. DOI: https://doi.org/10.1084/jem.182.2.477

37. Haig DM, Thomson J, McInnes C, et al. Orf virus immuno-modulation and the host immune response. Veterinary Immunology and Immunopathology. 2002;87(3-4):395-399. DOI: https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00087-9

38. Keltsev VA, Grebenkina LI, Petrova EV, et al. Functional state and relationship of the immune and endocrine systems in patients with Epstein-Barr viral mononucleosis. Children infections. 2005;4(1):29-32. Russian.

39. Yulish EI, Ivanova LA, Chernysheva OE, et al. The state of immunity in the different course of cytomegalovirus infection in children, often and for a long time suffering from respiratory diseases. Child health. 2008;5:14. Russian.

40. Simovanyan EN, Denisenko VB, Grigoryan AV, et al. Epstein-Barr Virus Infection in Children: Improving the Diagnosis and Treatment Program. Children infections. 2016;15(1):15-23. Russian.

41. Logvinova OL, Pomazunovskaya EP, Sokur OS. Congenital cytomegalovirus infection: ICCRG guidelines and management aspects that are at the stage of clinical trials. Child's Health. 2018;13(2):187-193. Russian. DOI: https://doi.org/10.22141/2224-0551.13.2.2018.129553

42. Helminen M, Lahdenpohja N, Hurme M. Polymorphism of the interleukin-10 gene is associated with susceptibility to Epstein-Barr virus infection. Journal of Infectious Diseases. 1999;180(2):496-499. DOI: https://doi.org/10.1086/314883

43. Tzygan VN, Ivanov AM, Kamilova TA, et al. Genetical polymorphism of cytokines. Vestnik Rossiyskoy voyenno-meditsinskoy akademii. 2010;(2):211-219. Russian.

44. Ip WE, Hoshi N, Shouval DS, et al. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. Science. 2017;356(6337):513-519. DOI: https://doi.org/10.1126/science.aal3535

45. Yaghobi R, Alizadeh F, Khodavandi A. Interaction between Herpes Virus Infections and IL10 and Risk of Bone Marrow Suppression. International Journal of Organ Transplantation Medicine. 2018;9(3):119.

46. Tang N, Huang J, Chen C, et al. Polymorphisms and haplotypes of IL2RA, IL10, IFNG, IRF5, and CCR2 are associated with Epstein–Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in children. Pediatric Blood and Cancer. 2021;38(8):e29097. DOI: https://doi.org/10.1002/pbc.29097

47. Serebrennikova S, Seminsky I, Semenov N, et al. Interleukin-1, interleukin-10 in regulation of inflammatory process. Siberian Medical Journal. 2012;115(8):5-7. Russian.

48. Gavrilova MV, Snegireva NA, Sidorova EV. Influence of Breg and IL-10 upon humoral immune response. Medical Immunology (Russia). 2016;18(4):331-338. Russian. DOI: https://doi.org/10.15789/1563-0625-2016-4-331-338

49. Stacey MA, Marsden M, Wang EC, et al, Humphreys IR. IL-10 restricts activation-induced death of NK cells during acute murine cytomegalovirus infection. The Journal of Immunology. 2011;187(6):2944-2952. DOI: https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101021

50. Scott MJ, Hoth JJ, Turina M, et al, Cheadle WG. Interleukin-10 suppresses natural killer cell but not natural killer T cell activation during bacterial infection. Cytokine. 2006;33(2):79-86. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cyto.2005.12.002

51. Littwitz-Salomon E, Malyshkina A, Schimmer S, et al. The cytotoxic activity of natural killer cells is suppressed by IL-10+ regulatory T cells during acute retroviral infection. Frontiers in Immunology. 2018;9:1947. DOI: https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01947

52. Holder KA, Grant MD. Human cytomegalovirus IL-10 augments NK cell cytotoxicity. Journal of Leukocyte Biology. 2019;106(2):447-454. DOI: https://doi.org/10.1002/JLB.2AB0418-158RR

53. Poole E, Neves TC, Oliveira MT, et al. Human Cytomegalovirus Interleukin 10 Homologs: Facing the Immune System. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2020;10:245. DOI: https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00245

54. Paolini R, Bernardini G, Molfetta R, et al. NK cells and interferons. Cytokine and Growth Factor Reviews. 2015;26(2):113-120. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.11.003

55. Farrell HE, Bruce K, Lawler C, et al. Type 1 interferons and NK cells limit murine cytomegalovirus escape from the lymph node subcapsular sinus. PLoS Pathogens. 2016;12(12):e1006069. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006069

Received 22 March 2022
Revised 20 May 2022
Accepted 27 May 2022

Information about the authors

Iulia A. Makarova, Post-graduate Student in Scientific Specialty 1.5.7 – Genetics, Academy of Biology and Biotechnologies, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia, E-mail: alex774makarov@mail.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9482-0602.

Elena D. Teplyakova, Doct. Sci. (Medicine), Associate Professor at the Department of Children's Diseases №3, Rostov State Medical University,

Rostov-on-Don, Russia, E-mail: elenatepl@rambler.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3585-7026.

Maria A. Kazumian, Head of the Department of Practical Training, Medical College, Moscow, Russia, E-mail: mkramn@inbox.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0877-6914.

Olga V. Lyangasova, Researcher, Academy of Biology and Biotechnologies, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia, E-mail: oll@sfedu.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8104-3763.

Anzhela A. Aleksandrova, Cand. Sci. (Biology), Associate Professor, Academy of Biology and Biotechnologies, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia, E-mail: aalexandrova@mail.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1948-4995.

Elena V. Mashkina, Doct. Sci. (Biology), Professor, Academy of Biology and Biotechnologies, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia, E-mail: lenmash@sfedu.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4424-9508.

Tatiana P. Shkurat, Doct. Sci. (Biology), Head of the Department of Genetics, Academy of Biology and Biotechnologies, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia, E-mail: tshkurat@sfedu.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0001-6197-7374.

CC BY

DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-3-0-4 **УДК 618.3-06**

Генетические маркеры тяжелого течения преэклампсии

М.Ю. Абрамова

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»,
ул. Победы, д. 85, г. Белгород, 308015, Российская Федерация
Автор для переписки: М.Ю. Абрамова (abramova_myu@bsu.edu.ru)

Резюме

Актуальность: В современной медицине пристальное внимание уделяется вопросам снижения показателей материнской заболеваемости и смертности, в структуру которых значительный вклад вносят гипертензивные расстройства гестации, в особенности преэклампсия. Сложные патоморфологические механизмы, лежащие в основе этиопатогенеза данного осложнения беременности, происходят задолго до манифестации выраженных клинических признаков, что затрудняет раннюю диагностику преэклампсии и определяет актуальность поиска новых специфичных для преэклампсии маркеров, в том числе и генетических. **Цель исследования:** Оценить ассоциации полиморфных маркеров GWAS-значимых генов-кандидатов АГ с развитием преэклампсией тяжелого течения. **Материалы и методы:** В выборку женщин с умеренным течением преэклампсии вошло 145 индивидуумов, а в выборку женщин с тяжелой преэклампсией – 72. Всем обследуемым проведено генотипирование четырех полиморфных локусов (rs8068318 *TBX2*, rs2681472 *ATP2B1*, rs4387287 *OBFC1*, rs1799945 *HFE*). Изучено эмпирическое распределение генотипов и его соответствие теоретически ожидаемому в рамках закономерности Харди-Вайнберга. Проведен логистический регрессионный анализ и изучены ассоциации полиморфных локусов с развитием преэклампсии тяжелого и умеренного течения согласно четырем генетическим моделям, с введением поправок на ковариаты. **Результаты:** Установлено, что rs8068318 гена *TBX2* ассоциирован с развитием преэклампсии тяжелого течения в рамках аллельной (OR = 0,45; p_{perm} = 0,004), аддитивной (OR = 0,46; p_{perm} = 0,002), доминантной (OR = 0,42; p_{perm} = 0,005) и рецессивной (OR = 0,22; p_{perm} = 0,04) генетических моделей. Полиморфный локус rs8068318 гена *TBX2* локализован в области гиперчувствительности к ДНКазе, регионе регуляторных мотивов ДНК к четырем факторам транскрипции, области гистоновых меток, маркирующих энхансеры и промоторы в различных органах и тканях, отрицательно регулирует экспрессию гена *TBX2-AS1* в жировой ткани и головном мозге, гена *TBX2* в щитовидной железе, и ассоциирован с уровнем альтернативного сплайсинга генов *TBX2-AS1* и *RP11-332H18.5* в различных тканях. **Заключение:** Полиморфный маркер rs8068318 гена *TBX2* ассоциирован с развитием преэклампсии тяжелого течения у населения Центрального Черноземья РФ.

Ключевые слова: преэклампсия; полиморфный локус; *TBX2*; GWAS

Для цитирования: Абрамова МЮ. Генетические маркеры тяжелого течения преэклампсии. Научные результаты биомедицинских исследований. 2022;8(3):305-316. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-3-0-4

Genetic markers of severe preeclampsia

Maria Yu. Abramova

Belgorod State National Research University,
85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia
Corresponding author: Maria Yu. Abramova (abramova_myu@bsu.edu.ru)

Abstract

Background: In modern medicine, close attention is paid to the issues of reducing maternal morbidity and mortality, to the structure of which hypertensive disorders of gestation, especially preeclampsia, make a significant contribution. The complex pathomorphological mechanisms underlying the etiopathogenesis of this pregnancy complication occur long before the manifestation of pronounced clinical signs, which complicates the early diagnosis of preeclampsia and determines the relevance of the search for new preeclampsia-specific markers, including genetic ones. **The aim of the study:** To evaluate the associations of polymorphic markers of GWAS-significant candidate genes of hypertension with the development of severe preeclampsia. **Materials and methods:** The sample of women with moderate preeclampsia included 145 individuals, and the sample of women with severe preeclampsia included 72 patients. All subjects underwent genotyping of four polymorphic loci (rs8068318 *TBX2*, rs2681472 *ATP2B1*, rs4387287 *OBFC1*, rs1799945 *HFE*). The empirical distribution of genotypes and its correspondence to the theoretically expected one within the framework of the Hardy-Weinberg regularity are studied. Logistic regression analysis was carried out and associations of polymorphic loci with the development of severe and moderate preeclampsia were studied according to four genetic models, with the introduction of corrections for covariates. **Results:** It was found that rs8068318 of the *TBX2* gene is associated with the development of severe preeclampsia in the framework of allelic (OR = 0.45; p_{perm} = 0.004), additive (OR = 0.46; p_{perm} = 0.002), dominant (OR = 0.42; p_{perm} = 0.005) and recessive (OR = 0.22; p_{perm} = 0.04) genetic models. The polymorphic locus rs8068318 of the *TBX2* gene is localized in the region of hypersensitivity to DNase, the region of DNA regulatory motifs to four transcription factors, the region of histone tags marking enhancers and promoters in various organs and tissues, negatively regulates the expression of the *TBX2-AS1* gene in adipose tissue and brain, the *TBX2* gene in the thyroid gland, and is associated with the level of alternative splicing of *TBX2-AS1* and *RP11-332H18.5* genes in various tissues. **Conclusion:** The rs8068318 polymorphic marker of the TBX2 gene is associated with the development of severe preeclampsia in the population of the Central Chernozem region of the Russian Federation.

Keywords: preeclampsia; polymorphic locus; *TBX2*; GWAS

For citation: Abramova MYu. Genetic markers of severe preeclampsia. Research Results in Biomedicine. 2022;8(3):305-316. Russian. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-3-0-4

Введение. В настоящее время, вопросы репродуктивного здоровья населения и факторов, его определяющих, рассматриваются как одни из наиболее значимых для современного населения [1]. Особое внимание уделяют показателям материнской и перинатальной смертности, как ключевым параметрам, по которым отображается экономическое и социальное благополучие населения отдельных стран. Гипертензивные расстройства беременности осложняют течение гестации в 5-15% всех случаев и ежегодно занимают лидирующие позиции среди причин материнской заболеваемости и смертности [2]. Особое место в данной группе заболеваний занимает пре-

эклампсия (ПЭ), как наиболее опасное и непредсказуемое осложнение беременности, поскольку патоморфологические процессы, лежащие в основе патогенеза ПЭ, происходят задолго до манифестации выраженных клинических признаков данного осложнения гестации [3].

Принципиальное значение в клинической практике для определения прогноза и тактики ведения данной беременности имеет разделение ПЭ на два фенотипа: с ранним началом (до 34 недели гестации) и с поздним – после 34 недели гестации [4, 5]. Нарушение инвазии вневорсинчатого цитотрофобласта и неполноценное ремоделирование спиральных маточных артерий приводит к патоморфологическим изменениям маточно-плацентарного кровотока и ранней манифестации ПЭ, в основном, тяжелого течения [6]. Развитие поздней ПЭ обусловлено, преимущественно, наличием особенностей функционирования сердечно-сосудистой системы и гемодинамики матери и сопровождается умеренным течением [7]. Тяжелое течение ПЭ сопряжено с более высокими рисками развития неблагоприятных последствий. Так у 42 % женщин с тяжелым течением ПЭ в течение года после родоразрешения сохраняется стойкая артериальная гипертензия (АГ), а в отдаленном будущем риск развития сердечно-сосудистых заболеваний более чем в 10 раз выше в сравнении с поздним формированием ПЭ умеренного течения [4, 8]. Однако, не смотря на различные молекулярные механизмы, лежащие в основе патогенеза этих фенотипов, дифференцировать между собой два типа ПЭ только на основе определения биохимических параметров не представляется возможным, что предопределяет актуальность поиска новых специфичных для тяжелого течения ПЭ маркеров [4, 9].

Не вызывает сомнений роль наследственной предрасположенности как основополагающего фактора риска. Согласно литературным данным, вклад генетических детерминант в формирование ПЭ составляет более 50%, среди которых доминирующая роль отводится материнскому геному – более 35% [10]. Многими научными коллективами изучается вклад различных групп генов-кандидатов, биологические продукты которых вовлечены в патогенез данного осложнения гестации [11]. Широко проводятся репликативные исследования однонуклеотидных полиморфных вариантов различных генов, показавших значимые ассоциации с заболеваниями, имеющие с ПЭ единые биологические механизмы развития [12]. Особую нишу среди данных работ занимают репликативные исследования GWAS-значимых полиморфных локусов, ассоциированных с формированием АГ, как одного из «ключевых» клинических симптомов ПЭ [13, 14]. Однако, стоит отметить, что полученные данные зачастую неоднозначны и имеют низкую воспроизводимость в выборках с иными этно-территориальными характеристиками, в том числе, и на территории России, что обуславливает актуальность продолжения изучения молекулярно-генетических основ ПЭ [15].

Цель исследования. Оценить ассоциации полиморфных маркеров GWAS-значимых генов-кандидатов АГ с развитием ПЭ тяжелого течения у населения Центрального Черноземья РФ.

Материалы и методы исследования. Обследовано 217 женщин с ПЭ, не имеющих между собой родственных связей (средний возраст составил 26,52±5,51 лет). В выборки для данной работы включались женщины русского этноса, родившиеся и проживающие на территории Центрального Черноземья России и давшие добровольное согласие на участие в исследовании. Критерии исключения установлены следующие: диагностированные заболевания матки (фибромиома матки, аномалии развития внутренних половых органов), иная патология гестации (резус-конфликт, аномалии прикрепления и расположения плаценты, плацентарная недостаточность с синдромом задержки роста плода), врожденные пороки развития плода, многоплодная беременность. В выборку женщин с ПЭ умеренного течения вошло 145 лиц, а в выборку женщин, у которых отмечались клинические признаки тяжелого течения ПЭ – 72 индивидуума. Диагноз ПЭ устанавливался при регистрации артериальной гипертензии при двукратном измерении на одной

руке с интервалом не менее 15 минут, и протеинурии. Верификация диагноза ПЭ тяжелого течения осуществлялась при регистрации тяжелой АГ (ДАД≥110 мм рт. ст. и/или САД≥160 мм рт. ст.) и суточной протеинурии более 5 г/л в сочетании с одним или более критериев тяжелой ПЭ, указанным в клинических рекомендациях «Гипертензивные расстройства во время беременности, в родах и послеродовом периоде. Преэклампсия. Эклампсия» (2016). При исключении же данных признаков тяжелой ПЭ и наличии только умеренного повышения АД (САД = 140-159 мм рт. ст. и/или ДАД = 90-109 мм рт. ст.) и протеинурии ≥0,3 г/л – устанавливался диагноз ПЭ умеренного течения [16]. Клиническое, клинико-анамнестическое и клинико-лабораторное обследование беременных проводились на базе Перинатального центра «Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа» под контролем этического комитета медицинского института.

Молекулярно-генетическое исследование четырех однонуклеотидных полиморфизмов (rs8068318 *TBX2*, rs2681472 *ATP2B1*, rs4387287 *OBFC1*, rs1799945 *HFE*) осуществлялось стандартным методом ПЦР-синтеза с использованием TagMan зондов на амплификаторе CFX-96 Real Time System (BioRad, США). Выделение геномной ДНК производилось из лейкоцитов периферической венозной крови обследуемых женщин методом фенол-хлороформной экстракции [17]. При помощи спектрофотометра Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) проведено измерение концентрации и оценка качества выделенной ДНК. Основанием для включения полиморфных вариантов в данное исследование и последующего генотипирования являлось наличие ассоциаций с развитием АГ, которые достигли полногеномного уровня значимости ($p \leq 5 \times 10^{-8}$) по данным двух и более GWAS-исследований и наличие значимого регуляторного потенциала согласно материалам онлайн-ресурса HaploReg (v.4.1) (http://compbio.mit.edu/HaploReg). Выполнен сравнительный анализ эмпирического распределения генотипов рассматриваемых полиморфных маркеров и его соответствие теоретически ожидаемому согласно закономерности Харди-Вайнберга (отклонения принимались за статистически значимые при $p \leq 0,05$). Проведен логистический регрессионный анализ и изучены ассоциации полиморфных локусов (rs8068318 *TBX2*, rs2681472 *ATP2B1*, rs4387287 *OBFC1*, rs1799945 *HFE*) с развитием ПЭ тяжелого и умеренного течения. Тестировались четыре генетические модели: аллельная, аддитивная, рецессивная и доминантная [18] с введением поправок на ковариаты (возраст, наследственная отягощенность по ПЭ, индекс массы тела в период, предшествующий наступлению гестации). В рамках генетического анализа выполнялась коррекция на множественные сравнения с использованием адаптивного пермутационного теста (p_{perm}). За статистически значимый принимался уровень $p_{perm} < 0,05$. Для оценки ассоциативных связей полиморфных вариантов с ПЭ были определены показатели OR (отношение шансов) и 95%CI (95% доверительный интервал для OR) [19]. Вышеуказанные статистические вычисления производились в программе PLINK v. 2.050 (http://zzz.bwh.harvard.edu/plink).

Для полиморфных вариантов, показавших значимые ассоциации с развитием ПЭ тяжелого течения, проведена оценка их связи с уровнем транскрипционной активности (eQTL) и альтернативного сплайсинга генов (sQTL) [20] согласно данным проекта Genotype-Tissue Expression (GTEx) (http://www.gtexportal.org/), а эпигенетические эффекты рассмотрены с помощью онлайн-сервиса HaploReg (v4.1), http://archive.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php).

Результаты и их обсуждение. Проведенный популяционно-генетический анализ наблюдаемого распределения генотипов по изучаемым полиморфным вариантам генов-кандидатов АГ (rs8068318 *TBX2*, rs2681472 *ATP2B1*, rs4387287 *OBFC1*, rs1799945 *HFE*) показал его соответствие ожидаемому распределению согласно закономерности Харди–Вайнберга.

Выявлена ассоциативная связь полиморфного локуса rs8068318 гена *TBX2* с развитием ПЭ тяжелого течения. Согласно полученным в работе данным, аллель (OR = 2,19; 95CI = 1,30-3,73; p = 0,003) и генотип TT (OR = 2,34; 95CI = 1,23-4,46; p = 0,008) rs8068318 гена *TBX2* ассоциирован с увеличением риска развития ПЭ тяжелого течения, а минорный аллель C и генотип CC выступает в роли «протективного» фактора согласно всем четырем тестируемым генетическим моделям: аллельной (OR = 0,45; 95% CI 0,27-0,74; p = 0,0015; p_{perm} = 0,004), аддитивной (OR = 0,46; 95% CI 0,27-0,75; p = 0,0024; p_{perm} = 0,002), доминантной (OR = 0,42; 95% CI 0,23-0,77; p = 0,005; p_{perm} = 0,005) и рецессивной (OR = 0,22; 95% CI 0,05-0,98; p = 0,047; p_{perm} = 0,04) (Таблица).

Таблица (начало)

Ассоциации GWAS-значимых полиморфных локусов генов-кандидатов артериальной гипертензии с развитием ПЭ тяжелого течения

Beginning of Table

Associations of GWAS-significant polymorphic loci of candidate genes for arterial hypertension with the development of severe PE

Локусы (ген)	Аллели, генотипы	ПЭ тяжелого течения (n=72) % (n)	ПЭ умеренного течения (n=145) % (n)	OR (95%CI)	p
rs2681472 (*ATP2B1*)	G	18,06% (26)	14,14% (41)	1,33 (0,75-2,36)	0,35
	A	81,94% (118)	85,86% (249)	0,74 (0,42-1,32)	
	GG	3,26% (2)	2,00% (4)	1,00 (0,12-6,59)	1,00
	AG	29,59% (22)	24,28% (34)	1,43 (0,72-2,83)	0,33
	AA	67,15% (48)	73,72% (107)	0,71 (0,36-1,37)	0,35
	Ho/He (P_{HWE})	0,30/0,29 (1,00)	0,23/0,24 (0,49)		
	Минорный аллель G (аллельная модель)			1,32 (0,77-2,27)	0,30
	A/A vs. A/G vs. G/G (аддитивная модель)			1,38 (0,77-2,24)	0,31
	G/G + A/G vs. A/A (доминантная модель)			1,44 (0,78-2,67)	0,24
	G/G vs. A/G + A/A (рецессивная модель)			1,00 (0,18-5,59)	1,00
rs8068318 (*TBX2*)	C	18,38% (25)	33,10% (96)	0,45 (0,26-0,76)	0,003
	T	81,62% (111)	66,90% (194)	2,19 (1,30-3,73)	
	CC	3,38% (2)	10,96% (17)	0,22 (0,03-1,07)	0,06
	CT	30,01% (21)	44,29 (62)	0,59 (0,31-1,14)	0,13
	TT	66,61% (45)	44,75% (66)	2,34 (1,23-4,46)	0,008
	Ho/He (P_{HWE})	0,31/0,30 (1,00)	0,42/0,44 (0,70)		
	Минорный аллель C (аллельная модель)			0,45 (0,27-0,74)	0,0015
	C/C vs. C/T vs. T/T (аддитивная модель)			0,46 (0,27-0,75)	0,0024
	C/C + C/T vs. T/T (доминантная модель)			0,42 (0,23-0,77)	0,005
	C/C vs. T/T + T/T (рецессивная модель)			0,22 (0,05-0,98)	0,047

Таблица (окончание)

Ассоциации GWAS-значимых полиморфных локусов генов-кандидатов артериальной гипертензии с развитием ПЭ тяжелого течения

End of Table

Associations of GWAS-significant polymorphic loci of candidate genes for arterial hypertension with the development of severe PE

Локусы (ген)	Аллели, генотипы	ПЭ тяжелого течения (n=72) % (n)	ПЭ умеренного течения (n=145) % (n)	OR (95%CI)	p
rs4387287 (*OBFC1*)	A	18,06% (26)	15,14% (43)	1,23 (0,69-2,17)	0,52
	C	81,94% (118)	84,86% (241)	0,81 (0,46-1,43)	
	AA	3,26% (1)	2,29% (4)	0,48 (0,02-4,73)	0,86
	AC	29,59% (24)	25,70% (36)	1,52 (0,78-2,97)	0,23
	CC	67,15% (47)	72,01% (105)	0,71 (0,37-1,37)	0,34
	Ho/He (P_{HWE})	0,33/0,27 (0,18)	0,24/0,24 (0,73)		
	Минорный аллель A (аллельная модель)			1,18 (0,67-2,10)	0,55
	A/A vs. A/C vs. C/C (аддитивная модель)			1,20 (0,66-2,17)	0,54
	A/A + A/C vs. C/C (доминантная модель)			1,38 (0,73-2,63)	0,32
	A/A vs. A/C + C/C (рецессивная модель)			1,21 (1,40-4,00)	0,99
rs1799945(*HFE*)	G	20,83% (30)	16,55% (48)	1,32 (0,77-2,27)	0,33
	C	79,17% (114)	83,45% (242)	0,75 (0,44-1,29)	
	GG	4,34% (5)	2,62% (7)	1,47 (0,38-5,41)	0,74
	GC	32,99% (20)	27,15% (34)	1,25 (0,62-2,50)	0,59
	CC	62,67% (47)	69,64% (104)	0,74 (0,38-1,41)	0,41
	Ho/He (P_{HWE})	0,27/0,33 (0,16)	0,24/0,28 (0,13)		
	Минорный аллель G (аллельная модель)			1,28 (0,77-2,13)	0,33
	G/G vs. G/C vs. C/C (аддитивная модель)			1,24 (0,77-1,99)	0,37
	G/G + G/C vs. C/C (доминантная модель)			1,29 (0,70-2,37)	0,40
	G/G vs. G/C + C/C (рецессивная модель)			1,42 (0,43-4,67)	0,55

Примечание: OR – показатель отношения шансов, 95%CI – 95% доверительный интервал для отношения щансов, p – уровень значимости, Ho – гетерозиготность наблюдаемая, He – гетерозиготность ожидаемая, P_{HWE} – уровень значимости отклонения от закономерности Харди-Вайнберга.

Note: OR – odds ratio, 95%CI – 95% confidence interval, p – level of significance, Ho – observed heterozygosity, He – expected heterozygosity, P_{HWE} – level of significance to match the Hardy-Weinberg equilibrium.

Для полиморфного маркера rs8068318 гена *TBX2,* показавшему значимые ассоциации с развитием ПЭ тяжелого течения в рамках настоящего исследования, проведена оценка функционального потенциала с использованием данных онлайн-ресурса HaploReg (v.4.1). Получено, что изучаемый SNP локализован в регионе гиперчувствительности к ДНКазе, регионе регуляторных мотивов ДНК к четырем транскрипционным факторам: MZF1:1-4, Pax-5, RXRA, SPIB, в области гистоновых меток H3K27ac и H3K9ac, маркирующих, соответственно, активные энхансеры и промоторы в патогенетических значимых для развития ПЭ тканях (плаценте, надпочечниках и почках плода, яичниках, различных отделах головного мозга, культуре клеток фибробластов и др.). Согласно материалам ресурса GTExportal, изучаемый полиморфный локус rs8068318 гена *TBX2* отрицательно регулирует экспрессию гена *TBX2-AS1* в висцеральной жировой клетчатке (β= -0,23; $p=9,1\times10^{-11}$), коре головного мозга (β= -0,35; $p=5,7\times10^{-9}$) и гена *TBX2* в щитовидной железе (β= -0,26; $p=6,9\times10^{-12}$), ассоциирован с уровнем альтернативного сплайсинга генов *TBX2-AS1* и *RP11-332H18.5* в висцеральной жировой клетчатке ($p=1,1\times10^{-60}$), яичниках ($p=2,9\times10^{-12}$), матке ($p=2,6\times10^{-15}$) и др. Для данного полиморфного локуса установлено 15 SNPs, находящихся с ним в неравновесии по сцеплению ($r^2\geq0,8$) и имеющих значимый регуляторный потенциал. 7 из 15 сцепленных SNPs находятся в регионах ДНК, взаимодействующих с 4 регуляторными белками: POL 2, GATA2, SUZ12, CHD 2. Непосредственно изучаемый локус не относится к несинонимическим заменам, но один из сцепленных с ним SNP (rs1057987) является миссенс-мутацией ($r^2=1$, D′=1), обуславливающей замену серина на аргинин (Ser609Arg) в аминокислотной последовательности в полипептидет T-box транскрипционного фактора (TBX2).

По данным GWAS-каталога, полиморфный локус rs8068318 гена *TBX2* показал значимые ассоциации ($p\leq5\times10^{-8}$) с параметрами артериального давления (АД) и АГ по данным двух полногеномных исследований [21, 22]. Выявлено, что аллель T исследуемого полиморфного варианта ассоциирован с развитием АГ и повышением показателей САД и ДАД в европейской популяции [21], в то время как аллель C выполняет «проективную» роль в отношении развития АГ и связан с более низким уровнем АД (САД, ДАД, СрАД) [22], что полностью согласуется с полученными нами данными о «протективной» роли аллеля C для развития ПЭ тяжелого течения. В рамках полногеномного исследования, проведенного Chambers et al. (2010), установлено, что rs8068318 гена *TBX2* вовлечен в регуляцию экскреторной функции почек – аллель C ассоциирован со снижением уровня креатинина ($OR=0,80$; $p=3,4\times10^{-10}$) [23].

Ген *TBX2* кодирует белок T-box transcription factor 2 (TBX2), являющимся регулятором транскрипционной активности различных генов (https://www.uniprot.org/) и относится к членам филогенетически консервативного семейства генов с общим ДНК-связывающим мотивом (домен T-box) [24]. Ген *TBX2* вовлечен в процессы морфогенеза различных органов и систем органов в эмбриогенезе, а также выступает ключевым звеном регуляции механизмов клеточной пролиферации, дифференцировки, апоптоза и старения клеток [25-28]. В работе Fernando F. et al. (2021) получено, что при сверхэкспрессии *TBX2* в клетках миометрия снижается высвобождение провоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-2), хемоаттракантов моноцитов (CCL3, CXCL13) и фактора некроза опухоли α (TNFα), и одновременно увеличивается продукция хемокинов классов CCL7, CXCL6, CCL13, играющих важную роль в инициации родовой деятельности [29]. Аллель C полиморфного локуса rs8068318 гена *TBX2* повышает афинность (рассчитывалась как разница между LOD scores альтернативного (alt) аллеля и референсного (ref)) регуляторного мотива ДНК к фактору транскрипции RXRA (ΔLOD = 2,3). RXRA представляет собой X-рецептор ретиноидной кислоты и лиганд-индуцируемый транскрипционный фактор,

дифференциально экспрессируемый в плаценте и участвующий в регуляции трансформации пролиферативного типа трофобласта в инвазивный для последующей перестройки спиральных маточных артерий [30]. Отмечается сверхэкспрессия гена *RARRES1*, индуцируемая посредством активации RXRA и RARA в клетках трофобласта в плацентах женщин, гестация которых осложнялась ПЭ [31]. Таким образом, выявленные медико-биологические эффекты полиморфного варианта rs8068318 гена *TBX2* имеют важное этиопатогенетическое значение при формировании ПЭ.

Заключение. Полиморфный маркер rs8068318 гена *TBX2* ассоциирован с развитием ПЭ тяжелого течения у населения Центрального Черноземья РФ согласно аллельной (OR = 0,45; p_{perm} = 0,004), аддитивной (OR = 0,46; p_{perm} = 0,002), доминантной (OR = 0,42; p_{perm} = 0,005) и рецессивной (OR = 0,22; p_{perm} = 0,04) генетических моделей. Полиморфный локус rs8068318 гена *TBX2* локализован в регионе гиперчувствительности к ДНКазе, регионе регуляторных мотивов ДНК к четырем транскрипционным факторам, области гистоновых меток H3K27ac и H3K9ac, маркирующих активные энхансеры и промоторы в патогенетически значимых для развития ПЭ тканях (плаценте, надпочечниках и почках плода, яичниках, различных отделах головного мозга, культуре клеток фибробластов и др.). Полиморфный вариант rs8068318 гена *TBX2* отрицательно регулирует экспрессию гена *TBX2-AS1* в висцеральной жировой клетчатке и коре головного мозга, а также гена *TBX2* в щитовидной железе, и ассоциирован с уровнем альтернативного сплайсинга генов *TBX2-AS1* и *RP11-332H18.5* в висцеральной жировой клетчатке, яичниках, матке и др.

Информация о финансировании
Финансирование данной работы не проводилось.
Financial support
No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interests
The author has no conflict of interest to declare.

Список литературы

1. Абрамова МЮ, Чурносов МИ. Современные представления об этиологии, патогенезе и факторах риска преэклампсии. Журнал акушерства и женских болезней. 2021;70(5):105-116. DOI: https://doi.org/10.17816/JOWD77046
2. Bovee EME, Gulati M, Maas AHEM. Novel Cardiovascular Biomarkers Associated with Increased Cardiovascular Risk in Women With Prior Preeclampsia/HELLP Syndrome: A Narrative Review. European Cardiology Review. 2021;16:e36. DOI: https://doi.org/10.15420/ecr.2021.21
3. Ives CW, Sinkey R, Rajapreyar I, et al. Preeclampsia-Pathophysiology and Clinical Presentations: JACC State-of-the-Art Review. Journal of the American College of Cardiology. 2020;76(14):1690-1702. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.08.014
4. Roberts JM, Rich-Edwards JW, McElrath TF, et al. Global Pregnancy Collaboration. Subtypes of Preeclampsia: Recognition and Determining Clinical Usefulness. Hypertension. 2021;77(5):1430-1441. DOI: https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.14781
5. Wilkerson RG, Ogunbodede AC. Hypertensive Disorders of Pregnancy. Emergency Medicine Clinics of North America. 2019;37(2):301-316. DOI: https://doi.org/10.1016/j.emc.2019.01.008
6. Сюндюкова ЕГ, Чулков ВС, Рябикина МГ. Преэклампсия: современное состояние проблемы. Доктор.Ру. 2021;20(1):11-16. DOI: https://doi.org/10.31550/1727-2378-2021-20-1-11-16
7. McLaughlin K, Snelgrove JW, Sienas LE, et al. Phenotype-Directed Management of Hypertension in Pregnancy. Journal of the American Heart Association. 2022;11(7):e023694. DOI: https://doi.org/10.1161/JAHA.121.023694
8. Hauspurg A, Countouris ME, Catov JM. Hypertensive Disorders of Pregnancy and Future Maternal Health: How Can the Evidence

Guide Postpartum Management? Current Hypertension Reports. 2019;21(12):96. DOI: https://doi.org/10.1007/s11906-019-0999-7

9. Stepan H, Hund M, Andraczek T. Combining Biomarkers to Predict Pregnancy Complications and Redefine Preeclampsia: The Angiogenic-Placental Syndrome. Hypertension. 2020;75(4):918-926. DOI: https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13763

10. Burton GJ, Redman CW, Roberts JM, et al. Pre-eclampsia: pathophysiology and clinical implications. BMJ. 2019;366:l2381. DOI: https://doi.org/10.1136/bmj.l2381

11. Решетников ЕА. Полиморфизм генов, ассоциированных с возрастом менархе, и риск формирования осложнений беременности у женщин Центрально-Черноземного региона России. Научные результаты биомедицинских исследований. 2021;7(2):132-142. DOI: https://doi.org/10.18413/2658-6533-2021-7-2-0-3

12. Golovchenko OV, Abramova MY, Ponomarenko IV, et al. Locus rs833061 of the VEGF Gene in Pregnant Women with Preeclampsia Is Associated with Newborn Weight. Russian Journal of Genetics. 2022;57(9):1100-1105. DOI: https://doi.org/10.1134/S1022795421090039

13. Wan JP, Wang H, Li CZ, et al. The common single-nucleotide polymorphism rs2681472 is associated with early-onset preeclampsia in Northern Han Chinese women. Reproductive Sciences. 2014;21(11):1423-1427. DOI: https://doi.org/10.1177/1933719114527354

14. Hou B, Jia X, Deng Z, et al. Exploration of CYP21A2 and CYP17A1 polymorphisms and preeclampsia risk among Chinese Han population: a large-scale case-control study based on 5021 subjects. Human Genomics. 2020;14(1):33. DOI: https://doi.org/10.1186/s40246-020-00286-0

15. Сереброва ВН, Трифонова ЕА, Степанов ВА. Эволюционно-генетический анализ роли регуляторных участков гена CORO2A в формировании наследственной предрасположенности к преэклампсии у русских и якутов. Научные результаты биомедицинских исследований. 2018;4(3):38-48. DOI: https://doi.org/10.18413/2313-8955-2018-4-3-0-4

16. Гипертензивные расстройства во время беременности, в родах и послеродовом периоде. Преэклампсия. Эклампсия. Клинические Рекомендации (протокол лечения). Москва; 2016.

17. Yarosh SL, Kokhtenko EV, Churnosov MI, et al. Joint effect of glutathione S-transferase genotypes and cigarette smoking on idiopathic male infertility. Andrologia. 2015;47(9):980-986. DOI: https://doi.org/10.1111/and.12367

18. Polonikov A, Bykanova M, Ponomarenko I, et al. The contribution of CYP2C gene subfamily involved in epoxygenase pathway of arachidonic acids metabolism to hypertension susceptibility in Russian population. Clinical and Experimental Hypertension. 2017;39(4):306-311. DOI: https://doi.org/10.1080/10641963.2016.1246562

19. Yarosh SL, Kokhtenko EV, Starodubova NI, et al. Smoking status modifies the relation between CYP1A1*2C gene polymorphism and idiopathic male infertility: the importance of gene-environment interaction analysis for genetic studies of the disease. Reproductive Sciences. 2013;20(11):1302-1307. DOI: https://doi.org/10.1177/1933719113483013

20. Bushueva O, Solodilova M, Churnosov M, et al. The flavin-containing monooxygenase 3 gene and essential hypertension: The joint effect of polymorphism E158K and cigarette smoking on disease susceptibility. International Journal of Hypertension. 2014;2014: 712169. DOI: https://doi.org/10.1155/2014/712169

21. Surendran P, Drenos F, Young R, et al. Trans-ancestry meta-analyses identify rare and common variants associated with blood pressure and hypertension. Nature Genetics. 2016;48(10):1151-1161. DOI: https://doi.org/10.1038/ng.3654

22. Liu C, Kraja AT, Smith JA, et al. Meta-analysis identifies common and rare variants influencing blood pressure and overlapping with metabolic trait loci. Nature Genetics. 2016;48(10):1162-1170. DOI: https://doi.org/10.1038/ng.3660

23. Chambers JC, Zhang W, Lord GM, et al. Genetic loci influencing kidney function and chronic kidney disease. Nature Genetics. 2010;42(5):373-375. DOI: https://doi.org/10.1038/ng.566

24. Takagi Y, Shimada K, Shimada S, et al. SPIB is a novel prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma that mediates apoptosis via the PI3K-AKT pathway. Cancer Science. 2016;107(9):1270-1280. DOI: https://doi.org/10.1111/cas.13001

25. Chang F, Xing P, Song F, et al. The role of T-box genes in the tumorigenesis and progression of cancer. Oncology Letters. 2016;12(6):4305-4311. DOI: https://doi.org/10.3892/ol.2016.5296

26. Cho GS, Park DS, Choi SC, et al. Tbx2 regulates anterior neural specification by repressing FGF signaling pathway. Developmental Biology. 2017;421(2):183-193. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.11.020

27. Lüdtke TH, Wojahn I, Kleppa MJ, et al. Combined genomic and proteomic approaches reveal DNA binding sites and interaction partners of TBX2 in the developing lung. Respiratory Research. 2021;22(1):85. DOI: https://doi.org/10.1186/s12931-021-01679-y

28. Seya D, Ihara D, Shirai M, et al. A role of Hey2 transcription factor for right ventricle development through regulation of Tbx2-Mycn pathway during cardiac morphogenesis. Development Growth and Differentiation. 2021;63(1):82-92. DOI: https://doi.org/10.1111/dgd.12707

29. Fernando F, Veenboer GJM, Oudijk MA, et al. TBX2, a Novel Regulator of Labour. Medicina. 2021;57(6):515. DOI: https://doi.org/10.3390/medicina57060515

30. Еникеев АД, Комельков АВ, Аксельрод МЕ, и др. Неканоническая активность ретиноевой кислоты как возможный механизм формирования резистентности злокачественных клеток к ретиноидной терапии. Российский биотерапевтический журнал. 2019;18(4):43-50. DOI: https://doi.org/10.17650/1726-9784-2019-18-4-43-50

31. Hubert MA, Sherritt SL, Bachurski CJ, et al. Involvement of transcription factor NR2F2 in human trophoblast differentiation. PLoS ONE. 2010;5(2):e9417. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009417

References

1. Abramova MY, Churnosov MI. Modern concepts of etiology, pathogenesis and risk factors for preeclampsia. Journal of Obstetrics and Women's Diseases. 2021;70(5):105-116. Russian. DOI: https://doi.org/10.17816/JOWD77046

2. Bovee EME, Gulati M, Maas AHEM. Novel Cardiovascular Biomarkers Associated with Increased Cardiovascular Risk in Women With Prior Preeclampsia/HELLP Syndrome: A Narrative Review. European Cardiology Review. 2021;16:e36. DOI: https://doi.org/10.15420/ecr.2021.21

3. Ives CW, Sinkey R, Rajapreyar I, et al. Preeclampsia-Pathophysiology and Clinical Presentations: JACC State-of-the-Art Review. Journal of the American College of Cardiology. 2020;76(14):1690-1702. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.08.014

4. Roberts JM, Rich-Edwards JW, McElrath TF, et al. Global Pregnancy Collaboration. Subtypes of Preeclampsia: Recognition and Determining Clinical Usefulness. Hypertension. 2021;77(5):1430-1441. DOI: https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.14781

5. Wilkerson RG, Ogunbodede AC. Hypertensive Disorders of Pregnancy. Emergency Medicine Clinics of North America. 2019;37(2):301-316. DOI: https://doi.org/10.1016/j.emc.2019.01.008

6. Syundyukova EG, Chulkov VS, Ryabikina MG. Preeclampsia: The Modern State of the Problem. Doctor.Ru. 2021;20(1):11-16. Russian. DOI: https://doi.org/10.31550/1727-2378-2021-20-1-11-16

7. McLaughlin K, Snelgrove JW, Sienas LE, et al. Phenotype-Directed Management of Hypertension in Pregnancy. Journal of the American Heart Association. 2022;11(7):e023694. DOI: https://doi.org/10.1161/JAHA.121.023694

8. Hauspurg A, Countouris ME, Catov JM. Hypertensive Disorders of Pregnancy and Future Maternal Health: How Can the Evidence Guide Postpartum Management? Current Hypertension Reports. 2019;21(12):96. DOI: https://doi.org/10.1007/s11906-019-0999-7

9. Stepan H, Hund M, Andraczek T. Combining Biomarkers to Predict Pregnancy Complications and Redefine Preeclampsia: The Angiogenic-Placental Syndrome. Hypertension. 2020;75(4):918-926. DOI: https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13763

10. Burton GJ, Redman CW, Roberts JM, et al. Pre-eclampsia: pathophysiology and clinical implications. BMJ. 2019;366:l2381. DOI: https://doi.org/10.1136/bmj.l2381

11. Reshetnikov EA. Polymorphism of genes associated with the age at menarche and the risk of complications of pregnancy in women in the Central Black Earth Region of Russia. Research Results in Biomedicine. 2021;7(2):132-142. Russian. DOI: https://doi.org/10.18413/2658-6533-2021-7-2-0-3

12. Golovchenko OV, Abramova MY, Ponomarenko IV, et al. Locus rs833061 of the VEGF Gene in Pregnant Women with Preeclampsia Is Associated with Newborn Weight. Russian Journal of Genetics. 2022;57(9):1100-1105. DOI: https://doi.org/10.1134/S1022795421090039

13. Wan JP, Wang H, Li CZ, et al. The common single-nucleotide polymorphism rs2681472 is

associated with early-onset preeclampsia in Northern Han Chinese women. Reproductive Sciences. 2014;21(11):1423-1427. DOI: https://doi.org/10.1177/1933719114527354

14. Hou B, Jia X, Deng Z, et al. Exploration of CYP21A2 and CYP17A1 polymorphisms and preeclampsia risk among Chinese Han population: a large-scale case-control study based on 5021 subjects. Human Genomics. 2020;14(1):33. DOI: https://doi.org/10.1186/s40246-020-00286-0

15. Serebrova VN, Trifonova EA, Stepanov VA. Evolutionary-genetic analysis of the role of regulatory regions in CORO2A gene in the development of hereditary predisposition to preeclampsia in russian and yakut ethnic groups. Research Results in Biomedicine. 2018;4(3):38-48 Russian. DOI: https://doi.org/10.18413/2313-8955-2018-4-3-0-4

16. Hypertensive disorders during pregnancy, childbirth and the postpartum period. Preeclampsia. Eclampsia. Clinical Guidelines (treatment protocol). Moscow. 2016. Russian.

17. Yarosh SL, Kokhtenko EV, Churnosov MI, et al. Joint effect of glutathione S-transferase genotypes and cigarette smoking on idiopathic male infertility. Andrologia. 2015;47(9):980-986. DOI: https://doi.org/10.1111/and.12367

18. Polonikov A, Bykanova M, Ponomarenko I, et al. The contribution of CYP2C gene subfamily involved in epoxygenase pathway of arachidonic acids metabolism to hypertension susceptibility in Russian population. Clinical and Experimental Hypertension. 2017;39(4):306-311. DOI: https://doi.org/10.1080/10641963.2016.1246562

19. Yarosh SL, Kokhtenko EV, Starodubova NI, et al. Smoking status modifies the relation between CYP1A1*2C gene polymorphism and idiopathic male infertility: the importance of gene-environment interaction analysis for genetic studies of the disease. Reproductive Sciences. 2013;20(11):1302-1307. DOI: https://doi.org/10.1177/1933719113483013

20. Bushueva O, Solodilova M, Churnosov M, et al. The flavin-containing monooxygenase 3 gene and essential hypertension: The joint effect of polymorphism E158K and cigarette smoking on disease susceptibility. International Journal of Hypertension. 2014;2014: 712169. DOI: https://doi.org/10.1155/2014/712169

21. Surendran P, Drenos F, Young R, et al. Trans-ancestry meta-analyses identify rare and common variants associated with blood pressure and hypertension. Nature Genetics. 2016;48(10):1151-1161. DOI: https://doi.org/10.1038/ng.3654

22. Liu C, Kraja AT, Smith JA, et al. Meta-analysis identifies common and rare variants influencing blood pressure and overlapping with metabolic trait loci. Nature Genetics. 2016;48(10):1162-1170. DOI: https://doi.org/10.1038/ng.3660

23. Chambers JC, Zhang W, Lord GM, et al. Genetic loci influencing kidney function and chronic kidney disease. Nature Genetics. 2010;42(5):373-375. DOI: https://doi.org/10.1038/ng.566

24. Takagi Y, Shimada K, Shimada S, et al. SPIB is a novel prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma that mediates apoptosis via the PI3K-AKT pathway. Cancer Science. 2016;107(9):1270-1280. DOI: https://doi.org/10.1111/cas.13001

25. Chang F, Xing P, Song F, et al. The role of T-box genes in the tumorigenesis and progression of cancer. Oncology Letters. 2016;12(6):4305-4311. DOI: https://doi.org/10.3892/ol.2016.5296

26. Cho GS, Park DS, Choi SC, et al. Tbx2 regulates anterior neural specification by repressing FGF signaling pathway. Developmental Biology. 2017;421(2):183-193. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.11.020

27. Lüdtke TH, Wojahn I, Kleppa MJ, et al. Combined genomic and proteomic approaches reveal DNA binding sites and interaction partners of TBX2 in the developing lung. Respiratory Research. 2021;22(1):85. DOI: https://doi.org/10.1186/s12931-021-01679-y

28. Seya D, Ihara D, Shirai M, et al. A role of Hey2 transcription factor for right ventricle development through regulation of Tbx2-Mycn pathway during cardiac morphogenesis. Development Growth and Differentiation. 2021;63(1):82-92. DOI: https://doi.org/10.1111/dgd.12707

29. Fernando F, Veenboer GJM, Oudijk MA, et al. TBX2, a Novel Regulator of Labour. Medicina. 2021;57(6):515. DOI: https://doi.org/10.3390/medicina57060515

30. Enikeev AD, Komelkov AV, Akselrod ME, et al. Non-canonical activity of retinoic acid as a possible mechanism of retinoid resistance in cancer therapy. Russian Journal of Biotherapy. 2019;18(4):43-50. Russian. DOI: https://doi.org/10.17650/1726-9784-2019-18-4-43-50

31. Hubert MA, Sherritt SL, Bachurski CJ, et al. Involvement of transcription factor NR2F2 in human trophoblast differentiation. PLoS ONE. 2010;5(2):e9417. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009417

Статья поступила в редакцию 12 февраля 2022 г.
Поступила после доработки 14 марта 2022 г.
Принята к печати 5 апреля 2022 г.

Received 12 February 2022
Revised 14 March 2022
Accepted 5 April 2022

Информация об авторе
Мария Юрьевна Абрамова, ассистент кафедры медико-биологических дисциплин ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Российская Федерация, E-mail: abramova_myu@bsu.edu.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1406-2515.

Information about the author
Maria Yu. Abramova, Assistant at the Department of Medical Biological Disciplines, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, E-mail: abramova_myu@bsu.edu.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1406-2515.

ФАРМАКОЛОГИЯ, КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ
PHARMACOLOGY

(cc) BY

DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-3-0-5 **УДК 57.084.1**

Studies to elucidate the effect and antiapoptotic mechanism of 2-ethyl-3-hydroxy-6-methylpyridine-n-acetyltaurinate in a rat model of retinal ischemia–reperfusion

Svetlana V. Efimenko[1], Sofia S. Chernyaeva[1], Anna A. Peresypkina[1], Anna S. Pobeda[1], Mikhail V. Korokin[1], Evgeniya A. Beskhmelnitsyna[1], Mikhail V. Pokrovskii[1], Aleksandar M. Ćorac[2]

[1] Belgorod State National Research University,
85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia
[2] University of Pristina,
Anri Dinana bb, Kosovska Mitrovica, 38220, Serbia
Corresponding author: Anna A. Peresypkina (peresypkina_a@bsu.edu.ru)

Abstract
Background: The study of possible ways of effective correction of retinal ischemia-reperfusion injury, which accompanies a number of eye diseases, is relevant today. **The aim of the study:** To study the retinoprotective effect and antiapoptotic mechanism of 2-Ethyl-3-hydroxy-6-methyl-pyridine-N-acetyltaurinate (EHMP-NAT) in a rat model of retinal ischemia–reperfusion (I/R). **Materials and methods:** A pathology model with an increase in intraocular pressure (IOP) to 110 mmHg was used. The retinoprotective effect of EHMP-NAT at a dose of 4.4 mg/kg/day, in comparison with emoxipine and taurine in equimolar doses, was estimated by the changes in the retinal microcirculation, electroretinograms (the b/a coefficient), and retinal caspase-3, NF-κB p65, p53 gene expressions in Wistar rats. **Results:** The use of EHMP-NAT led to an increase in the retinal microcirculation level to 756.5 (median) perfusion units in comparison with emoxipine ($p = 0.045$) and taurine ($p = 0.00029$). The b/a coefficient increased in comparison with the group with emoxipine ($p = 0.0099$) and with the group with taurine ($p = 0.015$). In the group with EHMP-NAT, the caspase-3 gene expression decreased reliably in comparison with emoxipine ($p = 0.0002$) and with taurine ($p = 0.0028$); the NF-κB p65 gene expression decreased in comparison with emoxipine ($p = 0.0009$) and with taurine ($p = 0.0022$); the p 53 gene expression decreased in comparison with emoxipine ($p = 0.0022$) and with taurine ($p = 0.0009$). **Conclusion:** Based on the data obtained, in correction of retinal I/R by EHMP-NAT, improvements in the retinal microcirculation, functional state, and caspase-3, NF-κB p65, p53 gene expressions were more pronounced than in monotherapy with emoxipine or taurine.
Keywords: retinal ischemia–reperfusion; rats; 2-ethyl-3-hydroxy-6-methyl-pyridine-n-acetyltaurinate; apoptosis

For citation: Efimenko SV, Chernyaeva SS, Peresypkina AA, et al. Studies to elucidate the effect and antiapoptotic mechanism of 2-ethyl-3-hydroxy-6-methylpyridine-n-acetyltaurinate in a rat model of retinal ischemia–reperfusion. Research Results in Biomedicine. 2022;8(3):317-326. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-3-0-5

Introduction. The retina is susceptible to lipid peroxidation because it consists of lipids with high levels of polyunsaturated fatty acids, such as docosahexaenoic acid, cis-arachidonic acid and choline phosphoglyceride. Prostanoids are synthesized from arachidonic acid as a result of the sequential action of phospholipase A2 and cyclooxygenase, which are triggered by oxidative stress and peroxidation. The accumulation of peroxides ultimately contributes to the production of thromboxane A2, which is a powerful cytotoxic agent for microvessels [1]. Platelet activation factor and lysophosphatidic acid are other lipids formed during lipid peroxidation, which act as pro-inflammatory mediators and contribute to damage to retinal microvessels. Platelet activation factor is produced in large quantities during oxidative stress, and its cytotoxic effects are largely mediated by thromboxane A2. Similarly, lysophosphatidic acid is released from lysophosphatidylcholine under the action of lysophospholipase D and may play a role in retinal inflammation, which leads to microvascular cytotoxicity [2]. Retinal microvascular injuries lead to a decrease in perfusion parameters and microcirculation.

The high rate of blood flow makes the retina susceptible to ischemia-reperfusion (I/R) injury. It is widely accepted that I/R injury is caused by the increased generation of reactive oxygen species (ROS) during the process of I/R, including superoxide (O^2), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radicals (OH^-). The overproduction of ROS can induce apoptosis in the retina [3, 4, 5]. As a result, inflammation and cell apoptosis are considered to be major causes of the pathological changes following I/R injury. Induction of an inflammatory response by reperfusion may increase the intensity of damage.

Many studies have shown that after I/R injury, treatment with antiapoptotic agents is effective for preserving cell populations throughout the retina [6-9]. p53 is a transcription factor that induces apoptosis in response to DNA damage, oncogene activation, hypoxia [10]. p53 may mediate apoptosis through extrinsic and intrinsic pathways. The intrinsic pathway is associated with Bcl-2 family proteins, which controls the mitochondria outer membrane permeabilization [11, 12]. Upregulation of p53 inhibits Bcl-xL and Bcl-2 protein, contributes to the release of cytochrome c, and promotes caspase-3–mediated apoptosis [13]. NF-κB is a transcription factor activated by oxygen free radicals, an increase in its immunoactivity in retinal inner nuclear layer (INL) and ganglion cells layer after I/R injury was consistent with TUNEL-labeling apoptosis [14]. In NMDA–mediated retinal excitotoxicity, NF-κB promotes an apoptotic response in ganglion cells via p53 upregulation [15].

The research object is a new molecule 2-ethyl-3-hydroxy-6-methyl-pyridine-N-acetyltaurinate (EHMP-NAT) that includes the following pharmacophores: 3-hydroxypyridine and N-acetyltaurinate. EHMP-NAT was synthesized at the All-Russian Scientific Center for Safety of Biologically Active Substances, Russia, and is related to the class of 3-hydroxypyridines. 3-hydroxypyridine substantiates antioxidant effect and the correction of glutamate excitotoxicity [16]. As is known from the literature data, 2-ethyl-3-hydroxy-6-methylpyridine hydrochloride (Emoxipine) has an antioxidant effect due to its ability to interact with Fe^{2+} and radicals and to enhance efficiency of the endogenous antioxidant protection [17, 18]. In the retina, taurine is present in high concentration, regulates Ca^{2+} transport and has antioxidant properties [19]. Taurine also suppresses glutamate-induced Ca^{2+} flow [20].

The problem of search for ways to improve the effectiveness of pharmacological correction of retinal ischemia is relevant and beyond doubt [21, 22]. In this experimental

study, we studied the possibility of pharmacological correction with 2-ethyl-3-hydroxy-6-methyl-pyridine-N-acetyltaurinate in retinal I/R, assessing its effect on microcirculation in the retina, the functional state of the retina and the expression of pro-apoptotic factor genes in the retina.

Objective: to study the retinoprotective effect and antiapoptotic mechanism of EHMP-NAT in a rat model of retinal I/R.

Materials and Methods

1. Animals

The experiments were approved by the Local Ethics Committee of Belgorod State National Research University, Belgorod (Protocol #11/20 from 7th of September 2020). The animals were obtained from the Stolbovaya laboratory animal nursery in the Moscow region, Russia. The study was performed in 50 Wistar rats weighing 225–275 g. Ethical principles of handling laboratory rats were observed in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes, CETS No. 123. All manipulations on rats were performed under general anesthesia with i.p. administration of chloral hydrate solution.

2. Design of the Experiment

The following groups were included in the experiment:

(1) control group (an equivalent volume of water for injections was administered using the same manner as the studied substance) (n = 10);

(2) group with the retinal I/R model (n = 10);

(3) group with I/R correction by EHMP-NAT (n = 10);

(4) group with I/R correction by emoxipine (n = 10);

(5) group with I/R correction by taurine (n = 10).

A model of retinal I/R was performed under general anesthesia using i.p. chloral hydrate, 300 mg/kg, by applying mechanical pressure to the anterior eye chamber for 30 min [23]. Mechanical pressure was 110 mm Hg and carried out by an atraumatic metal rod in the cylinder with calibrated piston system. The system for retinal I/R simulation was calibrated as followed: IOP was registered by administrating into the anterior eye chamber 30G needle sensor (Biopac System, Inc., Goleta, CA, USA) with use the TSD104A hard-ware-software complex MP150 production Biopac System, Inc., and the computer pro-gram AcqKnowledge 4.2. Rendering mechanical pressure was carried out as per step calibration system of the cylinder with the registration of the increase of IOP that allowed us to estimate the level of IOP increase at a specific position.

EHMP-NAT (All-Russian Scientific Center for Safety of Biologically Active Substances, Staraya Kupavna, Russia) was administered parabulbarly (into the orbital adipose body, the area of the lower eyelid) as a 1% solution at a dose of 4.4 mg/kg/day daily for 4 days, including the first injection 30 min before I/R.

Emoxipine (1% solution for injections, Federal State Unitary Enterprise “Moscow Endocrine Plant”, Moscow, Russia) as a comparison drug was administered at a dose of 2 mg/kg [5] in the same manner as EHMP-NAT.

Taurine (4% solution for injections, “Dalkhimpharm” JSC, Khabarovsk, Russia) as a comparison drug was administered at a dose of 1.8 mg/kg in the same manner as EHMP-NAT. The studied substance and comparison drugs were taken for research in equimolar doses.

The retinoprotective effects of pharmacological agents were estimated by changes in retinal microcirculation level using laser Doppler flowmetry (LDF), and electroretinography (ERG) after 72 hours of reperfusion [23]. The expression of proapoptotic factor genes (Caspase 3, NF-κB p65, p53) in the retina was evaluated by quantitative real-time PCR.

3. LDF

72 hours after ischemia, the microcirculation level in rats was measured by LDF. The online registration was performed using MP150 production Biopac System, Inc., a computer-based data acquisition system with AcqKnowledge 4.2 software, and a TSD-144 needle-type sensor (Biopac System, Inc., Goleta, CA, USA). After the rats were anesthetized, the microcirculation level was measured

at 10 points on the circumference of the eye. The duration of the recording at each point was about 20 sec. Then the average value was calculated, which was taken as the value of the retinal microcirculation level in a particular rat [23]. An example of recording the microcirculation level in the eye of a rat from the control group is presented in Figure 1.

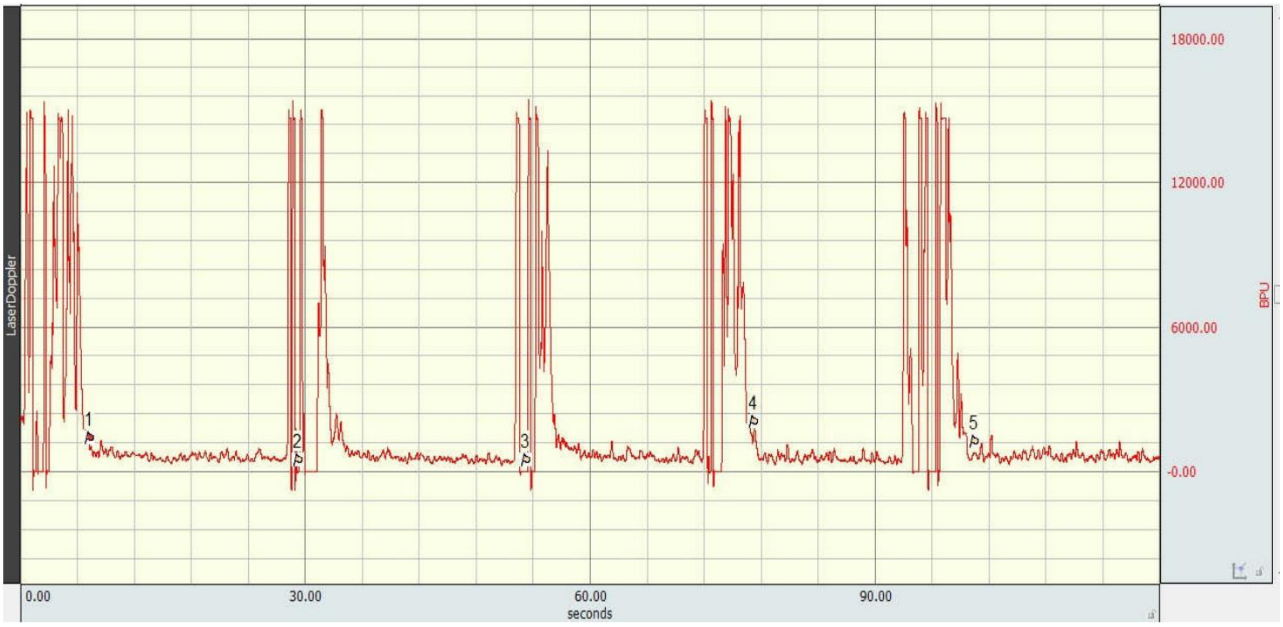


Fig. 1. An example of recording the microcirculation level in the eye of a rat

4. ERG

ERG was performed according to the protocol previously published [8]. Evoked biopotentials were run at a frequency of 1–1000 Hz, amplified, averaged, and presented graphically on the screen using the MP150 data acquisition and analysis system (Biopac Systems, Inc., Goleta, CA, USA). ERG registration was carried out in response to a single stimulation. To assess the degree of retinal ischemia, the b/a coefficient was calculated.

5. *Quantitative real-time PCR*

10 to 20 mg of retinal tissue was cleaned with ice cold PBS 0.1 M solution before immersion in RNAlater Stabilisation Solution to avoid degradation of cellular RNA. Before RNA extraction, retinal tissue was sonicated in 300 µl of lysis buffer. The total RNA was extracted as follows: the samples were homogenized in a commercial solution "Extract RNA" (Evrogen, Russia) at the rate of 50 mg of tissue per 1 ml of extractor. The resulting suspension was centrifuged for 5 minutes at 15000g at room temperature. Then, the samples were washed sequentially and centrifuged with chloroform, 100% isopropanol, and 75% ethanol cooled. 15 µl of distilled water was added to the resulting sediment and vortexed. The concentration of RNA in the resulting solution was determined using a NanoDrop 2000C spectrophotometer (Thermo Scientific Inc., USA) three times. After calculating the average concentration, the samples were adjusted to an RNA content of 200 ng/ml.

For the translation of RNA into cDNA, the reverse transcription reaction was carried out in a Bio Rad CFX96 amplifier using a commercial MMLV RT kit (Evrogen, Russia) at the rate of 11 µl of the sample per 9 µl of the reverse transcription kit. Reaction temperature conditions: 60 minutes at 39 °C + 10 minutes at 70 °C. Then, to evaluate the expression of targeted genes in the Bio Rad CFX96 amplifier, PCR of samples was performed using a commercial SYBR® Green Master Mix kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) and oligonucleotide primers (Evrogen, Russia).

Primers were selected using the Primer-BLAST resource (NCBI, USA) (Table 1).

Table 1

Primer sequence used for quantitative real-time PCR

Gene	Primer sequence (5′–3′)	Annealing temperature (°C)
ACTB ^{F}	GAC ATC CGT AAA GAC CTC TAT GCC	64
ACTB ^{R}	ATA GAG CCA CCA ATC CAC ACA GAG	
Caspase 3 ^{F}	TCC ATA AAA GCA CTG GAA TG	59
Caspase 3 ^{R}	CTG TGA TCT TCC TTA GAA ACA C	
NF-κB p65 ^{F}	TTC CCT GAA GTG GAG CTA GGA	61.3
NF-κB p65 ^{R}	CAT GTC GAG GAA GAC ACT GGA	
p53 ^{F}	GTC GGC TCC GAC TAT ACC ACT ATC	67.4
p53 ^{R}	CTC TCT TTG CAC TCC CTG GGG G	

Note: ^{F} – forward; ^{R} – reverse.

After amplification, the relative expression value for each gene was calculated using the formula:

$$E_{GOI} = 2\text{^}(Ct_{ACTB} - \Delta Ct_{GOI}),$$

where Ct_{ACTB} is the cycle threshold value for the reference gene ACTB.

6. Statistical Analysis

In all cases, the median (Me) and lower (Q_L) and upper (Q_U) quartiles were calculated. Between-group differences were analyzed by the Mann–Whitney U test. Statistical analyses were performed using Statistica 10.0 software.

Results

1. LDF results

In the control group, the microcirculation level was 748.5 (median; Q_L = 733.0; Q_U = 768.0) perfusion units. In the group with I/R, the microcirculation level was 357.0 (median; Q_L = 314.0; Q_U = 385.0) perfusion units, which was significantly lower (p = 0.00016) than in the control group. The use of EHMP-NAT led to an increase in this parameter to 756.5 (median; Q_L = 680.0; Q_U = 774.0) perfusion units compared to the group with retinal I/R (p = 0.00016); compared to the group with emoxipine (p = 0.045); compared to the group with taurine (p = 0.00029). In the group treated with emoxipine, the retinal microcirculation level was 685.5 (median; Q_L = 647.0; Q_U = 710.0) perfusion units, which was significantly different (p = 0.0028) from the control group, and significantly different from the group with retinal I/R (p = 0.00016). In the group with taurine, this parameter was 390.5 (median; Q_L = 311.0; Q_U = 415.0) perfusion units, which was significantly different from the control group (p = 0.00016), and didn't differ from the group with I/R (p = 0.212).

Based on the data obtained, in the retinal I/R model, improvement in the retinal microcirculation in correction by EHMP-NAT was more pronounced than in monotherapy with emoxipine or taurine.

2. ERG results

The influences of the studied substance and comparison drugs on the a- and b-wave amplitudes and the b/a coefficient in the model of retinal I/R are presented in Table 2. The a-wave amplitude values remained unchanged in all experimental groups.

When simulating I/R, the b-wave amplitude reduced by 2.1 times in comparison with the control group (p = 0.0002). In the group treated with EHMP-NAT, the b-wave amplitude increased by 93.2% (p = 0.0002) in comparison with the group with I/R; the b/a coefficient increased by 93.3% in comparison with the group with I/R (p = 0.0002); by 64.2% in comparison with the group with emoxipine (p = 0.0099); by 65.8% in comparison with the group with taurine (p = 0.015). In the group with emoxipine administration, the b-wave amplitude increased by 72.7% (p = 0.0002) in comparison with the group with I/R; the b/a coefficient increased by 64.2% (p = 0.0002) in comparison with the group with I/R. In the group with taurine, the b-wave amplitude increased by 63.6% (p = 0.0002) in comparison with the group with I/R; the b/a coefficient increased by 65.8% (p = 0.0002) in comparison with the group with I/R.

Based on the table data from the ERG study, the best correction of functional retinal changes caused by I/R was found in group with EHMP-NAT administration.

Table 2

The values of the a- and b- wave amplitudes and the b/a coefficient when correcting retinal ischemia-reperfusion by 2-ethyl-3-hydroxy-6-methyl-pyridine-N-acetyltaurinate, emoxipine, and taurine (Me (Q_L;Q_u))

Groups	The a-wave Amplitudes (*n* = 10), mV	The b-wave Amplitudes (*n* = 10), mV	The b/a Coefficient (*n* = 10), R.U.
Control	0.38 (0.31;0.45)	0.93 (0.84;1.06)	2.46 (1.87;3.24)
I/R	0.35 (0.33;0.45)	0.44 (0.38;0.49)#	1.20 (1.07;1.40)#
I/R + EHMP-NAT, 4.4 mg/kg/day	0.38 (0.35;0.40)	0.85 (0.76;0.91)^{yet}	2.32 (1.98;2.55)^{yet}
I/R + emoxipine, 2 mg/kg/day	0.37 (0.34;0.40)	0.76 (0.69;0.81)#^{y}	1.97 (1.78;2.27)#^{y}
I/R + taurine, 1.8 mg/kg/day	0.37 (0.33;0.44)	0.72 (0.66;0.79)#^{y}	1.99 (1.57;2.06)#^{y}

Note: I/R – group with retinal ischemia–reperfusion; EHMP-NAT – 2-ethyl-3-hydroxy-6-methyl-pyridine-N-acetyltaurinate; R.U. – relative units; # – compared to the control group; ^{y} – compared to the ischemia–reperfusion model; ^{e} – compared to the group with emoxipine; ^{t} – compared to the group with taurine.

3. Real-time PCR results

Effects of the studied substance and comparison drugs on I/R-induced changes in the retinal caspase-3, NF-κB p65, p53 genes expression were evaluated after 72 hours of reperfusion. When simulating pathology, the caspase-3 gene expression increased reliably in comparison with the control group (p = 0.00016); the NF-κB p65 gene expression in-creased by 2.5 times in comparison with the control group (p = 0.00016); the p 53 gene expression increased by 2.4 times in comparison with the control (p = 0.0002).

In the group treated with EHMP-NAT, the caspase-3 gene expression decreased by 2.3 times (p = 0.0002) in comparison with I/R group; the NF-κB p65 gene expression decreased by 1.6 times (p = 0.0002) in comparison with the group with I/R; the p 53 gene expression decreased by 1.6 times in comparison with I/R group (p = 0.0002).

In the group with emoxipine administration, the caspase-3 gene expression decreased by 24.6% (p = 0.001) in comparison with the group with I/R; the NF-κB p65 gene expression decreased by 1.3 times (p = 0.0032) in comparison with the group with I/R; the p 53 gene expression decreased by 1.2 times in comparison with I/R group (p = 0.0008).

In the group with taurine, the caspase-3 gene expression decreased by 1.7 times (p = 0.0007) in comparison with I/R group; the NF-κB p65 gene expression was not significantly different from the group with I/R (p = 0.076); the p 53 gene expression was significantly different from the control group (p = 0.0002) and from the I/R group (p = 0.011) (Table 3).

Table 3

Effects of pharmacological correction with 2-ethyl-3-hydroxy-6-methyl-pyridine-N-acetyltaurinate, emoxipine, and taurine on I/R-induced changes in caspase-3, NF-κB p65, p 53 genes expression

Groups	Caspase-3 (*n* = 10)	NF-κB p65 (*n* = 10)	p53 (*n* = 10)
Control	1.05 (0.98;1.17)	0.97 (0.87;1.03)	0.96 (0.69;1.15)
I/R	1.99 (1.84;2.09)#	2.47 (2.14;2.76)#	2.29 (2.11;2.48)#
I/R + EHMP-NAT, 4.4 mg/kg/day	0.87 (0.78;0.99)^{yet}	1.59 (1.37;1.76)#^{yet}	1.43 (1.23;1.65)#^{yet}
I/R + emoxipine, 2 mg/kg/day	1.50 (1.26;1.67)#^{y}	1.97 (1.88;2.20)#^{y}	1.87 (1.69;2.01)#^{y}
I/R + taurine, 1.8 mg/kg/day	1.19 (0.98;1.45)^{y}	2.20 (1.88;2.49)#	1.98 (1.81;2.12)#^{y}

Note: I/R – group with retinal ischemia–reperfusion; EHMP-NAT – 2-ethyl-3-hydroxy-6-methyl-pyridine-N-acetyltaurinate; # – compared to the control group; ^{y} – compared to the ischemia–reperfusion model; ^{e} – compared to the group with emoxipine; ^{t} – compared to the group with taurine

In the group with EHMP-NAT, the caspase-3 gene expression decreased reliably in comparison with emoxipine (p = 0.0002) and with taurine (p = 0.0028); the NF-κB p65 gene expression decreased in comparison with emoxipine (p = 0.0009) and with taurine (p = 0.0022); the p 53 gene expression decreased in comparison with emoxipine (p = 0.0022) and with taurine (p = 0.0009).

Based on the table data from the real-time PCR study, the best pharmacological correction of retinal I/R by protecting retina from apoptosis was found in the group with EHMP-NAT.

Discussion. In this study, we investigated the retinoprotective effect and the mechanism of antiapoptotic action of EHMP-NAT against the retinal I/R through the evaluation of retinal microcirculation, electrophysiological state, and caspase-3, NF-κB p65, p53 gene expressions.

Several studies have shown that, in the early stage of ischemia, an increase in extracellular glutamate activates NMDA-receptors, causing a Ca^{2+} influx. Then, NO is produced under the NO-synthase action in the mitochondria, which leads to production of $ONOO^-$ [4,24]. Based on the literature data, glutamate receptor stimulation activates NF-κB and plays a role in ROS-induced cell apoptosis [25, 26]. NF-κB p65 has been shown to be activated in NMDA-mediated retinal excitotoxicity as well as other neurodegenerative diseases [27]. Our study demonstrated that the exposure to transient increase in IOP to 110 mmHg (ischemic episode) followed by 72-hour reperfusion increases the retinal expression of NF-κB p65 gene. It is likely that the observed changes in NF-κB expression at these time points involve response to NMDA activation in retinal glial and ganglion cells [28]. Correction with EHMP-NAT reduced NF-κB p65 gene expression in retinal I/R model.

The present study also investigated the effect of EHMP-NAT on the retinal I/R-mediated changes in the p53 and caspase-3 gene expressions. Based on the literature data, NMDA-induced retinal ganglion cell loss corresponded with increased levels of the p53 gene [8]. The inactivation or low expression of p53 provide a retinoprotective effect in retinal ischemia or excitotoxicity [29]. There is evidence that Bax and Bcl-2 expressions are highly regulated by the p53 gene [30]. Several studies have shown that, p53-mediated retinal ganglion cell apoptosis is accompanied by the activation of caspase-3 dependent signaling pathway [31, 32]. Correction with EHMP-NAT also reduced p53 and caspase-3 gene expressions in retinal I/R model.

Over the past two decades, LDF has been adapted to measure blood flow in the optic disc, subfoveal vasculature [33], and iris in humans [34]. LDF values depend linearly on the state of the blood flow. This makes it useful in assessing changes in blood flow caused by physiological or pathological stimuli that do not change the optical properties of tissues [35]. Hyperoxia, hypercapnia, flickering light stimuli, changes in ocular perfusion pressure affect blood flow in the optic disc and choroidal blood flow measured using LDF [36]. The results of our study indicate that correction with EHMP-NAT improved the retinal microcirculation against I/R.

In this study, ERG was used to confirm whether microcirculatory changes in the retina were related to functional changes. ERG has confirmatory rather than primary diagnostic value because injuries to any of the retinal layers could result in ERG changes: photoreceptors (a-wave), and the inner nuclear layer (b-wave) [37]. The amacrine and bipolar cells are located in the inner nuclear layer and are sensitive to I/R- and NMDA-mediated retinal injury [38]. As it was shown earlier, in retinal I/R, the cells of the inner nuclear layer are primarily damaged [5, 23]. The results of the present study indicate that treatment with EHMP-NAT preserved the retinal electrophysiology against I/R.

The detected retinoprotective effect of EHMP-NAT to correct experimental retinal I/R may be also associated with the following: (a) 3-hydroxypyridine is a “scavenger” of peroxides and superoxides of fatty acids [39]; (b) taurine, an antioxidant and the predominant free amino acid in the retina that maintains membrane structural integrity, regulates Ca2+

binding and transport [40], and inhibits retinal excitotoxic injury [41].

In view of the above, further studies of the effects of EHMP-NAT on the models of NMDA-mediated retinal excitotoxicity with intravitreal administration of NMDA, cerebral stroke, and traumatic brain injury are planned.

Conclusion. EHMP-NAT at a dose of 4.4 mg/kg of rat mass has a pronounced retinoprotective effect, which is superior to the effects of comparison drugs, emoxipine and taurine, in equimolar doses in the simulated retinal I/R. This was confirmed by the improvement in the attainment of target values of the retinal microcirculation, improvement in the functional state of the retina, downregulation of caspase-3, NF-κB p65, p53 genes expression in retina.

References

1. Hardy P, Beauchamp M, Sennlaub F, et al. Inflammatory lipid mediators in ischemic retinopathy. Pharmacological Reports. 2005;57(Suppl.):169-190.

2. Usui-Ouchi A, Ouchi Y, Ebihara N. The peroxisome proliferator-activated receptor pan-agonist bezafibrate suppresses microvascular inflammatory responses of retinal endothelial cells and vascular endothelial growth factor production in retinal pigmented epithelial cells. International Immunopharmacology. 2017;52:70-76. DOI: https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.08.027

3. Xu YP, Han F, Tan J. Edaravone protects the retina against ischemia/reperfusion induced oxidative injury through the PI3K/Akt/Nrf2 pathway. Molecular Medicine Reports. 2017;16:9210-9216. DOI: https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7739

4. Nor Arfuzir NN, Agarwal R, Iezhitsa I, et al. Effect of Magnesium Acetyltaurate and Taurine on Endothelin1-Induced Retinal Nitrosative Stress in Rats. Curr Eye Res. 2018;43:1032-1040. DOI: https://doi.org/10.1080/02713683.2018.1467933.

5. Peresypkina A, Pazhinsky A, Danilenko L, et al. Retinoprotective Effect of 2-Ethyl-3-hydroxy-6-methylpyridine Nicotinate. Biology (Basel). 2020;9(3):45. DOI: https://doi.org/10.3390/biology9030045. PMID: 32121045

6. Arikan S, Ersan I, Karaca T, et al. Quercetin protects the retina by reducing apoptosis due to ischemia-reperfusion injury in a rat model. Arquivos Brasileiros de Oftalmologia. 2015;78:100-104. DOI: https://doi.org/10.5935/0004-2749.20150026

7. Qin X, Li N, Zhang M, et al. Tetrahedral framework nucleic acids prevent retina ischemia-reperfusion injury from oxidative stress via activating the Akt/Nrf2 pathway. Nanoscale. 2019;11:20667-20675. DOI: https://doi.org/10.1039/c9nr07171g

8. Lambuk L, Iezhitsa I, Agarwal, et al. Magnesium acetyltaurate prevents retinal damage and visual impairment in rats through suppression of NMDA-induced upregulation of NF-κB, p53 and AP-1 (c-Jun/c-Fos). Neural Regeneration Research. 2021;16: 2330-2344. DOI: https://doi.org/10.4103/1673-5374.310691

9. Li N, Gao S, Wang J, et al. Antiapoptotic effect of interleukin-17 in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. Experimental Eye Research. 2019;187:107743. DOI: https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107743

10. Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. Current Opinion in Cell Biology. 2001;13:332-337. DOI: https://doi.org/10.1016/s0955-0674(00)00216-7

11. Haupt S, Berger M, Goldberg Z, et al. Apoptosis – the p53 network. Journal of Cell Science. 2003;116:4077–4085. DOI: https://doi.org/10.1242/jcs.00739

12. Chipuk JE, Fisher JC, Dillon CP, et al. Mechanism of apoptosis induction by inhibition of the antiapoptotic BCL-2 proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008;105:20327-20332. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.0808036105

13. Sot B, Freund SM, Fersht AR. Comparative biophysical characterization of p53 with the pro-apoptotic BAK and the antiapoptotic BCL-xL. Journal of Biological Chemistry. 2007;282:29193-29200. DOI: https://doi.org/10.1074/jbc.M705544200

14. Chen YG, Zhang C, Chiang SK, et al. Increased nuclear factor-κB p65 immunoreactivity following retinal ischemia and reperfusion injury in mice. Journal of Neuroscience Research. 2003;72:125-131. DOI: https://doi.org/10.1002/jnr.10548

15. Qin ZH, Chen RW, Wang Y, et al. Nuclear factor κB nuclear translocation upregulates c-Myc and p53 expression during NMDA receptor-mediated apoptosis in rat striatum. Journal of Neuroscience. 1999;19:4023-4033. DOI: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-10-04023.1999

16. Voronina TA. Mexidol: The spectrum of pharmacological effects. Zhurnal Nevrologii i Psikhiatrii imeni S.S. Korsakova. 2012;112:86-90. Russian.

17. Chesnokova NB, Beznos OV, Pavlenko TA, et al. Effects of hydroxypyridine derivatives mexidol and emoxypin on the reparative processes in rabbit eye on the models of corneal epithelial defect and conjunctival ischemia. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2015;158:346-348. DOI: https://doi.org/10.1007/s10517-015-2758-3

18. Manin AN, Voronin AP, Drozd KV, et al. Pharmaceutical salts of emoxypine with dicarboxylic acids. Acta crystallographica. Section C, Structural chemistry. 2018;74(7):797-806. DOI: https://doi.org/10.1107/S2053229618007386

19. Keys SA, Zimmerman WF. Antioxidant activity of retinol, glutathione, and taurine in bovine photoreceptor cell membranes. Experimental Eye Research. 1999:68:693-702. DOI: https://doi.org/10.1006/exer.1999.0657

20. Jafri AJA, Arfuzir NNN, Lambuk L, et al. Protective effect of magnesium acetyltaurate against NMDA-induced retinal damage involves restoration of minerals and trace elements homeostasis. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 2017;39:147-154. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.09.005

21. Peresypkina AA, Pokrovskii MV, Dolzhikov AA, et al. Correction of experimental ischemic neuropathy of the optic nerve by imidazoline receptor agonist type I and II. Eksperimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiya. 2018;81:12-17. DOI: https://doi.org/10.30906/0869-2092-2018-81-4-12-17

22. Chien J-Y, Lin S-F, Chou Y-Y, et al. Protective Effects of Oroxylin A on Retinal Ganglion Cells in Experimental Model of Anterior Ischemic Optic Neuropathy. Antioxidants. 2021;10:902. DOI: https://doi.org/10.3390/antiox10060902

23. Peresypkina AA, Gubareva VO, Levkova EA, et al. Pharmacological correction of retinal ischemia/reperfusion by minoxidil. Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo. 2018;146:530-533. DOI: https://doi.org/10.2298/sarh170814006p

24. Arfuzir NN, Lambuk L, Jafri AJ, et al. Protective effect of magnesium acetyltaurate against endothelin-induced retinal and optic nerve injury. Neuroscience. 2016;325:153-164. DOI: https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.03.041

25. McInnis J, Wang C, Anastasio N, et al. The role of superoxide and nuclear factor-kappa B signaling in N-methyl-D-aspartate-induced necrosis and apoptosis. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2002;301:478-487. DOI: https://doi.org/10.1124/jpet.301.2.478

26. Kawamoto EM, Lima LS, Munhoz CD, et al. Influence of N-methyl-D-aspartate receptors on ouabain activation of nuclear factor-κB in the rat hippocampus. Journal of Neuroscience Research. 2012;90:213-228. DOI: https://doi.org/10.1002/jnr.22745

27. Kitaoka Y, Kumai T, Kitaoka Y, et al. Nuclear factor-kappa B p65 in NMDA-induced retinal neurotoxicity. Molecular Brain Research. 2004;131:8-16. DOI: https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.07.021

28. Fan W, Cooper NG. Glutamate-induced NF-κB activation in the retina. Investigative Ophthalmology and Visual Science. 2009;50:917-925. DOI: https://doi.org/10.1167/iovs.08-2555

29. Liebermann DA, Hoffman B, Vesely D. p53 induced growth arrest versus apoptosis and its modulation by survival cytokines. Cell Cycle. 2007;6:166-170. DOI: https://doi.org/10.4161/cc.6.2.3789

30. Singh L, Pushker N, Saini N, et al. Expression of pro-apoptotic Bax and anti-apoptotic Bcl-2 proteins in human retinoblastoma. Clinical and Experimental Ophthalmology. 2015;43:259-267. DOI: https://doi.org/10.1111/ceo.12397

31. Lambuk L, Jafri AJ, Arfuzir NN, et al. Neuroprotective effect of magnesium acetyltaurate against NMDA-induced excitotoxicity in rat retina. Neurotoxicity Research. 2017;31:31-45. DOI: https://doi.org/10.1007/s12640-016-9658-9

32. Maes ME, Schlamp CL, Nickells RW. BAX to basics: how the BCL2 gene family controls the death of retinal ganglion cells. Progress in Retinal and Eye Research. 2017;57:1-25. DOI: https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2017.01.002

33. Riva CE, Cranstoun SD, Grunwald JE, et al. Choroidal blood flow in the foveal region of the human ocular fundus. Investigative Ophthalmology and Visual Science. 1994;35:4273-4281.

34. Chamot SR, Movaffaghy AM, Petrig BL, et al. Blood flow in the human iris measured by laser Doppler flowmetry. Microvascular Research. 1999;57:153-161. DOI: https://doi.org/10.1006/mvre.1998.2136

35. Riva CE, Geiser M, Petrig BL, et al. Ocular blood flow assessment using continuous laser Doppler flowmetry. Acta Ophthalmologica.

2010;88:622-629. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2009.01621.x

36. Schmidl D, Boltz A, Kaya S, et al. Comparison of choroidal and optic nerve head blood flow regulation during changes in ocular perfusion pressure. Investigative Ophthalmology and Visual Science. 2012;53:4337-4346. DOI: https://doi.org/10.1167/iovs.11-9055

37. Mdzomba JB, Jordi N, Rodriguez L, et al. Nogo-A inactivation improves visual plasticity and recovery after retinal injury. Cell Death and Disease. 2018;9:1-14. DOI: https://doi.org/10.1038/s41419-018-0780-x

38. Fischer AJ, Zelinka C, Milani-Nejad N. Reactive retinal microglia, neuronal survival, and the formation of retinal folds and detachments. GLIA. 2015;63:313-327. DOI: https://doi.org/10.1002/glia.22752

39. Novikov VE, Levchenkova OS. Promising directions of search for antihypoxants and targets of their action. Experimental and clinical pharmacology. 2013;76:37-47. Russian.

40. Lambert IH, Kristensen DM, Holm JB, et al. Physiological role of taurine–from organism to organelle. Acta Physiologica. 2015;213:191-212. DOI: https://doi.org/10.1111/apha.12365

41. Jafri AJA, Agarwal R, Iezhitsa I, et al. Protective effect of magnesium acetyltaurate and taurine against NMDAinduced retinal damage involves reduced nitrosative stress. Molecular Vision. 2018;24:495-508.

Received 10 March 2022
Revised 7 May 2022
Accepted 25 May 2022

Information about the authors

Svetlana V. Efimenko, Post-graduate Student in Scientific Specialty 3.3.6. – Pharmacology, Clinical Pharmacology, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, E-mail: spotapova96@mail.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1041-9978.

Sofia S. Chernyaeva, Post-graduate Student in Scientific Specialty 3.3.6. – Pharmacology, Clinical Pharmacology, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, E-mail: sonyachernyaeva@yandex.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3937-2472.

Anna A. Peresypkina, Doct. Sci. (Biology), Professor at the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, E-mail: peresypkina_a@bsu.edu.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2829-9860.

Anna S. Pobeda, Cand. Sci. (Biology), Associate Professor at the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, E-mail: pobeda@bsu.edu.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0541-8946.

Mikhail V. Korokin, Doct. Sci. (Medicine), Associate Professor, Professor at the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, E-mail: mkorokin@mail.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5402-0697.

Evgeniya A. Beskhmelnitsyna, Cand. Sci. (Medicine), Researcher at the Research Institute of Pharmacology of Living Systems, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, E-mail: evgeny_b89@mail.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0001-6009-5740.

Mikhail V. Pokrovskii, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Head of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, E-mail: mpokrovsky@yandex.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1493-3376.

Aleksandar M. Ćorac, PhD, Full Professor, Professor at the Department of Preventive Medicine, Faculty of Medicine, University of Pristina, Kosovska Mitrovica, Serbia, E-mail: aleksandar.corac@med.pr.ac.rs, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1689-8076.

(cc) BY

DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-3-0-6

In silico identification of the potential natural inhibitors of SARS-CoV-2 Guanine-N7 methyltransferase

Adekunle B. Rowaiye[1], Olukemi A. Onuh[1], Joy A. Oladimeji-Salami[1], Doofan Bur[1], Moses Njoku[2], Nma H. Ifedilichukwu[1], Comfort O. John[1], Olanike Binuyo[1], Faith P. Udoh[1]

[1]National Biotechnology Development Agency,
16 DunukofiaSt., Abuja, 900288, Nigeria
[2]National Institute for Pharmaceutical Research and Development,
Plot 942, Cadastral Zone C16, Industrial District B1, Abuja, 900288, Nigeria
Corresponding author: Doofan Bur (doughfaniyorza@gmail.com)

Abstract
Background: The outbreak of the COVID-19 pandemic caused by the SARS-CoV-2 has triggered intense scientific research into the possible therapeutic strategies that can combat the ravaging disease. One of such strategies is the inhibition of an important enzyme that affects an important physiological process of the virus. The enzyme, Guanine-N7 Methyltransferase is responsible for the capping of the SARS-CoV-2 mRNA to conceal it from the host's cellular defense. **The aim of the study:** This study aims at computationally identifying the potential natural inhibitors of the SARS-CoV-2 Guanine-N7 methyltransferase binding at the active site (Pocket 41). **Materials and methods:** A library of small molecules was obtained from edible African plants and was molecularly docked against the SARS-CoV-2 Guanine-N7 methyltransferase (QHD43415_13. pdb) using the Pyrx software. Sinefungin, an approved antiviral drug had a binding score of -7.6 kcal/ mol with the target was chosen as a standard. Using the molecular descriptors of the compounds, virtual screening for oral availability was performed using the Pubchem and SWISSADME web tools. The online servers pkCSM and Molinspiration were used for further screening for the pharmacokinetic properties and bioactivity respectively. The molecular dynamic simulation and analyses of the Apo and Holo proteins were performed using the GROMACS software on the Galaxy webserver. **Results:** With a total RMSD of 77.78, average RMSD of 3.704, total regional (active site) RMSF of 30.61, average regional RMSF of 1.91, gyration of 6.9986, and B factor of 696.14, Crinamidine showed the greatest distortion of the target. **Conclusion:** All the lead compounds performed better than the standard while Crinamidine is predicted to show the greatest inhibitory activity. Further tests are required to further investigate the inhibitory activities of the lead compounds.
Keywords: COVID-19; SARS-CoV-2; guanine-n7 methyltransferase; inhibition; molecular docking; molecular dynamic simulation

For citation: Rowaiye AB, Onuh OA, Oladimeji-Salami JA, et al. *In silico* identification of the potential natural inhibitors of SARS-CoV-2 Guanine-N7 methyltransferase. Research Results in Biomedicine. 2022;8(3):327-350. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-3-0-6

Introduction. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is a novel infection that began in China resulting in a worldwide outbreak. The disease was declared a global health emergency and later recognized as a pandemic by the World Health Organization in March 2020 [1]. As of the 25th of July, 2020, the global number of reported cases of the disease stood at 15,975,268 with 643,476 deaths and 9,766,873 recoveries [2]. COVID-19 is caused by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) which causes mild to severe respiratory illness with symptoms such as fever, cough, and shortness of breath. The ailment becomes life-threatening in the presence of co-morbidities such as diabetes, hypertension, and cardiovascular diseases [3,4]. There is currently no WHO-approved drug or vaccine for the cure or prevention of COVID-19. SARS-CoV-2 belongs to a large family of viruses consisting of multiple strains that are known to cause illnesses ranging from the common cold to more severe diseases such as the Middle East Respiratory Syndrome (MERS) and Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) [4,5]. SARS-CoV-2 is a positive-sense, single-stranded RNA virus possessing the largest and most complex genome (about 30 Kb), packed inside a nucleocapsid protein and enveloped with several structural proteins [6]. The size of the viral particle is in the range of 8 0-90nm and there are bulbous surface projections that form crown-like patterns (corona) on the surface of the particles [7]. The potential therapeutic strategies for the treatment of COVID-19 include immunomodulation and viral inhibition. Several enzymes or structural proteins of SARS-CoV-2 are potential drug targets as they directly affect physiological processes such as RNA synthesis, replication, assembly, and human cell receptor binding [8,9]. Guanine N-7-MethylTransferase (GNMT) is one of such targets and it is the enzyme responsible for the capping of SARS-CoV-2 mRNA. For many life-sustaining processes such as replication, protein translation, and metabolism, viruses require a host cell as they lack the proper cellular machinery. Viral propagation within the host cell requires the transcription of viral mRNA. To do this, the viral mRNA assumes molecular anonymity to evade detection in the host cell cytoplasm. The viral mRNA undergoes structural modification by a 5’ cap structure. By evading the host cell defense system, viral mRNA can be effectively translated into proteins. The addition of the guanine N-7-methylguanosine cap is necessary for the maturation, stability, nuclear export, and efficient translation of viral mRNA. Eukaryotic mRNA is modified by the addition of the 5′ cap structure which is a 7-methylguanosine linked to the first transcribed nucleotide by a 5′-5′ triphosphate bridge [10]. The mRNA cap is formed on the first transcribed nucleotide of transcripts by three sequential enzymatic activities; triphosphatase, guanylyltransferase, and methyltransferase [11,12]. The 5′ triphosphate of pre-mRNA is hydrolyzed to diphosphate by a 5′-triphosphatase, to which Guanosine monophosphate (GMP) is added by the RNA guanylyltransferase to create the cap intermediate, GpppN. Guanine-N-7-methyl transferase (GNMT) also known as mRNA cap guanine-N7 methyltransferase is the enzyme that catalyzes the chemical reaction and most importantly plays a necessary part in the RNA capping reaction. RNA guanine N7 methyltransferase creates the mature cap, m7GpppN, and a byproduct, AdoHcy (S-adenosyl homocysteine) through the methylation of the cap intermediate utilizing the methyl donor, AdoMet [13]. The GNMT in coronaviruses belongs to a large class of SAM (S-Adenosyl methionine)-dependent methyltransferases and is an exoribonuclease [14]. Additionally, they are linked with a unique 3’ to 5’ exoribonuclease (ExoN) domain in non-structural protein 14 (nsp14). The diversity of the capping apparatus makes viral RNA capping an attractive target for drug design and development [14,15]. Accordingly, the inhibition of GNMT which may induce potent antiviral activity makes it an important drug target [16]. This implies that incompletely-capped

mRNAs can be recognized by immune sensors which trigger innate immunity pathways that culminate in the expression of type I interferon and other cytokines that have antiviral activity in neighboring cells [17,18]. The active site of GNMT is found in Pocket 41 and it includes residues ARG 289, VAL 290, TRP 292, GLY 333, PRO 335, ASP 352, ALA 353, GLN 354, PRO 355, CYS 356, SER 357, TRP 385, ASN 386, CYS 387, ASN 388 and PHE 426 [19].

In the light of the absence of a universally accepted drug for the treatment of COVID-19 and the severity of the pandemic, the aim of this study is to therefore identify potential natural inhibitors of SARS CoV-2 GNMT.

Materials and Methods

Preparation, analysis, and validation of target protein structure: The 3D structure of SARS-CoV-2 GNMT in the Protein Data Bank (pdb) format (ID: QHD43415_13. pdb) was obtained from the I-TASSER online server with an estimated Template Modelling (TM) score of 0.99 [20]. The web server, Volume, Area, Dihedral Angle Reporter (VADAR 1.8) was used to reveal the architecture of GNMT. The structure of the target was further analysed using the Ramanchandran plot obtained from the MolProbity web server [21].

Ligand preparation: A library of 1,048 compounds obtained from edible African plants such as fruits, spices, and vegetables were downloaded from PubChem database [22]. All the compounds had been pre-screened for Lipinski (hydrogen bond donor (HBD) ≤ 5, hydrogen bond acceptor (HBA) ≤ 10, molecular weight ≤ 500, and logP ≤ 5) and Veber (polar surface area (PSA) ≤ 140, and rotatable bonds ≤ 10) rules [23]. The 3D structures of all the compounds and that of the standard, Sinefungin (PubChem CID 65482) were downloaded from PubChem in the structure-data file (sdf) format [22].

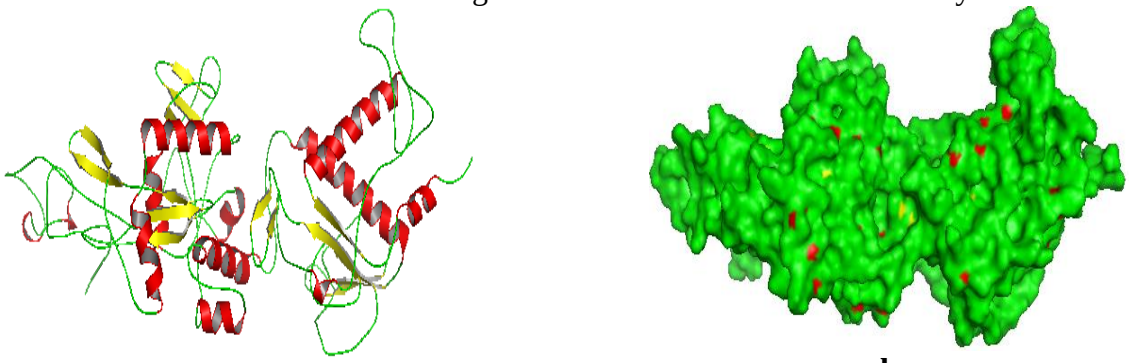
***Molecular docking and virtual screening*:** In preparation for molecular docking, all the ligands were uploaded on the virtual screening software, PyRx (Python prescription) 0.8 version using the Open Babel plug-in tool [24] and converted from sdf to Protein Data Bank, Partial Charge, & Atom Type (pdbqt) format [25]. For stable conformation, the Universal Force Field (UFF) was used as the energy minimization parameter and conjugate gradient descent as the optimization algorithm. Using the AutoDock Vina plug-in tool in Pyrx, all ligands and the standard were docked against the target protein, SARS-CoV-2 GNMT using the following grid parameters [26]. Centre X = 92.432, Y = 92.529, Z = 92.555 and Dimensions (Angstrom): X = 87.658, Y = 97.427, Z = 64.081 [24]. Using the Microsoft Excel software, the docked results were exported in comma-separated values (.csv) format and screened using the docking score of the standard, Sinefungin (-7.6 kcal/mol) as the cut-off. The SWISSADME, pkCSM, and Molinspiration web-servers were used to predict the molar refractivity, pharmacokinetic properties, and bioactivity of all the ligands respectively [27-30]. The SMILES for Sinefungin and the ligands were downloaded from PubChem. Binding site analyses: Using the Pymol software, the target protein was superimposed with the docked poses of all the front-runner compounds [31]. The Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) webserver was used to evaluate the resultant protein-ligand complexes for hydrogen bonds, salt bridges, and other protein-ligand interactions. The analyses carried out include the name and number of residues, exhaustiveness, bond distance, and bond angle [32]. The binding pockets of the target protein were analysed with the Fpocket web server [19].

***Molecular Dynamic Simulations (MDS) and Analyses*:** A 2-nanoseconds MDS of the Apo and Holo structures of SARS-CoV-2 GNMT was performed using the GROMACS software of the Galaxy (versions 2019.1 and 2019.1.4) supercomputing server [33]. For ligand parameterization, LigParGen server was used to generate GROMACS-compatible topology files for the small molecules. OPLS-AA/ 1.14*CM1A was the force field parameter used [34, 35]. After initial conversion to topology files, solvation, energy minimization, and equilibration (NVT and NPT), a 1,000,000-step MDS was performed. The analyses of trajectories were done using the BIO

3D tool on the Galaxy super-computing platform [36]. These include the Principal Component Analysis (PCA), per residue Root Mean Square Fluctuation (RMSF) of the protein backbone, and Root Mean Square Deviation of atomic positions (RMSD) and Dynamical Cross-Correlation Matrix (DCCM). [37]. The radius of gyration and the B factor was also analysed using the MDWeb web server [38].

Results and Discussion

Structural analysis, validation, and preparation of SARS-CoV-2 GNMT (QHD43415_13. pdb): The Apo structure of SARS-CoV-2 GNMT (QHD43415_13. pdb) has 527 amino acids with the following constituent secondary structures: α helix 21%; beta-sheets 30%; Coil 48%; and Turns 16% (Fig. 1). The Total Accessible Solvent Area (ASA) is 260780 (Å) ². The geometry of SARS-CoV-2 GNMT (QHD43415_13. pdb) reveals 8.01% poor rotamers, 83.98% favored rotamers, 4.00% Ramachandran outliers, 82.29% Ramachandran favored, 3.22% Carbon Beta deviations >0.25Å, 0.00% bad bonds and 1.04% bad angles (Fig. 2). The Peptide omegas of SARS-CoV-2 GNMT (QHD43415_13. pdb) include 0.00% Cis Prolines and 3.04% Twisted Peptides. The low-resolution criteria include 8.2% CaBLAM outliers and 0.96% CA Geometry outliers.



a **b**

Fig. 1. a: Cartoon model of the crystal structure of SARS-CoV-2 GNMT (QHD43415_13.pdb). Beta-sheets (yellow), Alpha helix (red), and Loops (green) b: Surface representation.

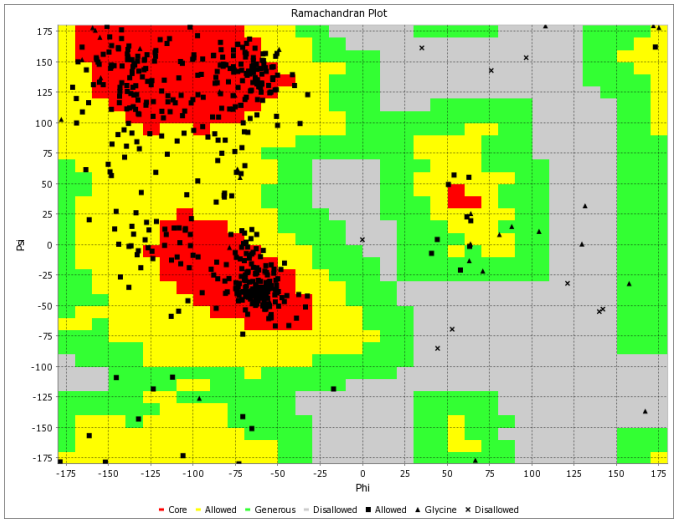


Fig. 2. Ramachandran plotfor SARS-CoV-2 GNMT (QHD43415_13.pdb)

Chemoinformatic profile of ligands (Fig. 3, Table 1): A combination of Ghose, Lipinski, and Veber rules define the molecular descriptors necessary for good oral bioavailability of drugs and their penetration through biological membranes. The molecular descriptors include a molecular weight ≤ 500 g/mol, log P ≤ 5, hydrogen bond donors ≤ 5, hydrogen bond acceptors ≤ 10, molar refractivity between 40 to 130, the number of rotatable bonds ≤ 10 and polar surface area (PSA) ≤ 140 [39-42].

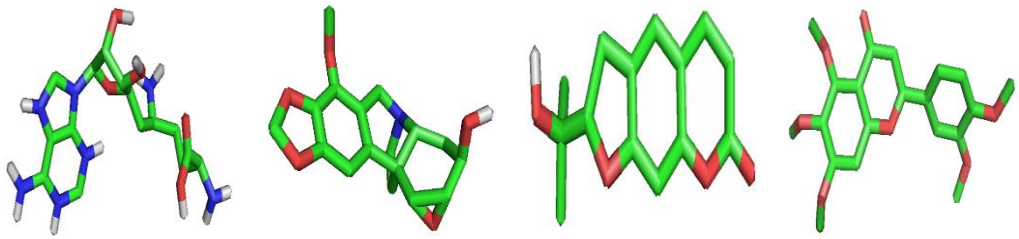


Fig. 3. The 3D chemical structures (stick model) of standard and lead compound.
a: Sinefungin; b: Crinamidine; c: Marmesin; d: Sinensetin

Table 1

Chemo-informatic properties of standard and lead compounds

	Sinefungin (Standard)	Crinamidine	Marmesin	Sinensetin
Molecular Weight (g/mol)	381.39	346.37	354.31	320.29
XLogP3	-4.31	-0.43	-1.05	0.33
Hydrogen Bond Donors	6	3	4	5
Hydrogen bond acceptors	10	6	9	7
# heavy atoms	27	25	25	23
# rotatable bonds	7	2	4	2
TPSA (A^a)	208.65	111.90	138.82	119.61
Molar Refractivity	92.73	88.47	83.12	80.83
Saturation (fraction csp^3)	0.60	0.63	0.44	0.25
PAIN Alert	0	0	0	0
GCPR ligand	1.15	0.22	-0.16	0.37
Ion channel modulator	0.66	0.02	-0.26	0.07
Kinase Inhibitor	0.74	-0.62	-0.26	0.11
Nuclear Receptor Ligand	-1.03	0.67	-0.14	0.48
Protease Inhibitor	0.57	0.14	-0.16	0.23
Enzyme Inhibitor	1.14	0.36	0.29	0.39

Results from Table 1, reveal that none of the lead compounds violated the Ghose, Lipinski, and Veber rules. This suggests that they have good oral bioavailability and permeability. Therefore, we predict that these compounds are good drug candidates having met the criteria for drug-likeness assessment [43]. However, the Standard (Sinefungin) violates the Veber rule with a high TPSA value (208.65A^a). This suggests that it would have a considerably lower intestinal absorption, blood-brain barrier permeation, and cellular potency than the lead compounds [44].

The molecular complexity of a compound is measured by the ratio of sp3 hybridized carbons over the total carbon count of the molecule (Fraction Csp3). It is an important property in determining the success of drug development. A value of at least 0.25 indicates saturation [45]. From (Table 1), all lead compounds and the standard are saturated suggesting molecular stability. Crinamidine has a higher saturation than the standard while Sinensetin has the lowest.

Due to problematic structural moieties, promiscuous bioactive compounds interact with multiple biological targets and aggregate under assay conditions giving false-positive results. While this might be good for polypharmacology, unintended interactions might likely lead to many undesired side effects [46]. From (Table 1) all lead compounds and the standard are predicted to be non-promiscuous.

Beyond ligand binding to the appropriate target, it should elicit a pharmacological effect. Drug candidates are classified based on their bioactivity which includes GPCR ligands, ion channel modulators, kinase inhibitors, nuclear receptor ligands, protease inhibitors, and other enzyme inhibitors [47]. In this

study, the results showed that only the standard and Crinamidine had poor bioactivity scores as Nuclear Receptor Ligand and Kinase inhibitors respectively. All other scores for standard and lead compounds revealed moderate to good bioactivity against the targets. Furthermore, all lead compounds showed good activity as enzyme inhibitors. While the standard showed the highest enzyme inhibition, Marmesin showed the least activity (Table 1) [29, 48].

Pharmacokinetic properties of ligands: Pharmacokinetic properties play an important role in drug discovery and development. The primary goal of drug discovery or design projects is to identify potential drug candidates that have the greatest efficacy and least toxicity. To avoid failures in the drug development process, it is proper to identify good Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity (ADMET) properties of the front-runner compounds through *in silico*methods [28]. An excellent drug candidate should have good ADMET properties at therapeutic doses [28, 49].

The penetration of a target molecule by a drug candidate is a good marker of its therapeutic potential and is influenced by absorption parameters such as human intestinal absorption (poor: <30%), caco2 permeability (high:> 0.9), water solubility (insoluble: less than -4.0 Log mol/L), and skin permeability (low: LogKp> −2.5). From Table 2, data suggests that the standard and all lead compounds have good human intestinal absorption property, and skin permeability. The ability to penetrate human epithelial colorectal adenocarcinoma cells is lowest in the standard, and highest in Crinamidine.

The pharmacological markers for distribution include CNS permeability (permeable Log PS > -2; poor Log PS < -3), BBB permeability (permeable: Log BBB > 0.3; poor <: Log BBB <-1), Volume of distribution steady state (Low: Log VDss<- 0.15; High: Log VDss> 0.45), and Fraction unbound. From Table 2, Sinensetin has a high VDSS, while the values for Marmesin and Crinamidine are below the pharmacological range. This can be corrected by dosage.

The standard and Marmesin have a poor ability to permeate into the brain tissue, while other lead compounds can permeate. The standard and all the lead compounds have poor CNS permeability. The fraction unbound values for standard and all lead compounds are within an acceptable range.

P-glycoprotein is a transmembrane efflux pump that pumps its substrates from inside to outside the cell [50]. All the lead compounds except Marmesin were shown to be P-glycoprotein substrates which imply that they should be co-administered with a P-glycoprotein inhibitor to prevent a potential reduction in absorption and oral bioavailability resulting in decreased retention time of the drug [51]. However, all lead compounds, and the standard showed no inhibition to P-glycoprotein I and II indicating less likelihood of its substrates inducing cellular toxicity, and drug interactions [52, 53].

The predicted metabolic behavior of bioactive compounds is a determinant of their inclusion or elimination in the drug discovery process. The inhibition or non-inhibition of the isomers of the Cytochrome P450 enzyme determines whether the drug candidates would undergo biotransformation or accumulate in the cellular spaces with toxic tendencies. If drug candidates are Cytochrome P450 enzyme substrates they would be administered with inhibitors to facilitate their metabolism [54]. From Table 2, all lead compounds are neither inhibitors nor substrates of CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, and CYP3A4 enzymes.

The predicted excretion values for Total Clearance for the standard, and the lead compounds are within the pharmacological range [23]. Similarly, they all are predicted to be non-substrates of Renal Organic Cation Transporter 2 (OCT2). This implies that they will all be eliminated from the blood into the proximal tubular cell by the Renal OCT2 [24].

The toxicity profile for the standard and all lead compounds suggests that are non-mutagenic, non- cardiotoxic, non-hepatotoxic, and non-dermatotoxic as revealed in their AMES toxicity, hERG I & II toxicity, hepatotoxicity, and skin Sensitization predictions respectively [28].

The dose administered at clinical trials is determined by the maximum recommended tolerated dose. Values less than 0.477 log mg/kg/day are considered low while values higher than 0.477 log mg/kg/day are considered as high. From Table 2 the predicted values suggest that Marmesinand Crinamidine are the most and least potent compounds respectively [55]. The predicted values for Oral Rat Acute Toxicity and Oral Rat Chronic Toxicity should be considered alongside factors such as concentration of drug, dose, and the length of time it is administered [55]. In this study, the data on theoral rat acute and chronic toxicity were obtained from the pkCSMonline server.

Inhibition of 50% of the growth of *T. pyriformis, a* protozoan bacterium (IGC50) is a toxicity marker in drug discovery. When the pIGC50 value is greater than -0.5 log Ug/L, the drug candidate is considered toxic. Results from Table 2, all lead compounds, and the standard are predicted to be toxic against *T. pyriformis* suggesting antibacterial effect properties (that might be unharmful to human cells) [55]. Similarly, in flathead Minnows, the log LC50 is the log of a compound that causes the death of 50% of the population. High acute toxicity is indicated by values less than 0.3 log mM. The results from Table 2 shows that all lead compounds and the standard are not toxic to Minnows [55].

Table 2

Pharmacokinetic properties of ligands

	Sinefungin (standard)	**Crinamidine**	**Marmesin**	**Sinensetin**
Water solubility (log mol/L)	-2.892	-2.487	-2.21	-3.085
Caco2 permeability (log Papp in 10-6 cm/s)	-0.933	0.54	0.377	-0.119
Human Intestinal absorption (% Absorbed)	32.936	51.799	48.119	60.725
Skin Permeability (log Kp)	-2.735	-2.735	-2.822	-2.735
P-glycoprotein substrate (Yes/No)	Yes	Yes	No	Yes
P-glycoprotein I inhibitor (Yes/No)	No	No	No	No
P-glycoprotein II inhibitor (Yes/No)	No	No	No	No
VDss (human) (log L/kg)	0.012	-1.386	-0.611	1.635
Fraction unbound (human) (Fu)	0.383	0.488	0.397	0.263
BBB permeability (log BB)	-1.582	-0.665	-1.286	-0.927
CNS permeability (log PS)	-3.928	-3.101	-3.954	-3.265
CYP2D6 substrate (Yes/No)	No	No	No	No
CYP3A4 substrate (Yes/No)	No	No	No	No
CYP1A2 inhibitor (Yes/No)	No	No	No	No
CYP2C19 inhibitor (Yes/No)	No	No	No	No
CYP2C9 inhibitor (Yes/No)	No	No	No	No
CYP2D6 inhibitor (Yes/No)	No	No	No	No
CYP3A4 inhibitor (Yes/No)	No	No	No	No
Total Clearance (log ml/min/kg)	0.564	0.744	0.716	0.347
Renal OCT2 substrate (Yes/No)	No	No	No	No
AMES toxicity (Yes/No)	No	No	No	No
Max. Tolerated dose (human) (log mg/kg/day)	0.44	0.777	0.393	0.368
hERG I inhibitor (Yes/No)	No	No	No	No
hERG II inhibitor (Yes/No)	No	No	No	No
Oral Rat Acute Toxicity (LD_{50})(mol/kg)	2.482	1.996	2.391	2.289
Oral Rat Chronic Toxicity (log mg/kg_bw/day)	3.081	2.278	3.756	2.929
Hepatotoxicity (Yes/No)	No	No	No	No
Skin Sensitization (Yes/No)	No	No	No	No
T. Pyriformis toxicity (log ug/L)	0.285	0.285	0.286	0.296
Minnow toxicity (log mM)	4.001	3.177	4.198	3.747

Molecular docking analyses of ligands against SARS-CoV-2 GNMT: In molecular docking, **t**he binding affinity score is a measure of the ability of the small molecule to find the optimal conformation in the protein binding pocket. Hence, the ligand with the lower binding energy suggests the greatest binding affinity making it a possible drug candidate [56].

All lead compounds have shown greater potency as drug candidates because they all have a stronger binding affinity than the standard. Crinamidine has the strongest binding affinity of -8.5 Kcal/mol (Table 3).

Table 3

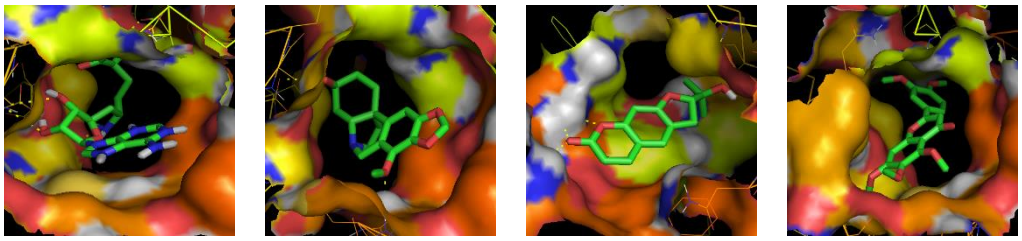
Molecular docking scores of ligands against SARS-CoV-2 GNMT

Ligand	Binding affinity (Kcal/mol)
Sinefungin	-7.6
Crinamidine	-8.5
Marmesin	-7.9
Sinensetin	-7.7

Binding Site analyses: Hydrogen bonding plays an important role in many biochemical processes such as protein-ligand interactions. By displacing water molecules, it enhances ligand binding [57]. Also, the orientation and length of an intermolecular hydrogen bond determine the direction and specificity of ligand binding [58].

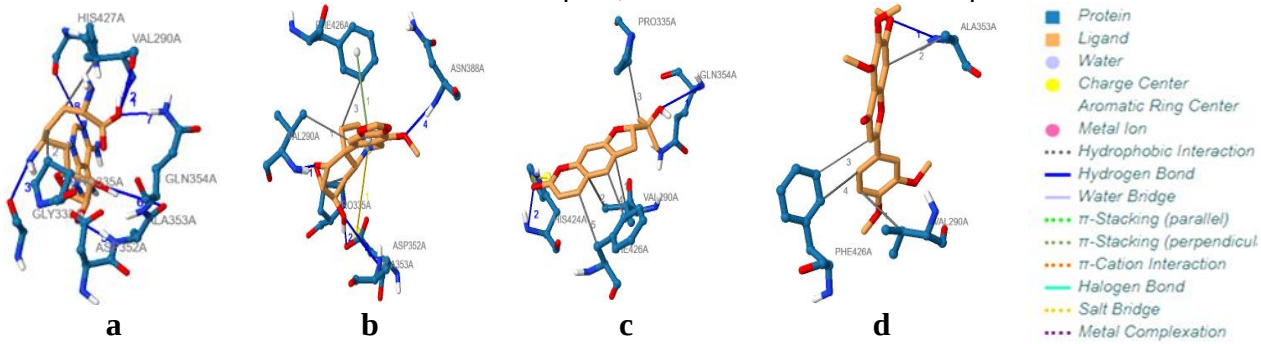
Hydrogen bonds (H-bonds) are abundant in nature and are vital in protein folding, protein-ligand interactions as well as catalytic reactions. In biological systems, they are generally considered facilitators of protein-ligand binding [59, 60]. An increasing number of H-bonds between protein and drug molecule in molecular simulations is indicative of a stronger binding affinity [61].

Figures 4 & 5 and Table 4 reveal that while the standard has the highest number of intermolecular hydrogen bonds (eight) while Marmesin forms the least (one). Of all the lead compounds, Crinamidine has the highest number of hydrogen bonds (four).



a **b** **c** **D**

Fig. 4. Binding site of SARS-CoV-2 GNMT interacting with standard and lead compounds;
a: GNMT-Sinefungin complex; b: GNMT-Crinamidine complex;
c: GNMT-Marmesin complex; d: GNMT-Sinensetin complex



a **b** **c** **d**

Fig. 5. Protein-Ligand interactions of SARS-CoV-2 GNMT with standard and lead compound.
a: GNMT-Sinefungin complex; b: GNMT-Crinamidine complex; c: GNMT-Marmesin complex;
d: GNMT-Sinensetin complex

Table 4

Hydrogen bond analysis

Complex	Number of bonds	Residues	Distance (H-A)	Distance (D-A)	Bond angle
GNMT-Sinefungin	8	VAL290	2.65	3.19	114.05
		VAL290	2.05	2.9	145.62
		GLY333	2.3	3.02	124.56
		ASP352	1.96	2.87	151.24
		ALA353	2.08	3.02	155.19
		ALA353	2.99	3.92	157.5
		GLN354	2.4	2.96	114.36
		HIS427	3.18	3.86	125.1
GNMT-Crinamidine	4	VAL290	3.34	4.04	129.2
		ASP352	2.13	3.09	159.62
		ALA353	3.38	3.95	118.21
		ASN388	2.17	3.16	167.33
GNMT-Marmesin	2	GLN354	3.46	3.78	101.13
		HIS424	2.67	3.36	126.18
GNMT-Sinensetin	1	ALA353	3.07	3.64	117.17

All hydrogen bonds of the lead compounds and standard fall within Pocket 41. Regarding the angles formed by hydrogen bonds, the standard forms four strong (greater than 130°) and four (less than 130°) hydrogen bonds with the target protein. Crinamidine forms two weak and two strong hydrogen bonds. Other lead compounds form only weak hydrogen bonds [62].

Regarding the donor to acceptor distance, the standard formssix moderate (2.5-3.2 Å) and two weak (3.2-4.0 Å) hydrogen bonds with the target protein. Crinamidine forms two moderate and two weak hydrogen bonds. Marmesin and Sinensetin form only weak bonds [62].

The identification of potential protein-ligand interactions is an integral aspect of drug discovery as it aids the discovery of possible new drug leads, thus contributing to the advancement from hits to leads and prediction of likely explanations for side effects of approved drug candidates [63]. The most frequently observed interactions in ligand design are hydrophobic bonds, hydrogen bonds, and π-stacking, followed by weak hydrogen bonds, salt bridges, amide stacking, and cation–π interactions [64]. The presence of hydrophobic interactions and salt bridges further strengthens and stabilizes the protein-ligand complexes [65].

The salt bridge is the strongest non-covalent bond, and it gives greater stability to the Protein-ligand complex [66]. From Table 5, GNMT-Crinamidine and GNMT-Marmesin complexes form salt bridges at residues ASP352 and HIS424 respectively. GNMT-Marmesin also has the highest number of hydrophobic interactions. This suggests a slightly more atom-efficient binding than other complexes. GNMT-Crinamidine has also p-stacking contributing to the small molecule interaction.

Table 5

Other Protein-ligand interactions

	Hydrophobic Int.		Salt bridge		p-Stacking	
Complex	Residue	Distance	Residue	Distance	Residue	Distance
GNMT-Sinefungin	VAL290	3.85				
	PRO335	3.72				
GNMT-Crinamidine	VAL290	3.82	ASP352	5.28	PHE426	4.78
	PRO335	3.8				
	PHE426	3.74				
GNMT-Marmesin	VAL290	3.79	HIS424	4.1		
	VAL290	3.85				
	PRO335	3.8				
	PHE426	3.61				
	PHE426	3.49				
GNMT-Sinensetin	VAL290	3.9				
	ALA353	3.87				
	PHE426	3.68				
	PHE426	3.72				

Analysis of MDS

Root Mean Square Deviation of Atomic Positions (RMSD): Through a computational approach, the RMSD is used to assess the quality of a reproduced binding pose. The new structures induced by simulation and/or ligand binding are compared to a reference structure where the RMSD is at zero. The structural distance between the Cα atoms of the protein backbone is used as a means of evaluation. Lower RMSD values show greater stability of the biological configuration. Higher values suggest greater structural instability [56, 67, 68]. Fig. 6 is s screenshot showing the conformational changes the Apo and Holo structures underwent after the MDS.

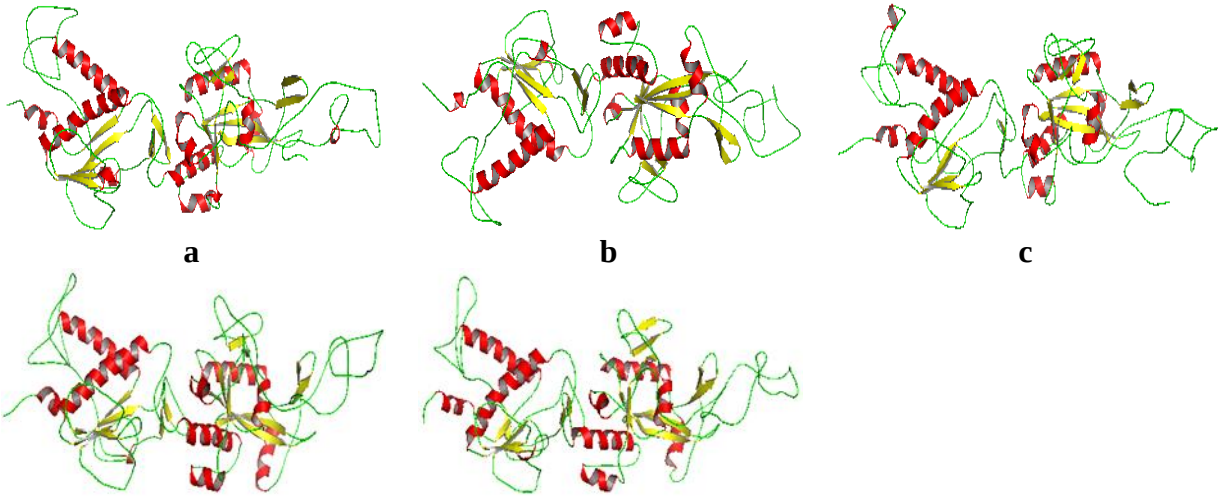


Fig. 6. Cartoon model of the crystal structure of SARS-CoV-2 GNMT Apo and Holo-structures (without water and ions) after molecular dynamics simulation. Beta-sheets (yellow), Alpha helix (red) and Loops (green). a: GNMT; b: GNMT-Sinefungin complex; c: GNMT-Crinamidine complex; d: GNMT-Marmesin complex; e: GNMT-Sinensetin complex

In a 2-nanosecond trajectory, the RMSD of Apo and Holo-structures were measured over consistent time frames (Fig. 7 and Table 6). Of all the Holo-structures, the GNMT-Sinefungin complex has the least total and average RMSD values. The other lead compounds produced greater total and average RMSD values than the standard (Sinefungin). Crinamidine followed closely by Sinensetin induced the greatest total and average RMSD values.

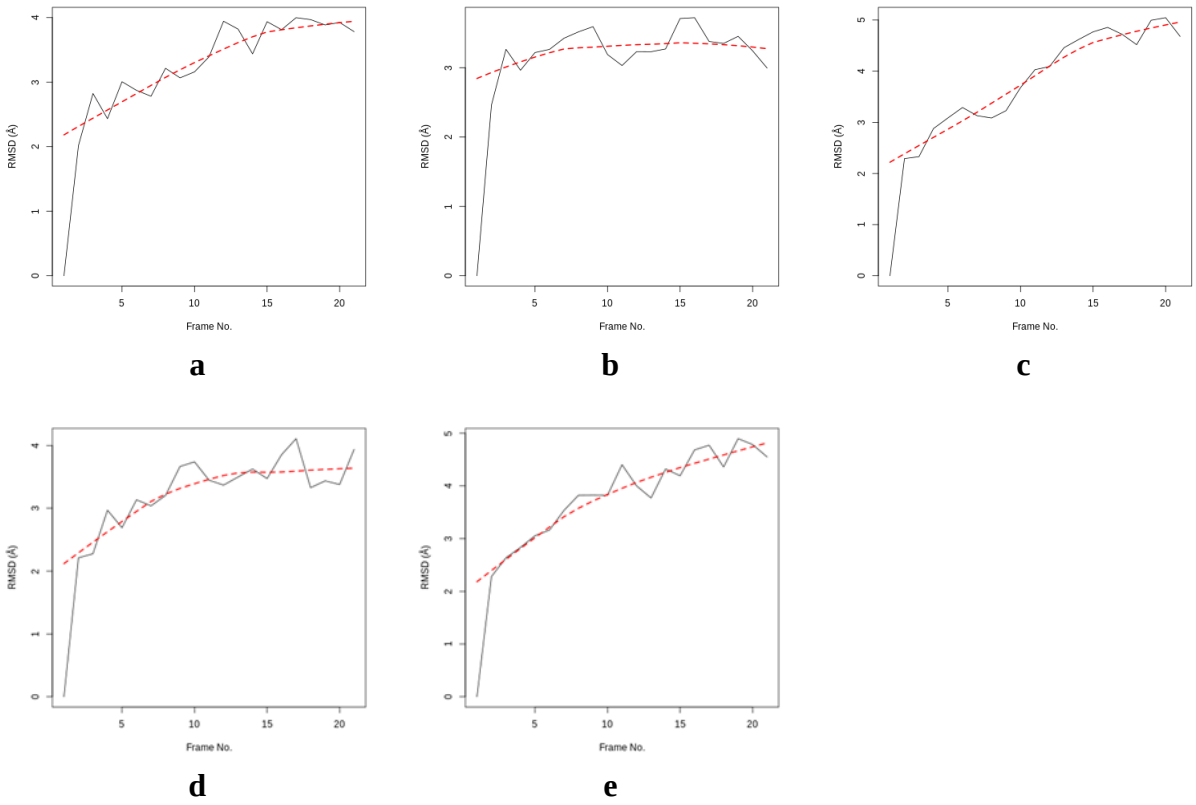


Fig. 7. RMSD for Apo and Holo-structures. a: GNMT; b: GNMT-Sinefungin complex; c: GNMT-Crinamidine complex; d: GNMT-Marmesin complex; e: GNMT-Sinensetin complex

There is a steep increase in RMSD of the simulated Apo protein relative to the crystal structure as the production time increased. The slope suggests that the RMSD values would increase with more simulation time. Similarly, the Holo-structures formed by the Crinamidine and Sinensetin also showed a steep increase of RMSD values all through the trajectory showing instability. This is also shown in the time frame in which their respective highest RMSD values were attained (20 and 19 respectively). The GNMT-Marmesin complex shows a gentle slope that flattens towards the end of the trajectory. The GNMT-Sinefungin complex shows the greatest stability with the least gradient of the slope.

The distribution of RMSD values of the Apo and Holo-structures (Fig. 8 and Table 6) suggests that the greatest deviation to the right from the respective reference structures comes from the GNMT-Crinimadine complex. A total of 17 peaks were found between RMSD values 3.0 to 5.0 Å for the GNMT-Crinimadine complex while 17, 17, and 16 peaks were found in the same positions for the GNMT-Sinefungin, GNMT-Sinensetin, and GNMT-Marmesin complexes respectively. The GNMT-Crinimadine complex shows a wider RMSD range than the GNMT-Sinefungin and GNMT-Sinensetin complexes. This is because the GNMT-Crinimadine complex has a peak between the 5.00 -5.49 Å range while the GNMT-Sinefungin complex has no peak beyond 4.0 Å and GNMT-Sinensetin complex has no peak beyond 5.0 Å.

Beginning of Table 6

Summary of data from Molecular Dynamics Simulations of Apo and Holo structures of SARS-CoV-2 GNMT

MDS Parameters	GNMT	GNMT-Sinefungin	GNMT-Crinamidine	GNMT-Marmesin	GNMT-Sinensetin
RMSD					
Total RMSD	67.269	65.504	77.78	66.383	77.69
Average RMSD	3.203	3.119	3.704	3.16	3.67
Lowest RMSD	0	0	0	0	0
Highest RMSD	3.998	3.721	5.046	4.108	4.895
Time Frame of Highest RMSD	17	16	20	17	19
Time Frame of Lowest RMSD	1	1	1	1	1
RMSD Peak Distribution					
0.00 – 0.49A	1	1	1	1	1
0.50 – 0.99A	0	0	0	0	0
1.00 – 1.49A	0	0	0	0	0
1.50 – 1.99A	0	0	0	0	0
2.00 – 2.49A	2	1	2	2	1
2.50 – 2.99A	3	2	1	2	2
3.00 – 3.49A	6	13	5	10	2
3.50 – 3.99	9	4	1	5	5
4.00 – 4.49	0	0	3	1	5
4.50 – 4.99	0	0	7	0	5
5.00 -5.49	0	0	1	0	0
RMSF					
Total Global RMSF	861.45	708.39	1100.42	864.69	946.28
Average Global RMSF	1.63	1.34	2.09	1.64	1.8
Total Regional (Pocket 41) RMSF	20.98	18.46	30.61	19.9	22.76
Average Regional (Pocket 41) RMSF	1.31	1.16	1.91	1.24	1.42
Least Fluctuation	0.65	0.59	0.62	0.7	0.71
Highest Fluctuation	6.68	6.04	7.1	6.55	6.83
Range of RMSF	6.03	5.45	6.48	5.85	6.12
PCA					
Total global motions (PC1, PC2 & PC3)	19.06382	19.42237	19.36949	19.6954	20.13226
Average global motions (PC1, PC2 & PC3)	0.03611	0.03685	0.03675	0.03737	0.0382
Total Regional (Pocket 41) Motion (PC1, PC2 & PC3)	0.44046	0.56208	0.55081	0.43385	0.55802
Average Regional (Pocket 41) Motion (PC1, PC2 & PC3)	0.02892	0.03513	0.03442	0.02712	0.03488
PC1 Eigenvalue	46.19%	28.44%	70.47%	40.24%	54.26%

End of Table 6

Summary of data from Molecular Dynamics Simulations of Apo and Holo structures of SARS-CoV-2 GNMT

MDS Parameters	GNMT	GNMT-Sinefungin	GNMT-Crinamidine	GNMT-Marmesin	GNMT-Sinensetin
PC2 Eigenvalue	16.23%	18.22%	10.06%	24.89%	11.73%
PC3 Eigenvalue	8.31%	13.31%	3.97%	9.07%	8.23%
Total	70.73%	59.97%	84.50%	74.20%	74.22%
PC1 cosine content	0.694	0.725	0.885	0.802	0.726
PC2 cosine content	0.592	0.003	0.452	0.635	0.553
PC3 cosine content	0.000	0.021	0.259	0.582	0.273
Radius of Gyration					
Average Gyration	6.9955	6.9929	6.9986	6.99292	6.9951
Maximim Gyration	7.00071	6.99792	7.00598	6.99873	6.99983
Minimum Gyration	6.99132	6.98818	6.98944	6.98703	6.98903
Range of Gyration	0.0094	0.0097	0.01654	0.117	0.0108
% Gyration	0.13	0.14	0.24	0.17	0.15
Time Frame of Max. Gyr.	14	21	18	8	5
Time Frame of Min.Gyr.	1	16	1	1	1
B Factor					
Global Average B Factor	324.51	168.72	513.95	247.71	276.95
Regional (Pocket 41) Average B Factor	220.53	167.69	696.14	154.53	260.06

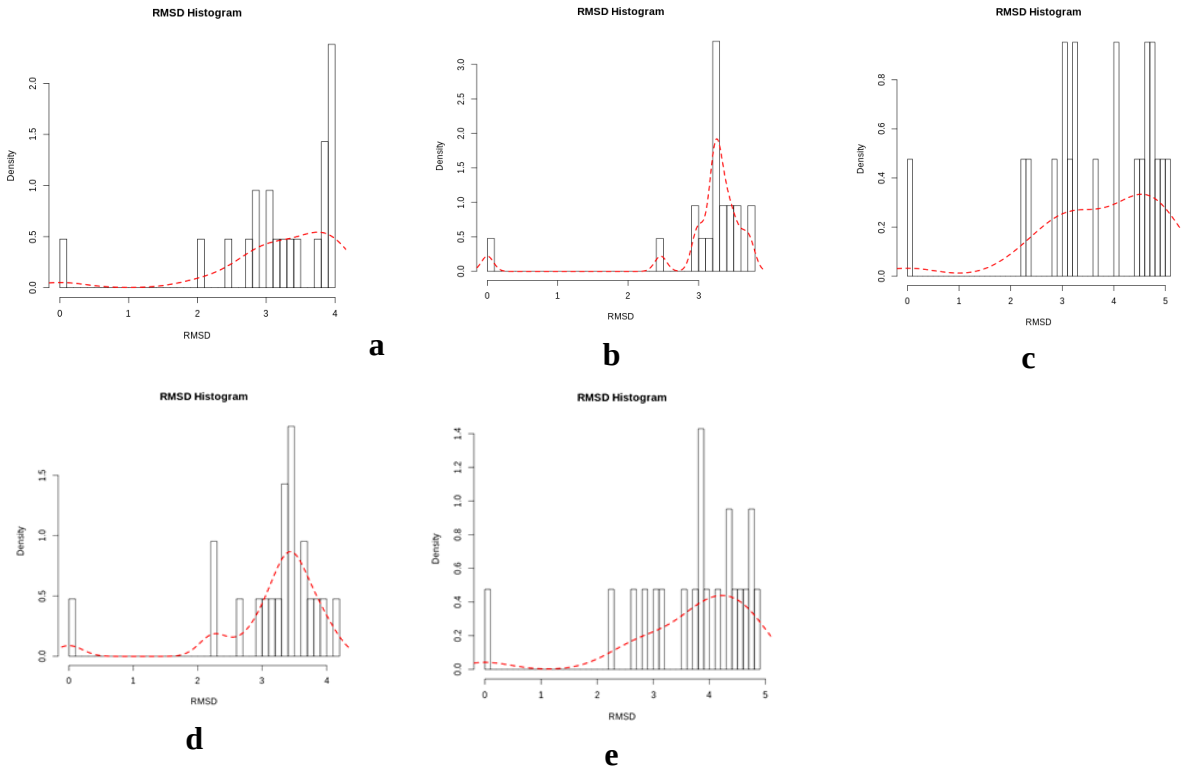


Fig. 8. RMSD histogram for Apo and Holo-structures. a: GNMT; b: GNMT-Sinefungin complex; c: GNMT-Crinamidine complex; d: GNMT-Marmesin complex; e: GNMT-Sinensetin complex

Put together, during the course of the simulation, the ligand-induced protein conformations have changed between different time points in the trajectory. The RMSD data suggests that Crinamdine, Marmesin, and Sinensetin in this order induced more structural distortion to GNMT than the standard. Crinamdine followed closely by Sinensetin showed the greatest ligand-induced instability of the viral protein.

RMSF: The function of a protein is largely dependent on its function and dynamics. Protein motions are global, regional (domain or active site), and local (residue). Protein dynamics can be evaluated through the measure of the root mean square fluctuations (RMSF) of aligned residues. [69].

From Figure 9 and Table 6, the total and average global RMSF is greater in the GNMT-Crinamidine complex than all the other Holo-structures and least in the GNMT-Sinefungin complex (Standard). In this regard, the GNMT-Crinamidine complex is followed by the GNMT-Sinestein complex. The total and average regional (pocket 41) RMSF remained highest in the GNMT-Crinamidine complex followed by the GNMT-Sinestein complex. The lowest values are seen in the GNMT-Sinefungin complex for Pocket 41. In a similar vein, the highest fluctuation and highest range of RMSF were found in the GNMT-Crinamidinecomplex is followed by the GNMT-Sinestein complex. GNMT-Sinefungin complex (Standard) had the lowest values.

Put together, Crinamidine showed the most instability with the greatest fluctuations at both global and regional sites followed by Sinensetin. Globally, Sinefungin showed the least fluctuation at the regional (Pocket 41) site.

Radius of Gyration: TheRoG analysis is run to indicate or ascertain the compactness of the secondary structures within the 3D structure of the protein. It is measured from the center of mass of the molecule with a high RoG suggesting loose packing while a low RoG suggests a tight packing of the protein [70].

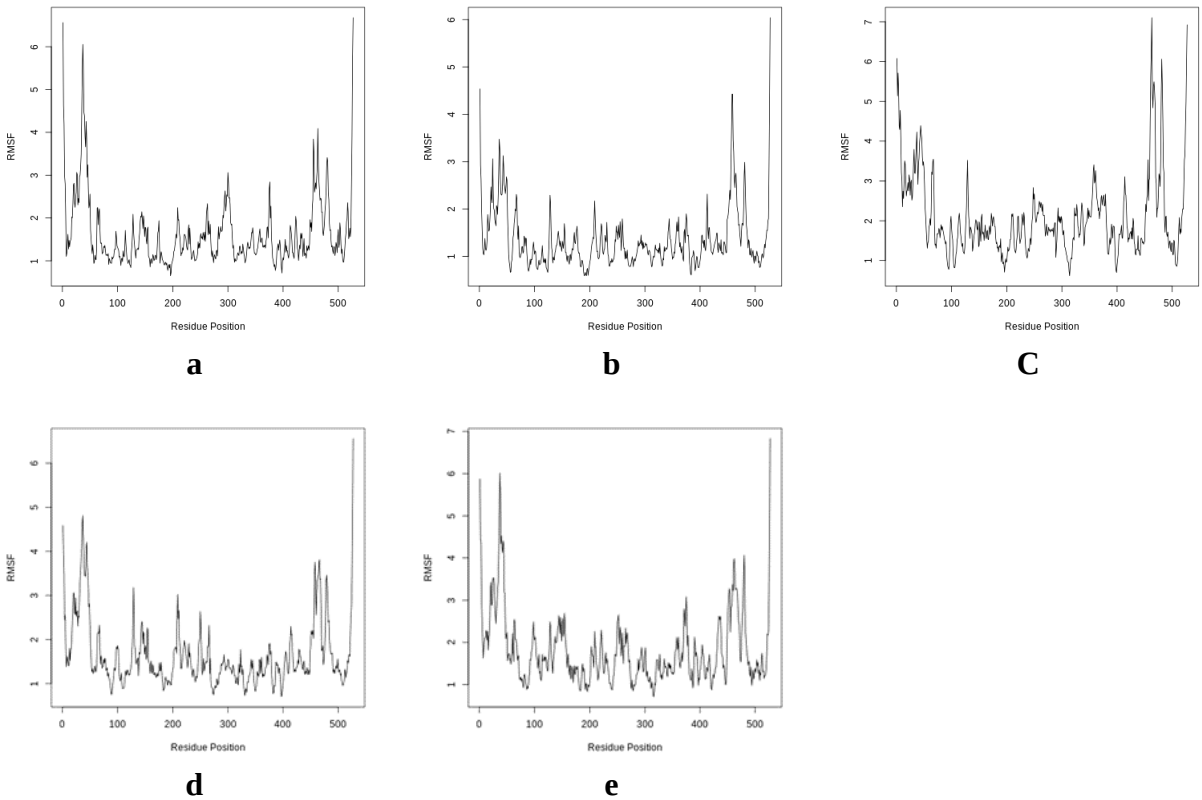


Fig. 9. Per-residue RMSF for Apo and Holo-structures.
a: GNMT; b: GNMT-Sinefungin complex; c: GNMT-Crinamidine complex;
d: GNMT-Marmesin complex; e: GNMT-Sinensetin complex

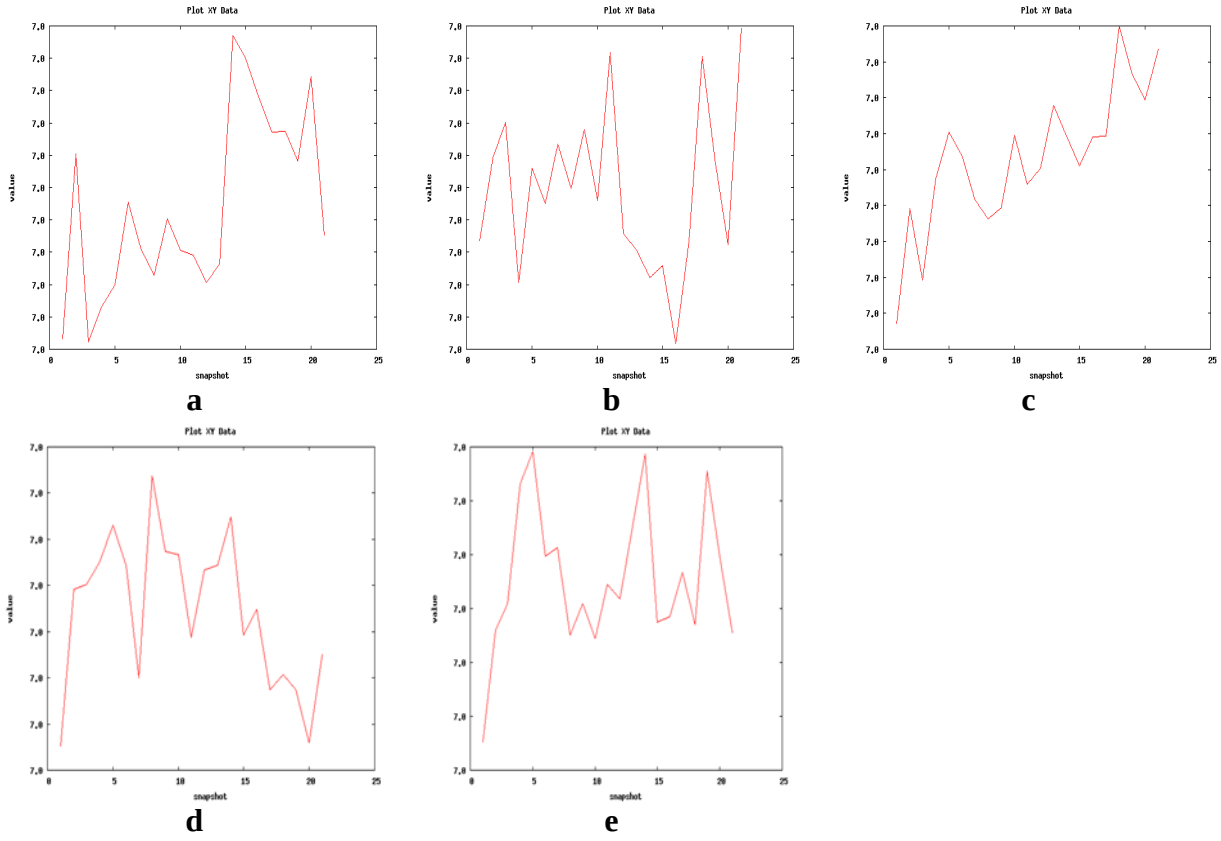


Fig. 10. Radius of gyration for Apo and Holo-structures.
a: GNMT; b: GNMT-Sinefungin complex; c: GNMT-Crinamidinecomplex;
d: GNMT-Marmesin complex; e: GNMT-Sinensetin complex

Graphical representation of the RoG reveals that the GNMT-Crinamindine complex has a steep slope in the upward direction showing the least compactness. The GNMT-Sinefungin complex also progressed upwardly howbeit with a gentle slope (Figure 10). The GNMT-Marmesin complex shows a gentle slope with a downward trend as the trajectory progressed. The GNMT-Sinensetin appears to be flat with a slight downward trend.

Trajectory data for RoG reveals that the GNMT-Crinamindine complex had the highest values of average gyration, range of gyration, and percentage gyration over the trajectory. This made it the least compact of all the Holo-structures. The GNMT-Sinefungin complex is the most compact and only marginally different from the GNMT Marmesin complex. (Table 6). Put together, the Crinamdine followed closely by Sinensetin induced the greatest conformational changes on the target protein as shown by the least compactness. This suggests that they are better GNMT inhibitors than the standard.

B-Factor: The B-Factor or Temperature factor is an evaluation of the thermostability of the protein molecule as it measures the internal atomic motions as reflected in their flexibility or rigidity [71]. The B-factor also directly impacts the residual factor (R factor) which is a determinant of the stereochemical quality of protein structure coordinates [72].

From Figure 11 and Table 6, the graphical plots of the B factor values show high values at the termini of the protein molecules suggesting molecular flexibility at these ends, and that the GNMT-Sinefungin complex is the most thermally stable of all the Holo-structures. The global average B-Factor value of the GNMT-Crinamidine complex is the highest of all the Holo-structures while the GNMT-Sinefungin has the lowest value.

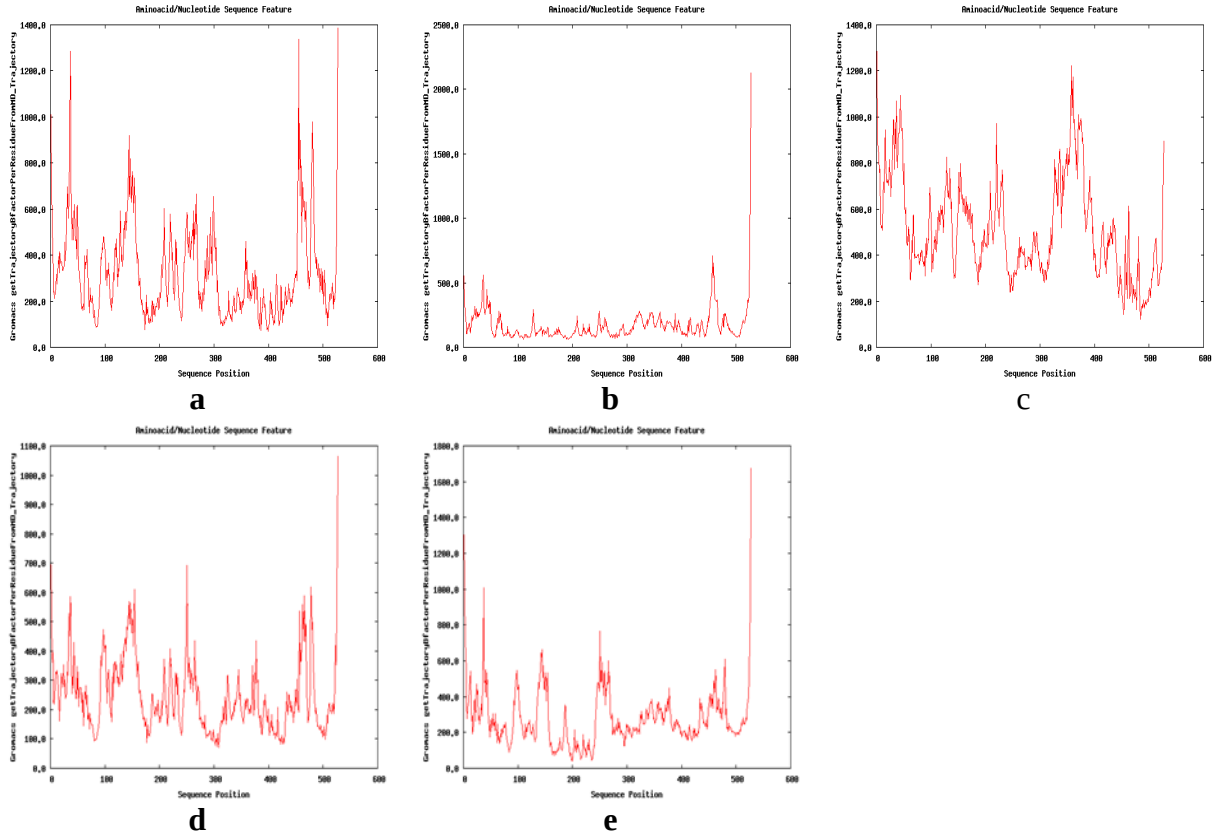


Fig. 11. B Factor for Apo and Holo-structures. a: GNMT; b: GNMT-Sinefungin complex; c: GNMT-Crinamidine complex; d: GNMT-Marmesin complex; e: GNMT-Sinensetin complex

This suggests that at the global level the lead compounds-induced conformations are more thermally unstable than the conformation induced by the standard. In a similar vein, data of the regional average B factor obtained from Pocket 41 suggests that the GNMT-Crinamidinecomplex has the highest values of all the Holo-structures and this was followed by the GNMT-Sinensetin complex. In only the GNMT-Crinamideine complex, the average B-factor value for the Pocket 41 is higher than that of the global average. The GNMT-Marmesin complex has the least B factor value at the regional level. Put together, the greatest temperature-dependent atomic vibrations were induced by Crinamidine binding causing the greatest dynamic disorder of the GNMT stereochemistry.

Principal components Analysis (PCA): New conformations are generated during the molecular dynamic simulation of a protein. The statistical significance of these conformations is determined by the use of principal component analysis (PCA) [73]. Of all the Holo-structures, the total global motions (mean of PC1, PC2, and PC3) were highest in the GNMT-Sinensetincomplexand least in the GNMT-Crinamidine complex. However, the total regional motions (mean of PC1, PC2 & PC3) were highest in the GNMT-Sinefungin complex followed closely by the GNMT-Sinensetin and GNMT-Crinamidine complexes (Figure 12 and Table 6).

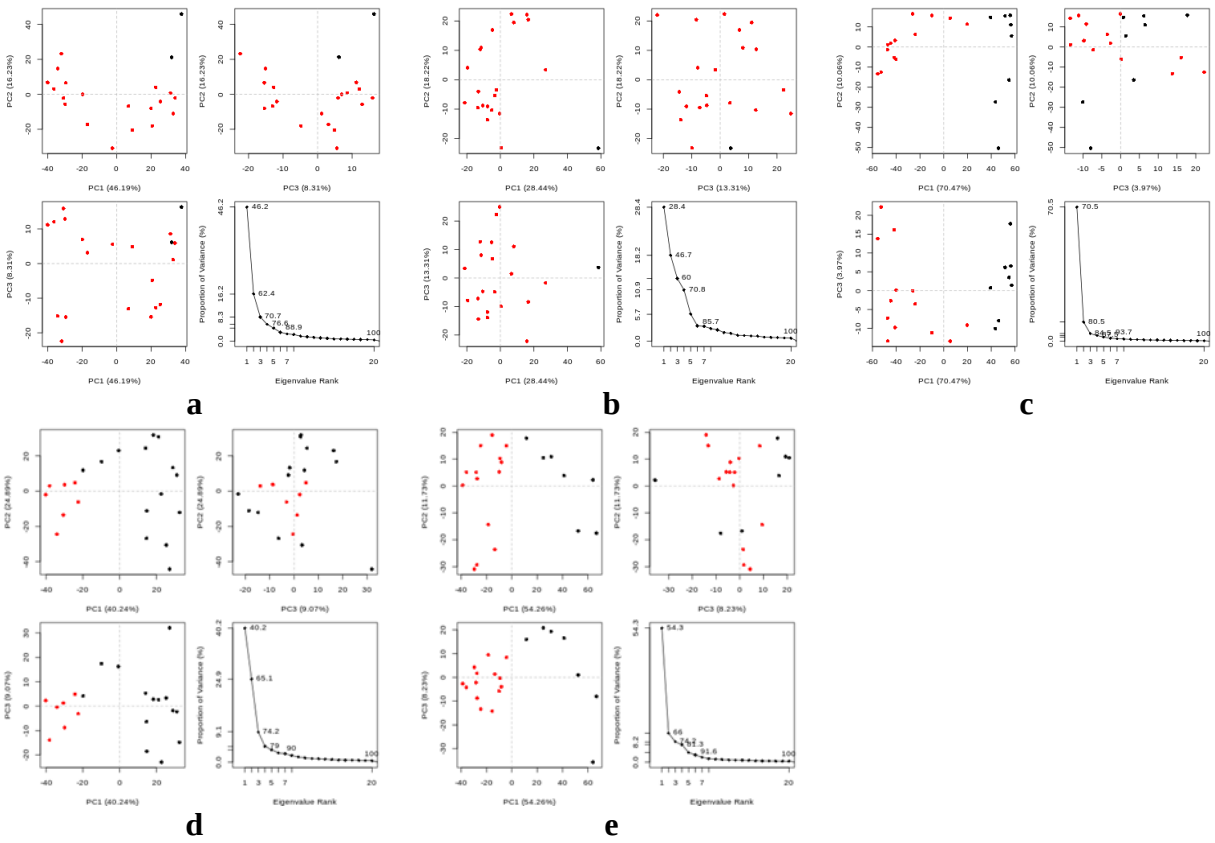


Fig. 12. Principal component analysis cluster plot of Apo and Holo-structures. The projection of trajectory onto 1st few eigenvectors for: a: GNMT; b: GNMT-Sinefungin complex; c: GNMT-Crinamidine complex; d: GNMT-Marmesin complex; e: GNMT-Sinensetin complex

Specifically, based on the greatest motions, the best global conformations are PC2 of the Apo protein, PC1 of the GNMT-Sinefungin complex, PC1 of the GNMT-Crinamidine complex, PC1 of the GNMT-Marmesin complex, and PC3 of the GNMT-Sinensetin complex. Of all these Holo structures, the GNMT-Sinensetin complex has the greatest motion. Similarly, the best conformations that produced the greatest motions at Pocket 41 are PC3, PC3, PC3, PC1, and PC2 of the Apo protein, GNMT-Sinefungin complex, GNMT-Crinamidine complex, GNMT-Marmesin complex, and the GNMT-Sinensetin complexes respectively. Of all these Holo-structures, the GNMT-Crinamidine complex has the greatest motion at the Pocket 41.

The convergence of the MD simulation is revealed by the cosine contents of the principal components. Convergence shows sampling quality, accuracy, and reproducibility. Table 6 shows the results of the cosine content. They show good quality except for a slight non-convergence at the PC3 of the GNMT-Sinefungin complex [74].

The dynamic cross-correlation (DCC) analysis: This is a standard method for analyzing significant intermolecular contacts that are rapidly substituted by side-chain flipping in molecular dynamic simulations [75]. The dynamic cross-correlation map captures the multimodal characteristics of atoms, especially at the interface of macromolecules by quantifying the correlation coefficients of motions between atoms depicting data as positive and negative correlation effect of amino acids [75, 76].

From Figure 13, the strongest overall anti-correlated motion of residues occurred in the GNMT-Crinamidine complex. The active site of GNMT fall within the range of residues 289-426. The GNMT-Sinefungin complex showed non-correlated between residues 300-400 while the other residues in the active site showed moderate anti-correlation motions.

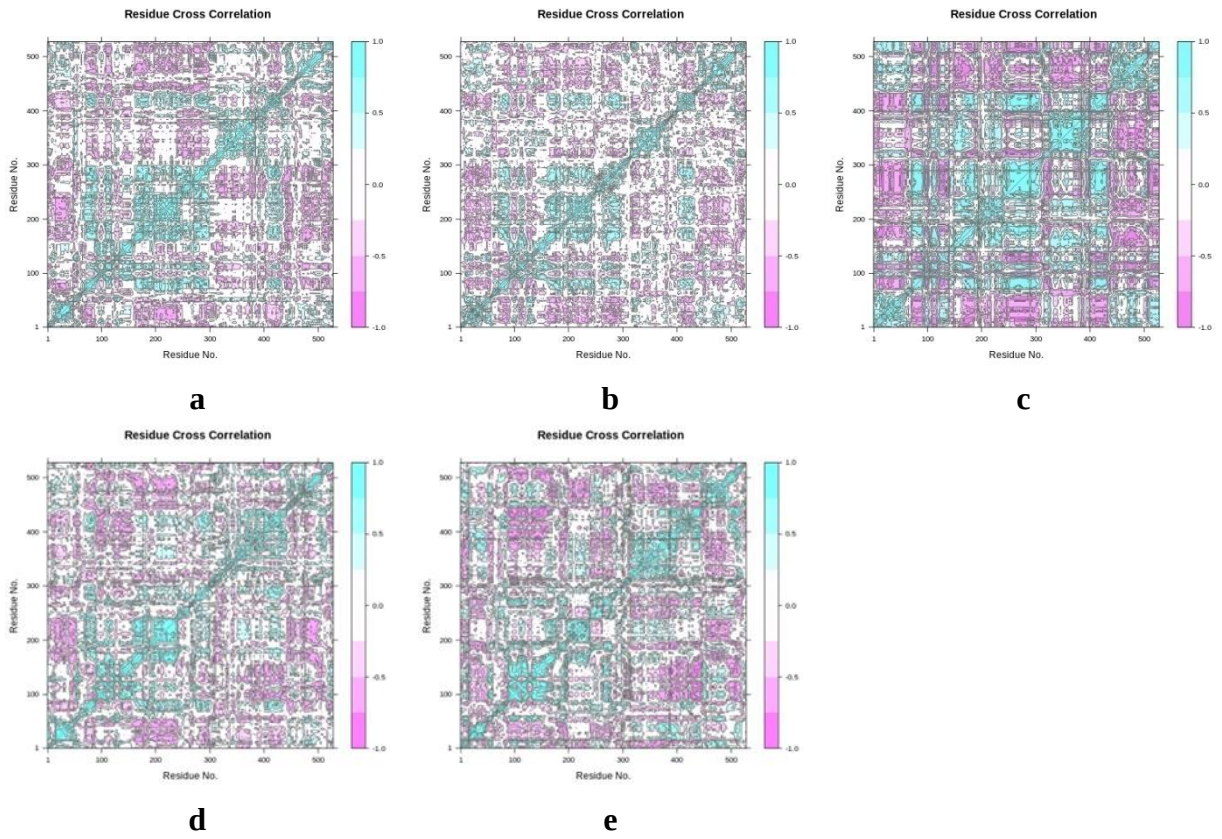


Fig. 13. Dynamic cross correlation map Apo and Holo-structures of 1m4k Purple represents anti-correlated, dark cyan represents fully correlated while white and cyan represents moderately and uncorrelated respectively. 1.0= correlated; 0 is non-correlated; and -1.0 is anti-correlated. a: GNMT; b: GNMT-Sinefungin complex; c: GNMT-Crinamidine complex; d: GNMT-Marmesin complex; e: GNMT-Sinensetin complex

The GNMT-Crinamidine complex showed strong anticorrelation motions between residues 250-450 which covers the whole area of the active site. The GNMT-Marmesin complex shows moderate anticorrelated motions at approximate residues 280-300, predominantly non-correlated motions between residues 300-350, and predominantly moderate anticorrelated motions from residues 350-400. The GNMT-Sinensetin complex showed non-correlation, moderate correlation, and moderate anticorrelation motions between residues 250-300. However, the greater portion consisting of residues 300-450 show moderate anticorrelation motions.

Put together, the greatest anticorrelation motions both globally and regionally (at the active site) were found in the GNMT-Crinamidine complex suggesting the greatest inhibitory activity. The heat map of the GNMT-Sinensetin complex also suggests a greater inhibitory activity than the standard at the active site.

The compounds all showed good oral bioavailability properties except for the Standard which has a high TPSA value. The standard, and the lead compounds all showed favorable absorption, metabolism, excretion, and toxicity properties. The distribution pharmacokinetics are generally favorable except that all the compounds have a poor CNS permeability, poor BBB (except standard and Marmesin) and they are P-glycoprotein substrates (except Marmesin). The standard has the highest number of hydrogen

bonds formed within the active site followed by Crinamidine. The trajectory data such as RMSD, RMSF, B-Factor, DCCM, and RoG, suggests that Crinamidine proved to cause the greatest distortion to the target protein while the standard caused the least at the global and regional levels (Pocket 41). Specifically, of all the compounds, the PC3 of Crinamidine is the conformation caused the greatest distortion at the active site.

Isolated for the *Streptomyces* species, Sinefungin is a natural nucleoside that is a derivative of S-adenosylmethionine (SAM) [77]. It has shown a wide range of biological effects which include amoebicidal, antifungal, antibacterial (*Streptococcus pneumoniae*) and antiparasitic (Plasmodium, malarial, trypanosomal, and leishmanial species) activities [77, 78,79,80].The antiviral activity of Sinefungin has also been established as it has been shown to be an inhibitor of mRNA(guanine-7-)-methyltransferase, mRNA(nucleoside-2'-)-methyltransferase, and DNA methyltransferases [81, 82]. Sinefungin is has been shown to inhibit the multiplication of feline herpesvirus type I, Newcastle disease and vaccinia virus [82, 83].

Crinamidine is an alkaloid obtained from*Crinumlatifolium* and *Talinum triangulare*. In Chinese ethnomedicine, the antiviral and antitumor properties of the extract of *Crinum latifolium* have been reported [84, 85]. Sinensetincan be found in orange (*Citrus sinensis*) peel, and it has a wide range of biological activity such as antiviral, anticancer, antitumor, anti-inflammatory. Sinensetin is an important ingredient of the aqueous extract of *Orthosiphon stamineus* extract which has shown inhibitory properties against Herpes Simplex Virus type 1 [86, 87]. Marmesincan be found in mango and wheat [88]. Its inhibitory activity against the Epstein-Barr virus (EBV) has been reported [89].

Conclusion. After the virtual screening of a library of 1,048 natural compounds against the SARS-CoV-2 GNMT, three lead compounds namely Crinamidine, Sinensetin and Marmesin were identified. Overall, the lead compounds proved to be better drug candidates than the standard in the following order: Crinamidine, Sinensetin and Marmesin.

It is recommended that the inhibitory effect of Crinamidine, Sinensetin and Marmesin on the active site of SARS-CoV-2 GNMT should be further investigated.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Conflict of interests

The authors have no conflict of interest to declare.

References

1. World Health Organization [Internet]. Infection prevention and control during health care when COVID-19 is suspected. [cited 2021Nov18]. Available from: https://www.who,int/publications-detail

2. Worldometer [Internet]. 2020[cited 2021Nov1]. Available from:https://www.worldometers.info/coronavirus/?utm_campaign=homeAdvegas1?

3. de Wit E, van Doremalen N, Falzarano D, et al. SARS and MERS: recent 345 insights into emerging coronaviruses. Nature Reviews Microbiology. 2016;14:523-34. DOI: https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.81

4. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. Nature Microbiology. 2020;5(4):536-44. DOI: https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z

5. Yu C, Deyin G. Molecular mechanisms of coronavirus RNA capping and methylation. Virologica Sinica. 2016;31(1):3-11. DOI: https://doi.org/10.1007/s12250-016-3726-4

6. Li F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. Annual Review of Virology. 2016;3:237-61. DOI: https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301

7. Al-Tameemi K, Kabakli R. Novel Coronavirus (2019-nCoV): Disease briefings. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 2020;13(5):22-7. DOI: http://dx.doi.org/10.22159/ajpcr.2020.v13i5.37436

8. Omrani AS, Saad MM, Baig K, et al. Ribavirin and interferon alfa-2a for severe Middle

East respiratory syndrome coronavirus infection: a retrospective cohort study. The Lancet Infectious Diseases. 2014;14(11):1090-5. DOI: https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70920-X

9. Wu C, Liu Y, Yang Y, et al. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. Acta Pharmaceutica Sinica B. 2020;10(5):766-88. DOI: https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.02.008

10. Shuman S. RNA capping: progress and prospects. RNA. 2015;21(4):735-7. DOI: https://doi.org/10.1261/rna.049973.115

11. Shuman S. What messenger RNA capping tells us about eukaryotic evolution. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2002;3:619-25. DOI: https://doi.org/10.1038/nrm880

12. Topisirovic I, Svitkin YV, Sonenberg N, et al. Cap and cap-binding proteins in the control of gene expression. Wiley interdisciplinary reviews. RNA. 2011;2(2):277-98. DOI: https://doi.org/10.1002/wrna.52

13. Varshney D, Petit A, Bueren-Calabuig JA, et al. Molecular basis of RNA guanine-7 methyltransferase (RNMT) activation by RAM. Nucleic Acids Research. 2016;44(21):10423-36. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkw637

14. Chen Y, Cai H, Xiang N, et al. Functional screen reveals SARS coronavirus nonstructural protein nsp14 as a novel cap N7 methyltransferase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2009;106(9):3484-9. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.0808790106

15. Chen Y, Tao J, Sun Y, et al. Structure-function analysis of severe acute respiratory syndrome coronavirus RNA cap guanine-N7-methyltransferase. Journal of Virology. 2013;87(11):6296-305. DOI: https://doi.org/10.1128/JVI.00061-13

16. Sun Y, Wang Z, Tao J, et al. Yeast-based assays for the high-through-put screening of inhibitors of coronavirus RNA cap guanine-N7-methyltranferase. Antiviral Research. 2014;104:156-64. DOI: https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.02.002

17. Aouadi W, Eydoux C, Coutard B, et al. Toward the identification of viral cap-methyltransferase inhibitors by fluorescence screening assay. Antiviral Research. 2017;144:330-9. DOI: https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.06.021

18. Decroly E, Canard B. Biochemical principles and inhibitors to interfere with viral capping pathways. Current Opinion in Virology. 2017;24:87-96. DOI: https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.04.003

19. Guilloux LV, Peter S, Pierre T. Fpocket: An open-source platform for ligand pocket detection. BMC Bioinformatics. 2009;10:168. DOI: https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-168

20. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. Nature Protocols. 2010;5:725-38. DOI: https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5

21. Ramachandran S, Kota P, Ding F, et al. Automated minimization of steric clashes in protein structures. Proteins: Structure, Function and Bioinformatics. 2011;79(1):261-70. DOI: https://doi.org/10.1002/prot.22879

22. Kim S, Chen J, Cheng T, et al. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. Nucleic Acids Research. 2019;47(D1):D1102-9. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gky1033

23. Atatreh N, Al Rawashdah S, Al Neyadi SS, et al. Discovery of new butyrylcholinesterase inhibitors via structure-based virtual screening. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 2019;34(1):1373-9. DOI: https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1644329

24. Dallakyan S, Olson AJ. Small-molecule library screening by docking with PyRx. Methods in Molecular Biology. 2015;1263:243-50. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2269-7_19

25. Gacche RN, Meshram RJ, Dawane AA, et al. Modeling studies of arginase from *Helicobacter pylori* divulge novel inhibitor-protein interactions. Clinical Proteomics.2016;1(3):54-61. DOI: https://doi.org/10.15761/CPB.1000113

26. Trott O, Olson AJ. Auto Dock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. Journal of Computational Chemistry. 2010;31(2):455-61. DOI: https://doi.org/10.1002/jcc.21334

27. Daina A, Olivier M, Vincent Z. Swiss ADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. Scientific Reports. 2017;7:42717. DOI: https://doi.org/10.1038/srep42717

28. Pires DEV, Blundell TL, Ascher DB. pk CSM: predicting small-molecule pharmacokinetic properties using graph-based signatures. Journal of Medicinal Chemistry.

2015;58(9):4066-72. DOI: https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104

29. Molinspiration [Internet]. Calculation of Molecular Properties and Bioactivity Score. 2015 [cited 2021Nov18]. Available from: http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties

30. Mishra SS, Chandra SS, Hemendra PS, et al. In silico ADME, Bioactivity and Toxicity Parameters Calculation of Some Selected Anti-Tubercular Drugs. International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research. 2016;6(6):77-9. DOI: https://doi.org/10.24896/eijppr.2016661

31. DeLano WL. Pymol: An open-source molecular graphics tool. CCP4 Newsletter on protein crystallography. 2020;40:82-92.

32. Salentin S, Schreiber S, Haupt VJ, et al. PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. Nucleic Acids Research. 2015;43(W1):W443-7. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkv315

33. Lionta E, Spyrou GK, Vassilatis D, et al. Structure-based virtual screening for drug discovery: principles, applications and recent advances. Current Topics in Medicinal Chemistry. 2014;14(16):1923-38. DOI: https://doi.org/10.2174/1568026614666140929124445

34. Afghan E, Dannon B, Marius VB, et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: update. Nucleic Acids Research. 2016;44(W1):W3-10. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gky379

35. Franco-Ulloa S, Riccardi L, Rimembrana F, et al. Nanomodeler: A webserver for molecular simulations and engineering of nanoparticles. Journal of Chemical Theory and Computation. 2019;15(3):2022-32. DOI: https://doi.org/10.1021/acs.jctc.8b01304

36. Dodda LS, Cabeza VI, Tirado-Rives J, et al. LigParGen web server: an automatic OPLSAA parameter generator for organic ligands. Nucleic Acids Research. 2017;3(W1):W331-6. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkx312

37. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. Software X. 2015;1-2:19-25. DOI: https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001

38. Hospital A, Andrio P, Fenollosa C, et al. MDWeb and MDMoby: an integrated web-based platform for molecular dynamics simulations. Bioinformatics. 2012;28(9):1278-9. DOI: https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts139

39. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Advanced Drug Delivery Reviews.1997;23(1-3):3-25. DOI: https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1

40. Okoli PT, Nzute VC, Durojaye OA, et al. An in-silico pharmacokinetics study on Cis-heptadeca-1, 9-Diene-4, 6-Diyne-3, 8-Diol: A nutraceutical compound with anticancer properties. Asian Food Science Journal. 2019;7:1-7. DOI: https://doi.org/10.9734/afsj/2019/v7i329972

41. Ghose AK, Viswanadhan VN, Wendoloski JJ. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. Journal of Combinatorial Chemistry. 1999;1(1):55-68. DOI: https://doi.org/10.1021/cc9800071

42. Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. Journal of Medicinal Chemistry. 2002;45(12):2615-23. DOI: https://doi.org/10.1021/jm020017n

43. Al Wasidi AS, Hassan AS, Naglah AM. *In vitro* cytotoxicity and druglikeness of pyrazolines and pyridines bearing benzofuran moiety. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2020;10(4):142-8. DOI: https://doi.org/10.7324/JAPS.2020.104018

44. Clark DE. What Has Polar Surface Area Ever Done for Drug Discovery? Future Medicinal Chemistry. 2011;3(4):469-84. DOI: https://doi.org/10.4155/fmc.11.1

45. Clemons PA, Bodycombe NE, Carrinski HA, et al. Small molecules of different origins have distinct distributions of structural complexity that correlate with protein-binding profiles. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2010;107(44):18787-92. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.1012741107

46. Feldmann C, Miljković F, Yonchev D, et al. Identifying Promiscuous Compounds with Activity against Different Target Classes. Molecules. 2019;24(22):4185. DOI: https://doi.org/10.3390/molecules24224185

47. Imran M, Choudhary MA, Kumar N, et al. Synthesis, spectroscopic characterization and Petra Osiris Molinspiration (POM) analyses of

dicarboxylic acid amides. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2016;7(5):1915-27. DOI: https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7(5).1915-27

48. Khan T, Dixit S, Ahmad R, et al. Molecular docking, PASS analysis, bioactivity score prediction, synthesis, characterization and biological activity evaluation of a functionalized 2-butanone thiosemicarbazone ligand and its complexes. Journal of Chemical Biology. 2017;10:91-104. DOI: https://doi.org/10.1007/s12154-017-0167-y

49. Lin J, Sahakian DC, De Morais SM, et al. The role of absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity in drug discovery. Current Topics in Medicinal Chemistry. 2003;3(10):1125-54. DOI: https://doi.org/10.2174/1568026033452096

50. Bachmakov I, Werner U, Endress B, et al. Characterization of β-adrenoceptor antagonists as substrates and inhibitors of the drug transporter P-glycoprotein 1. Fundamental and Clinical Pharmacology. 2006;20(3):273-82. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2006.00408.x

51. Amin ML. P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery. Drug Target Insights. 2013;7:27-34. DOI: https://doi.org/10.4137/DTI.S12519

52. Varma MV, Ashokraj Y, Dey CS, et al. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. Pharmacological Research. 2003;48(4):347-59. DOI: https://doi.org/10.1016/S1043-6618(03)00158-0

53. Ondieki G, Nyagblordzro M, Kikete S, et al. Cytochrome P450 and P-Glycoprotein-Mediated Interactions Involving African Herbs Indicated for Common Noncommunicable Diseases. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 2017;2582463. DOI: https://doi.org/10.1155/2017/2582463

54. Zhou SF. Drugs behave as substrates, inhibitors and inducers of human cytochrome P450 3A4. Current Drug Metabolism. 2008;9(4):310-22. DOI: https://doi.org/10.2174/138920008784220664

55. Sliwoski G, Kothiwale S, Meiler J, et al. Computational methods in drug discovery. Pharmacological Reviews. 2013;66(1):334-95. DOI: https://doi.org/10.1124/pr.112.007336

56. Bell EW, Zhang Y. DockRMSD: an open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. Journal of Cheminformatics. 2019;11:40. DOI: https://doi.org/10.1186/s13321-019-0362-7

57. Sarkar A, Kellogg GE. Hydrophobicity-shake flasks, protein folding and drug discovery. Current Topics in Medicinal Chemistry. 2010;10(1):67-83. DOI: https://doi.org/10.2174/156802610790232233

58. Jeffrey GA. An Introduction to Hydrogen Bonding. Oxford University Press; 1997.

59. Gao J, Bosco DA, Powers ET, et al. Localized thermodynamic coupling between hydrogen bonding and microenvironment polarity substantially stabilizes proteins. Nature Structural and Molecular Biology. 2009;16:684-90.DOI: https://doi.org/10.1038/nsmb.1610

60. Salentin S, Haupt VJ, Daminelli S, et al. Polypharmacology rescored: Protein–ligand interaction profiles for remote binding site similarity assessment. Progress in Biophysics and Molecular Biology. 2014;116(2-3):174-86. DOI: https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2014.05.006

61. Chen D, Oezguen N, Urvil P, et al. Regulation of protein-ligand binding affinity by hydrogen bond pairing. Science advances. 2016;2(3):e1501240. DOI: https://doi.org/10.1126/sciadv.1501240

62. Desiraju G, Steiner T. The Weak Hydrogen Bond. In *Structural Chemistry and Biology*; Oxford University Press: Oxford; 2001.

63. Ching LL, Koh C, Reker D, et al. Predicting protein-ligand interactions based on bow-pharmacological space and Bayesian additive regression trees. Scientific Reports. 2019;9:7703. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-019-43125-6

64. de Freitas RF, Schapira M. A systematic analysis of atomic protein-ligand interactions in the PDB. MedChemComm. 2017;8:1970-81. DOI: https://doi.org/10.1039/C7MD00381A

65. Kumar S, Nussinov R. Close-range electrostatic interactions in proteins. ChemBioChem. 2002;3(7):604-17. DOI: https://doi.org/10.1002/1439-7633(20020703)3:7<604::AID-CBIC604>3.0.CO;2-X

66. Kurczab R, Śliwa P, Rataj K, et al. Salt Bridge in Ligand–Protein Complexes—Systematic Theoretical and Statistical Investigations. Journal of Chemical Information and Modeling. 2018;58(11):2224-38. DOI: https://doi.org/10.1021/acs.jcim.8b00266

67. Maiorov VN, Crippen GM. Significance of root-mean-square deviation in comparing three-dimensional structures of globular proteins. Journal of Molecular Biology. 1994;235(2):625-34. DOI: https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1017

68. Kirchmair J, Markt P, Distinto S, et al. Evaluation of the performance of 3D virtual screening protocols: RMSD comparisons, enrichment assessments, and decoy selection—what can we learn from earlier mistakes? Journal of Computer-Aided Molecular Design. 2008;22:213-28. DOI: https://doi.org/10.1007/s10822-007-9163-6

69. Fuglebakk E, Echave J, Reuter N. Measuring and comparing structural fluctuation patterns in large protein datasets. Bioinformatics. 2012;28(19):2431-40. DOI: https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts445

70. Sneha P, Doss CGP. Molecular dynamics: new frontier in personalized medicine. Advances in Protein Chemistry and Structural Biology. 2016;102:181-224. DOI: https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2015.09.004

71. Sun Z, Liu Q, Qu G, et al. Utility of B-Factors in Protein Science: Interpreting Rigidity, Flexibility, and Internal Motion and Engineering Thermostability. Chemical Reviews. 2019;119(3):1626-65. DOI: https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00290

72. Carson M, Bugg C, DeLucas L, et al. Comparison of homology model to the experimental structure of a novel serine protease. Acta Crystallographica Section D: Structural Biology. 1994;D50:889-99. DOI: https://doi.org/10.1107/S0907444994004907

73. David CC, Jacobs DJ. Principal component analysis: a method for determining the essential dynamics of proteins. Methods in Molecular Biology. 2014;1084:193-226. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-658-0_11

74. Sawle L, Ghosh K. Convergence of Molecular Dynamics Simulation of Protein Native States: Feasibility vs Self-Consistency Dilemma. Journal of Chemical Theory and Computation. 2016;12(2):861-9. DOI: https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00999

75. Kasahara K, Fukuda I, Nakamura H. A Novel Approach of Dynamic Cross Correlation Analysis on Molecular Dynamics Simulations and Its Application to Ets1 Dimer-DNA Complex. PLoS ONE. 2014;9(11):e112419. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112419

76. Mubashir H, Saba S, Sung SY, et al. Molecular Docking and Dynamic Simulation of AZD3293 and Solanezumab Effects Against BACE1 to Treat Alzheimer's Disease. Frontiers in Computational Neuroscience. 2018;12:1-34. DOI: https://doi.org/10.3389/fncom.2018.00034

77. Nolan LL. Molecular target of the antileishmanial action of sinefungin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1987;31(10):1542-8. DOI: https://doi.org/10.1128/AAC.31.10.1542

78. Kumar YM, Park S, Chae S, et al. Sinefungin, a natural nucleoside analogue of S-adenosylmethionine, inhibits *Streptococcus pneumoniae* biofilm growth. BioMed Research International. 2014;2014:156987. DOI: https://doi.org/10.1155/2014/156987

79. Trager W, Tershakovec M, Chiang PK, et al. *Plasmodium falciparum*: antimalarial activity in culture of sinefungin and other methylation inhibitors. Experimental Parasitology. 1980;50(1):83-9. DOI: https://doi.org/10.1016/0014-4894(80)90010-7

80. Dube DK, Mpimbaza G, Allison AC, et al. Antitrypanosomal activity of sinefungin. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1983;32(1):31-3. DOI: https://doi.org/10.4269/ajtmh.1983.32.31

81. Ihsan MF, Yanuar A. Molecular Dynamics Simulations of several selected compounds from the herbal database of Indonesia results of molecular docking against DNA Methyltranferase enzyme. International Journal of Applied Pharmaceutics. 2018;10(1):285-90. DOI: https://doi.org/10.22159/ijap.2018.v10s1.63

82. Pugh CS, Borchardt RT, Stone HO. Sinefungin, a potent inhibitor of virion mRNA(guanine-7-)-methyltransferase, mRNA(nucleoside-2'-)-methyltransferase, and viral multiplication. Journal of Biological Chemistry. 1978;253(12):4075-7. DOI: https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)34682-3

83. Kuroda Y, Yamagata H, Nemoto M, et al. Antiviral effect of sinefungin on in vitro growth of feline herpesvirus type 1. Journal of Antibiotics. 2019;72:981-5. DOI: https://doi.org/10.1038/s41429-019-0234-4

84. Jenny M, Wondrak A, Zvetkova E, et al. *Crinum Latifolium* Leave Extracts Suppress Immune Activation Cascades in Peripheral Blood Mononuclear Cells and Proliferation of Prostate Tumor Cells. Scientia Pharmaceutica. 2011;79(2):323-35. DOI: https://doi.org/10.3797/scipharm.1011-13

85. Ikewuchi CC, Ikewuchi JC, Ifeanacho MO. Bioactive phytochemicals in an aqueous extract of the leaves of *Talinum triangulare*. Food Science and Nutrition. 2017;5(3):696-701. DOI: https://doi.org/10.1002/fsn3.449

86. Ripim NSM, Fazil N, Ibrahim SNK, et al. Antiviral Properties of *Orthosiphon stamineus* Aqueous Extract in Herpes Simplex Virus Type 1 Infected Cells. Sains Malaysiana. 2018;47(8):1725-30. DOI: http://dx.doi.org/10.17576/jsm-2018-4708-11

87. Hossain MA, Ismail Z. Quantification and enrichment of sinensetin in the leaves of *Orthosiphon stamineus*. Arabian Journal of Chemistry. 2016;9(2):S1338-S1341. DOI: https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.02.016

88. Scalbert A, Andres-Lacueva C, Arita M, et al. Databases on Food Phytochemicals and Their Health-Promoting Effects. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2011;59(9):4331-48. DOI: https://doi.org/10.1021/jf200591d

89. Ee GCL, Razis AFA. Phytochemical Constituents and Biological Activities of Melicopelunu-ankenda. Molecules. 2018;23(10):2708. DOI: https://doi.org/10.3390/molecules23102708

Received 18 November 2021
Revised 19 March 2022
Accepted 23 April 2022

Information about the authors

Adekunle B. Rowaiye, PhD, DVM, Doctor, Deputy Director of the National Biotechnology Development Agency, Abuja, Nigeria, E-mail: adekunlerowaiye@gmail.com, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-8773-5944.

Olukemi A. Onuh, PhD, MSc, Doctorate, Deputy Director of the National Biotechnology Development Agency, Abuja, Nigeria, E-mail: kemmieonuh@yahoo.com, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5545-4662.

Joy A. Oladimeji-Salami, PhD, MSc, Doctorate, Assistant Chief Scientific Officer at the National Biotechnology Development Agency, Abuja, Nigeria, E-mail: soiy143@gmail.com, ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1474-3801.

Doofan Bur, DSc, Scientific Officer I at the National Biotechnology Development Agency, Abuja, Nigeria, E-mail: doughfaniyorza@gmail.com, ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7625-7118.

Moses Njoku, PhD, MSc, Doctorate, Head of Department of the National Institute for Pharmaceutical Research and Development, Abuja, Nigeria, E-mail: njokum2003@yahoo.com, ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2837-5368.

Nma H. Ifedilichukwu, PhD in view, MSc, Assistant Chief Research Office rat the National Biotechnology Development Agency, Abuja, Nigeria, E-mail: ufenma@yahoo.co.uk, ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7538-8888.

Comfort O. John, MLS, MSc, Chief Lab Technician at the National Biotechnology Development Agency, Abuja, Nigeria, E-mail: commyo2009@yahoo.com, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1631-1650.

Olanike Binuyo, PhD in view, MSc, Senior Lab Scientist at the National Biotechnology Development Agency, Abuja, Nigeria, E-mail: nikebinuyo@yahoo.com, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-8100-9183.

Faith P. Udoh, MSc, Senior Scientific Officer at the National Biotechnology Development Agency, Abuja, Nigeria, E-mail: gblackyoung@yahoo.com, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-8811-1535.

(cc) BY

DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-3-0-7 **УДК 616-092.9:615.21/26**

Коррекция митохондриальной дисфункции коричными кислотами при экспериментальной гиперцитокинемии

Д.И. Поздняков

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет», пл. Павших борцов, д. 1, г. Волгоград, 400131, Российская Федерация
Автор для переписки: Д.И. Поздняков (pozdniackow.dmitry@yandex.ru)

Резюме

Актуальность: Митохондриальная дисфункция является существенной составляющей патогенеза гиперцитокиновой нейротоксичности и представляет собой перспективную фармакотерапевтическую мишень. **Цель исследования:** Оценить влияние коричных кислот на изменение митохондриальной функции в ткани головного мозга у крыс в условиях экспериментальной гиперцитокинемии. **Материалы и методы:** Гиперцитокинемию моделировали у крыс путем внутрибрюшинного введения липополисахарида в дозе 10 мг/кг. Исследуемые соединения (коричную, феруловую, кумаровую, кофейную, синаповую кислоты) и препарат сравнения (этилметилгидроксипиридина сукцинат) вводили в дозе 100 мг/кг, перорально на протяжение 14 дней с момента введения липополисахарида. Далее у крыс оценивали изменение неврологического дефицита и в митохондриальной фракции головного мозга определяли активность сукцинатдегидрогеназы и цитохром-с-оксидазы, концентрацию митохондриального пероксида водорода и супероксид-радикала. **Результаты:** Применение препарата сравнения, кофейной и кумаровой кислот и в меньшей степени коричной кислоты способствовало уменьшению неврологического дефицита у крыс (на 38,5%; 42,3% 40,4% и 21,2% соответственно, все показатели $p<0,05$ относительно группы животных негативного контроля), при увеличении активности сукцинатдегидрогеназы (на 23,0% ($p<0,05$); 30,0% ($p<0,05$) и 20,0% ($p<0,05$), коричная кислота значимого влияния на активность фермента не оказала) и цитохром-с-оксидазы (на 22,2%; 34,4%; 32,2%; и 22,2% соответственно, все показатели $p<0,05$ относительно группы животных негативного контроля), а также снижении концентрации супероксид радикала (на 38,8%; 48,8%;46,3%;и 33,4% соответственно, все показатели $p<0,05$ относительно группы животных негативного контроля) и пероксида водорода (на 25,0% ($p<0,05$); 54,2% ($p<0,05$); 50,4% и 27,9% ($p<0,05$) соответственно). При этом, антирадикальная активность и изменение активности сукцинатдегидрогеназы коррелировало с нормальным градиентом молекул. **Заключение:** Исследование показало возможность применения коричных кислот, содержащих свободные гидроксильные группы в ароматическом кольце, для коррекции постгиперцитокиновой нейротоксичности.

Ключевые слова: коричные кислоты; нейротоксичность; митохондриальная дисфункция; гиперцитокинемия

Для цитирования: Поздняков ДИ. Коррекция митохондриальной дисфункции коричными кислотами при экспериментальной гиперцитокинемии. Научные результаты биомедицинских исследований. 2022;8(3):351-364. DOI:10.18413/2658-6533-2022-8-3-0-7

Correction of mitochondrial dysfunction with cinnamic acids in experimental hypercytokinemia

Dmitry I. Pozdnyakov

Volgograd State Medical University,
1 Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, 400131, Russia
Corresponding author: Dmitry I. Pozdnyakov (pozdniackow.dmitry@yandex.ru)

Abstract
Background: Mitochondrial dysfunction is an essential component of the hypercytokine neurotoxicity pathogenesis and is a promising pharmacotherapeutic target. **The aim of the study:** To evaluate the effect of cinnamic acids on changes in mitochondrial function in brain tissue of rats under experimental hypercytokinemia. **Materials and methods:** Hypercytokinemia was modeled in rats by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide at a dose of 10 mg/kg. The test compounds (cinnamic, ferulic, coumaric, caffeic, synapic acids) and the reference medicine (ethylmethylhydroxypyridine succinate) were administered at a dose of 100 mg/kg, orally for 14 days from the moment of lipopolysaccharide injection. Further, changes of neurological deficits in rats and the activity of succinatedehydrogenase and cytochrome-c-oxidase were assessed, the concentration of mitochondrial hydrogen peroxide and superoxide radical were determined in the mitochondrial fraction of the brain. **Results:** The use of the reference, caffeic and coumaric acids and, to a lesser extent, cinnamic acid contributed to a decrease in neurological deficit in rats (by 38.5%; 42.3%, 40.4% and 21.2%, respectively, all indicators $p<0.05$ relative to the negative control group of animals), with an increase in succinate dehydrogenase activity (by 23.0% ($p<0.05$); 30.0% ($p<0.05$) and 20.0% ($p<0.05$), cinnamic acid had no significant effect on enzyme activity) and cytochrome- c-oxidase (by 22.2%; 34.4%; 32.2%; and 22.2%, respectively, all indicators $p<0.05$ relative to the group of negative control animals), as well as a decrease in the concentration of superoxide radical (by 38.8%; 48.8%; 46.3%; and 33.4%, respectively, all indicators $p<0.05$ relative to the negative control group of animals) and hydrogen peroxide (by 25.0% ($p<0.05$); 54.2% ($p<0.05$); 50.4% and 27.9% ($p<0.05$), respectively). At the same time, the antiradical activity and the change in the activity of succinatedehydrogenase correlated with the normal gradient of the molecules. **Conclusion:** The study showed the possibility of using cinnamic acids containing free hydroxyl groups in the aromatic ring to correct posthypercytokine neurotoxicity.
Keywords: cinnamic acids; neurotoxicity; mitochondrial dysfunction; hypercytokinemia

For citation: Pozdnyakov DI. Correction of mitochondrial dysfunction with cinnamic acids in experimental hypercytokinemia. Research Results in Biomedicine. 2022;8(3):351-364. Russian. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-3-0-7

Введение. Гипперцитокиновые расстройства, такие как «цитокиновый шторм» наносят огромный ущерб организму человека. В результате массированного выброса в системный кровоток провоспалительных цитокинов отмечается развитие полиорганной недостаточности, в ходе которой прежде всего повреждаются сердечно-сосудистая, дыхательная и выделительная системы [1]. Также было установлено, что гиперпродукция цитокинов (фактор некроза опухоли -α (ФНО-α), интерлейкин-6 (ИЛ-6) и интерлейкин 1-β (ИЛ-1β)) и вызываемые ими эффекты негативно отражаются на структурно-функциональной целостности нейронов головного мозга, запуская процессы нейровоспаления [2]. Активация процессов воспаления мозговой ткани приводит к повреждению эндотелия мозговых сосудов, увеличению проницаемости гематоэнцефалического барьера, эксайтотоксичности, дегенерации аксонов, нейромедиаторному дисбалансу и ухудшению клеточного метаболизма [3].

Также, воспалительные процессы в ткани головного мозга могут активироваться не только провоспалительными цитокинами или хемокинами. Не последнюю роль в нейровоспалении играют активные формы кислорода (АФК), провоспалительные ферменты, такие как индуцибельная синтаза оксида азота (iNOS) и вторичные мессенджеры. На сегодняшний день установлено, что повышению интенсивности нейровоспалительных реакций способствуют «неклассические» соединения, например, вещества, образующиеся в ходе деструкции митохондрий клетки [4]. Митохондрии содержат целый ряд потенциально сильных провоспалительных агентов, таких как митохондриальная ДНК (мтДНК), цитохром С, кардиолипин, формилпептиды, которые в определенных условиях могут приобретать иммуногенные свойства. Одной из таковых причин является окислительная модификация митохондрий под действием прооксидантов с последующей их гибелью [5]. В результате лизиса митохондрий окисленная мтДНК инициирует вторичный выброс цитокинов/хемокинов глиальными клетками, усиливая нейровоспалительные процессы. Также клетки глии могут активироваться избытком молекул АТФ, увеличивая экспрессию гена ИЛ-6 [6].

В этой связи можно предположить, что сохранение целостности митохондрий, а также стабилизации их функции может уменьшить негативное влияние цитокинов на клетки головного мозга [7].

В коррекции митохондриальных нарушений все большую актуальность приобретают соединения природного происхождения, которые выгодно отличаются от веществ, полученных синтетическим путем, оптимальным соотношением эффективность/безопасность. Установлено положительное влияние на изменение функциональной активности митохондрий ресвератрола, диосмина, куркумина, ди/ и тритепеноидов, гераниола и ряда других соединений [8]. В литературе приводятся сведения о митохондриотропной активности производных коричной кислоты, в частности, модифицированная трифенилфосфониевым катионом кофейная кислота проявляла свойства эффективного антиоксиданта, подавляя образование митохондриального пероксида водорода [9]. Также ранее проведенные исследования показали, что применение производных коричной кислоты при ишемии мозга способствовало восстановлению активности ферментов митохондриального происхождения – аконитазы, цитратсинтазы и α-кетоглутаратдегидрогеназы [10]. Таким образом, можно предположить, что на фоне введения коричных кислот будет отмечаться снижение степени повреждения головного мозга, опосредованного гиперпродукцией цитокинов.

Цель исследования. Оценить влияние производных коричной кислоты на изменение митохондриальной функции в головном мозге у крыс в условиях экспериментальной гиперцитокинемии.

Материалы и методы исследования. Исследование выполнено на 80 крысах-самцах линии Wistar (половозрелые, масса тела – 200-220 грамм). Животные

были получены из лаборатории живых систем Пятигорского медико-фармацевтического института и на время исследования содержались в контролируемых условиях экспериментального вивария при температуре воздуха 18-22 °С, относительной влажности 50-60% и 12-ти часовой смене суточного цикла. Дизайн исследования, биометодологические техники и содержание животных соответствовали принципам ARRIVE 2.0. [11]. Гиперцитокинемию у крыс воспроизводили путем интраперитонеального введения липолисахарида *E.coli* в дозе 10 мг/кг [12]. В ходе проведения исследования экспериментальные группы формировались методом рандомизации по массе тела. Были выделены следующие группы животных: ИН – интактные животные, НК – негативный контроль, группа животных, которой вводили референтный препарат этилметилгидроксипиридина сукцинат (Мексидол, ФАРМАСОФТ, Россия) в дозе 100 мг/кг (*per os*) и группы крыс, получавших изучаемые соединения – коричную кислоту, кофейную кислоту, кумаровую кислоту, синаповую и феруловою кислоты в дозе 100 мг/кг (*per os*) каждое соединение [10]. Выбор препарата сравнения основан на исследовании, проведенном Кировой Ю.И., с соавт. 2020, в котором показано, что применение этилметилгидроксипиридина сукцината увеличивает митохондриогенез в головном мозге, посредством взаимодействия с регуляторным сукцинатным рецептором $SUCNR_1$. [13].

Исследуемые объекты были предоставлены *Hunan Warrant Pharmaceuticals* (КНР). Препарат сравнения и анализируемые вещества вводили на протяжение 14 дней с момента введения бактериального липополисахарида. Продолжительность введения исследуемых соединений и референта обусловлена особенностями экспериментальной модели гиперцитокинемии. Далее у животных оценивали изменение неврологического дефицита по шкале McGraw [14], производили забор биоматериала и осуществляли оценку изменения митохондриальной функции в ткани головного мозга.

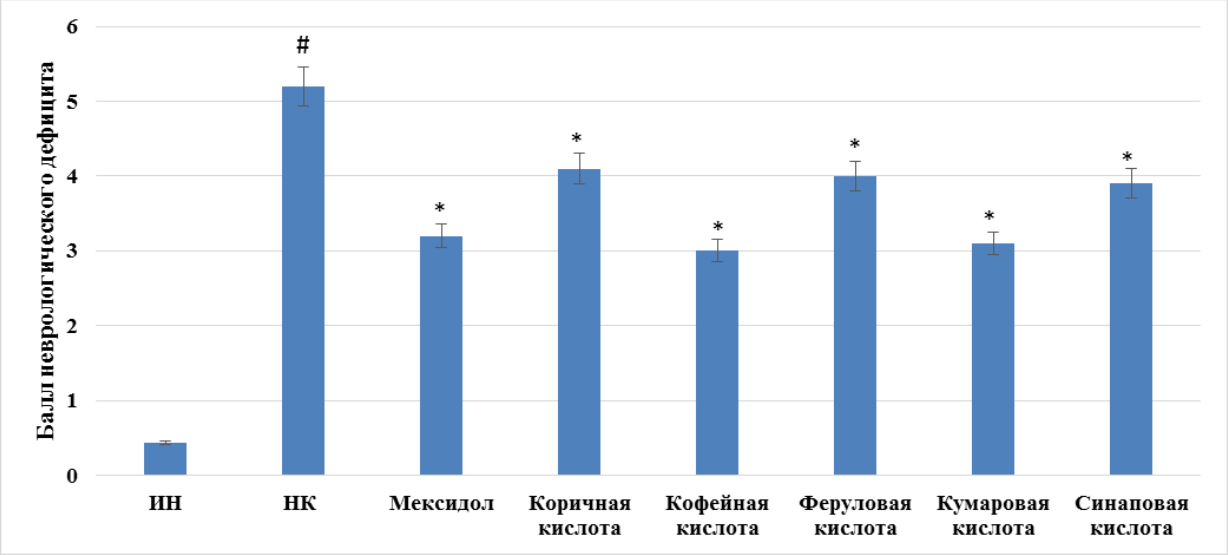
Митохондриальную фракцию головного мозга получали путем градиентного центрифугирования гомогената головного мозга, для чего головной мозг гомогенизировали в среде 1 ммоль ЭГТА + 215 ммоль маннита + 75 ммоль сахарозы + 0,1% раствор БСА + 20 ммоль HEPES, при pH 7,2. Гомогенат центрифугировали в течение 2 минут при ускорении 1100g. Супернатант переносили в пробирки Эппендорф и наслаивали 10%-раствор перколла (*Sigma-Aldrich*). Полученную смесь повторно центрифугировали в течение 10 минут при ускорении 18000g. Надосадочную жидкость отбрасывали, осадок ресуспендировали в 1 мл изолирующей среды и центрифугировали в течение 5 минут при 10 000 g. [15].

Полученную надосадочную фракцию удаляли для определения активности цитохром-с-оксидазы и сукцинатдегидрогеназы, а также концентрации митохондриального пероксида водорода и супероксид-радикала. Активность цитохром-с-оксидазы определяли в митохондриальной фракции по изменению оптической плотности среды реакции окисления цитохрома С (II) в присутствии KCN при 500 нм. [16]. Активность сукцинатдегидрогеназы оценивали спектрофотометрически в реакции сукцинат-зависимого восстановления дихлорфенолиндофенола при добавлении в анализируемую среду ротенона при 600 нм. [17]. Оптическую плотность смесей регистрировали на спектрофотометре ПРОМ-ЭКОЛАБ ПЭ-5300В в кюветах с длиной оптического пути 10 мм. Активность ферментов выражали в Ед/мг белка. Содержание белка в анализируемых образцах оценивали по методу Бредфорда. Концентрацию митохондриального пероксида водорода измеряли по изменению флуоресцентного сигнала, окрашенного резоруфина при длине волны возбуждения/эмиссии 570/585 нм. Содержание супероксид-радикала в анализируемых образцах определяли по изменению флуоресцентного сигала дигидроэтидий бромида при длине волны возбуждения/эмиссии 480/610 нм. [18]. С целью вы-

явления некоторых закономерностей соотношения структура-активность в ряду исследуемых веществ был произведен расчет квантово-химических параметров, характеризующих целевые свойства молекул: теплота образования (ккал/моль), общая энергия (ЕВ), электронная энергия (ЭВ), энергия межъядерного взаимодействия (ЕВ), нормальный градиент, дипольный момент, потенциал ионизации (ЕВ), энергия наивысшей занятой молекулярной орбитали (ЕВ) и энергия низшей занятой молекулярной орбитали (ЕВ). Расчет произведен с применением программного обеспечения MOPAC 2016 с протоколом PM7.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с применением программного пакета STATISTICA 6.0 (*StatSoft*). Данные выражали в виде M±SEM (среднее ± стандартная ошибка среднего). Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка, однородность дисперсия – с применением критерия Левена. Статистическую значимость отличий между группами проводили методом однофакторного дисперсионного анализа с пост-обработкой Ньюмена-Кейсла при критическом уровне значимости $p<0,05$. Корреляционный анализ выполнен согласно критерию Пирсона.

Результаты исследования. В ходе оценки изменения неврологического дефицита (рис. 1) было установлено, что у НК группы крыс по отношению к ИН крысам наблюдалось повышение суммарного балла неврологического дефицита в 12,1 раза ($p<0,05$). На фоне введения Мексидола отмечено снижение степени выраженности неврологической симптоматики в сравнении с НК группой на 38,5% ($p<0,05$), в то время как при применении изучаемых соединений – коричной, кофейной, феруловой, кумаровой и синаповой кислот данный показатель уменьшился на 21,2% ($p<0,05$), 42,3% ($p<0,05$), 23,1 %($p<0,05$),40,4% ($p<0,05$) и 25,0 % ($p<0,05$) соответственно.



Примечание: # – статистически достоверно относительно ИН группы; * – статистически достоверно относительно НК группы. Во всех случаях критерий Ньюмена-Кейсла $p<0,05$.

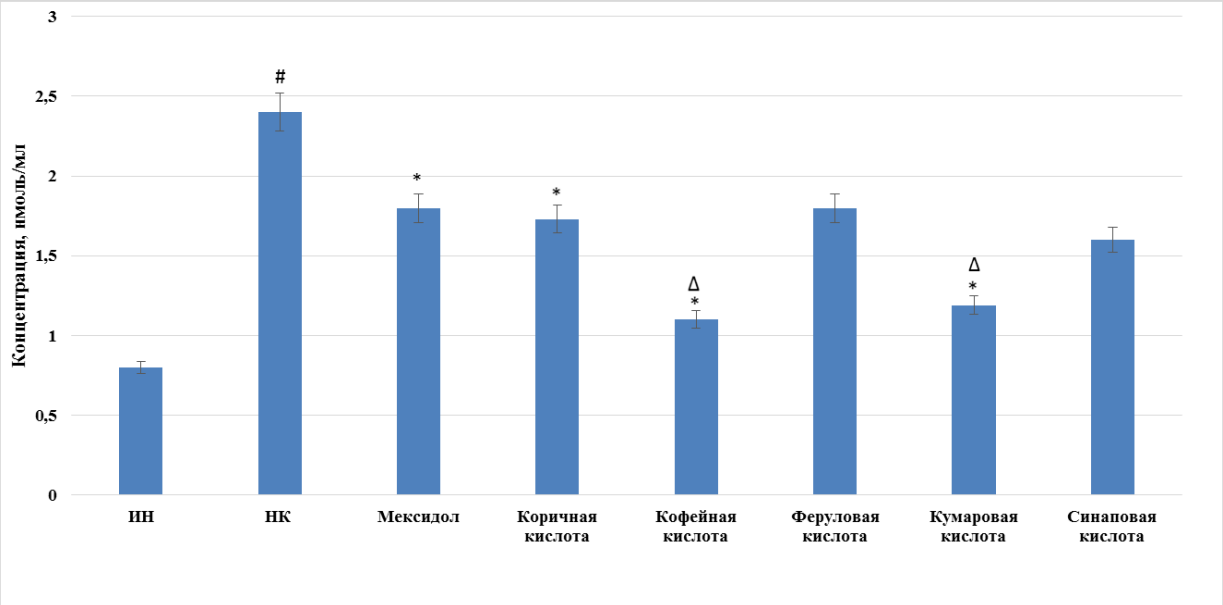
Рис. 1. Влияние изучаемых соединений и препарата сравнения на изменение неврологического дефицита у животных в условиях гиперцитокинемии

Note: # – statistically significant relative to the group ID; * – statistically significant relative to the NC group. In all cases, the Newman-Keuls test $p<0.05$.

Fig. 1. Effect of the studied compounds and the reference medicine on the change of neurological deficit in animals under conditions of hypercytokinemia

Дальнейший ход исследования показал, что концентрация митоходриального пероксида водорода (рис. 2) и супероксид-радикала (рис. 3) в мозговой ткани у крыс НК группы была выше такового у ИН группы животных в 3,0 ($p<0,05$) и 4,0 ($p<0,05$) раза соответственно. Применение Мексидола способствовало уменьшение содержания в митохондриальной фракции, как пероксида водорода, так и супероксид-радикала по отношению к НК группе животных на 25,0% ($p<0,05$) и 38,8% ($p<0,05$) соответственно.

В ряду изучаемых веществ наиболее выраженные антирадикальные свойства были установлены для кофейной и кумаровой кислот, введение которых способствовало уменьшению концентрации пероксида водорода на 54,2% ($p<0,05$) и 50,4% ($p<0,05$) соответственно, а супероксид-радикала на 48,8 % ($p<0,05$) и 46,3% ($p<0,05$) соответственно. Несколько меньшую активность проявляла коричная кислота, на фоне применения которой содержание митохондриального пероксида водорода и супероксид-радикала уменьшилось на 27,9% ($p<0,05$) и 33,4% ($p<0,05$) в сравнении с показателями НК группы крыс. При этом, концентрация пероксида водорода при применении кофейной и кумаровой кислот была ниже, чем у группы крыс, получавшей Мексидол на 38,8 ($p<0,05$) и 33,3% ($p<0,05$) соответственно. Стоит отметить, что применение феруловой и синаповой кислот значимого влияния на изменение содержания пероксида водорода и супероксид-радикала в митохондриальной фракции головного мозга не оказало.

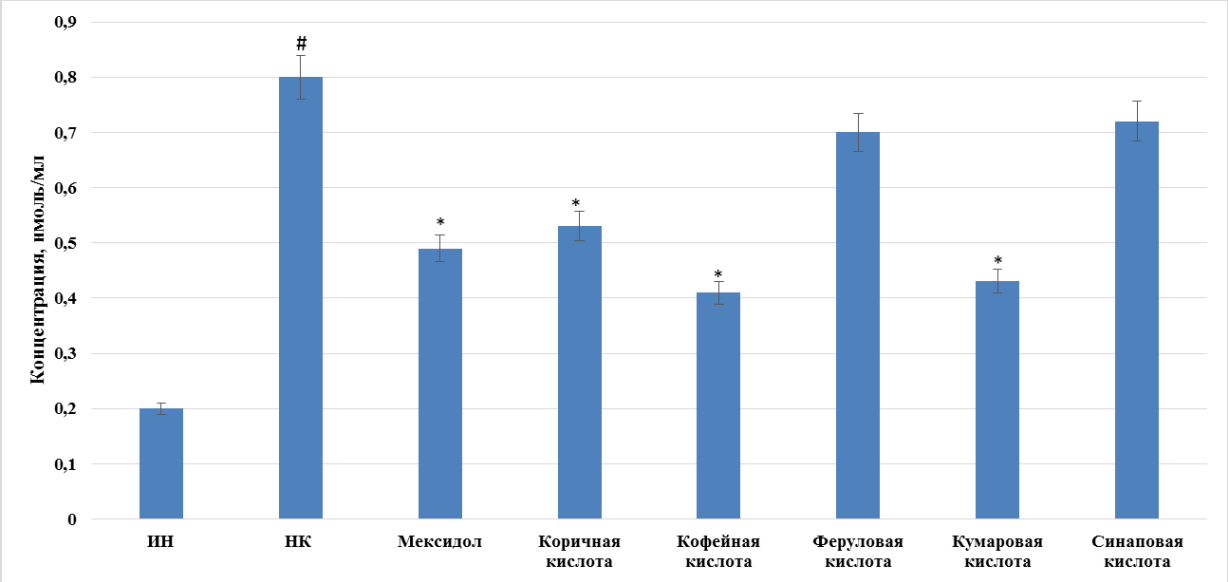


Примечание: # – статистически достоверно относительно ИН группы; * – статистически достоверно относительно НК группы; Δ – статистически достоверно, относительно животных, которым вводили Мексидол. Во всех случаях критерий Ньюмена-Кейсла $p<0,05$.

Рис. 2. Влияние изучаемых соединений и препарата сравнения на изменение концентрации пероксида водорода в митохондриальной фракции головного мозга у животных в условиях гиперцитокинемии

Note: # – statistically significant relative to the group ID; * – statistically significant relative to the NC group; Δ – statistically significant, relative to the animals that were injected with Mexidol. In all cases, the Newman-Keuls test $p<0.05$.

Fig. 2. Effect of the studied compounds and the reference medicine on the change in the concentration of hydrogen peroxide in the mitochondrial fraction of the brain in animals under conditions of hypercytokinemia



Примечание: # – статистически достоверно относительно ИН группы; * – статистически достоверно относительно НК группы. Во всех случаях критерий Ньюмена-Кейсла p<0,05.

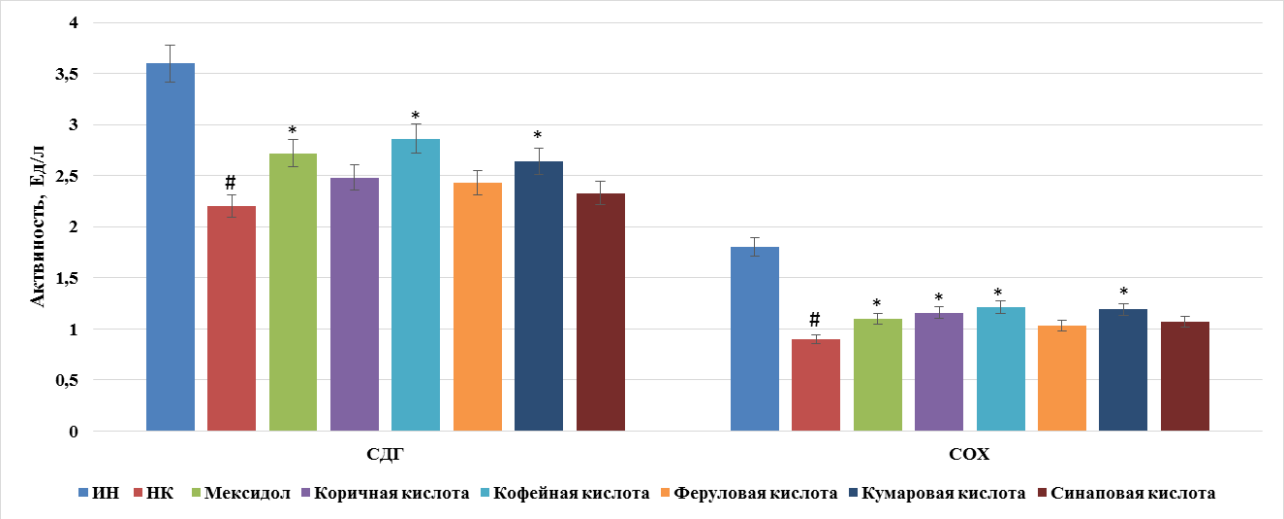
Рис. 3. Влияние изучаемых соединений и препарата сравнения на изменение концентрации супероксид-радикала в митохондриальной фракции головного мозга у животных в условиях гиперцитокинемии

Note: # – statistically significant relative to the group ID; * – statistically significant relative to the NK group. In all cases, the Newman-Keuls test p<0.05.

Fig. 3. Effect of the studied compounds and the reference medicine on the change in the concentration of the superoxide radical in the mitochondrial fraction of the brain in animals under conditions of hypercytokinemia

Анализ изменения активности сукцинатдегидрогеназы (рис.4) позволил установить, что у крыс НК отмечено снижение активность данного энзима относительно ИН группы на 38,9% (p<0,05), при уменьшении активности цитохром-с-оксидазы (рис. 4) в 2,0 раза (p<0,05). Применение Мексидола способствовало повышению активности сукцинатдегидрогеназы и цитохром-с-оксидазы в сравнении с НК группой животных на 23,6% (p<0,05) и 22,2% (p<0,05) соответственно. Также каталитические свойства сукцинатдегидрогеназы и цитохром-с-оксидазы увеличились при введении животным кофейной кислоты (на 30,0% (p<0,05) и 34,4%(p<0,05) соответственно) и кумаровой кислоты (на 20,0 %(p<0,05) и 32,2% (p<0,05) соответственно). У крыс, получавших коричную кислоту отмечено повышение активности цитохром-с-оксидазы в сравнении с показателем НК группы на 22,2%(p<0,05).

Проведенный в дальнейшем корреляционный анализ взаимосвязи активности и изменения квантово-химических параметров молекул (табл. 1) позволил установить, что в ингибирующая активность в отношение супероксид-радикала в наибольшей степени зависит от нормального градиента (r=-0,96587).



Примечание: СДГ – сукцинатдегидрогеназа; СОХ – цитохром-с-оксидаза; # – статистически достоверно относительно ИН группы; * – статистически достоверно относительно НК группы. Во всех случаях критерий Ньюмена-Кейсла $p<0,05$.

Рис. 4. Влияние изучаемых соединений и препарата сравнения на изменение активности сукцинатдегидрогеназы и цитохром-с-оксидазы в митохондриальной фракции головного мозга у животных в условиях гиперцитокинемии

Note: СДГ – succinate dehydrogenase; СОХ – cytochrome c oxidase; # – statistically significant relative to the group ИН; * – statistically significant relative to the НК group. In all cases, the Newman-Keuls test $p<0.05$.

Fig. 4. Effect of the studied compounds and the reference medicine on the change in the activity of succinatedehydrogenase and cytochrome-c oxidase in the mitochondrial fraction of the brain in animals under conditions of hypercytokinemia

Таблица 1

Квантово-химические параметры, используемые при проведении корреляционного анализа

Table 1

Quantum-chemical parameters used in the correlation analysis

Параметр	Коричная кислота	Кофейная кислота	Феруловая кислота	Кумаровая кислота	Синаповая кислота
Теплота образования, ккал/моль	-46,881	-138,52093	-92,08089	-165,61028	-133,52933
Общая энергия, ЕВ	-1803,48678	-2394,44371	-2098,94702	-2988,56099	-2543,95571
Электронная энергия, ЕВ	-8793,15092	-12030,2032	-10324,3609	17459,3008	-13664,3484
Энергия межядерного взаимодействия, ЕВ	6989,66414	9635,75953	8225,4139	14470,73981	11120,39266
Нормальный градиент	0,68336	0,9593	0,75388	0,89961	0,91461
Дипольный момент	5,04333	3,71918	6,25115	6,90021	4,48361
Потенциал ионизации, ЕВ	10,05844	9,031399	9,517903	8,945714	8,851467
Энергия наивысшей занятой молекулярной орбитали, ЕВ	-10,058	-9,031	-9,518	-8,946	-8,851
Энергия низшей занятой молекулярной орбитали, ЕВ	-0,847	-0,465	-0,852	-0,485	-0,35

Сильная корреляция была установлена между способностью изучаемых веществ ингибировать образование пероксида водорода и нормальным градиентом ($r=-0,802155$). Также с изменением нормального градиента сильно коррелировало изменение активности сукцинатдегидрогеназы ($r=0,864808$). Стоит отметить, что выражен-

ных взаимосвязей между квантово-химическими параметрами исследуемых веществ и изменением активности цитохром-с-оксидазы не прослеживалось (табл. 2).

Таблица 2

Значение полученных коэффициентов корреляции

Table 2

The value of the obtained correlation coefficients

Параметр	Супероксид, нмоль/мл	Пероксид водорода, нмоль/мл	СДГ, Ед/л	СОХ, Ед/л
Теплота образования, ккал/моль	0,400171	0,771782	-0,659831	-0,278867
Общая энергия, ЕВ	0,337788	0,690160	-0,492990	-0,275793
Электронная энергия, ЕВ	-0,513381	-0,455051	0,031248	0,426591
Энергия межъядерного взаимодействия, ЕВ	-0,310128	-0,634297	0,394323	0,284858
Нормальный градиент	-0,96587	-0,802155	0,864808	0,340750
Дипольный момент	-0,082382	0,169051	-0,568228	-0,207693
Потенциал ионизации, ЕВ	0,156184	0,636947	-0,650265	-0,092914
Энергия наивысшей занятой молекулярной орбитали, ЕВ	-0,155949	-0,636922	0,650514	0,092973
Энергия низшей занятой молекулярной орбитали, ЕВ	-0,095511	-0,660227	0,746693	0,280159

Обсуждение результатов. Гиперцитокинемия как самостоятельный патологический синдром, так и как часть патогенеза других заболеваний сопровождается значительной смертностью населения, в ряде случаев составляющей более 40%. Установлено, что провоспалительные цитокины оказывают неспецифическое повреждающее действие практически на все органы и ткани, что приводит к полиорганной недостаточности. Высокая степень цитокин-опосредованных нарушений отмечается прежде всего в органах с интенсивным метаболизмом, например, в головном мозге, что выражается в развитии нейротоксического эффекта [19].

Повреждение головного мозга, вызываемое цитокинами, в основном происходит за счет индукции нейровоспаления, в ходе которого отмечается развитие каскада взаимосвязанных реакций, таких как, повреждение гемато-энцефалического барьера, развитие отеков цитотоксического и вазогенного типа, лактат-ацидоз, окислительный стресс, энергодефицит [20]. В связи с высокой патогенетической ролью нейровоспаления данный патогенетический механизм все чаще становиться мишенью для целенаправленного фармакологического вмешательства, в том числе и в условиях системой гиперцитокинемии. Так, Yang, et al., 2020 было показано, что применение дигидротестростерона у животных с экспериментальной гиперцитокинемией способствовало уменьшению степени повреждающего действия на мозговую ткань провоспалительных цитокинов – ИЛ-1, ИЛ-6 и ФНО-α. Также в данном исследовании продемонстрирована связь воспаления и апоптотического каскада, что является характерной особенностью липополисахарида как индуктора гиперцитокинемии [21]. Известно, что введение бактериального липополисахарида приводит к выраженной нейротоксичности за счет повышенного образования провоспалительных цитокинов и индукции нисходящих провоспалительных сигнальных путей, контролируемых NfkB, что приводит к инициированию программы апоптоза, развитию окислительного стресса в нейронах и клетках глии, приводя к их гибели с развитием клинических проявлений поражения ЦНС [22]. Одним из основных медиаторов липополисахарид-индуцированной нейротоксичности являются митохондриальные активные формы кислорода (АФК), представленные, как правило, супероксид-радикалом и пероксидом водорода [23]. АФК считаются токсичными интермедиатами аэробного

метаболизма и основной причиной клеточного повреждения. Высокая интенсивность окислительных процессов, происходящих в митохондриях, делают данные органеллы основными продуцентами АФК. В митохондриях идентифицировано 11 сайтов генерации АФК, образующихся при утечке протонов в митохондриальной дыхательной цепи [24]. Важное значение в образовании митохондриальных АФК играет изменение активность комплексов митохондриальной дыхательной цепи, в том числе макромолекулярными комплексами сукцинатдегидрогеназы и цитохром-с-оксидазы. Сукцинатдегидрогеназа или митохондриальный комплекс II генерирует значительное количество АФК, связанных с дефицитом флавопротеина. Цитохром-с-оксидаза (комплекс IV) менее склонна к генерации АФК, но образующиеся радикалы могут инициировать альтернативные каскады клеточного повреждения [25]. В этой связи наблюдаемое на фоне введения изучаемых соединений – кофейной и кумаровой кислот повышение активности сукцинатдегидрогеназы и цитохром-с-оксидазы может являться причиной снижения интенсивности реакций образования АФК, что было подтверждено в ходе оценки изменения концентрации митохондриального пероксида водорода и супероксид-радикала. Кроме того, данные ферментативные комплексы (сукцинатдегидрогеназа и цитохром-с-оксидаза) служат маркерами митохондриального биогенеза и повышение их активности свидетельствует о повышении синтеза митохондрий *de novo* [26]. При этом, увеличение биогенеза митохондрий в условиях липополисахарид-индуцированной нейротоксичности может иметь решающее значение для выживаемости нейронов, поскольку вновь образующиеся митохондрии содержат на порядок меньше дефектной ДНК и менее склонны к генерации АФК и инициированию апоптоза [27]. Также немаловажно, что при введении исследуемых соединений отмечено снижение выраженности неврологического дефицита. Стоит отметить, что наибольший уровень активности продемонстрировали соединение, содержащие в своей структуре свободные гидроксильные группы в ароматическом кольце. В этой связи был проведен корреляционный анализ, на основе методов вычислительной химии, целью которого являлось установить наличие определенных закономерностей изменения фармакологического эффекта от квантово-химических параметров молекул, наиболее полно характеризующих их состояние. Квантово-химические дескрипторы играют фундаментальную роль в химии и биомедицинских исследованиях, поскольку они определяют корреляции между химическими структурами и свойствами молекул (количественное соотношение структура-активность). Данные параметры могут предоставить исчерпывающую информацию о пространственно-геометрических, электростатических и реакционных свойствах молекул. Таким образом, многие дескрипторы отражают свойства молекул и могут дать представление о химической природе соединений, что несомненно важно в ходе целенаправленного синтеза новых родственных веществ.

Проведенный корреляционный анализ показал, что радикал-ингибирующие свойства в большей степени коррелируют с изменением нормального градиента (r=-0,96587 для супероксид-радикала и r=-0,802155 для пероксида водорода), что и отражает вклад гидрокси групп в изменение плотности электронного заряда в ароматическом кольце [28]. Стоит отметить, что активность сукцинатдегидрогеназы также коррелировало с изменением нормального градиента (r=0,864808), в то время как в отношение цитохром-с-оксидазы существенных корреляционных взаимосвязей не установлено.

Заключение. Проведенное исследование показало, что в условиях липополисахарид-индуцированной нейротоксичности применение кумаровой и кофейной кислот способствовало восстановлению митохондриальной функции, что отразилось в повышении активности сукцинатдегидрогеназы и цитохром-с-оксидазы, снижению генерации митохондриальных активных

форм кислорода, что в итоге привело к уменьшению степени выраженности неврологического дефицита.

Информация о финансировании
Финансирование данной работы не проводилось.
Financial support
No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов
Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interests
The author has no conflict of interest to declare.

Список литературы

1. Fajgenbaum DC, June CH. Cytokine Storm. New England Journal of Medicine. 2020;383(23):2255-2273. DOI: https://doi.org/10.1056/NEJMra2026131
2. Kempuraj D, Selvakumar GP, Ahmed ME, et al. COVID-19, Mast Cells, Cytokine Storm, Psychological Stress, and Neuroinflammation. Neuroscientist. 2020;26(5-6):402-414. DOI: https://doi.org/10.1177/1073858420941476
3. Yang QQ, Zhou JW. Neuroinflammation in the central nervous system: Symphony of glial cells. GLIA. 2019;67(6):1017-1035. DOI: https://doi.org/10.1002/glia.23571
4. Garabadu D, Agrawal N, Sharma A, et al. Mitochondrial metabolism: a common link between neuroinflammation and neurodegeneration. Behavioural Pharmacology. 2019;30(8):642-652. DOI: https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000505
5. Swerdlow RH. Mitochondria and Mitochondrial Cascades in Alzheimer's Disease. Journal of Alzheimer's Disease. 2018;62(3):1403-1416. DOI: https://doi.org/10.3233/JAD-170585
6. Wilkins HM, Swerdlow RH. Relationships Between Mitochondria and Neuroinflammation: Implications for Alzheimer's Disease. Current Topics in Medicinal Chemistry. 2016;16(8):849-57. DOI: https://doi.org/10.2174/1568026615666150827095102
7. DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation: the devil is in the details. Journal of Neurochemistry. 2016;139(S2):136-153. DOI: https://doi.org/10.1111/jnc.13607
8. Stacchiotti A, Corsetti G. Natural Compounds and Autophagy: Allies Against Neurodegeneration. Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2020;8:555409. DOI: https://doi.org/10.3389/fcell.2020.555409
9. Teixeira J, Soares P, Benfeito S, et al. Rational discovery and development of a mitochondria-targeted antioxidant based on cinnamic acid scaffold. Free Radical Research. 2012;46(5):600-11. DOI: https://doi.org/10.3109/10715762.2012.662593
10. Воронков АВ, Поздняков ДИ, Аджиахметова СЛ, др. Влияние некоторых производных коричной кислоты на изменение активности ферментов цикла трикарбоновых кислот у крыс в условиях ишемии головного мозга. Медицинский академический журнал. 2020;20(2):27-32. DOI: https://doi.org/10.17816/MAJ33994
11. Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. PLoS Biology. 2020;18(7):e3000410. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410
12. Zhang H, Sha J, Feng X, et al. Dexmedetomidine ameliorates LPS induced acute lung injury via GSK-3β/STAT3-NF-κB signaling pathway in rats. International Immunopharmacology. 2019;74:105717. DOI: https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105717
13. Кирова ЮИ, Шакова ФМ, Германова ЭЛ, и др. Влияние Мексидола на церебральный митохондриогенез в молодом возрасте и при старении. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2020;120(1):62-69. DOI: https://doi.org/10.17116/jnevro202012001162
14. Vasilevskaya E, Makarenko A, Tolmacheva G, et al. Local Experimental Intracerebral Hemorrhage in Rats. Biomedicines. 2021;9(6):585. DOI: https://doi.org/10.3390/biomedicines9060585
15. Воронков АВ, Поздняков ДИ, Аджиахметова СЛ, и др. Митохондриальная дисфункция при нейродегенеративных и ишемических поражениях головного мозга. Экспериментальные и фармакологические аспекты. К: Бук; 2020.
16. Hill MD, Goyal M, Menon BK, et al. Efficacy and safety of nerinetide for the treatment of acute ischaemic stroke (ESCAPE-NA1): a multicentre, double-blind, randomised controlled trial. The Lancet. 2020;395(10227):878-887. DOI: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30258-0

17. Fargualy AM, Habib NS, Ismail KA, et al. Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of some pyrimidine derivatives. European Journal of Medicinal Chemistry. 2013;66:276-95. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.05.028

18. Zhu Z, Guo R, Li Y, et al. Comparison of three analytical methods for superoxide produced by activated immune cells. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. 2020;101:106637. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vascn.2019.106637

19. Norelli M, Camisa B, Barbiera G, et al. Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells. Nature Medicine. 2018;24(6):739-748. DOI: https://doi.org/10.1038/s41591-018-0036-4

20. Mukhara D, Oh U, Neigh GN. Neuroinflammation. Handbook of Clinical Neurology. 2020;175:235-259. DOI: https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64123-6.00017-5

21. Yang L, Zhou R, Tong Y, et al. Neuroprotection by dihydrotestosterone in LPS-induced neuroinflammation. Neurobiology of Disease. 2020;140:104814. DOI: https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104814

22. Alhadidi Q, Shah ZA. Cofilin Mediates LPS-Induced Microglial Cell Activation and Associated Neurotoxicity Through Activation of NF-κB and JAK-STAT Pathway. Molecular Neurobiology. 2018;55(2):1676-1691. DOI: https://doi.org/10.1007/s12035-017-0432-7

23. Park J, Min JS, Kim B, et al. Mitochondrial ROS govern the LPS-induced pro-inflammatory response in microglia cells by regulating MAPK and NF-κB pathways. Neuroscience Letters. 2015;584:191-6. DOI: https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.10.016

24. Cadenas S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics. 2018;1859(9):940-950. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2018.05.019

25. Zhao RZ, Jiang S, Zhang L, et al. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). International Journal of Molecular Medicine. 2019;44(1):3-15. DOI: https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4188

26. Jornayvaz FR, Shulman GI. Regulation of mitochondrial biogenesis. Essays in Biochemistry. 2010;47:69-84. DOI: https://doi.org/10.1042/bse0470069

27. Stetler RA, Leak RK, Yin W, et al. Mitochondrial biogenesis contributes to ischemic neuroprotection afforded by LPS pre-conditioning. Journal of Neurochemistry. 2012;123(S2):125-37. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07951.x

28. Оганесян ЭТ, Шатохин СС. Использование квантово-химических параметров для прогнозирования антирадикальной (но·) активности родственных структур, содержащих цинамоильный фрагмент. III. халконы, флаваноны и флавоны с флороглюциновым типом кольца "А". Фармация и фармакология. 2020;8(6):446-455. DOI: https://doi.org/10.19163/2307-9266-2020-8-6-446-455

References

1. Fajgenbaum DC, June CH. Cytokine Storm. New England Journal of Medicine. 2020;383(23):2255-2273. DOI: https://doi.org/10.1056/NEJMra2026131

2. Kempuraj D, Selvakumar GP, Ahmed ME, et al. COVID-19, Mast Cells, Cytokine Storm, Psychological Stress, and Neuroinflammation. Neuroscientist. 2020;26(5-6):402-414. DOI: https://doi.org/10.1177/1073858420941476

3. Yang QQ, Zhou JW. Neuroinflammation in the central nervous system: Symphony of glial cells. GLIA. 2019;67(6):1017-1035. DOI: https://doi.org/10.1002/glia.23571

4. Garabadu D, Agrawal N, Sharma A, et al. Mitochondrial metabolism: a common link between neuroinflammation and neurodegeneration. Behavioural Pharmacology. 2019;30(8):642-652. DOI: https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000505

5. Swerdlow RH. Mitochondria and Mitochondrial Cascades in Alzheimer's Disease. Journal of Alzheimer's Disease. 2018;62(3):1403-1416. DOI: https://doi.org/10.3233/JAD-170585

6. Wilkins HM, Swerdlow RH. Relationships Between Mitochondria and Neuroinflammation: Implications for Alzheimer's Disease. Current Topics in Medicinal Chemistry. 2016;16(8):849-57. DOI: https://doi.org/10.2174/1568026615666150827095102

7. DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation: the devil is in the details. Journal of Neurochemistry. 2016;139(S2):136-153. DOI: https://doi.org/10.1111/jnc.13607

8. Stacchiotti A, Corsetti G. Natural Compounds and Autophagy: Allies Against Neurodegeneration. Frontiers in Cell and Developmental

Biology. 2020;8:555409. DOI: https://doi.org/10.3389/fcell.2020.555409

9. Teixeira J, Soares P, Benfeito S, et al. Rational discovery and development of a mitochondria-targeted antioxidant based on cinnamic acid scaffold. Free Radical Research. 2012;46(5):600-11. DOI: https://doi.org/10.3109/10715762.2012.662593

10. Voronkov AV, Pozdnyakov DI, Adjiakhmetova SL, et al. The effect of some cinnamic acid derivatives on the change in the activity of enzymes of the tricarboxylic acid cycle in rats under conditions of cerebral ischemia. Medical Academic Journal. 2020;20(2):27-32. Russian. DOI: https://doi.org/10.17816/MAJ33994

11. Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. PLoS Biology. 2020;18(7):e3000410. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410

12. Zhang H, Sha J, Feng X, et al. Dexmedetomidine ameliorates LPS induced acute lung injury via GSK-3β/STAT3-NF-κB signaling pathway in rats. International Immunopharmacology. 2019;74:105717. DOI: https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105717

13. Kirova YU, Shakova FM, Germanova EL, et al. The effect of Mexidol on cerebral mitochondriogenesis at a young age and during aging. Zhurnal Nevrologii i Psikhiatrii imeni S.S. Korsakova. 2020;120(1):62-69. 2020;120(1):62-69. Russian. DOI: https://doi.org/10.17116/jnevro202012001162

14. Vasilevskaya E, Makarenko A, Tolmacheva G, et al. Local Experimental Intracerebral Hemorrhage in Rats. Biomedicines. 2021;9(6):585. DOI: https://doi.org/10.3390/biomedicines9060585

15. Voronkov AV, Pozdnyakov DI, Adjiakhmetova SL, et al. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative and ischemic brain lesions. Experimental and pharmacological aspects. K: Buk; 2020. Russian.

16. Hill MD, Goyal M, Menon BK, et al. Efficacy and safety of nerinetide for the treatment of acute ischaemic stroke (ESCAPE-NA1): a multicentre, double-blind, randomised controlled trial. The Lancet. 2020;395(10227):878-887. DOI: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30258-0

17. Fargualy AM, Habib NS, Ismail KA, et al. Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of some pyrimidine derivatives. European Journal of Medicinal Chemistry. 2013;66:276-95. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.05.028

18. Zhu Z, Guo R, Li Y, et al. Comparison of three analytical methods for superoxide produced by activated immune cells. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. 2020;101:106637. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vascn.2019.106637

19. Norelli M, Camisa B, Barbiera G, et al. Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells. Nature Medicine. 2018;24(6):739-748. DOI: https://doi.org/10.1038/s41591-018-0036-4

20. Mukhara D, Oh U, Neigh GN. Neuroinflammation. Handbook of Clinical Neurology. 2020;175:235-259. DOI: https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64123-6.00017-5

21. Yang L, Zhou R, Tong Y, et al. Neuroprotection by dihydrotestosterone in LPS-induced neuroinflammation. Neurobiology of Disease. 2020;140:104814. DOI: https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104814

22. Alhadidi Q, Shah ZA. Cofilin Mediates LPS-Induced Microglial Cell Activation and Associated Neurotoxicity Through Activation of NF-κB and JAK-STAT Pathway. Molecular Neurobiology. 2018;55(2):1676-1691. DOI: https://doi.org/10.1007/s12035-017-0432-7

23. Park J, Min JS, Kim B, et al. Mitochondrial ROS govern the LPS-induced pro-inflammatory response in microglia cells by regulating MAPK and NF-κB pathways. Neuroscience Letters. 2015;584:191-6. DOI: https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.10.016

24. Cadenas S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics. 2018;1859(9):940-950. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2018.05.019

25. Zhao RZ, Jiang S, Zhang L, et al. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). International Journal of Molecular Medicine. 2019;44(1):3-15. DOI: https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4188

26. Jornayvaz FR, Shulman GI. Regulation of mitochondrial biogenesis. Essays in Biochemistry. 2010;47:69-84. DOI: https://doi.org/10.1042/bse0470069

27. Stetler RA, Leak RK, Yin W, et al. Mitochondrial biogenesis contributes to ischemic neuroprotection afforded by LPS pre-conditioning. Journal of Neurochemistry. 2012;123(S2):125-37. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07951.x

28. Oganesyan ET, Shatokhin S. The use of quantum-chemical parameters for predicting the antiradical (but·) activity of related structures containing a cinnamoyl fragment. III. chalcones, flavonones and flavones with the phloroglucin type of the "A" ring. Pharmacy & Pharmacology. 2020;8(6):446-455. DOI: https://doi.org/10.19163/2307-9266-2020-8-6-446-455

Статья поступила в редакцию 30 августа 2021 г.
Поступила после доработки 22 января 2022 г.
Принята к печати 16 апреля 2022 г.

Received 30 August 2021
Revised 22 January 2022
Accepted 16 April 2022

Информация об авторе
Дмитрий Игоревич Поздняков, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет», г. Пятигорск, Российская Федерация, E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5595-8182.

Information about the author
Dmitry I. Pozdnyakov, Cand. Sci. (Pharmacy), Associate Professor at the Department of Pharmacology with a Course in Clinical Pharmacology, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – Branch of Volgograd State Medical University, Pyatigorsk, Russia, E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5595-8182.

КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА
MEDICINE

(cc) BY

DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-3-0-8 **УДК 618.1**

Аномальные маточные кровотечения: этиология и патогенез (описательный обзор)

Е.В. Енькова, Е.В. Киселева, О.В. Хоперская, А.В. Хатунцев, И.Д. Тюрина

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко», ул. Студенческая, д. 10, г. Воронеж, 394036, Российская Федерация
Автор для переписки: О.В. Хоперская (smv250587@mail.ru)

Резюме

Актуальность: Несмотря на прогресс в медицине маточные кровотечения остаются общеизвестной медицинской проблемой. Аномальные маточные кровотечения оказывают негативное влияние на физическое, эмоциональное, социальное, в т.ч. материальное благополучие женского населения. Около трети женщин обращается за медицинской помощью к гинекологу в связи с аномальными маточными кровотечениями. Их частота увеличивается с возрастом: если в репродуктивном возрасте она составляет 20-30%, то в период пери- и постменопаузы возрастает до 80%. Аномальные маточные кровотечения занимают 2-е место среди причин госпитализации женщин в гинекологические стационары, служат показанием для большей части хирургических вмешательств, в т.ч. деструктивных. **Цель исследования:** Рассмотреть этиологию и патогенез аномальных маточных кровотечений, их современную терминологию и классификационные системы, опираясь на данные руководств и исследований последних лет, что позволит систематизировать знания исследователей и клиницистов о данной проблеме, выбрать оптимальный метод терапии. **Материалы и методы:** Нами был проведен анализ литературных данных по проблеме аномальных маточных кровотечений, опубликованных за последние 10 лет. Были использованы следующие источники: PubMed, Elibrary, Scopus. **Результаты:** Анализ литературных источников продемонстрировал, что проблема аномальных маточных кровотечений актуальна и находится в центре внимания клиницистов, исследователей, международных гинекологических обществ, рассматривается в международных рекомендациях. Использование единой терминологии и универсальной классификационной системы аномальных маточных кровотечений, предложенной Международной федерацией гинекологии и акушерства, позволило систематизировать знания об этой проблеме, разрешить трудности в проведении научных исследований и разработке стандартов ведения больных. **Заключение:** Международная федерация гинекологии и акушерства рекомендует для классификации причин аномальных маточных кровотечений использовать систему PALM-COEIN, которая

включает структурные и неструктурные причины кровотечения, исключая гестационные причины. Этиологический диагноз определяет метод терапии маточных кровотечений и напрямую связан с успехом лечения. Знание основ патогенеза развития маточного кровотечения при тех или иных состояниях позволит разработать новые инструменты диагностики и мониторинга, которые помогут стратифицировать лечение женщин с аномальными маточными кровотечениями, особенно в отношении «эндометриальных» и «неклассифицированных» причин.
Ключевые слова: маточное кровотечение; аномальное маточное кровотечение; тяжелое менструальное кровотечение; полип эндометрия; аденомиоз; миома матки; рак эндометрия; гиперплазия эндометрия

Для цитирования: Енькова ЕВ, Киселева ЕВ, Хоперская ОВ, и др. Аномальные маточные кровотечения: этиология и патогенез (описательный обзор). Научные результаты биомедицинских исследований. 2022;8(3):365-381. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-3-0-8

Abnormal uterine bleeding: etiology and pathogenesis (descriptive review)

Elena V. Enkova, Elena V. Kiseleva, Olga V. Khoperskaya, Andrey V. Khatuncev, Inga D. Tyurina

Burdenko Voronezh State Medical University,
10 Studentskaya St., Voronezh, 394036, Russia
Corresponding author: Olga V. Khoperskaya (smv250587@mail.ru)

Abstract

Background: Despite advances in medicine, uterine bleeding remains a well-known medical problem. Abnormal uterine bleeding has a negative impact on the physical, emotional, social, incl. material well-being of the female population. About a third of all women seek medical help from a gynecologist in connection with abnormal uterine bleeding. Their frequency increases with age: if in the reproductive age it is 20-30%, then in the period of peri- and postmenopause it increases to 80%. Abnormal uterine bleeding ranks second among the reasons for hospitalization of women to gynecological inpatient facilities and are indications for most surgical interventions, including destructive. **The aim of the study:** To consider the etiology and pathogenesis of abnormal uterine bleeding, modern terminology and classification systems, based on the recent data of guidelines and studies of recent years. It will allow to systematize the knowledge of researchers and clinicians about this problem and will help to choose the optimal therapy method. **Materials and methods:** We analyzed the literature data on the problem of abnormal uterine bleeding published over the past 10 years. The resources PubMed, Elibrary, Scopus were used to analyze the data. **Results:** The analysis of literature sources showed that the problem of abnormal uterine bleeding and possible ways to solve it is still relevant and is the focus of attention of clinicians, researchers, international gynecological societies, and is considered in international recommendations. The use of a unified terminology and the universal classification system for abnormal uterine bleeding, proposed by the International Federation of Gynecology and Obstetrics made it possible to systematize knowledge about this problem, resolve difficulties in conducting scientific research and develop standards for patient management. **Conclusion:** The International Federation of Gynecology and Obstetrics recommends using the PALM-COEIN system to classify causes of abnormal uterine bleeding, which includes structural and non-structural causes of bleeding, excluding gestational causes. The etiological diagnosis determines the method of therapy of uterine bleeding and is directly related to the success of treatment. Knowledge

of the pathogenesis fundamentals of uterine bleeding will allow the development of new diagnostic and monitoring tools that will help stratify the treatment of women with abnormal uterine bleeding, especially in relation to "endometrial" and "unclassified" causes.
Keywords: uterine bleeding; abnormal uterine bleeding; heavy menstrual bleeding; endometrial polyp; adenomyosis; uterine myoma; endometrial cancer; endometrial hyperplasia

For citation: Enkova EV, Kiseleva EV, Khoperskaya OV, et al. Abnormal uterine bleeding: etiology and pathogenesis (descriptive review). Research Results in Biomedicine. 2022;8(3):365-381. Russian. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-3-0-8

Введение. Согласно клиническим рекомендациям Российского общества акушеров-гинекологов термином аномальное маточное кровотечение (АМК) определяются кровотечения чрезмерные по длительности (более 8 дней), объему кровопотери (более 80 мл) и/ или частоте (менее 24 дней). Нормальный менструальный цикл имеет длительность от 24 до 38 дней, продолжительность менструации находится в пределах от 7 до 9 дней, с потерей от 5 до 80 миллилитров крови [1, 2]. Вариации любого из этих 4 параметров представляют собой аномальное маточное кровотечение (Таблица). Кроме того, NICE (National Institute for Health and Clinical Excellence) был предложен термин тяжелое менструальное кровотечение (ТМК), который определяет чрезмерную менструальную кровопотерю, оказывающую негативное влияние на физическое, социальное, эмоциональное и/или материальное благополучие женщины.

Таблица

Симптомы аномального маточного кровотечения по данным FIGO (2018 г.)

Table

Symptoms of abnormal uterine bleeding according to FIGO (2018)

Показатель	Характеристика
Частота	Отсутствие менструации=аменорея Редкая (более 38 дней) Нормальная (≥24 дней ≤38 дней) Частая (24дней)
Длительность	Нормальная (≤8 дней) Длительная (>8 дней)
Регулярность	Регулярные (цикл варьирует ≤7-9 дней*) Нерегулярные (цикл варьирует ≥8-10 дней)
Объем кровопотери (определяет пациент)	Легкая Нормальная Тяжелая

Примечание: * нормы вариабельности цикла зависят от возраста женщины: 18-25 лет, ≤9 дней; 26-41 год, ≤7 дней; 42-45 лет, ≤9 дней
Note: * Norms of cycle variability depend on the woman's age: 18-25 years, ≤9 days; 26-41 years old, ≤7 days; 42-45 years old, ≤9 days

Распространенность аномальных маточных кровотечений среди женщин репродуктивного возраста во всем мире оценивается от 3% до 30%, причем более высокая частота встречается в период менархе и перименопаузы. Многие исследования ограничиваются ТМК, но, если рассматривать нерегулярные и межменструальные кровотечения, то распространенность АМК возрастает до 35% и выше. По имеющимся данным около половины женщин с АМК не обращаются за медицинской помощью, даже при ее доступности, что объясняет различия в распространенности этой патологии; некоторые компоненты диагноза являются объективными, а другие – субъективными, что так же затрудняет определение точной распространенности АМК [3, 4]. Несмотря на крайне незначительную смертность, АМК оказывают огромное влияние на фи-

зическое, социальное и эмоциональное качество жизни женщины в дополнение к экономическим потерям, включая стоимость медицинского обслуживания и потерю трудоспособности [5, 6]. Более того, АМК являются одной из основных причин анемии и железодефицитного состояния у женского населения, что приводит к увеличению материнской заболеваемости и смертности у беременных женщин с ранее существовавшей анемией [7]. Женщины с нарушениями менструального цикла чаще сообщают о тревоге, депрессии, бессоннице, чрезмерной сонливости и болевом синдроме, чем женщины без проблем с менструальным циклом [8, 9].

Классификация и терминология

Длительное время не существовало единой терминологии и универсальной классификационной системы АМК, что существенно затрудняло проведение научных исследований и разработку стандартов ведения больных. В 2011 г. Международная Федерация гинекологии и акушерства (FIGO – International Federation of Gynecology and Obstetrics) разработала новую классификационную систему АМК – PALM-COEIN.

PALM-COEIN – это аббревиатура, позволяющая классифицировать основные причины аномального маточного кровотечения. Первая часть, «PALM», описывает структурные причины кровотечений. Вторая часть, «COEI», описывает неструктурные причины. «N» означает «не классифицировано иначе».

- **P:** полип
- **A:** аденомиоз
- **L:** лейомиома
- **M:** гиперплазия/рак эндометрия.
- **C:** коагулопатия/нарушение свертываемости крови
- **O:** овуляторная дисфункция
- **E:** эндометриальные причины
- **I:** ятрогенные причины
- **N:** не классифицировано иначе

Одна или сразу несколько из перечисленных выше причин могут способствовать развитию АМК у одной пациентки. Однако следует учитывать, что некоторые структурные образования, такие как полипы эндоцервикса, полипы эндометрия или лейомиомы, могут протекать бессимптомно и не являться основной причиной АМК [1].

АМК могут проявляться тяжелыми менструальными кровотечениями и межменструальными кровотечениями, ранее обозначавшимися терминами «меноррагия», «менометроррагия», «метроррагия» [2]. Эти термины уже не используются в современной классификационной системе [10].

В соответствии с длительностью кровотечения АМК также можно разделить на острые и хронические. Острое АМК представляет собой чрезмерное кровотечение, требующее незамедлительного медицинского вмешательства для предотвращения дальнейшей кровопотери. Острое АМК может возникать само по себе или развиваться на фоне уже существующего хронического АМК. Для хронического АМК характерны нарушения менструального цикла, существующие в течение большей части предыдущих 6 месяцев [11].

Допустимы специфические изменения в характере менструальных кровотечений, которые могут встречаться в начале и конце репродуктивного периода (то есть в подростковом или перименопаузальном возрасте) [2, 10, 11].

Этиология и патогенез АМК

Любой патологический процесс, приводящий к нарушению нормальных эндокринных, паракринных или гемостатических функций эндометрия, а также к нарушению сократимости миометрия, может вызвать АМК [12].

Полип: АМК-P

Вклад полипов в АМК варьирует в широких пределах от 3,7% до 65%. В то время как полипы эндометрия широко распространены при всех типах АМК, они также часто встречаются у женщин без АМК. Полипы эндометрия представляют собой выросты слизистой оболочки эндометрия, состоящими из моноклонального разрастания стромальных клеток эндомет-

рия с включением неопухолевого железистого компонента. [13] Они могут быть единичными или множественными, в некоторых исследованиях сообщалось о самой высокой частоте полипов в пятом десятилетии жизни. Полипы, как правило, являются доброкачественными новообразованиями эндометрия, но требуется тщательное патоморфологическое исследование, чтобы исключить возможность фокального ракового перерождения в структуре полипа. По некоторым данным у женщин в пременопаузальном периоде до 2-х процентов полипов эндометрия имеют риск ракового перерождения.

Одной из основных причин развития полипов эндометрия является нарушение экспрессии эстрогеновых и прогестероновых рецепторов в эндометрии, усиление активности сигнальных путей, индуцирующих пролиферацию и ангиогенез, снижение апоптоза [14]. Кроме того, генетические мутации и сверхэкспрессия ароматазы эндометрия, которая увеличивает местный эстрогенный сигнал, также участвуют в образовании полипов эндометрия [15, 16]. Небольшие (<1 см) доброкачественные полипы эндометрия часто регрессируют, но более крупные поражения могут длительно сохраняться [17].

Патогенетический механизм увеличения менструальной кровопотери при полипах эндометрия окончательно не изучен. Аномальная густая микрососудистая сеть с выраженными мышечными стенками – это особенность полипов эндометрия, которая является важным диагностическим маркером при патоморфологическом исследовании, и это может дать некоторые объяснения.

Аденомиоз: АМК-А

Аденомиоз является распространенным заболеванием, которое характеризуется наличием желез эндометрия в миометрии, обычно окруженных гипертрофированной гладкой мышцей миометрия [18, 19]. До недавнего времени диагноз зависел от исследования образцов гистерэктомии, и распространенность заболевания колебалась от 5 до 70%. Теперь диагноз может быть также установлен с использованием визуализирующих методов исследования, таких как магнитно-резонансная томография (МРТ) или трансвагинальное ультразвуковое исследование [20, 21]. Аденомиоз наиболее распространен у женщин позднего репродуктивного возраста, имеющих роды в анамнезе [22].

Приблизительно у трети женщин с аденомиозом он протекает бессимптомно. Наиболее распространенным симптомом является ТМК, дисменорея и диспареуния. Исследование образцов гистерэктомии показало, что степень и распространение аденомиоза не влияют на симптомы АМК [23]. Симптомы, о которых сообщают женщины с аденомиозом, неспецифичны, и, поскольку часто существует сопутствующая патология матки, такая как лейомиомы, неясно, могут ли симптомы быть отнесены исключительно к аденомиозу.

Причина АМК при аденомиозе неизвестна. Аденомиоз может влиять на нормальную сократимость миометрия, и это может способствовать возникновению кровотечения. Также сообщается, что доля эндометриальных желез в аденомиозе связана с АМК. Аденомиоз часто связан с другой патологией матки, включая полипы эндометрия, лейомиомы и гиперплазию, и которые также могут быть связаны с ТМК [24].

Хотя большинство женщин с аденомиозом имели роды в анамнезе, в некоторых случаях он может быть связан с бесплодием. У женщин с аденомиозом изменяется популяции лейкоцитов эндометрия: сообщается об увеличении количества макрофагов и естественных киллеров в лютеиновой фазе эндометрия у женщин с рецидивирующей недостаточностью имплантации и аденомиозом, диагностированным с помощью МРТ таза [25].

Патогенез аденомиоза неясен, и были предложены различные объяснения. Наиболее популярной гипотезой является то, что эндометрий проникает в миометрий из базального слоя во время периодов регенерации и заживления. Это может произойти из-за механической травматизации, например, при кюретаже, при которой

нарушается граница эндо-миометрия [26]. На аденомиоз также влияют стероидные гормоны. Сообщалось, что очаги аденомиоза экспрессируют более высокие уровни рецепторов эстрогена, чем соответствующий эутопический эндометрий [27, 28], что указывает на высокую чувствительность к эстрогенам в аденомиотических поражениях, приводящих к митозу. Однако есть и другие сообщения, предполагающие, что экспрессия рецепторов эстрогена при аденомиозе ниже, чем в соседнем эндометрии. Ткань аденомиоза также экспрессирует ароматазу, что приводит к локальной выработке эстрогена, что может способствовать дальнейшей стимуляции роста [29].

Альтернативным предположением является, что аденомиоз развивается из остатков Мюллерова протока [30]. Совсем недавно было высказано предположение, что аденомиоз возникает из стволовых клеток, полученных из костного мозга, которые вытесняются через сосудистую сеть или из стволовых клеток в пределах базального слоя эндометрия [31].

Неизвестно, почему у некоторых женщин развивается аденомиоз, а у других – нет. Существует семейная предрасположенность, и в нескольких исследованиях изучались генетические аномалии при аденомиозе. Сообщалось о различных хромосомных и генетических аномалиях при аденомиозе [32]. Недавние исследования указывают на явные аномалии эндометрия при аденомиозе, включая потенциально измененные местные иммунные реакции, повышенную способность эндометрия к инвазии и измененную экспрессию рецепторов стероидных гормонов [33, 34, 35].

Лейомиома: AMK-L

Лейомиомы, обычно называемые «миомами», представляют собой доброкачественные новообразования миометрия и являются самой распространенной опухолью у женщин репродуктивного возраста. Поскольку многие из них не имеют симптомов, распространенность трудно определить. Однако после гистопатологического исследования образцов гистерэктомии лейомиомы были выявлены у 77% [36]. Лейомиомы являются моноклональными опухолями, возникающими из одной клетки. Сообщалось о различных неслучайных хромосомных аномалиях, включая удаление частей 7q, трисомии 12 и перестроек 12q15, 6p21 или 10q22 [37]. Существует семейная предрасположенность, и наличие родственника первой линии родства с миомой увеличивает риск по крайней мере в два раза [38].

Заболеваемость миомой увеличивается в репродуктивном возрасте и достигает пика в пятом десятилетии [39]. По сравнению с нормальным миометрием лейомиомы имеют более высокую концентрацию рецепторов эстрогенов и прогестерона и ароматазы [40, 41].

Миомы могут как не вызывать симптомов вообще, так и, по некоторым данным, у 20-50% женщин давать симптомы, которые можно напрямую отнести к миоме [42]. Наиболее распространенным симптомом является ТМК. Несколько теорий были предложены для объяснения ТМК, которое рассматривается в связи с лейомиомами. К ним относятся увеличенная площадь поверхности матки, увеличенная сосудистая сеть и кровоток в матке, сниженная сократительная способность миометрия, особенно внутренней соединительной зоны, повреждение эндометрия над субмукозными лейомиоматозными узлами и застой крови в миометрии и эндометрии за счет механического сдавления венозного сплетения [43]. FIGO в 2018 году предложена классификация миомы матки в зависимости от местоположения, предполагается, что именно местоположение узла влияет на симптомы, при этом подслизистые лейомиомы имеют большую связь с ТМК (Рис. 1).

Нарушение регуляции нормальной функции сосудов при лейомиомах может быть связано с нарушениями в экспрессии ангиогенных факторов роста и их рецепторов. В недавнем исследовании кровоток и экспрессия ангиогенных генов были исследованы в миоме, перифиброзе и отдаленном миометрии. Кровоток в ткани вокруг лейомиом был выше, чем внутри лейомиомы. Экспрессия девяти генов, связанных с

ангиогенезом, значительно различалась между миомой и отдаленным миометрием, и два гена значительно различались между миомой и перифиброидом [44].

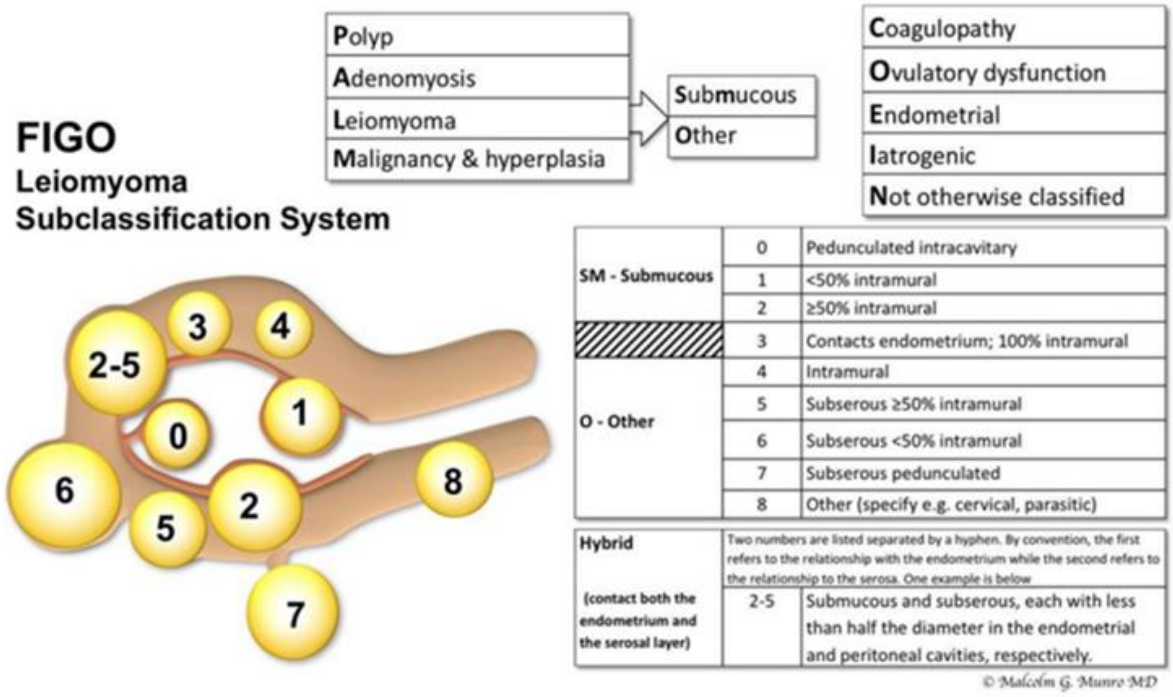


Рис. 1. Классификация лейомиомы матки (FIGO 2018)
Fig. 1. Classification of uterine leiomyoma (FIGO 2018)

Наличие лейомиом также может влиять на строение вышележащего эндометрия. Когда сравнивали лейкоциты эндометрия, покрывающего лейомиомы, с удаленным эндометрием, количество естественных клеток-киллеров матки было уменьшено в эндометрии, покрывающем лейомиомы во время средней и поздней секреторной фаз, в то время как макрофаги увеличивались в той же области в течение всего менструального цикла [45]. Как естественные клетки-киллеры матки, так и макрофаги являются потенциальными продуцентами ангиогенных факторов роста [46], которые могут влиять на сосуды эндометрия, покрывающего лейомиомы.

Злокачественная опухоль: АМК-М

Дисгормональное состояние, сопровождающееся эстрогеново-прогестеронным дисбалансом, а также чрезмерная и длительная эстрогенная стимуляция, либо факторы предотвращающие противодействующие эффекты прогестерона, будут способствовать чрезмерному росту эндометрия с потенциальным риском развития гиперплазии эндометрия (ГЭ) и канцерогенеза [47].

ГЭ гистологически определяется как аномальное разрастание эндометриальных желез по отношению к стромальному компоненту эндометрия [48]. Согласно ВОЗ в настоящее время ГЭ классифицируется на гиперплазию без атипии (включая простую и сложную гиперплазию) и на атипичную гиперплазию/эндометриоидную интраэпителиальную неоплазию [49]. Разделение на вышеперечисленные категории основано на том, что гиперплазия с атипией клеток является известным предшественником рака эндометрия (РЭ) и проявляет многие мутации, типичные для инвазивной эндометриоидной аденокарциномы [48]. Эстрогенная стимуляция, обычно связанная с овуляторной дисфункцией у женщин в пре- и перименопаузе, является частой причиной ГЭ, которая может наблюдаться у 20-ти

процентов женщин с синдромом поликистозных яичников (СПЯ) с олигоменореей, а при наличии атипии в 30 процентах случаев может нести риск развития или сосуществования с РЭ [50]. К факторам риска ГЭ и РЭ также следует отнести ожирение, бесплодие, отсутствие родов, селективные модуляторы рецепторов эстрогена, диабет и синдром Линча [48].

Патогенетические механизмы развития АМК при ГЭ до конца не изучены. Одним из вариантов, объясняющим развитие АМК, является отсутствие обычного снижения уровня прогестерона, чтобы инициировать отторжение утолщенной ткани эндометрия; пролиферативная активность в эндометрии и, возможно, обильный кровоток, необходимый для ускоренного роста эндометрия; все это может вызвать длительное, сильное кровотечение.

Карцинома эндометрия является наиболее распространенным гинекологическим заболеванием в западном мире. Согласно классификация Бохмана до настоящего времени сохраняется разделение РЭ на эндометриоидные и неэндометриоидные гистологические подтипы. Эндометриоидный подтип опухолей (подтип 1) возникает на фоне ГЭ, связанной с гиперэстрогенией, часто сопровождающейся цитологической атипией. Эти опухоли наблюдаются в связи с избыточной продукцией эстрогенов, например, при ожирении и СПЯ. Напротив, неэндометриоидные опухоли (подтип 2) возникают на фоне атрофического эндометрия и не являются эстрогензависимыми. К этой группе опухолей относят серозный рак матки и прозрачно-клеточную карциному и, как правило, имеют неблагоприятный прогноз [51].

РЭ является редкой причиной АМК, так РЭ наиболее часто встречается в постменопаузе, реже наблюдается у женщин в пременопаузе, и наиболее редко встречается у пациенток в возрасте до 40 лет [52]. Тем не менее, РЭ является гормонально-обусловленным заболеванием, и считается, что непрерывный эффект митотического действия эстрогена является основным онкогенным промотором по меньшей мере в 80% случаев рака эндометрия. Таким образом, условия, которые не регулируют последовательное воздействие прогестерона в эндометрии, такие как ожирение, СПКЯ, диабет, эстроген-секретирующие опухоли яичников и использование тамоксифена, среди прочего, увеличивают риск возникновения РЭ [52, 53]. Обычная картина АМК, связанного с РЭ, является нерегулярной и непрерывной. Кровотечение развивается вторично по отношению к разрушению сосудов эндометрия из-за инвазии злокачественными клетками и аномального неоваскулогенеза [51].

Коагулопатия: АМК-С

Сообщается, что коагулопатии поражают 13% женщин с ТМК. Большинство из этих женщин страдают болезнью Виллебранда [54]. Системные нарушения гемостаза могут быть выявлены у 90% женщин при использовании специального структурированного анамнеза [1]. Ранее выделялись 4 клинических варианта АМК-С: 1 – АМК во время антикоагулянтной терапии (в настоящее время это группа АМК-I), 2 – АМК с наследственными нарушениями свертываемости, 3 – АМК, ассоциированное с цитопениями (в частности, тромбоцитопенией), 4 – АМК при серповидноклеточной анемии.

АМК-С, может возникать вторично, но фоне других нозологических форм, самостоятельно вызывающих АМК [55]. Например, компрессия, вызванная большой миомой матки, может привести к венозной тромбоэмболии, поэтому кровотечение, ранее считавшееся АМК-L, может быть усугублено последующей антикоагуляцией, что создает дополнительные проблемы при лечении.

Овуляторная дисфункция: АМК-О

Ановуляторные циклы могут вносить вклад в АМК за счет неконтролируемого воздействия эстрогена на эндометрий, которое вызывает его заметную пролиферацию и утолщение, что приводит к обильным менструальным кровотечениям и измененной частоте менструации. Как пра-

вило, АМК-О наблюдается в крайних случаях репродуктивного возраста: во время менархе и перименопаузы, но может проявляться и на любом этапе репродуктивной жизни. В эту группу также можно отнести нарушения менструального при эндокринопатиях: синдроме поликистозных яичников (СПЯ), гиперпролактинемии, гипотиреозе, а также такие состояния, как ожирение, анорексия, потеря веса, психическое перенапряжение и экстремальные физические нагрузки.

СПЯ является распространенным гинекологическим состоянием, сопровождающимся ановуляцией, ожирением, гиперандрогенией и развитием АМК. В периферической жировой ткани происходит трансформация андрогенов в эстрогены, что приводит к длительной гиперэстрогенной стимуляции эндометрия во время ановуляторного цикла [56].

Другим патологическим состоянием, получившим в настоящее время широкое распространение и нарушающим нормальное гормональное равновесие в эндометрии, является ожирение. В результате опосредованного ароматазой жировой ткани превращения андростендиона, секретируемого надпочечниками, в эстрон обеспечивается дополнительная поставка эстрогенов для эндометрия [57].

Наркотическая зависимость, которая влияет на уровень дофамина, также в настоящее время входит в эту категорию. АМК-О – это диагноз исключения, для его постановки следует исключить другие структурные и функциональные причины АМК.

Эндометриальная дисфункция: АМК-Е

В настоящее время до конца не изучены регуляторные механизмы инициации и прекращения менструального кровотечения. Реэпителизацию поверхности эпителия в настоящее время нельзя считать основным фактором прекращения кровотечения [58], так как получены данные гистологических исследований, подтверждающие, что полная реэпителизация часто наблюдается уже в 1 и 2 дни менструального цикла, несмотря на сохраняющееся менструальное кровотечение.

Эндометрий человека является одним из немногих органов взрослого человека, где происходит регулярный физиологический ангиогенез. Механизмы регуляции роста сосудов эндометрия остаются неясными. Предполагается, что фактор роста эндотелия сосудов (Vascular endothelial growth factor, VEGF), продуцируемый внутрисосудистыми нейтрофилами [59]. Патологический ангиогенез приводит к формированию аномальных кровеносных сосудов с хрупкими стенками и способствует развитию АМК. Недавнее исследование сообщило, что, хотя количество сосудов не отличалось между контролем и АМК, была изменена экспрессия маркеров дифференцировки гладких мышц сосудов при АМК [60].

Ятрогенные причины: АМК-I

Ятрогенные причины АМК включают экзогенную терапию, которая может привести к маточному кровотечению. Сюда относят АМК, связанные с использованием системной фармакотерапии или внутриматочных систем или устройств. В дополнение к половым стероидам, таким как эстрогены, прогестины и андрогены, и агентам, которые непосредственно влияют на их продукцию или функцию, в эту категорию в настоящее время входят нестероидные лекарственные препараты, которые способствуют нарушениям овуляции, препараты, которые влияют на метаболизм дофамина, включая фенотиазины и трициклические антидепрессанты. В первоначальной классификации женщины с АМК, связанные с применением антикоагулянтов, были классифицированы в группу коагулопатий – АМК-С; в новом пересмотре они считаются ятрогенными и классифицируются как АМК-I [1]. Эта группа препаратов включает антагонисты витамина К и современные пероральные прямые антикоагулянты. Недавние исследования показали повышенный риск АМК при использовании ривароксабана по сравнению с другими пероральными прямыми антикоагулянтами или варфарином. Повышенный риск АМК при приеме ривароксабана имел место среди

женщин без гинекологических заболеваний [61, 62].

Не классифицированные иначе: АМК-N

Категория «АМК-N», «не классифицированная как-либо иначе» была создана в исходной системе для размещения объектов, которые встречаются редко или плохо определены. Они включают, но не ограничиваются такими состояниями, как артериовенозные мальформации, нишу после кесарева сечения, гипертрофию миометрия, а также другие нарушения состояния эндометрия, которые в настоящее время нельзя определить с помощью стандартных методов диагностики [2, 54].

В настоящее время FIGO рекомендует клиницистам и исследователям рассмотреть возможность использования диагностической матрицы для оценки пациентов с АМК в репродуктивном возрасте [1] (Рис. 2).

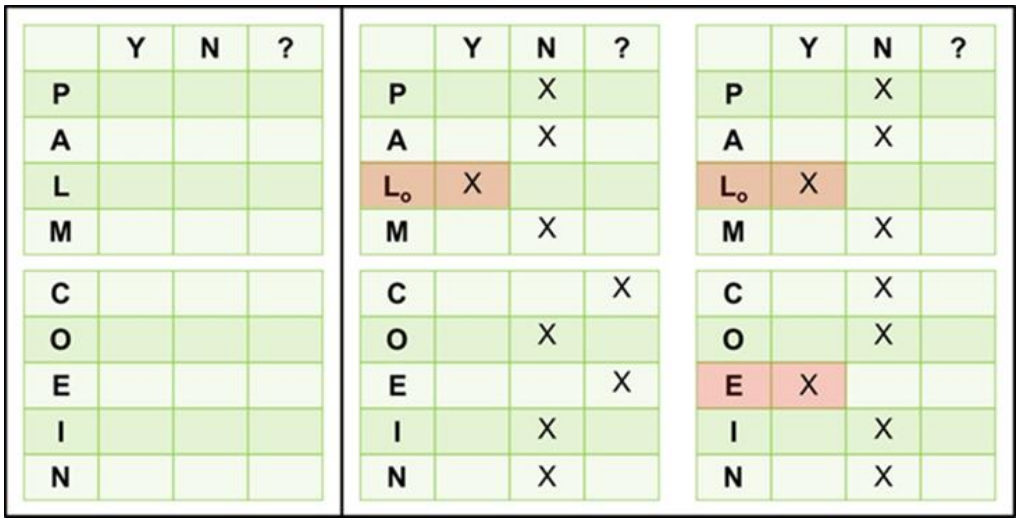


Рис. 2. Диагностическая матрица для оценки пациентов с АМК в репродуктивном возрасте.
Fig. 2. Diagnostic matrix for evaluation of patients with AUB at reproductive age.

В упрощенной диагностической матрице каждый из основных элементов системы классификации перечисляется в столбце слева. Если пациент не был полностью оценен по потенциальной причине, он указан в столбце под знаком «?». Если оценка не продемонстрировала никаких признаков аномальности, помечается столбец «N», и, если оценка положительная, знак X помещается в соответствующий сектор.

Заключение. Международная федерация гинекологии и акушерства рекомендует основывать классификацию причин АМК на системе PALM-COEIN, которая включает структурные и неструктурные причины маточного кровотечения, исключая гестационные причины. Этиологический диагноз определяет выбор метода терапии при АМК и напрямую связан с успехом лечения. Знание основ патогенеза развития маточного кровотечения при тех или иных состояниях позволит разработать новые инструменты диагностики и мониторинга, которые помогут стратифицировать лечение женщин с АМК, особенно в отношении «эндометриальных» и «неклассифицированных» причин.

Информация о финансировании
Финансирование данной работы не проводилось.
Financial support
No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interests
The authors have no conflict of interest to declare.

Список литературы

1. Munro MG, Critchley HOD, Fraser IS. The two FIGO systems for normal and abnormal uterine bleeding symptoms and classification of causes of abnormal uterine bleeding in the reproductive years: 2018 revisions. International Journal of Gynecology and Obstetrics. 2018;143(3):393-408. DOI: https://doi.org/10.1002/ijgo.12666

2. Munro MG, Critchley HOD, Brode MS et al. FIGO classification system (PALM-COEIN) for causes of abnormal uterine bleeding in nongravid women of reproductive age. International Journal of Gynecology and Obstetrics. 2011;113(1):1-2. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2010.11.011

3. Sun Y, Wang Y, Mao L, et al. Prevalence of abnormal uterine bleeding according to new International Federation of Gynecology and Obstetrics classification in Chinese women of reproductive age: A cross-sectional study. Medicine (Baltimore). 2018;97(31):e11457. DOI: https://doi.org/10.1097/MD.0000000000011457

4. Kazemijaliseh H, Tehrani FR, Behboudi-Gandevani S, et al. A Population-Based Study of the Prevalence of Abnormal Uterine Bleeding and its Related Factors among Iranian Reproductive-Age Women: An Updated Data. Archives of Iranian Medicine. 2017;20(9):558-563.

5. Lee JHS, Cheng EOL, Choi KM, et al. 2020 Hong Kong College of Obstetricians and Gynaecologists guideline on investigations of premenopausal women with abnormal uterine bleeding. Hong Kong Medical Journal. 2020;26(6):520-525. DOI: https://doi.org/10.12809/hkmj208897

6. Matteson KA, Raker CA, Clark MA, et al. Abnormal uterine bleeding, health status, and usual source of medical care: analyses using the Medical Expenditures Panel Survey. Journal of Women's Health. 2013;22(11):959-65. DOI: https://doi.org/10.1089/jwh.2013.4288

7. Lam C, Anderson B, Lopes V, et al. Assessing Abnormal Uterine Bleeding: Are Physicians Taking a Meaningful Clinical History? Journal of Women's Health. 2017;26(7):762-767. DOI: https://doi.org/10.1089/jwh.2016.6155

8. Tanaka E, Momoeda M, Osuga Y, et al. Burden of menstrual symptoms in Japanese women: results from a survey-based study. Journal of Medical Economics. 2013;16(11):1255-66. DOI: https://doi.org/10.3111/13696998.2013.830974

9. Maqbool R, Maqbool M, Zehravi M, et al. Menstrual distress in females of reproductive age: a literature review. International Journal of Adolescent Medicine and Health. 2021;34(2):11-17. DOI: https://doi.org/10.1515/ijamh-2021-0081

10. 2021 exceptional surveillance of heavy menstrual bleeding: assessment and management (NICE guideline NG88). London: National Institute for Health and Care Excellence (NICE); 2021.

11. ACOG committee opinion no. 557: Management of acute abnormal uterine bleeding in nonpregnant reproductive-aged women. Obstetrics and Gynecology. 2013;121(4):891-896. DOI: https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000428646.67925.9a

12. Hapangama DK, Bulmer JN. Pathophysiology of heavy menstrual bleeding. Women's Health. 2015;12(1):3-13 DOI: https://doi.org/10.2217/whe.15.81

13. Indraccolo U, Di Iorio R, Matteo M, et al. The pathogenesis of endometrial polyps: a systematic semi-quantitative review. European Journal of Gynaecological Oncology. 2013;34(1):5-22.

14. Uglietti A, Buggio L, Farella M, et al. The risk of malignancy in uterine polyps: A systematic review and meta-analysis. European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology. 2019;237:48-56. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2019.04.009

15. Peres GF, Spadoto-Dias D, Bueloni-Dias FN, et al. Immunohistochemical expression of hormone receptors, Ki-67, endoglin (CD105), claudins 3 and 4, MMP-2 and -9 in endometrial polyps and endometrial cancer type I. OncoTargets and Therapy. 2018;11:3949-3958. DOI: https://doi.org/10.2147/OTT.S160014

16. Harmsen MJ, Wong CFC, Mijatovic V. Role of angiogenesis in adenomyosis-associated abnormal uterine bleeding and subfertility: a systematic review. Human Reproduction Update. 2019;25(5):647-671. DOI: https://doi.org/10.1093/humupd/dmz024

17. Wong M, Crnobrnja B, Liberale V, et al. The natural history of endometrial polyps. Human Reproduction. 2017;32(2):340-345. DOI: https://doi.org/10.1093/humrep/dew307

18. Stratopoulou CA, Donnez J, Dolmans MM. Origin and Pathogenic Mechanisms of Uterine Adenomyosis: What Is Known So Far. Reproductive Sciences. 2021;28:2087-2097. DOI: https://doi.org/10.1007/s43032-020-00361-w

19. Bazot M, Daraï E. Role of transvaginal sonography and magnetic resonance imaging in the diagnosis of uterine adenomyosis. Fertility and Sterility. 2018;109(3):389-397. DOI: https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.01.024

20. Chapron C, Vannuccini S, Santulli P, et al. Diagnosing adenomyosis: An integrated clinical and imaging approach. Human Reproduction Update. 2020;26(3):392-411. DOI: https://doi.org/10.1093/humupd/dmz049

21. Naftalin J, Hoo W, Pateman K, et al. How common is adenomyosis? A prospective study of prevalence using transvaginal ultrasound in a gynaecology clinic. Human Reproduction. 2012;27(12):3432-9. DOI: https://doi.org/10.1093/humrep/des332

22. Taylor HS, Kotlyar AM, Flores VA. Endometriosis is a chronic systemic disease: Clinical challenges and novel innovations. The Lancet. 2021;397(10276):839-852. DOI: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00389-5

23. Lacheta J. Uterine adenomyosis: pathogenesis, diagnostics, symptomatology and treatment. Ceska Gynekologie. 2019;84(3):240-246.

24. Tremellen KP, Russell P. The distribution of immune cells and macrophages in the endometrium of women with recurrent reproductive failure. II: adenomyosis and macrophages. Journal of Reproductive Immunology. 2012;93(1):58-63. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jri.2011.12.001

25. Leyendecker G, Wildt L. A new concept of endometriosis and adenomyosis: Tissue injury and repair (TIAR). Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation. 2011;5(2):125-142. DOI: https://doi.org/10.1515/HMBCI.2011.002

26. Huang TS, Chen YJ, Chou TY, et al. Oestrogen-induced angiogenesis promotes adenomyosis by activating the Slug-VEGF axis in endometrial epithelial cells. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2014;18(7):1358-71. DOI: https://doi.org/10.1111/jcmm.12300

27. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2018;20:69-84. DOI: https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4

28. Zondervan KT, Becker CM, Koga K. Endometriosis. Nature Reviews Disease Primers. 2018;4(1):9. DOI: https://doi.org/10.1038/s41572-018-0008-5

29. Garcia L, Isaacson K. Adenomyosis: review of the literature. Journal of Minimally Invasive Gynecology. 2011;18(4):428-37. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jmig.2011.04.004

30. Gargett CE, Schwab KE, Deane JA. Endometrial stem/progenitor cells. the first 10 years. Human Reproduction Update. 2016;22(2):137-163. DOI: https://doi.org/10.1093/humupd/dmv051

31. Benagiano G, Habiba M, Brosens I. The pathophysiology of uterine adenomyosis: an update. Fertility and Sterility. 2012;98(3):572-579. DOI: https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.06.044

32. An M, Li N, Yuan M, et al. Different macrophages equally induce EMT in endometria of adenomyosis and normal. Reproduction. 2017;154:79-92. DOI: https://doi.org/10.1530/REP-17-0174

33. Zhou W, Peng Z, Zhang C, et al. ILK-induced epithelial-mesenchymal transition promotes the invasive phenotype in adenomyosis. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2018;497(4):950-956. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.184

34. Bulun SE, Yildiz S, Adli M, et al. Adenomyosis pathogenesis: insights from next-generation sequencing. Human Reproduction Update. 2021;27(6):1086-1097. DOI: https://doi.org/10.1093/humupd/dmab017

35. Stewart EA, Cookson CL, Gandolfo RA, et al. Epidemiology of uterine fibroids: a systematic review. BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology. 2017;124(10):1501-1512. DOI: https://doi.org/10.1111/1471-0528.14640

36. Markowski DN, Holzmann C, Bullerdiek J. Genetic alterations in uterine fibroids – a new direction for pharmacological intervention? Expert Opinion on Therapeutic Targets. 2015;19(11):1485-94. DOI: https://doi.org/10.1517/14728222.2015.1075510

37. Machado-Lopez A, Simón C, Mas A. Molecular and Cellular Insights into the Development of Uterine Fibroids. International Journal of Molecular Sciences. 2021;22(16):8483. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms22168483

38. Wise LA, Laughlin-Tommaso SK. Epidemiology of Uterine Fibroids: From Menarche to Menopause. Clinical Obstetrics and Gynecology. 2016;59(1):2-24. DOI: https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000164

39. Reis FM, Bloise E, Ortiga-Carvalho TM. Hormones and pathogenesis of uterine fibroids. Best Practice and Research in Clinical Obstetrics and Gynaecology. 2016;34:13-24. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2015.11.015

40. Omar M, Laknaur A, Al-Hendy A, et al. Myometrial progesterone hyper-responsiveness associated with increased risk of human uterine fibroids. BMC Women's Health. 2019;19:92. DOI: https://doi.org/10.1186/s12905-019-0795-1

41. Barjon K, Mikhail LN. Uterine Leiomyomata [Internet]. 2022 [cited 2022 Jan]; URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK546680/

42. Wray S, Prendergast C. The Myometrium: From Excitation to Contractions and Labour. Advances in Experimental Medicine and Biology. 2019;1124:233-263. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-13-5895-1_10

43. Ciavattini A, Di Giuseppe J, Stortoni P, et al. Uterine fibroids: Pathogenesis and interactions with endometrium and endomyometrial junction. Obstetrics and Gynecology International. 2013;2013:173184. DOI: https://doi.org/10.1155/2013/173184

44. Ikhena DE, Bulun SE. Literature Review on the Role of Uterine Fibroids in Endometrial Function. Reproductive Sciences. 2018;25(5):635-643. DOI: https://doi.org/10.1177/1933719117725827

45. Pitman H, Innes BA, Robson SC, et al. Altered expression of interleukin-6, interleukin-8 and their receptors in decidua of women with sporadic miscarriage. Human Reproduction. 2013;28(8):2075-86. DOI: https://doi.org/10.1093/humrep/det233

46. Hapangama DK, Kamal AM, Bulmer JN. Estrogen receptor beta: the guardian of the endometrium. Human Reproduction Update. 2015;21(2):174-93. DOI: https://doi.org/10.1093/humupd/dmu053

47. Ordi J, Bergeron C, Hardisson D, et al. Reproducibility of current classifications of endometrial endometrioid glandular proliferations: further evidence supporting a simplified classification. Histopathology. 2014;64(2):284-92. DOI: https://doi.org/10.1111/his.12249

48. Lax SF. New features in the 2014 WHO classification of uterine neoplasms. Der Pathologe. 2016;37(6):500-511. DOI: https://doi.org/10.1007/s00292-016-0230-4

49. Park JC, Lim SY, Jang TK, et al. Endometrial histology and predictable clinical factors for endometrial disease in women with polycystic ovary syndrome. Clinical and Experimental Reproductive Medicine. 2011;38(1):42-6. DOI: https://doi.org/10.5653/cerm.2011.38.1.42

50. Colombo N, Preti E, Landoni F, et al. Endometrial cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of Oncology. 2011;24(Suppl 6):VI33-VI38. DOI: https://doi.org/10.1093/annonc/mdt353

51. Sivridis E, Giatromanolaki A. The pathogenesis of endometrial carcinomas at menopause: facts and figures. Journal of Clinical Pathology. 2011;64(7):553-60. DOI: http://dx.doi.org/10.1136/jcp.2010.085951

52. Setiawan VW, Yang HP, Pike MC, et al. Type I and II endometrial cancers: have they different risk factors? Journal of Clinical Oncology. 2013;31(20):2607-2618. DOI: https://doi.org/10.1200/JCO.2012.48.2596

53. Ragni MV, Machin N, Malec LM, et al. Von Willebrand factor for menorrhagia: a survey and literature review. Haemophilia. 2016;22(3):397-402. DOI: https://doi.org/10.1111/hae.12898

54. Archer DF. Vascular dysfunction as a cause of endometrial bleeding. Gynecological Endocrinology. 2012;28(9):688-93. DOI: https://doi.org/10.3109/09513590.2011.588848

55. Nandi A, Chen Z, Patel R, et al. Polycystic ovary syndrome. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. 2014;43(1):123-47. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ecl.2013.10.003

56. Uchikova E, Uchikov P, Parahuleva P. Obesity and endometrial carcinogenesis. Akush Ginekol (Sofiia). 2015;54(9):34-7. Bulgarian.

57. Berbic M, Fraser IS. Immunology of normal and abnormal menstruation. Women's Health. 2013;9(4):387-95. DOI: https://doi.org/10.2217/WHE.13.32

58. Maybin JA, Critchley HOD. Menstrual physiology: implications for endometrial pathology and beyond. Human Reproduction Update. 2015;21(6):748-61. DOI: https://doi.org/10.1093/humupd/dmv038

59. Shivhare SB, Bulmer JN, Innes BA, et al. Altered vascular smooth muscle cell differentiation in the endometrial vasculature in menorrhagia. Human Reproduction. 2014;29(9):1884-94. DOI: https://doi.org/10.1093/humrep/deu164

60. Eworuke E, Hou L, Zhang R, et al. Risk of Severe Abnormal Uterine Bleeding Associated with Rivaroxaban Compared with Apixaban, Dabigatran and Warfarin. Drug Safety. 2021;44(7):753-763. DOI: https://doi.org/10.1007/s40264-021-01072-0

61. Weaver J, Shoaibi A, Truong HQ, et al. Comparative Risk Assessment of Severe Uterine Bleeding Following Exposure to Direct Oral Anticoagulants: A Network Study Across Four Observational Databases in the USA. Drug Safety. 2021;44(4):479-497. DOI: https://doi.org/10.1007/s40264-021-01060-4

62. Zimran A, Morris E, Mengel E, et al. The female Gaucher patient: the impact of enzyme replacement therapy around key reproductive

events (menstruation, pregnancy and menopause). Blood Cells, Molecules, and Diseases. 2009;43(3):264-88. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2009.04.003

References

1. Munro MG, Critchley HOD, Fraser IS. The two FIGO systems for normal and abnormal uterine bleeding symptoms and classification of causes of abnormal uterine bleeding in the reproductive years: 2018 revisions. International Journal of Gynecology and Obstetrics. 2018;143(3):393-408. DOI: https://doi.org/10.1002/ijgo.12666

2. Munro MG, Critchley HOD, Brode MS et al. FIGO classification system (PALM-COEIN) for causes of abnormal uterine bleeding in nongravid women of reproductive age. International Journal of Gynecology and Obstetrics. 2011;113(1):1-2. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2010.11.011

3. Sun Y, Wang Y, Mao L, et al. Prevalence of abnormal uterine bleeding according to new International Federation of Gynecology and Obstetrics classification in Chinese women of reproductive age: A cross-sectional study. Medicine (Baltimore). 2018;97(31):e11457. DOI: https://doi.org/10.1097/MD.0000000000011457

4. Kazemijaliseh H, Tehrani FR, Behboudi-Gandevani S, et al. A Population-Based Study of the Prevalence of Abnormal Uterine Bleeding and its Related Factors among Iranian Reproductive-Age Women: An Updated Data. Archives of Iranian Medicine. 2017;20(9):558-563.

5. Lee JHS, Cheng EOL, Choi KM, et al. 2020 Hong Kong College of Obstetricians and Gynaecologists guideline on investigations of premenopausal women with abnormal uterine bleeding. Hong Kong Medical Journal. 2020;26(6):520-525. DOI: https://doi.org/10.12809/hkmj208897

6. Matteson KA, Raker CA, Clark MA, et al. Abnormal uterine bleeding, health status, and usual source of medical care: analyses using the Medical Expenditures Panel Survey. Journal of Women's Health. 2013;22(11):959-65. DOI: https://doi.org/10.1089/jwh.2013.4288

7. Lam C, Anderson B, Lopes V, et al. Assessing Abnormal Uterine Bleeding: Are Physicians Taking a Meaningful Clinical History? Journal of Women's Health. 2017;26(7):762-767. DOI: https://doi.org/10.1089/jwh.2016.6155

8. Tanaka E, Momoeda M, Osuga Y, et al. Burden of menstrual symptoms in Japanese women: results from a survey-based study. Journal of Medical Economics. 2013;16(11):1255-66. DOI: https://doi.org/10.3111/13696998.2013.830974

9. Maqbool R, Maqbool M, Zehravi M, et al. Menstrual distress in females of reproductive age: a literature review. International Journal of Adolescent Medicine and Health. 2021;34(2):11-17. DOI: https://doi.org/10.1515/ijamh-2021-0081

10. 2021 exceptional surveillance of heavy menstrual bleeding: assessment and management (NICE guideline NG88). London: National Institute for Health and Care Excellence (NICE); 2021.

11. ACOG committee opinion no. 557: Management of acute abnormal uterine bleeding in nonpregnant reproductive-aged women. Obstetrics and Gynecology. 2013;121(4):891-896. DOI: https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000428646.67925.9a

12. Hapangama DK, Bulmer JN. Pathophysiology of heavy menstrual bleeding. Women's Health. 2015;12(1):3-13 DOI: https://doi.org/10.2217/whe.15.81

13. Indraccolo U, Di Iorio R, Matteo M, et al. The pathogenesis of endometrial polyps: a systematic semi-quantitative review. European Journal of Gynaecological Oncology. 2013;34(1):5-22.

14. Uglietti A, Buggio L, Farella M, et al. The risk of malignancy in uterine polyps: A systematic review and meta-analysis. European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology. 2019;237:48-56. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2019.04.009

15. Peres GF, Spadoto-Dias D, Bueloni-Dias FN, et al. Immunohistochemical expression of hormone receptors, Ki-67, endoglin (CD105), claudins 3 and 4, MMP-2 and -9 in endometrial polyps and endometrial cancer type I. OncoTargets and Therapy. 2018;11:3949-3958. DOI: https://doi.org/10.2147/OTT.S160014

16. Harmsen MJ, Wong CFC, Mijatovic V. Role of angiogenesis in adenomyosis-associated abnormal uterine bleeding and subfertility: a systematic review. Human Reproduction Update. 2019;25(5):647-671. DOI: https://doi.org/10.1093/humupd/dmz024

17. Wong M, Crnobrnja B, Liberale V, et al. The natural history of endometrial polyps. Human Reproduction. 2017;32(2):340-345. DOI: https://doi.org/10.1093/humrep/dew307

18. Stratopoulou CA, Donnez J, Dolmans MM. Origin and Pathogenic Mechanisms of Uterine Adenomyosis: What Is Known So Far. Reproductive Sciences. 2021;28:2087-2097. DOI: https://doi.org/10.1007/s43032-020-00361-w

19. Bazot M, Daraï E. Role of transvaginal sonography and magnetic resonance imaging in the diagnosis of uterine adenomyosis. Fertility and Sterility. 2018;109(3):389-397. DOI: https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.01.024

20. Chapron C, Vannuccini S, Santulli P, et al. Diagnosing adenomyosis: An integrated clinical and imaging approach. Human Reproduction Update. 2020;26(3):392-411. DOI: https://doi.org/10.1093/humupd/dmz049

21. Naftalin J, Hoo W, Pateman K, et al. How common is adenomyosis? A prospective study of prevalence using transvaginal ultrasound in a gynaecology clinic. Human Reproduction. 2012;27(12):3432-9. DOI: https://doi.org/10.1093/humrep/des332

22. Taylor HS, Kotlyar AM, Flores VA. Endometriosis is a chronic systemic disease: Clinical challenges and novel innovations. The Lancet. 2021;397(10276):839-852. DOI: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00389-5

23. Lacheta J. Uterine adenomyosis: pathogenesis, diagnostics, symptomatology and treatment. Ceska Gynekologie. 2019;84(3):240-246.

24. Tremellen KP, Russell P. The distribution of immune cells and macrophages in the endometrium of women with recurrent reproductive failure. II: adenomyosis and macrophages. Journal of Reproductive Immunology. 2012;93(1):58-63. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jri.2011.12.001

25. Leyendecker G, Wildt L. A new concept of endometriosis and adenomyosis: Tissue injury and repair (TIAR). Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation. 2011;5(2):125-142. DOI: https://doi.org/10.1515/HMBCI.2011.002

26. Huang TS, Chen YJ, Chou TY, et al. Oestrogen-induced angiogenesis promotes adenomyosis by activating the Slug-VEGF axis in endometrial epithelial cells. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2014;18(7):1358-71. DOI: https://doi.org/10.1111/jcmm.12300

27. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2018;20:69-84. DOI: https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4

28. Zondervan KT, Becker CM, Koga K. Endometriosis. Nature Reviews Disease Primers. 2018;4(1):9. DOI: https://doi.org/10.1038/s41572-018-0008-5

29. Garcia L, Isaacson K. Adenomyosis: review of the literature. Journal of Minimally Invasive Gynecology. 2011;18(4):428-37. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jmig.2011.04.004

30. Gargett CE, Schwab KE, Deane JA. Endometrial stem/progenitor cells. the first 10 years. Human Reproduction Update. 2016;22(2):137-163. DOI: https://doi.org/10.1093/humupd/dmv051

31. Benagiano G, Habiba M, Brosens I. The pathophysiology of uterine adenomyosis: an update. Fertility and Sterility. 2012;98(3):572-579. DOI: https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.06.044

32. An M, Li N, Yuan M, et al. Different macrophages equally induce EMT in endometria of adenomyosis and normal. Reproduction. 2017;154:79-92. DOI: https://doi.org/10.1530/REP-17-0174

33. Zhou W, Peng Z, Zhang C, et al. ILK-induced epithelial-mesenchymal transition promotes the invasive phenotype in adenomyosis. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2018;497(4):950-956. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.184

34. Bulun SE, Yildiz S, Adli M, et al. Adenomyosis pathogenesis: insights from next-generation sequencing. Human Reproduction Update. 2021;27(6):1086-1097. DOI: https://doi.org/10.1093/humupd/dmab017

35. Stewart EA, Cookson CL, Gandolfo RA, et al. Epidemiology of uterine fibroids: a systematic review. BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology. 2017;124(10):1501-1512. DOI: https://doi.org/10.1111/1471-0528.14640

36. Markowski DN, Holzmann C, Bullerdiek J. Genetic alterations in uterine fibroids – a new direction for pharmacological intervention? Expert Opinion on Therapeutic Targets. 2015;19(11):1485-94. DOI: https://doi.org/10.1517/14728222.2015.1075510

37. Machado-Lopez A, Simón C, Mas A. Molecular and Cellular Insights into the Development of Uterine Fibroids. International Journal of Molecular Sciences. 2021;22(16):8483. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms22168483

38. Wise LA, Laughlin-Tommaso SK. Epidemiology of Uterine Fibroids: From Menarche to Menopause. Clinical Obstetrics and Gynecology. 2016;59(1):2-24. DOI: https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000164

39. Reis FM, Bloise E, Ortiga-Carvalho TM. Hormones and pathogenesis of uterine fibroids. Best Practice and Research in Clinical Obstetrics and Gynaecology. 2016;34:13-24. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2015.11.015

40. Omar M, Laknaur A, Al-Hendy A, et al. Myometrial progesterone hyper-responsiveness associated with increased risk of human uterine fibroids. BMC Women's Health. 2019;19:92. DOI: https://doi.org/10.1186/s12905-019-0795-1

41. Barjon K, Mikhail LN. Uterine Leiomyomata [Internet]. 2022 [cited 2022 Jan]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK546680/

42. Wray S, Prendergast C. The Myometrium: From Excitation to Contractions and Labour. Advances in Experimental Medicine and Biology. 2019;1124:233-263. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-13-5895-1_10

43. Ciavattini A, Di Giuseppe J, Stortoni P, et al. Uterine fibroids: Pathogenesis and interactions with endometrium and endomyometrial junction. Obstetrics and Gynecology International. 2013;2013:173184. DOI: https://doi.org/10.1155/2013/173184

44. Ikhena DE, Bulun SE. Literature Review on the Role of Uterine Fibroids in Endometrial Function. Reproductive Sciences. 2018;25(5):635-643. DOI: https://doi.org/10.1177/1933719117725827

45. Pitman H, Innes BA, Robson SC, et al. Altered expression of interleukin-6, interleukin-8 and their receptors in decidua of women with sporadic miscarriage. Human Reproduction. 2013;28(8):2075-86. DOI: https://doi.org/10.1093/humrep/det233

46. Hapangama DK, Kamal AM, Bulmer JN. Estrogen receptor beta: the guardian of the endometrium. Human Reproduction Update. 2015;21(2):174-93. DOI: https://doi.org/10.1093/humupd/dmu053

47. Ordi J, Bergeron C, Hardisson D, et al. Reproducibility of current classifications of endometrial endometrioid glandular proliferations: further evidence supporting a simplified classification. Histopathology. 2014;64(2):284-92. DOI: https://doi.org/10.1111/his.12249

48. Lax SF. New features in the 2014 WHO classification of uterine neoplasms. Der Pathologe. 2016;37(6):500-511. DOI: https://doi.org/10.1007/s00292-016-0230-4

49. Park JC, Lim SY, Jang TK, et al. Endometrial histology and predictable clinical factors for endometrial disease in women with polycystic ovary syndrome. Clinical and Experimental Reproductive Medicine. 2011;38(1):42-6. DOI: https://doi.org/10.5653/cerm.2011.38.1.42

50. Colombo N, Preti E, Landoni F, et al. Endometrial cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of Oncology. 2011;24(Suppl 6):VI33-VI38. DOI: https://doi.org/10.1093/annonc/mdt353

51. Sivridis E, Giatromanolaki A. The pathogenesis of endometrial carcinomas at menopause: facts and figures. Journal of Clinical Pathology. 2011;64(7):553-60. DOI: http://dx.doi.org/10.1136/jcp.2010.085951

52. Setiawan VW, Yang HP, Pike MC, et al. Type I and II endometrial cancers: have they different risk factors? Journal of Clinical Oncology. 2013;31(20):2607-2618. DOI: https://doi.org/10.1200/JCO.2012.48.2596

53. Ragni MV, Machin N, Malec LM, et al. Von Willebrand factor for menorrhagia: a survey and literature review. Haemophilia. 2016;22(3):397-402. DOI: https://doi.org/10.1111/hae.12898

54. Archer DF. Vascular dysfunction as a cause of endometrial bleeding. Gynecological Endocrinology. 2012;28(9):688-93. DOI: https://doi.org/10.3109/09513590.2011.588848

55. Nandi A, Chen Z, Patel R, et al. Polycystic ovary syndrome. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. 2014;43(1):123-47. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ecl.2013.10.003

56. Uchikova E, Uchikov P, Parahuleva P. Obesity and endometrial carcinogenesis. Akush Ginekol (Sofiia). 2015;54(9):34-7. Bulgarian.

57. Berbic M, Fraser IS. Immunology of normal and abnormal menstruation. Women's Health. 2013;9(4):387-95. DOI: https://doi.org/10.2217/WHE.13.32

58. Maybin JA, Critchley HOD. Menstrual physiology: implications for endometrial pathology and beyond. Human Reproduction Update. 2015;21(6):748-61. DOI: https://doi.org/10.1093/humupd/dmv038

59. Shivhare SB, Bulmer JN, Innes BA, et al. Altered vascular smooth muscle cell differentiation in the endometrial vasculature in menorrhagia. Human Reproduction. 2014;29(9):1884-94. DOI: https://doi.org/10.1093/humrep/deu164

60. Eworuke E, Hou L, Zhang R, et al. Risk of Severe Abnormal Uterine Bleeding Associated with Rivaroxaban Compared with Apixaban, Dabigatran and Warfarin. Drug Safety. 2021;44(7):753-763. DOI: https://doi.org/10.1007/s40264-021-01072-0

61. Weaver J, Shoaibi A, Truong HQ, et al. Comparative Risk Assessment of Severe Uterine Bleeding Following Exposure to Direct Oral Anticoagulants: A Network Study Across Four Observational Databases in the USA. Drug Safety.

2021;44(4):479-497. DOI: https://doi.org/10.1007/s40264-021-01060-4

62. Zimran A, Morris E, Mengel E, et al. The female Gaucher patient: the impact of enzyme replacement therapy around key reproductive events (menstruation, pregnancy and menopause). Blood Cells, Molecules, and Diseases. 2009;43(3):264-88. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2009.04.003

Статья поступила в редакцию 1 марта 2022 г.
Поступила после доработки 6 мая 2022 г.
Принята к печати 30 мая 2022 г.

Received 1 March 2022
Revised 6 May 2022
Accepted 30 May 2022

Информация об авторах

Елена Владимировна Енькова, доктор медицинских наук, профессор кафедры акушерства и гинекологии №2, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко», г. Воронеж, Российская Федерация, E-mail: enkova@bk.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8885-1587.

Елена Владимировна Киселева, кандидат медицинских наук, доцент кафедры акушерства и гинекологии №2, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко», г. Воронеж, Российская Федерация, E-mail: e.v.kiseleva@vrngmu.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6195-3740.

Ольга Викторовна Хоперская, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры акушерства и гинекологии №2, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко», г. Воронеж, Российская Федерация, E-mail: smv250587@mail.ru**,** ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4199-8156.

Андрей Владимирович Хатунцев, кандидат медицинских наук, доцент кафедры акушерства и гинекологии №2, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко», г. Воронеж, Российская Федерация, E-mail: andrei-hat@yandex.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9865-7291.

Инга Дмитриевна Тюрина, аспирант по научной специальности 3.1.4 – Акушерство и гинекология ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко», г. Воронеж, Российская Федерация, E-mail: inga.tyurina@mail.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5234-1929.

Information about the authors

Elena V. Enkova, Doct. Sci. (Medicine), Professor at the Department of Obstetrics and Gynecology No. 2, Burdenko Voronezh State Medical University, Voronezh, Russia, E-mail: enkova@bk.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8885-1587.

Elena V. Kiseleva, Cand. Sci. (Medicine), Associate Professor at the Department of Obstetrics and Gynecology No. 2, Burdenko Voronezh State Medical University, Voronezh, Russia, E-mail: e.v.kiseleva@vrngmu.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6195-3740.

Olga V. Khoperskaya, Cand. Sci. (Medicine), Assistant at the Department of Obstetrics and Gynecology No. 2, Burdenko Voronezh State Medical University, Voronezh, Russia, E-mail: smv250587@mail.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4199-8156.

Andrey V. Khatuncev, Cand. Sci. (Medicine), Associate Professor at the Department of Obstetrics and Gynecology No. 2, Burdenko Voronezh State Medical University, Voronezh, Russia, E-mail: andrei-hat@yandex.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9865-7291.

Inga D. Tyurina, Post-graduate Student in Scientific Specialty 3.1.4 – Obstetrics and gynecology, Burdenko Voronezh State Medical University, Voronezh, Russia, E-mail: inga.tyurina@mail.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5234-1929.

(cc) BY

DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-3-0-9 **УДК 612.886:612.812:613.98:616-053.88**

Особенности постурального баланса у работающих женщин 60-69 лет

А.В. Дёмин[1], А.Н. Ильницкий[2], К.С. Кореневич[2]

[1] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова», наб. Северной Двины, д. 17, г. Архангельск, 163002, Российская Федерация
[2] Академия постдипломного образования Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», Волоколамское шоссе, д. 91, г. Москва, 125371, Российская Федерация
Автор для переписки: А.В. Дёмин (adi81@yandex.ru)

Резюме

Актуальность: Формирование государственной политики оптимизации здорового и активного старения, направленной на формирование у пожилых людей стимула к более продолжительной работе, требую новых знаний об особенностях физического и психологического здоровья пенсионеров, продолжающих трудиться. За последние восемь лет в отечественной научной литературе исследования, направленные на выявление особенностей компонентов постурального баланса, включая сенсорную организацию постурального контроля, у работающих женщин пенсионного возраста, в том числе в возрасте 65 лет и старше, практически не отражены. **Цель исследования:** Оценить эффективность функции равновесия и сенсорной организации постурального контроля у работающих женщин 60-69 лет. **Материалы и методы:** Были обследованы 153 женщины в возрасте 60-69 лет (средний возраст 64±2,7 лет), которые продолжали работать по своей профессии и после выхода на пенсию. Первую возрастную группу составили женщины в возрасте 60-64 года (n=84), вторую – 65-69 лет (n=69). Для комплексной оценки компонентов равновесия использовали компьютерный комплекс динамической постурографии «Smart Equitest Balance Manager». Проводили Sensory Organization Test (SOT). **Результаты:** При анализе показателей SOT не было выявлено статистически значимых различий между группами работающих женщин, что позволяет сделать вывод: у работающих женщин в возрасте 65-69 лет не отмечается возрастных изменений в эффективности поддержания и снижения общей результативности статического и статодинамического равновесия, а также адаптационных, физиологических и нейрофизиологических механизмов управления и контроля позой. Также в проведенном исследовании у женщин после 64 лет не наблюдается увеличения колебаний центра тяжести при поддержании статического и особенно статодинамического баланса. Кроме того, у работающих женщин 65-69 лет не выявлено снижения коэффициентов участия соматосенсорной, зрительной и вестибулярной информации в контроле над балансом, включая изменения в сенсорной интеграции постурального контроля. Все это можно рассматривать как предикторы, влияющие на способность к продолжению безопасной трудовой деятельности у женщин после 64 лет. **Заключение:** У женщин в возрасте 60-69 лет удовлетворенность своим постуральным балансом будет определять уверенность и желание к продолжению успешной трудовой деятельности, а также сохранению своего социального и профессионального статуса.

Ключевые слова: компьютерная постурография; Sensory Organization Test; центр тяжести; поддержание статического и статодинамического баланса; работающие женщины 60-69 лет; трудовая деятельность на пенсии

Для цитирования: Дёмин АВ, Ильницкий АН, Кореневич КС. Особенности постурального баланса у работающих женщин 60-69 лет. Научные результаты биомедицинских исследований. 2022;8(3):382-397. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-3-0-9

Features of postural balance in working women aged 60-69

Alexander V. Dyomin[1], Andrei N. Ilnitski[2], Ksenia S. Korenevich[2]

[1] Northern (Arctic) Federal University,
17 Severnaya Dvina Emb., Arkhangelsk, 163002, Russia
[2] Academy of Postgraduate Education, Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Medical Assistance and Medical Technologies, Federal Medical Biological Agency,
91 Volokolamskoe Highway, Moscow, 125371, Russia
Corresponding author: Alexander V. Dyomin (adi81@yandex.ru)

Abstract

Background: The formation of the state policy for optimizing healthy and active aging, aimed at creating an incentive for older people to work longer, requires new knowledge about the characteristics of the physical and psychological health of pensioners who continue to work. Over the past eight years, studies aimed at identifying the features of the components of postural balance, including the sensory organization of postural control, in working women of retirement age, including those aged 65 years and older, have practically not been reflected in the domestic scientific literature. **The aim of the study:** To evaluate the effectiveness of the function of balance and sensory organization of postural control in working women aged 60-69 years. **Materials and methods:** We examined 153 60-69 years women (mean age 64±2.7 years), who continued to work in their profession after retirement. The first age group consisted of women aged 60-64 (n=84), the second – 65-69 years (n=69). For a comprehensive assessment of the balance components, the Smart Equitest Balance Manager computer complex of dynamic posturography was used. Conducted Sensory Organization Test (SOT). **Results:** When analyzing the SOT indicators, no statistically significant differences were found between groups of working women, which allows us to conclude that working women aged 65-69 do not show age-related changes in the effectiveness of maintaining and reducing the overall effectiveness of static and statodynamic balance, as well as adaptive, physiological and neurophysiological mechanisms of posture management and control. Also in the study in women after 64 years of age, there is no increase in fluctuations in the center of gravity while maintaining a static and especially static-dynamic balance. In addition, working women aged 65-69 did not show a decrease in the coefficients of participation of somatosensory, visual and vestibular information in balance control, including changes in the sensory integration of postural control. All of these can be seen as predictors of women's ability to continue working safely after age 64. **Conclusion:** In 60-69-year-old women, satisfaction with their postural balance will determine the confidence and desire to continue successful work, as well as maintain their social and professional status.

Keywords: computer posturography; Sensory Organization Test; center of gravity; maintaining static and statodynamic balance; working women aged 60-69; working life in retirement

For citation: Dyomin AV, Ilnitski AN, Korenevich KS. Features of postural balance in working women aged 60-69. Research Results in Biomedicine. 2022;8(3):382-397. Russian. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-3-0-9

Введение. В связи с повышением возраста выхода на пенсию и общей тенденцией постарения населения России, активное вовлечение пожилых кадров к работе по своей профессии, по которой они работали и до пенсии, является обоснованным социально-экономическим решением проблемы старения [1, 2]. Формирование государственной политики оптимизации здорового и активного старения**,** направленной на формирование у пенсионеров стимула к более продолжительной работе, поможет пожилым людям продолжать участвовать в трудовой деятельности, без опасения быть уволенным (сокращенным) по возрасту. Однако ее формирование требую новых знаний об особенностях физического и психологического здоровья пенсионеров, продолжающих трудиться, поскольку трудовая деятельность на пенсии напрямую зависит от состояния физического и психологического здоровья, а также факторов влияющих на него [3, 4].

Принято считать, что любые изменения в компонентах системы равновесия у людей после 64 лет, и особенно у женщин, являются частой причиной прекращения их трудовой (волонтерской, общественно-политической, воспитательной (воспитание собственных внуков)) деятельности [1, 5, 6]. В то же время, имеются сведения, что продолжительная профессиональная деятельность у людей в пожилом возрасте негативно сказывается на показателях их статического и статодинамического баланса, повышая риск травматизмана рабочем месте [7]. За последние восемь лет в отечественной научной литературе исследования, направленных на выявление особенностей компонентов постурального баланса, включая сенсорную организацию постурального контроля, у работающих женщин пенсионного возраста, в том числе в возрасте 65 лет старше, практически не отражены [1]. Это и послужило импульсом к проведению ряда исследований в данном направлении, **цель одного из них** – оценить эффективность функции равновесия и сенсорной организации постурального контроля у работающих женщин 60-69 лет.

Материалы и методы. Были обследованы 153 женщины в возрасте 60-69 лет (средний возраст 64±2,7 лет), которые продолжали работать по своей профессии и после выхода на пенсию. В статье представлены сведения только о тех женщинах, которые и через 12 месяцев после проведенного обследования продолжали трудовую деятельность и не планировали прекращать ее в течение последующего года. Именно такой подход в формировании групп исследования позволил получить новые данные и обозначить направления для будущей работы [1]. Первую возрастную группу составили женщины, календарный возраст (КВ) которых находился в пределах 60-64 года (n=84), вторую – в возрасте 65-69 лет (n=69). Все женщины имели среднее специальное образование, высшее профессиональное образование или ученую степень. Исходя из рекомендаций по проведению подобных исследований, в данные группы не были включены женщины, испытавшие два и более падений, у которых имелись в анамнезе черепно-мозговые травмы, неврологические заболевания, депрессивные состояния, нарушения мозгового кровообращения, хронические заболевания в стадии декомпенсации, а также злоупотребляющие алкоголем [1].

Для комплексной оценки компонентов равновесия использовали компьютерный комплекс динамической постурографии «Smart Equitest Balance Manager». В работе представлены данные по Sensory Organization Test (SOT) [1, 8-11]. С целью унификации получаемых данных обследования людей разного возраста и пола использовали разработанную нами технологию «стабилоконтроля» центра тяжести (ЦТ) [1, 8].

В основе SOT лежит оценка физиологических, нейрофизиологических и адаптационных способностей человека эффективно удерживать свое равновесие, по средствам контроля ЦТ, воспринимать и анализировать отдельные сигналы сенсорных систем (соматосенсорной, зрительной и вестибулярной), участвующих в поддержании статического и статодинамического равновесия и качественно управлять им.

SOT – как признанный, во всем мире, высокоинформативный постурографический тест анализирует данные, основанные на выполнении 6-ти функциональных проб (Conditions): Condition 1 (COND1) – стоя с открытыми глазами (ОГ); COND2 – стоя с закрытыми глазами (ЗГ); COND3 – стоя с ОГ при дестабилизирующем воздействии пространственного окружения; COND4 – стоя с ОГ при дестабилизирующем воздействии опорной поверхности; COND5 – стоя с ЗГ при дестабилизирующем воздействии опорной поверхности; COND6 – стоя с ОГ, включая одновременное дестабилизирующее воздействие пространственного окружения и опорной поверхности.

Equilibrium Score (ES) – один из информативных показателей теста, позволяет оценить эффективность поддержания равновесия той или иной функциональной пробе (COND-1–6). Значения ES варьируется в диапазоне от 0 до 100 %; ES=100% указывает на идеальную устойчивость у человека. В данной статье представлены средние значения трех выполненных попыток в той или иной функциональной пробе (ES-1–6_m).

Composite Equilibrium Score (COMP–ES) SOT – это составная, результирующая оценка эффективности функции поддержания статического и статодинамического равновесия всего теста, с учетом сенсорной организации, адаптационных возможностей, особенностей физиологических, нейрофизиологических и психофизиологических механизмов поддержания баланса человека. Значения COMP–ES также должны стремиться к 100 %. Снижаться у людей 60-69 лет COMP–ES ниже 66 % может вызывать серьезное опасение за их постуральную устойчивость.

Сенсорный анализ SOT включает следующие расчетные коэффициенты: Ratio for sensory analysis-Somatosensory (RAT–SOM) – для соматосенсорной; Ratio for sensory analysis-Visual (RAT–VIS) – зрительной; Ratio for sensory analysis-Vestibular (RAT–VEST) – вестибулярной систем. Эти коэффициенты, которые у здорового человека должны стремиться к 100 %, позволяют оценить в какой мере пациент может эффективно использовать конкретные сенсорные сигналы, с учетом различного функционального состояния, для поддержанияи управление своим балансом. Кроме того, SOT позволяет расчетным способом оценить коэффициент сенсорного предпочтения пациента (Ratio for sensory analysis-patient Preference (RAT–PREF)), т.е. способность ЦНС подавлять входящую информацию от зрительной системы, когда она доступна, но функционально не точна, поскольку подвержена влиянию факторов внешнего окружения. Данный коэффициент позволяет оценить способность пациента быстро переключаться с противоречивых зрительных сигналов, на другие источники сенсорной информации в постуральном контроле для снижения дисбаланса. RAT–PREF ниже 90 % у пожилых пациентов будет вызывать озабоченность за сенсорную интеграцию их постурального контроля [10, 11].

SOT также дает оценку стратегии поддержания позы пациента (Postural Strategy Score (PSS)). У здорового человека PSS должен быть не ниже 50 %и стремиться к 100 %, указывая на степень преобладание голеностопной стратегии при поддержании статического и статодинамического равновесия. Последние данные исследований свидетельствуют, что снижение показателя PSS указывает также на повышение скорости колебания ЦТ, азначения ниже 50 % могут свидетельствовать о сложности в контроле колебательных движений ЦТ у пациента. В данной статье представлены средние значения трех выполненных попыток в той или иной функциональной пробе (PSS-1–6_m) [1, 8, 9].

В процессе нашей работы мы обосновали важность расчета и использования в научных публикациях показателя Composite PSS (COMP–PSS) SOT. COMP–PSS – это составная, результирующая оценка показателей постуральной стратегии пациента всего теста. Данный показатель отражает общие тенденции преобладания конкретной постуральной стратегии, физиологических механизмов и адаптационных возможностей, результативность стратегии поддержания статической и статодинамической позы обследуемого. Данный показатель рассчитывали как среднее значение PSS 1-6_m. У пожилых людей озабоченность по поводу их постуральных колебаний и общей стратегии поддержания баланса будут вызывать значения COMP–PSS ниже 80 % [1, 8, 9].

При помощи компьютерной программы «IBM SPSS Statistics верия 20» проводили статистический анализ. Полученные результаты исследования по группам обследуемых женщин представлены медианой (Me) и процентильным (квартальным) интервалом 25-75 (Q_1–Q_3). Для сравнения двух независимых выборок использовали непараметрический статистический метод U-тест Манна–Уитни.

Результаты и их обсуждение. Сравнительный анализ показателей ES-1–5_m SOT (табл. 1) не выявил статистически значимых различий ($p > 0,1$). Первые квартили ES-2_m, ES-4_m и ES-5_m, были выше у женщин 65–69 лет. В то же время ES-6_m выявил различия на уровне статистической тенденции ($0,05 > p \leq 0,1$). Все квартили ES-6_m были выше у женщин 60–64 года, т.е. у работающих женщин после 64 лет существует определенный риск снижения эффективности функции равновесия в пробе 6. Следовательно, снижения эффективности функции равновесия в COND6 у женщин 65-69 лет может происходить не зависимо от продолжения ими трудовой деятельности. Все это делает ES-6_m первостепенным информативным показателем при анализе преждевременных изменений в компонентах постурального баланса человека [10].

Таблица 1

Sensory Organization Test (SOT) у работающих женщин 60-69 лет, %

Table 1

Sensory Organization Test (SOT) scores in female workers aged 60-69, %

Показатели	60-64 года	65-69 лет	p
	n = 84	n = 69	
	Me (Q1–Q3)		
КВ, лет	62 (61-63)	66 (65-68)	< 0,001
Equilibrium Score (ES)			
ES-1_m	95 (94-96)	95 (94-96)	0,686
ES-2_m	94 (92-95)	94 (93-94)	0,649
ES-3_m	92 (91-94)	92 (91-94)	0,748
ES-4_m	90 (87-92)	91 (88-92)	0,734
ES-5_m	72 (64-75)	69 (66-74)	0,455
ES-6_m	73 (65-78)	69 (63-75)	0,063
COMP–ES	83 (80-86)	82 (80-84)	0,362
Postural Strategy Score (PSS)			
PSS-1_m	99 (98-100)	99 (98-99)	0,553
PSS-2_m	98 (98-99)	98 (98-99)	0,104
PSS-3_m	98 (97-99)	98 (97-98)	0,791
PSS-4_m	91 (89-93)	92 (90-94)	0,151
PSS-5_m	78 (75-83)	79 (74-83)	0,950
PST-6_m	78 (75-83)	79 (74-82)	0,831
COMP–PSS	90 (89-92)	91 (89-92)	0,656
Sensory analysis			
RAT–SOM	99 (98-99)	99 (98-99)	0,283
RAT–VIS	95 (92-97)	96 (93-97)	0,601
RAT–VEST	75 (68-79)	73 (68-78)	0,441
RAT–PREF	99 (97-103)	99 (96-102)	0,320

Анализируя показатели ES-1–3$_m$ SOT, можно сделать вывод, что у работающих 65–69-летних женщин не происходит возрастных изменений в эффективности поддержания статического баланса, что можно рассматривать как предиктор, оказывающий положительное влияние на продолжение трудовой деятельности после 64 лет [1, 11-13].

В то же время на основании анализ показателей ES-4–6$_m$ SOT можно говорить о тенденции к снижению эффективности поддержания статодинамического баланса у работающих женщин после 64 лет. Однако эти тенденции не являются клинически значимыми изменениями, но обосновываю необходимость проведения контрольно-реабилитационных мероприятий, направленных на повышение эффективности поддержания статодинамического равновесия [1, 11-13].

Сравнение COMP–ES SOT не обнаружило статистически значимых различий. Медиана и третий квартиль были выше у женщин 60-64 года, а первые квартили были одинаковыми и равнялись 80%. Не выявлено возрастных изменений общей результативности постурального баланса, а также снижения физиологических, нейрофизиологических механизмов и адаптационных возможностей функции равновесия у работающих женщин после 64 лет. Ранее уже отмечалось снижение данного показателя в общей когорте обследованных женщин (включая как работающих, так и не работающих) после 64 лет [9].

Сравнение показателей PSS-1–6$_m$ и COMP–PSS также не выявило статистических различий. Медианы PSS-4$_m$, PSS-5$_m$ и PST-6$_m$, а также первый квартиль PSS-4$_m$ были выше у женщин 65-69 лет. Первые квартили COMP–PSS были одинаковыми (89%). Отсутствие возрастных изменений PSS в COND 1-6 и COMP–PSS свидетельствует, что у женщин 65-69 лет сохраняется хорошая балансировка ЦТ и адаптация к быстрым постуральным возмущениям. Это можно также рассматривать как предиктор, оказывающий благоприятное влияние на продолжение трудовой деятельности у женщин старше 64 лет. Возможно, адаптация к быстрым постуральным возмущениям является важной характеристикой в оценке преждевременных изменений компонентов постурального баланса у человека, влияя на его восприятие своего баланса.

Значение COMP–ES, равное 80 % и выше, а значение COMP–PSS – от 89% и вышеможно рассматривать у женщин 60–69 лет как пределы их «оптимального» баланса, необходимого для успешного продолжения трудовой деятельности, особенно поле 64 лет, тем самым высоко характеризуя их продуктивное и социальное старение.

Не было выявлено статистически значимых различий между показателями RAT–SOM, RAT–VIS и RAT–VEST SOT. Медиана и первый квартиль RAT–VIS были выше у женщин 65-69 лет. Первые квартили RAT–VEST были одинаковыми (68%). У работающих женщин 65-69 лет не происходит изменений коэффициентов участия соматосенсорной, зрительной и вестибулярной информации в контроле над балансом, что можно рассматривать как предиктор, оказывающий положительное влияние на способность к трудовой (волонтерской, общественно-политической, воспитательной) деятельности, особенно после 64 лет [1, 3]. Значения RAT–SOM от 98 % и выше, RAT–VEST – от 68% и выше можно рассматривать как пределы «оптимального» сенсорного обеспечения постурального баланса при характеристике работающих женщин 60-69 лет. Ранее нами уже отмечалось, что в общей когорте обследованных женщин (включая как работающих, так и не работающих) после 64 лет наблюдается снижение показателей RAT–VIS и RAT–VEST SOT [9].

Установлена важность вклада зрительной информации в постуральном балансе у работающих женщин 65-69 лет. При этом значение RAT–VIS в 93% можно рассматривать как у них предел «оптимального» зрительного обеспечения постурального баланса. Возможно, что именно дефи-

цит соматосенсорной и зрительной информации в постуральном контроле у пожилых женщин является первостепенным фактором, оказывающим влияние на желание прекратить работать в своей профессии.

Сравнение RAT–PREF SOT также не выявило различий, хотя все квартили данного коэффициента были выше в группе 60-64 года. У работающих 65-69-летних женщин не наблюдалось снижения способности ЦНС быстро и качественно истолковывать визуально-пространственную информацию для поддержания статического и статодинамического баланса. Ранее уже отмечалось снижение RAT–PREF в общей когорте обследованных женщин (включая как работающих, так и не работающих) после 64 лет [9]. В то же время, у работающих женщин 65-69 лет сохраняется эффективность процесса сенсорной интеграции для поддержания постурального баланса и чувства пространственной ориентации. Возможно, именно замедление процесса сенсорной интеграции у шестидесятилетних женщин будет являться определяющим фактором в прогнозировании трудовой деятельности и оценке преждевременных изменений центральных интеграционных процессов нервной системы.

С целью контроля постуральных изменений и снижения травматизма у работающих пожилых женщин нами были рассчитаны нормативные значения параметров «нормального» баланса по данным SOT [10, 11]. Они были рассчитаны как для средних значений (ES-1–6_m; PST-1–6_m), включая коэффициенты сенсорного анализа, что будет полезно для сравнительной оценки в научных публикациях и докладах. Так и для значения каждой функциональной пробы ($ES_{1,2,3}$ COND 1–6), что повысит результативность проведения постурографического обследования. Кроме того, такой подход необходим для точности сравнительного унифицированного анализа получаемых данных (табл. 2). Значения SOT ниже нормативных будут указывать на снижение параметров поддержания баланса необходимого для успешного продолжения трудовой деятельности у женщин данной возрастной категории, а также уменьшать вероятность продолжения трудовой деятельности. Разработанные нормативы позволят снизить уровень травматизма на рабочих местах, а также их важно учитывать в случае, если предъявляются высокие требования к функции равновесия пожилых работников.

Анализ рассчитанных нормативных параметров SOT показал, что предельные значения ES-1, ES-2, ES-2_m, ES-3, ES-3_m, ES-4, ES-4_m, ES-5, ES-6, ES-6_m, а также COMP–ES были выше в возрастной группе 65-69 лет. Значения показателей PST, за исключением PST–6_m, были выше в возрастной группе 65-69 лет. RAT–SOM и RAT–VIS, они были также выше во второй возрастной группе женщин. Становится очевидным, что продолжение трудовой деятельности женщин 65-69 лет находит отражение в высоких показателях SOT. Следовательно, показатели данного теста у пожилых женщин отражают степень их продуктивной деятельности и старения.

Первые квартили ES-2_m и ES-3_m у работающих 60-летних женщин были выше, чем у здоровых тренированных женщин в возрасте 18-35 лет [14]. Принято считать, что у здоровых тренированных молодых людей показатель ES-4_m в норме имеет значения от 75% и выше, а показатели ES-5_m и ES-6_m – от 50% и выше [11, 15-17]. Исследования ряда авторов, включая наши исследования, показывают, что для большинства физически подготовленных здоровых лиц трудоспособного возраста значение COMP–ES находится в пределах 80-82% и выше [11, 14, 15, 17, 18]. У женщин 60-69 лет, работающих в своей профессии, показатели ES COND 1-6 и COMP–ES SOT находятся на уровне здоровых физически подготовленных лиц трудоспособного возраста. Следовательно, ощущения своего хорошего баланса, находящегося, по данным SOT, на уровне молодых лиц мотивирует пожилых женщин продолжать трудовую (волонтерскую, общественно-политическую, воспитательную) деятельность.

Таблица 2

Пределы «нормального» баланса по показателям SOT для работающих женщин 60-69 лет, %

Table 2

SOT scores for “normal” equilibrium range in female workers aged 60-69, %

Показатели SOT	60-64 года	65-69 лет
Equilibrium Score (ES)		
ES-1	92	93
ES-1_m	93	93
ES-2	89	91
ES-2_m	89	92
ES-3	85	88
ES-3_m	85	89
ES-4	76	79
ES-4_m	79	82
ES-5	54	57
ES-5_m	58	58
ES-6	51	54
ES-6_m	56	57
COMP–ES	76	77
Postural Strategy Score (PSS)		
PSS-1_m	97	98
PSS-2_m	95	98
PSS-3_m	94	96
PSS-4_m	82	87
PSS-5_m	66	69
PST-6_m	69	66
COMP–PSS	86	87
Sensory analysis		
RAT–SOM	94	96
RAT–VIS	82	86
RAT–VEST	61	61
RAT–PREF	93*	93**

Примечание: * Возможно, значение RAT–PREF, равное 109%, также следует рассматривать как верхний предел «нормального» баланса для работающих женщин в возрасте 60-64 года. ** Возможно, значение RAT–PREF, равное 106%, также следует рассматривать как верхний предел «нормального» баланса для работающих женщин в возрасте 65–69 лет.

Note: * RAT–PREF 109 % could also be considered as the ceiling figure for the “normal” equilibrium range in women workers aged 60-64. ** RAT–PREF 106 % could also be considered as the ceiling figure for the “normal” equilibrium range in women workers aged 65-69.

Первые квартили PSS-2_m, PSS-3_m и PSS-4_m у обследованных пожилых женщин были выше, чем у здоровых тренированных молодых женщин [14]. Данные показатели можно учитывать при прогнозировании трудовой деятельности женщин предпенсионного и пенсионного возраста. Всё вышесказанное может свидетельствовать об отсутствии возрастных различий, а также преждевременных изменений, в механизмах регулирования позы при статических и статодинамических задачах у работающих женщин 60-69 лет, которые также будут влиять на их стремление продолжать трудовую (волонтерскую, общественно-политическую) деятельность.

Поскольку известно, что параметры поддержания динамического равновесия, по сравнению с лицами трудоспособного возраста, начинают достоверно изменятся именно в 60-летнем возрасте, и особенно после 64 лет [3, 19], то можно говорить, что снижение показателей поддержания статического и статодинамического равновесия у пожилых женщин, особенно ниже нормативных, является предиктором риска для

успешной продуктивной деятельности и старения.

На основании анализа показателей PSS SOT можно сделать вывод об отсутствии возрастных изменений в скорости колебания ЦТ у работающих женщин 65–69 лет, что можно рассматривать как предиктор, оказывающий благоприятное влияние на продолжение их трудовой деятельности. Увеличение постуральных колебаний при поддержании статического и особенно статодинамического баланса будет снижать вероятность продолжения трудовой деятельности у женщин 65-69 лет.

Отсутствие значимых различий PSS в COND 1–6 у обследованных женщин указывает на хорошую способность голеностопных суставов в балансировке ЦТ, а также подтверждает несущественные возрастные изменения в функциях опорно-двигательного аппарата после 64 лет [20]. Преждевременные изменения в результативности голеностопных суставов, особенно гибкости и силы, даже у физически подготовленных лиц трудоспособного возраста будет повышать у них риск травматизма [21]. Вероятный риск получения производственных травм у обследованных женщин 60-69 лет, связанный с изменениями их постурального баланса, будет на том же уровне, что и у лиц трудоспособного возраста. По-видимому, показатели SOT могут отображать риски производственного травматизма.

Анализ данных по ES и PSS позволяет сделать вывод, что у работающих женщин не наблюдается изменений в их автоматическом постуральном контроле [8, 10, 11, 14, 19], что также будет оказывать положительное влияние на стремление работать в своей профессии, особенно после 64 лет. В то же время само по себе старение постуральной системы вызывает переход от «автоматического» к более «корковому» контролю вертикальной позы и передвижения. У пожилых людей наблюдается повышенное и активное участие корковых областей (особенно в префронтальной коре) в поддержании различных видом баланса по сравнению с молодыми людьми. Это увеличение коркового взаимодействия означает, что у пожилых людей постуральная система требует большего внимания, чем у молодых лиц [22]. Следовательно, именно снижение автоматического контроля вертикальной позы будет уменьшать вероятность продолжения работать в своей профессии на пенсии, а также свидетельствовать о старении постуральной системы управления. Этот факт открывает новые горизонты для прогнозирования продолжительности трудовой (волонтерской, общественно-политической) деятельности у людей в пожилом возрасте.

На основании анализа RAT–SOM, RAT–VIS и RAT–VEST SOT можно констатировать, что сенсорный вклад в постуральное равновесие остается стабильным, как и у лиц трудоспособного возраста. У работающих женщин 60-69 лет сохраняется способность соматосенсорной, зрительной и вестибулярной систем к избыточному функционированию [19]. Все это также можно рассматривать как фактор, влияющий на способность к трудовой деятельности, особенно в возрасте 65-69 лет. Можно предположить, что снижение двух сенсорных входов в обеспечении постурального равновесия у женщин 65-69 лет приведет к прекращению их трудовой деятельности. У большинства физически подготовленных здоровых молодых лиц значение RAT–SOM – от 97% и выше, RAT–VIS – от 88% и выше, а RAT–VEST – от 69% и выше [8, 10, 11, 14]. У большинства обследованных 60-летних женщин показатели степени участия RAT–VIS были выше, чем у физически подготовленных здоровых лиц трудоспособного возраста. Но после 64 лет может наблюдаться значительное снижение данного сенсорного коэффициента. Как известно, любые изменения в зрительном восприятии являются частой причиной прекращения трудовой деятельности у людей старше 66 лет [3, 9, 12]. Коэффициент RAT–VIS возможно также связан с параметрами биологического старения. Очевидно, что зрительное обеспечение постурального баланса становиться важной составляющей в определении и прогнозировании трудовой

деятельности у женщин 65 лет и старше. Хорошее функционирование соматосенсорной информации в постуральном балансе также определяет эффективность контроля и энергозатраты необходимые пациенту для удержания ЦТ в пределах базы опоры, особенно при быстрых возмущениях [10, 19, 23]. Способность адаптации к быстрым постуральным возмущениям при статических, статодинамических и динамических задачах, становится одним из важных условий продуктивной деятельности по мере увеличения КВ [23].

Изменение анатомо-функциональных особенностей мозжечка было связано с ослаблением сенсорной интеграции у людей предпенсионного возраста [19]. Следовательно, любые изменения в этом отделе головного мозга будут снижать вероятность продолжения трудовой деятельности у женщин 65-69 лет. Хорошая (не подверженная преждевременным изменениям) сенсорная интеграция, а также высокое (на уровне лиц трудоспособного возраста) мультисенсорное обеспечение постурального баланса является необходимым условием продолжения трудовой (волонтерской, общественно-политической) деятельности у женщин после 64 лет.

У людей в пожилом возрасте снижение самооценки своего здоровья и стрессоустойчивости, включая снижение физической работоспособности, часто сопровождается прекращением трудовой деятельности [2-4, 23]. При этом продолжение трудовой деятельности на пенсии в возрасте старше 66 лет также связано с хорошим психическим здоровьем [3]. Значения показателей COMP–ES выше 79%, COMP–PSS – выше 88%, RAT–SOM – выше 97%, а также RAT–VEST – выше 68% у женщин 60-69 лет могут указывать на высокий уровень их физической работоспособности, на хорошую самооценку физического и психологического здоровья, а также стрессоустойчивость. Продолжение трудовой (волонтерской, общественно-политической) деятельности также связано с физическим и психологическим благополучием [24], что также отражают показатели SOT [1, 8, 9]. Таким образом, у женщин в пожилом возрасте удовлетворенность своим постуральным балансом будет определять их уверенность и желание к продолжению успешной трудовой деятельности.

Показатели SOT у пожилых людей могут быть связаны и с эффективностью их профессиональной деятельности [10, 25]. Трудовая деятельность у пожилых женщин в первую очередь определяется их способностью выполнять свою работу не хуже, чем более молодые работники [3]. Согласно данным SOT, высокие значения эффективности поддержания статического и статодинамического баланса, а также сенсорной обеспечения постурального контроля, особенно на уровне лиц трудоспособного возраста, у работающих шестидесятилетних женщин также связаны с сохранением у них способности к эффективной работе. Постуральные механизмы поддержания статического и статодинамического равновесия оказываю существенное влияние на социальное и продуктивное старение пожилых людей, определяя также их поведенческое реагирование в социуме [19]. Способность адаптироваться к современным реалиям жизни становится важным условием, определяющим возможность продолжать работу после выхода на пенсию. Неуверенность в своем статическом и статодинамическом балансе у пожилых людей будет снижать производительность их труда.

Частые случаи прекращения трудовой деятельности у людей после 64 лет, связаны со снижением их когнитивных функций [26], а, как известно, эти изменения у людей в пожилом возрасте связаны со способностью постуральной системы быстро адаптироваться в сложных условиях окружающей среды. Кроме того, когнитивные изменения у пожилых людей также связаны с эффективностью их автоматического постурального контроля [19, 27]. В связи с этим можно говорить о том, что у работающих женщин 65-69 лет не наблюдаются преждевременные или возрастные когнитивные изменения.

Продолжение трудовой деятельности у людей после 59 и 64 лет определяется, с

одной стороны, стремлением сохранить финансовое благополучие, с другой, связано со стремлением сохранить свой социальный и профессиональный статус [3, 26, 28]. Известно, что у пожилых людей любые мультисенсорные изменения приводят к снижению их социальной активности и негативно сказываются на профессиональной деятельности [3, 19]. Следовательно, у пожилых женщин стремление сохранить свой социальный и профессиональный статус может определяться результирующей оценкой эффективности функции равновесия всего SOT на уровне 80% и выше, а также высокими коэффициентами соматосенсорной (98% и выше) и зрительной (от 92% в выше) информации в контроле над балансом. Уменьшение двух сенсорных коэффициентов (особенно соматосенсорной и зрительной) в сенсорном обеспечении баланса у пожилых людей будут влиять на производительность их труда. Хороший постуральный баланс становиться необходимым условием для здоровья, благополучия и производительности труда пожилых работников. Поскольку вестибулярная информация передается во многие отделы мозга, которые выполняют ряд важных поведенческих функций (поддержание статического, статодинамического и динамического баланса, двусторонняя координация, поддержание стабильного поля зрения и пространственного положения, восприятие окружения для эффективной навигации тела в пространстве и др.) [19], то можно предположить, что функционирование вестибулярной системы оказывает влияние на способность и желание пожилых женщин продолжать свою трудовую деятельность, сохранять свой социальный и профессиональный статус. Колебательные движения ЦТ у человека, помимо психоэмоционального состояния [11, 13, 14], отражают его мотивацию и поведенческие реакции. Следовательно, сохранение хорошей балансировки и управлением ЦТ у пожилых женщин также находит отражение на физической выносливости и эмоциональной устойчивости, которые по результатам как наших, так и других исследований находятся на уровне лиц трудоспособного уровня. Колебательные движения ЦТ у женщин 60-69 лет отражают их физическое и психическое старение. Все это возвращает нас к рассмотрению колебательных движений ЦТ человека как психического действия, которое, по сути, являться отражением его психического состояния и эмоционально-поведенческого реагирования. Уже сегодня становится очевидной, важность использования компьютерной постурографии (стабилометрии) посредством биологической обратной связи не только при физической, но и психологической реабилитации [8]. В настоящее время нами апробируется методика оценки психического состояния и эмоционально-поведенческого реагирования по постуральным колебаниям. Можно говорить о формировании нового инструментального метода психологической диагностики и консультирования с использованием комплекса динамической постурографии «Smart Equitest Balance Manager». Необходима разработка, создание и активное внедрение подобного отечественного постурографического комплекса. Колебательные движения ЦТ имеют огромнейший исследовательский потенциал для современной медицины, физиологии, психофизиологии и психологии, их анализ и расшифровка позволят обозначить новые направления научных исследований, и не только в оценке функции равновесия человека.

Полученные результаты исследования будут полезны в контексте формирования государственной политики по увеличению участия пожилых людей в трудовой деятельности, включая разработку нормативно-правовых актов об устранении дискриминации по возрасту, по охране труда и безопасной рабочей среды, а также для создания государственной программы поддержки занятости лиц в пожилом возрасте.

Выводы

1. У работающих женщин после 64 лет не наблюдается возрастных изменений в эффективности поддержания и результа-

тивности статического и статодинамического равновесия, адаптационных, физиологических и нейрофизиологических механизмов постурального контроля.

2. В проведенном исследовании у женщин после 64 лет не наблюдается увеличения колебаний центра тяжести при поддержании статического и особенно статодинамического баланса, а также повышения энергозатрат, связанных с предотвращением дисбаланса и удержанием центра тяжести в пределах опорной базы. Сохранение хорошей балансировки центра тяжести и способность быстро противодействовать дисбалансу при статических и статодинамических задачах у пожилых женщин являются важными факторами эффективной и безопасной работы, сохранения и поддержания своего социального и профессионального статуса. Кроме этого хорошая балансировка и управлением ЦТ у пожилых женщин также находит отражение на физической выносливости и эмоциональной устойчивости, которые по результатам как наших, так и других исследований находятся на уровне лиц трудоспособного уровня.

3. Отсутствие любых изменений в автоматическом постуральном контроле у шестидесятилетних женщин можно рассматривать как важный предиктор, влияющий на удовлетворенность своим статическим и статодинамическим балансом, а также уверенность и желание продолжать безопасную трудовую деятельность, сохраняя финансовое благополучие на пенсии.

4. У работающих женщин 65-69 лет не выявлено снижения степени участия соматосенсорной, зрительной и вестибулярной информации в контроле над балансом, включая изменения в сенсорной интеграции постурального контроля. Хорошая (не подверженная преждевременным изменениям) сенсорная интеграция, а также высокое (на уровне лиц трудоспособного возраста) мультисенсорное обеспечение постурального баланса у пожилых женщин будет определять стремление к продолжению успешной трудовой деятельности, сохранению социального и профессионального статуса.

Информация о финансировании
Финансирование данной работы не проводилось.
Financial support
No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interests
The authors have no conflict of interest to declare.

Список литературы

1. Гудков АБ, Чащин ВП, Демин АВ, и др. Оценка качества жизни и постурального баланса у женщин старших возрастных групп, продолжающих работу в своей профессии. Медицина труда и промышленная экология. 2019;(8):473-478. DOI: https://doi.org/10.31089/1026-9428-2019-59-8-473-478
2. Silva TA, Mansine DP, Santos IN, et al. Analysis of quality of life, sociodemographic variables and self-reported diseases among working older adults. Revista Brasileira de Medicina do Trabalho. 2019;17(2):154-159. DOI: https://doi.org/10.5327/Z1679443520190349
3. Baltes BB, Rudolph CW, Zacher H. Work across the lifespan (1st Edition). San Diego: Elsevier Academic Press; 2019.
4. Dantas RG, Perracini MR, Guerra RO, et al. What are the sociodemographic and health determinants for older adults continue to participate in work? Archives of Gerontology and Geriatrics. 2017;71:136-141. DOI: https://doi.org/10.1016/j.archger.2017.04.005
5. Bryant EC, Trew ME, Bruce AM, et al. Gender differences in balance performance at the time of retirement. Clinical Biomechanics. 2005;20(3):330-335. DOI: https://doi.org/10.1016/j.clinbiomech.2004.11.006
6. Palmer KT, Goodson N. Ageing, musculoskeletal health and work. Best Practice and Research in Clinical Rheumatology. 2015;29(3):391-404. DOI: https://doi.org/10.1016/j.berh.2015.03.004
7. Nakamura K, Kitamura K, Oshiki R, et al. Prolonged occupational activity and 6-year changes in postural sway in elderly women. Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions. 2015;15(1):78-82.

8. Гудков АБ, Дёмин АВ, Попова ОН, и др. Характеристика постурального баланса у женщин, переживших пожар в пожилом возрасте. Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. 2018;(4):68-75. DOI: https://doi.org/10.25016/2541-7487-2018-0-4-68-75

9. Дёмин АВ, Гудков АБ, Долгобородова АА, и др. Возрастная характеристика постурального баланса у женщин 60-69 лет. Журнал медико-биологических исследований. 2018;6(4):332-339. DOI: https://doi.org/10.17238/issn2542-1298.2018.6.4.332

10. NeuroCom International. Balance Manager Systems. Clinical Operations Guide. NeuroCom International, Inc., a division of Natus: Clackamas (OR); 2011.

11. ER Pletcher, VJ Williams, Abt JP, et al. Normative Data for the NeuroCom Sensory Organization Test in US Military Special Operations Forces. Journal of Athletic Training. 2017;52(2):129-136. DOI: https://doi.org/10.4085/1062-6050-52.1.05

12. Ford-Smith CD, Wyman JF, Elswick Jr RK, et al. Test-retest reliability of the sensory organization test in noninstitutionalized older adults. Archives of Physical Medicine and Rehabilitation. 1995;76(1):77-81. DOI: https://doi.org/10.1016/S0003-9993(95)80047-6

13. Wrisley DM, Stephens MJ, Mosley S, et al. Learning Effects of Repetitive Administrations of the Sensory Organization Test in Healthy Young Adults. Archives of Physical Medicine and Rehabilitation. 2007;88(8):1049-1054. DOI: https://doi.org/10.1016/j.apmr.2007.05.003

14. Гудков АБ, Дёмин АВ, Долгобородова АА, и др. Характеристика постурального контроля у флорболисток национальной сборной России в соревновательном периоде. Теория и практика физической культуры. 2017;2:23-26.

15. Colburn D, Russo L, Burkard R, et al. Firefighter protective clothing and self-contained breathing apparatus does not alter balance testing using a standard sensory organization test or motor control test in healthy, rested individuals. Applied Ergonomics. 2019;80:187-192. DOI: https://doi.org/10.1016/j.apergo.2019.05.010

16. Dickin DC, Clark S. Generalizability of the Sensory Organization Test in College-Aged Males: Obtaining a Reliable Performance Measure. Clinical Journal of Sport Medicine. 2007;17(2):109-15. DOI: https://doi.org/10.1097/JSM.0b013e31803bf647

17. Haran FJ, Slaboda JC, King LA, et al. Sensitivity of the Balance Error Scoring System and the Sensory Organization Test in the Combat Environment. Journal of Neurotrauma. 2016;33(7):705-11. DOI: https://doi.org/10.1089/neu.2015.4060

18. Row J, Chan L, Damiano D, et al. Balance Assessment in Traumatic Brain Injury: A Comparison of the Sensory Organization and Limits of Stability Tests. Journal of Neurotrauma. 2019;36(16):2435-2442. DOI: https://doi.org/10.1089/neu.2018.5755

19. Lord SR, Sherrington C. Falls in Older People: Risk Factors, Strategies for Prevention and Implications for Practice, 3rd Edition. Cambridge: Cambridge University Press; 2021.

20. Cohen H, Heaton LG, Congdon SL, et al. Changes in Sensory Organization Test Scores with Age. Age and Ageing. 1996;25(1):39-44. DOI: https://doi.org/10.1093/ageing/25.1.39

21. Keenan KA, Wohleber MF, Perlsweig KA, et al. Association of prospective lower extremity musculoskeletal injury and musculoskeletal, balance, and physiological characteristics in Special Operations Forces. Journal of Science and Medicine in Sport. 2017;20(4):S34-S39. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jsams.2017.09.002

22. Marusic U, Taube W, Morrison SA, et al. Aging effects on prefrontal cortex oxygenation in a posture-cognition dual-task: an fNIRS pilot study. European Review of Aging and Physical Activity. 2019;2:16. DOI: https://doi.org/10.1186/s11556-018-0209-7

23. DiDomenico A, McGorry RW, Huang YH, et al. Perceptions of postural stability after transitioning to standing among construction workers. Safety Science. 2010;48(2):166-172. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ssci.2009.07.006

24. Di Gessa G, Corna L, Price D, et al. The decision to work after state pension age and how it affects quality of life: evidence from a 6-year English panel study. Age and Ageing. 2018;47(3):450-457. DOI: https://doi.org/10.1093/ageing/afx181

25. Gao KL, Hui-Chan CWY, Tsang WWN, et al. Golfers have better balance control and confidence than healthy controls. European Journal of Applied Physiology. 2011;111(11):2805-2812. DOI: https://doi.org/10.1007/s00421-011-1910-7

26. Fisher GG, Chaffee DS, Tetrick LE, et al. Cognitive functioning, aging, and work: A re-

view and recommendations for research and practice. Journal of Occupational Health Psychology. 2017;22(3):314-336. DOI: https://doi.org/10.1037/ocp0000086

27. Potvin-Desrochers A, Richer N, Lajoie Y. Cognitive tasks promote automatization of postural control in young and older adults. Gait and Posture. 2017;57:40-45. DOI: https://doi.org/10.1016/j.gaitpost.2017.05.019

28. Clarke P, Marshall VW, Weir D. Unexpected Retirement from Full Time Work after Age 62: Consequences for Life Satisfaction in older Americans. European Journal of Ageing. 2012;9(3):207-219. DOI: https://doi.org/10.1007/s10433-012-0229-5

References

1. Gudkov AB, Chashchin VP, Demin AV, et al. Assessment of quality of life and postural balance in women of older age groups who continue to work in their profession. Russian Journal of Occupational Health and Industrial Ecology. 2019;(8):473-478. Russian. DOI: https://doi.org/10.31089/1026-9428-2019-59-8-473-478

2. Silva TA, Mansine DP, Santos IN, et al. Analysis of quality of life, sociodemographic variables and self-reported diseases among working older adults. Revista Brasileira de Medicina do Trabalho. 2019;17(2):154-159. DOI: https://doi.org/10.5327/Z1679443520190349

3. Baltes BB, Rudolph CW, Zacher H. Work across the lifespan (1st Edition). San Diego: Elsevier Academic Press; 2019.

4. Dantas RG, Perracini MR, Guerra RO, et al. What are the sociodemographic and health determinants for older adults continue to participate in work? Archives of Gerontology and Geriatrics. 2017;71:136-141. DOI: https://doi.org/10.1016/j.archger.2017.04.005

5. Bryant EC, Trew ME, Bruce AM, et al. Gender differences in balance performance at the time of retirement. Clinical Biomechanics. 2005;20(3):330-335. DOI: https://doi.org/10.1016/j.clinbiomech.2004.11.006

6. Palmer KT, Goodson N. Ageing, musculoskeletal health and work. Best Practice and Research in Clinical Rheumatology. 2015;29(3):391-404. DOI: https://doi.org/10.1016/j.berh.2015.03.004

7. Nakamura K, Kitamura K, Oshiki R, et al. Prolonged occupational activity and 6-year changes in postural sway in elderly women. Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions. 2015;15(1):78-82.

8. Gudkov AB, Dyomin AV, Popova ON, et al. Characteristics of postural balance in older female fire victims. Medico-Biological and Socio-Psychological Problems of Safety in Emergency Situations. 2018;(4):68-75. Russian. DOI: https://doi.org/10.25016/2541-7487-2018-0-4-68-75

9. Demin AV, Gudkov AB, Dolgoborodova AA, et al. Age Characteristics of Postural Balance in Women Aged 60-69 Years. Journal of Medical and Biological Research. 2018;6(4):332-339. Russian. DOI: https://doi.org/10.17238/issn2542-1298.2018.6.4.332

10. NeuroCom International. Balance Manager Systems. Clinical Operations Guide. NeuroCom International, Inc., a division of Natus: Clackamas (OR); 2011.

11. ER Pletcher, VJ Williams, Abt JP, et al. Normative Data for the NeuroCom Sensory Organization Test in US Military Special Operations Forces. Journal of Athletic Training. 2017;52(2):129-136. DOI: https://doi.org/10.4085/1062-6050-52.1.05

12. Ford-Smith CD, Wyman JF, Elswick Jr RK, et al. Test-retest reliability of the sensory organization test in noninstitutionalized older adults. Archives of Physical Medicine and Rehabilitation. 1995;76(1):77-81. DOI: https://doi.org/10.1016/S0003-9993(95)80047-6

13. Wrisley DM, Stephens MJ, Mosley S, et al. Learning Effects of Repetitive Administrations of the Sensory Organization Test in Healthy Young Adults. Archives of Physical Medicine and Rehabilitation. 2007;88(8):1049-1054. DOI: https://doi.org/10.1016/j.apmr.2007.05.003

14. Gudkov AB, Demin AV, Dolgoborodova AA, et al. Russian women's national floorball team in regular season: postural control rating study. Theory and Practice of Physical Culture. 2017;(2):23-26. Russian.

15. Colburn D, Russo L, Burkard R, et al. Firefighter protective clothing and self-contained breathing apparatus does not alter balance testing using a standard sensory organization test or motor control test in healthy, rested individuals. Applied Ergonomics. 2019;80:187-192. DOI: https://doi.org/10.1016/j.apergo.2019.05.010

16. Dickin DC, Clark S. Generalizability of the Sensory Organization Test in College-Aged Males: Obtaining a Reliable Performance Measure. Clinical Journal of Sport Medicine.

2007;17(2):109-15. DOI: https://doi.org/10.1097/JSM.0b013e31803bf647

17.Haran FJ, Slaboda JC, King LA, et al. Sensitivity of the Balance Error Scoring System and the Sensory Organization Test in the Combat Environment. Journal of Neurotrauma. 2016;33(7):705-11. DOI: https://doi.org/10.1089/neu.2015.4060

18.Row J, Chan L, Damiano D, et al. Balance Assessment in Traumatic Brain Injury: A Comparison of the Sensory Organization and Limits of Stability Tests. Journal of Neurotrauma. 2019;36(16):2435-2442. DOI: https://doi.org/10.1089/neu.2018.5755

19.Lord SR, Sherrington C. Falls in Older People: Risk Factors, Strategies for Prevention and Implications for Practice, 3rd Edition. Cambridge: Cambridge University Press; 2021.

20.Cohen H, Heaton LG, Congdon SL, et al. Changes in Sensory Organization Test Scores with Age. Age and Ageing. 1996;25(1):39-44. DOI: https://doi.org/10.1093/ageing/25.1.39

21.Keenan KA, Wohleber MF, Perlsweig KA, et al. Association of prospective lower extremity musculoskeletal injury and musculoskeletal, balance, and physiological characteristics in Special Operations Forces. Journal of Science and Medicine in Sport. 2017;20(4):S34-S39. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jsams.2017.09.002

22.Marusic U, Taube W, Morrison SA, et al. Aging effects on prefrontal cortex oxygenation in a posture-cognition dual-task: an fNIRS pilot study. European Review of Aging and Physical Activity. 2019;2:16. DOI: https://doi.org/10.1186/s11556-018-0209-7

23.DiDomenico A, McGorry RW, Huang YH, et al. Perceptions of postural stability after transitioning to standing among construction workers. Safety Science. 2010;48(2):166-172. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ssci.2009.07.006

24.Di Gessa G, Corna L, Price D, et al. The decision to work after state pension age and how it affects quality of life: evidence from a 6-year English panel study. Age and Ageing. 2018;47(3):450-457. DOI: https://doi.org/10.1093/ageing/afx181

25.Gao KL, Hui-Chan CWY, Tsang WWN, et al. Golfers have better balance control and confidence than healthy controls. European Journal of Applied Physiology. 2011;111(11):2805-2812. DOI: https://doi.org/10.1007/s00421-011-1910-7

26.Fisher GG, Chaffee DS, Tetrick LE, et al. Cognitive functioning, aging, and work: A review and recommendations for research and practice. Journal of Occupational Health Psychology. 2017;22(3):314-336. DOI: https://doi.org/10.1037/ocp0000086

27.Potvin-Desrochers A, Richer N, Lajoie Y. Cognitive tasks promote automatization of postural control in young and older adults. Gait and Posture. 2017;57:40-45. DOI: https://doi.org/10.1016/j.gaitpost.2017.05.019

28.Clarke P, Marshall VW, Weir D. Unexpected Retirement from Full Time Work after Age 62: Consequences for Life Satisfaction in older Americans. European Journal of Ageing. 2012;9(3):207-219. DOI: https://doi.org/10.1007/s10433-012-0229-5

Статья поступила в редакцию 19 июня 2021 г.
Поступила после доработки 27 января 2022 г.
Принята к печати 20 марта 2022 г.

Received 19 June 2021
Revised 27 January 2022
Accepted 20 March 2022

Информация об авторах

Александр Викторович Дёмин, кандидат биологических наук, доцент кафедры биологии человека и биотехнических систем ФГАОУ ВО «Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова», г. Архангельск, Российская Федерация, E-mail: adi81@yandex.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8161-5776.

Андрей Николаевич Ильницкий, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой терапии, гериатрии и антивозрастной медицины Академии постдипломного образования Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: a-ilnitski@yandex.by, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1090-4850.

Ксения Сергеевна Кореневич, аспирант по научной специальности 3.1.31 – Геронтология и гериатрия Академии постдипломного образования Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: karat.klinic@mail.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7284-2782.

Information about the authors
Alexander V. Dyomin, Cand. Sci. (Biology), Associate Professor at the Department of Human Biology and Biotechnical Systems, Northern (Arctic) Federal University, Arkhangelsk, Russia, E-mail: adi81@yandex.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8161-5776.
Andrei N. Ilnitski, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Head of the Department of Therapy, Geriatrics and Anti-Aging Medicine, Academy of Postgraduate Education, Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Medical Assistance and Medical Technologies, Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia, E-mail: a-ilnitski@yandex.by, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1090-4850.
Ksenia S. Korenevich, Post-graduate Student in Scientific Specialty 3.1.31 – Gerontology and Geriatrics, Academy of Postgraduate Education, Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Medical Assistance and Medical Technologies, Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia, E-mail: karat.klinic@mail.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7284-2782.

(cc) BY

DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-3-0-10 **УДК 616.45-001.1/.3:547.853.3:615.015**

Влияние нейропептидов семейства меланокортинов на уровень апоптотических и нейротрофических факторов в условиях «социального» стресса

А.Л. Ясенявская[1], А.А. Цибизова[1], Л.А. Андреева[2], Н.Ф. Мясоедов[2], О.А. Башкина[1], М.А. Самотруева[1]

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Астраханский государственный медицинский университет», ул. Бакинская, д. 121, г. Астрахань, 414000, Российская Федерация
[2] Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», пл. академика Курчатова, д. 2, г. Москва, 123182, Российская Федерация
Автор для переписки: А.Л. Ясенявская (yasen_9@mail.ru)

Резюме

Актуальность: В настоящее время особый интерес представляют научные работы, отражающие результаты изучения патологического влияния стрессогенных факторов, в том числе и «социального» стресса, на различные системы организма. Доказано, что длительное воздействие стресса способствует формированию различных видов расстройств, что в конечном итоге, приводит к развитию нарушений молекулярно-клеточных механизмов запрограммированной гибели клеток. В связи с чем, в настоящее время пристальное внимание уделяется оценке роли апоптотических и нейротрофических факторов в реализации стрессовой реакции. **Цель исследования:** Изучить влияние меланокортиновых нейропептидных соединений на уровень апоптотических (каспаза-3, каспаза-8, TNF-α) и нейротрофических (BDNF, NGF) факторов в сыворотке крови белых крыс в условиях «социального» стресса. **Материалы и методы:** Экспериментальные исследования проводили на 70 нелинейных белых крысах-самцах 6-месячного возраста. В процессе моделирования «социального» стресса все крысы были разделены по типу поведения на «агрессоров» и «жертв». В исследовании формировались экспериментальные группы (n = 10): контрольные животные; животные, в течение 20 дней подвергавшиеся воздействию стресса; группы крыс, получавших внутрибрюшинно в дозе 100 мкг/кг/сут, начиная с 1-го дня воздействия стресс-фактора, курсом 20 дней нейропептидные соединения семейства меланокортинов АКТГ(4-7)-Pro-Gly-Pro (Семакс) и АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro. Влияние соединений на уровень апоптотических и нейротрофических факторов оценивали путем определения уровня каспазы-3, каспазы-8, фактора некроза опухоли, фактора роста нервов и нейротрофического фактора мозга в сыворотке крови белых крыс методом иммуноферментного анализа. **Результаты:** По результатам проведенного исследования было установлено, что в условиях «социального» стресса наблюдалось усиление апоптотических процессов, сопровождающихся увеличением уровня каспазы-3, каспазы-8, TNF-α в сыворотке крови белых крыс и снижением концентрации BDNF и NGF. Введение меланокортиновых

нейропептидов на фоне стресса способствовало восстановлению уровня исследуемых показателей, что, вероятнее всего, связано с наличием у меланокортинов антиапоптотического и нейропротекторного действия за счет ингибирования каспаза-зависимого каскада реакций апоптоза, а также индукции синтеза нейротрофических факторов, обладающих антиапоптотической активностью. **Заключение:** Таким образом, введение меланокортиновых нейропептидных соединений АКТГ(4-7)-Pro-Gly-Pro (Семакс) и АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro в условиях стрессогенного воздействия способствует восстановлению уровня каспаз и фактора некроза опухоли, а также нейротрофических факторов, в результате чего наблюдается антиапоптотический эффект за счет ингибирования каспаза-зависимого каскада реакций.
Ключевые слова: меланокортины; нейропептиды; «социальный» стресс; апоптоз; каспазы; фактор некроза опухоли; фактор роста нервов; нейротрофический фактор мозга; TNF-α; BDNF; NGF

Для цитирования: Ясенявская АЛ, Цибизова АА, Андреева ЛА, и др. Влияние нейропептидов семейства меланокортинов на уровень апоптотических и нейротрофических факторов в условиях «социального» стресса. Научные результаты биомедицинских исследований. 2022;8(3):398-411. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-3-0-10

Effect of melanocortin neuropeptides on the level of apoptotic and neurotrophic factors under «social» stress

Anna L. Yasenyavskaya[1], Alexandra A. Tsybizova[1], Lyudmila A. Andreeva[2], Nikolay F. Myasoedov[2], Olga A. Bashkina[1], Marina A. Samotrueva[1]

[1] Astrakhan State Medical University,
121 Bakinskaya St., Astrakhan, 414000, Russia
[2] National Research Centre "Kurchatov Institute"
2 Akademik Kurchatov Sq., Moscow, 123182, Russia
Corresponding author: Anna L. Yasenyavskaya (yasen_9@mail.ru)

Abstract

Background: Currently, scientific papers reflecting the results of studying the pathological influence of stress factors, including "social" stress, on various body systems are of particular interest. It has been proven that prolonged exposure to stress contributes to the formation of various types of disorders, which ultimately leads to the development of violations of the molecular and cellular mechanisms of programmed cell death. In this connection, close attention is currently being paid to assessing the role of apoptotic and neurotrophic factors in the implementation of a stress reaction. **The aim of the study:** To study the effect of melanocortin neuropeptide compounds on the level of apoptotic (caspase-3, caspase-8, TNF-α) and neurotrophic (BDNF, NGF) factors in the blood serum of white rats under conditions of "social" stress. **Materials and methods:** Experimental studies were carried out on 70 nonlinear white male rats 6 months of age. In the process of modeling "social" stress, all rats were divided by type of behavior into "aggressors" and "victims". Experimental groups (n = 10) were formed in the study: control animals; animals exposed to stress for 20 days; groups of rats treated intraperitoneally at a dose of 100 mcg/kg/day, starting from the 1st day of exposure to the stress

factor, with a course of 20 days, glyproline compounds ACTH(4-7)-Pro-Gly-Pro (Semax) and ACTH(6-9)-Pro-GLY-Pro. The effect of the compounds on the level of apoptotic and neurotrophic factors was assessed by determining the level of caspase-3, caspase-8, tumor necrosis factor, nerve growth factor and brain neurotrophic factor of white rat blood serum by enzyme immunoassay. **Results:** The study revealed that under conditions of "social" stress, an increase in apoptotic processes was observed, accompanied by an increase in the level of caspase-3, caspase-8, TNF-α in the blood serum of white rats and a decrease in the concentration of BDNF and NGF. The introduction of melanocortin neuropeptides against the background of stress contributed to the restoration of the level of the studied indicators, which is most likely due to the presence of antiapoptotic and neuroprotective effects in melanocortins due to inhibition of the caspase-dependent cascade of apoptosis reactions, as well as induction of the synthesis of neurotrophic factors with antiapoptotic activity. **Conclusion:** Thus, the introduction of melanocortin neuropeptide compounds ACTH(4-7)-Pro-GLY-Pro (SEMAX) and ACTH(6-9)-Pro-GLY-Pro under stress conditions contributes to the restoration of the level of caspases and tumor necrosis factor, as well as neurotrophic factors, resulting in an anti-apoptotic effect due to inhibition of the caspase-dependent cascade of reactions.
Keywords: melanocortins; neuropeptides; "social" stress; apoptosis; caspase; tumor necrosis factor, neurotrophic factors, TNF-α; BDNF; NGF

For citation: Yasenyavskaya AL, Tsybizova AA, Andreeva LA, et al. Effect of melanocortin neuropeptides on the level of apoptotic and neurotrophic factors under «social» stress. Research Results in Biomedicine. 2022;8(3):398-411. Russian. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-3-0-10

Введение. В настоящее время пристальное внимание уделяется научным исследованиям, отражающим влияние различных стрессовых факторов на организм человека [1, 2]. Установлено, что длительное стрессовое воздействие приводит к формированию неврологических, иммунных, эндокринных, метаболических и других видов расстройств, а также развитию нарушений молекулярно-клеточных механизмов апоптоза, в том числе нейроцитов [3, 4]. В связи с чем в настоящее время пристальное внимание уделяется оценке роли апоптотических и нейротрофических факторов в реализации стрессовой реакции.

Наиболее информативными показателями в оценке апоптотических процессов являются фактор некроза опухоли, инициаторные и эффекторные каспазы [5, 6]. Результаты многочисленных исследований показали, что фактор некроза опухоли способствует увеличению секреции воспалительных медиаторов, что относит данный цитокин к одному из самых значимых активаторов апоптоза [7, 8]. Установлено, что уровень TNF-α повышен у пациентов с психоневрологическими и нейродегенеративными заболеваниями, а также травматическими повреждениями головного мозга. Установлено, что в результате воздействия стрессогенных факторов наблюдается формирование комплекса TNF-α с рецепторами Fas с последующей активацией сигнальных молекул, который активирует инициирующую каспазу-8 и эффекторную каспазу-3, в результате чего развивается необратимое повреждению нейронов [9, 10, 11]. Установленный процесс инициации характерен также для развития апоптоза в лимфоидных и эндотелиальных клетках, что, в свою очередь, способствует развитию иммунной дисфункции, а также патологии различных систем организма [12, 13, 14].

При рассмотрении нейротрофиновой гипотезы развития различных патологических нарушений, в том числе апоптоза, таким нейротрофическим факторам, как фактор роста нервов и нейротрофический фактор мозга, обладающим выраженной нейроспецифичностью, отводится важное значение в проявлении нейропротекторного действия за счет реализации их способности к индукции синтеза антиапоптотических белков и ингибированию проапоптотических,

оказывая влияние тем самым на выживаемость и дифференцировку отдельных популяций нейронов [15, 16]. Доказано, что апоптоз напрямую зависит от баланса NGF и BDNF, которые активируя рецепторы тирозинкиназ, оказывают нейропротекторное действие. Установлено, что фактор роста нервов привлекает внимание ученых в качестве перспективного средства лечения различных психоневрологических заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и депрессия [17, 18]. Доказана способность фактора роста нервов к индукции высвобождения иммуноактивных нейропептидов и нейротрансмиттеров, а также к влиянию на врожденные и адаптивные иммунные реакции. Доказано также, что уровень сывороточного BDNF имеет отрицательную корреляционную связь со степенью выраженности тревожных расстройств и даже в ряде случаев определяет развитие нейродегенеративных процессов [19, 20].

Таким образом, апоптотические и нейротрофические факторы играют важную роль в реализации адаптационных механизмов к стрессовым воздействиям различного генеза и определяет перспективность рассмотрения его в качестве мишени для стресспротекторов.

В настоящее время особый интерес вызывают нейропептидные соединения, на основе которых синтезируется большое количество высокоэффективных и безопасных лекарственных препаратов, обладающих разносторонней фармакологической активностью, в том числе и стресспротекторной [21]. На сегодняшний день в ряду пептидных соединений в отдельную группу выделены регуляторные пептиды – меланокортины [22, 23], представителем которых является зарегистрированный препарат Семакс, синтезированный учеными Института молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт». В медицинской практике Семакс применяется с целью улучшения мнестических функций. Доказано, что наряду с нейротропной активностью, данный препарат оказывает иммунотропное, антиоксиданьное, противогипоксическое и др. виды действия [24]. Описанные свойства актуализируют необходимость детального изучения фармакологического действия нейропептидов семейства меланокортинов.

Цель исследования. Изучить влияние меланокортиновых нейропептидных соединений на уровень апоптотических (каспаза-3, каспаза-8, TNF-α) и нейротрофических (BDNF, NGF) факторов в сыворотке крови белых крыс в условиях «социального» стресса.

Материал и методы исследования. Исследование проводили на 70 белых крысах-самцах 6-месячного возраста. Содержание лабораторных животных отвечало требованиям международной нормативной документации [25] и протоколу Этического комитета ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России № 8 от 24 ноября 2015 г.

«Социальный» стресс моделировали путем обеспечения условий проживании крыс при наличии сенсорного контакта и отсутствии физического с последующим формированием агрессивного и субмиссивного типа поведения [26, 27, 28] при размещении животных попарно в клетках, разделенных прозрачной перегородкой. С целью наблюдения за межсамцовыми конфронтациями ежедневно на 10 мин снимали перегородку, по результатам чего были сформированы группы крыс «агрессоров» и «жертв». Агрессивность крыс оценивалась по наличию вертикальных и боковых стоек и атаки, а субмиссивность – по наличию неподвижности, обнюхивания, аутогруминга, вертикальных «защитных» стоек.

В исследовании формировались экспериментальные группы (n = 10): контрольные животные; животные, в течение 20 дней подвергавшиеся воздействию стресса; группы крыс, получавших внутрибрюшинно в дозе 100 мкг/кг/сут, начиная с 1-го дня воздействия стресс-фактора, курсом 20 дней меланокортиновые соединения АКТГ(4-7)-Pro-Gly-Pro (Семакс) и АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro

Выбор дозы нейропептидных соединений основан на предварительном изучении выраженности психомодулирующего

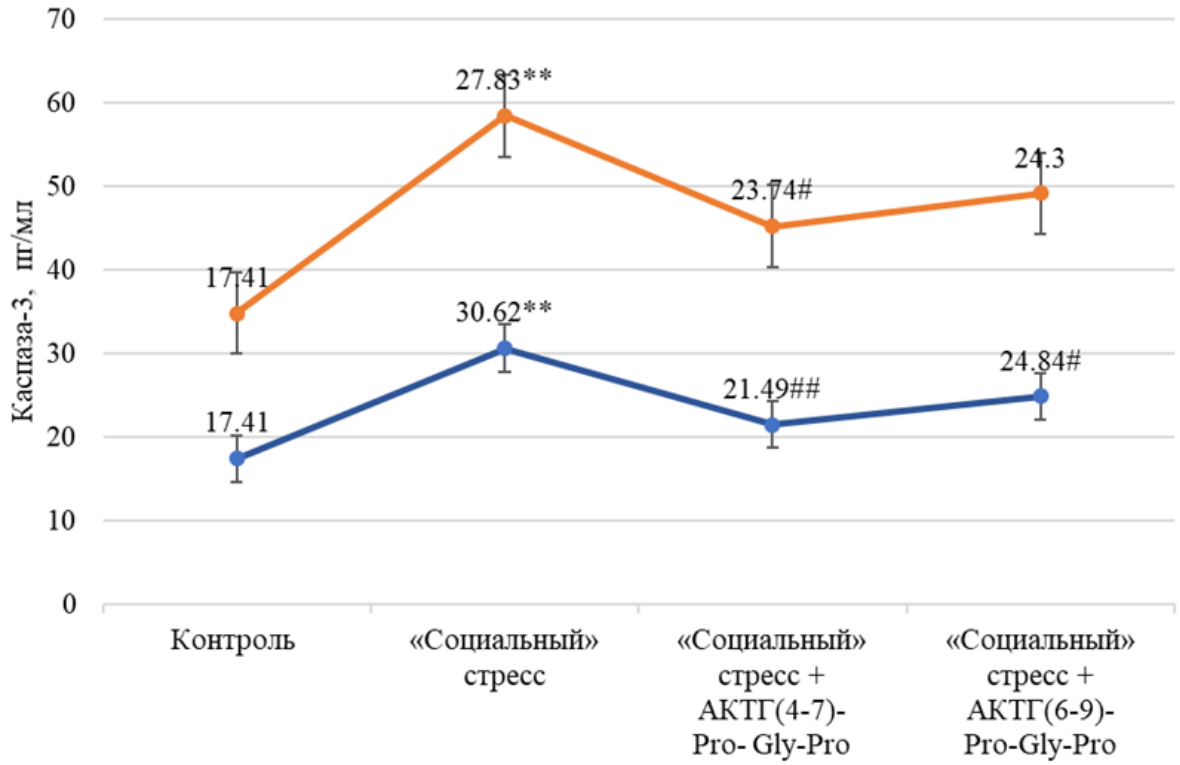
эффекта. Исследования проводили при введении исследуемых соединений в дозах 25, 50, 100 и 200 мкг/кг/сут. Было установлено, что наиболее активными дозами явились 100 и 200 мкг/кг/сут. В связи с чем, в качестве экспериментальной дозы в дальнейшем была выбрана наименьшая – 100 мкг/кг/сут.

Влияние нейропептидов на уровень каспазы-3, каспазы-8, TNF-α, BDNF, NGF в сыворотке крови белых крыс оценивали методом иммуноферментного анализа с использованием иммунологического анализатора «Multiscan FC» и применением высокочувствительных наборов ELISA Kit for Caspase-8 (США); ELISA Kit for Caspase-3 (США); ELISA Kit for Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-α) (США), ELISA Kit for Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) (США); ELISA Kit for Nerve Growth Factor (NGF) (США).

Нейропептидные соединения для исследования предоставлены Институтом молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета Excel и программного обеспечения BIOSTAT, с учетом критерия Манна-Уитни. Статистически значимыми различия считали при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Результаты, отражающие влияние меланокортинов на уровень каспаз-3 в сыворотке крови белых крыс в условиях «социального» стресса, представлены рисунке 1.



Примечание: ** – $p \leq 0,01$ – относительно контроля; #; ## – $p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$ – относительно группы «социальный» стресс.

Рис. 1. Уровень каспазы-3 в сыворотке крови белых крыс в условиях экспериментального «социального» стресса под влиянием нейропептидов меланокортиновой структуры

- животные с агрессивным типом поведения;
- животные с субмиссивным типом поведения.

Note: ** – $p \leq 0.01$ – relative to control; #; ## – $p \leq 0.05$; $p \leq 0.01$ – relative to the "social" stress group.

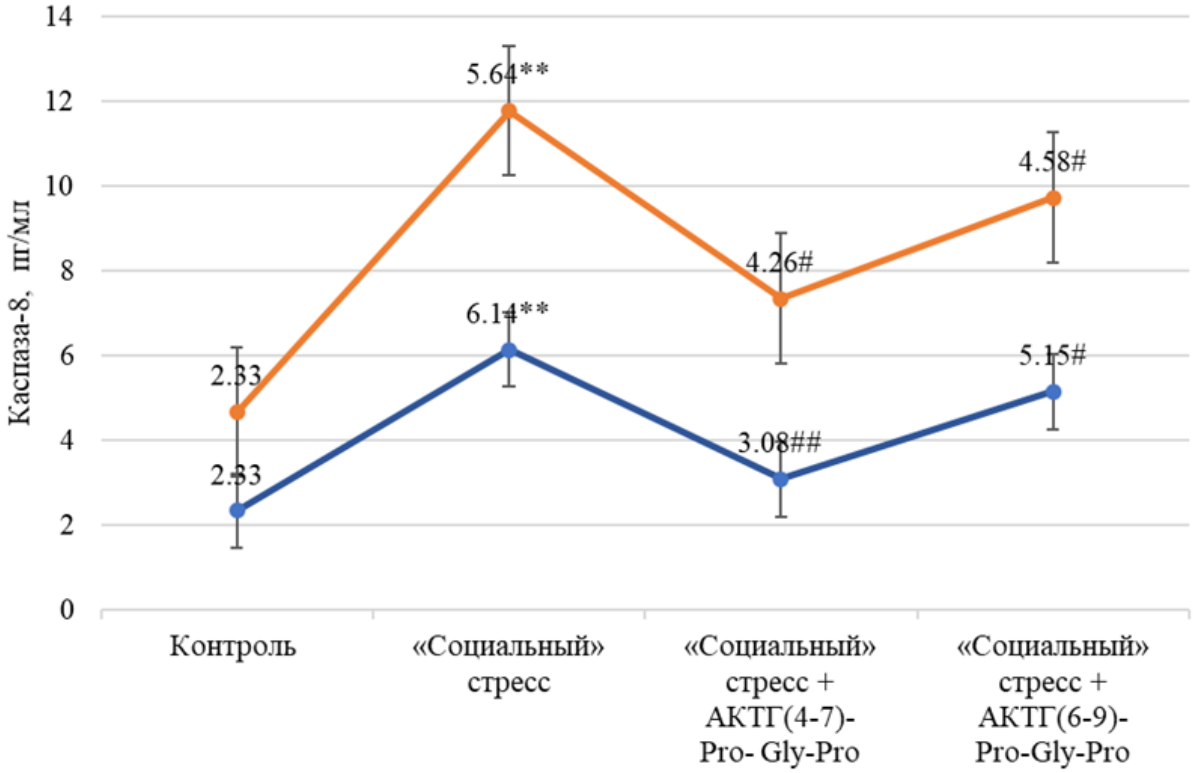
Fig. 1. The level of caspase-3 in the blood serum of white rats under conditions of experimental "social" stress under the influence of neuropeptides of the melanocortin structure

– animals with aggressive type of behavior;
– animals with a submissive type of behavior.

При формировании «социального» стресс у животных с агрессивным типом поведения уровень каспазы-3 увеличился практически на 76% (p≤0,01) по отношению к контролю. При введении меланокортиновых соединений было отмечено снижение уровня исследуемого показателя: при АКТГ(4-7)-Pro-Gly-Pro (Семакс) – на 30% (p≤0,01) и АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro – на 20% (p≤0,05) в сравнении с группой стресс.

В группе стрессированных животных с субмиссивным типом поведения уровень каспазы-3 увеличился на 60 % (p ≤ 0,01) по отношению к контрольной группе животных. При введении АКТГ(4-7)-Pro-Gly-Pro (Семакс) отмечалось снижение уровня показателя более чем на 15% (p≤0,05), АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro – на 12% (p≥0,05) по сравнению с группой «социального» стресса.

Результаты, отражающие влияние меланокортинов на уровень каспаз-8 в сыворотке крови белых крыс в условиях «социального» стресса, представлены рисунке 2.



Примечание: ** – p ≤ 0,01 – относительно контроля; #; ## – p ≤ 0,05; p ≤ 0,01 – относительно группы «социальный» стресс.

Рис. 2. Уровень каспазы-8 в сыворотке крови белых крыс в условиях экспериментального «социального» стресса под влиянием нейропептидов меланокортиновой структуры

- животные с агрессивным типом поведения;
- животные с субмиссивным типом поведения.

Note: ** – p ≤ 0.01 – relative to control; #; ## – p ≤ 0.05; p ≤ 0.01 – relative to the "social" stress group.

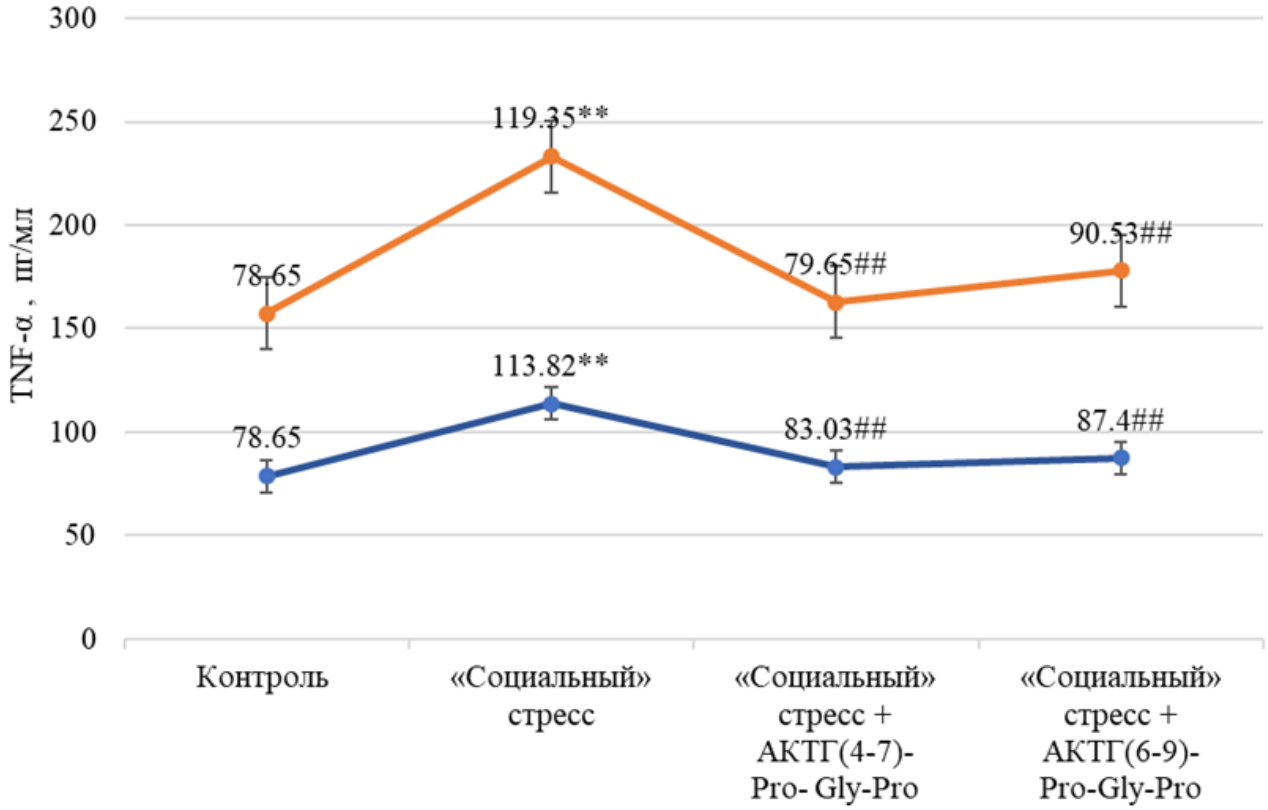
Fig. 2. The level of caspase-8 in the blood serum of white rats under experimental "social" stress under the influence of neuropeptides of melanocortin structure

- animals with aggressive type of behavior;
- animals with a submissive type of behavior.

Формирование «социального» стресса привело к увеличению уровня каспазы-8 в 2,6 раза (p≤0,01) в сравнении с контрольными крысами. Введение меланокортиновых соединений АКТГ(4-7)-Pro-Gly-Pro (Семакс) и АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro способствовало снижению данного показателя в 1,5 раза (p≤0,01), в 1,2 (p≤0,01) соответственно по отношению к группе стрессированных животных.

Уровень каспазы-8 в группе стрессированных животных с субмиссивным типом поведения увеличился в 2,4 раза (p≤0,01) по отношению к интактным животным. Введение меланокортиновых нейропептидных соединений АКТГ(4-7)-Pro-Gly-Pro (Семакс) и АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro способствовало снижению уровня изучаемого показателя на 24% (p≤0,05); на 19% (p≤0,01) соответственно по сравнению с группой «социального» стресса.

На рисунке 3 представлены результаты, отражающие влияние нейропептидов меланокортиновой структуры на уровень TNF-α в сыворотке крови белых крыс в условиях «социального» стресса.



Примечание: ** – p ≤ 0,01 – относительно контроля; ## – p ≤ 0,01 – относительно группы «социальный» стресс.

Рис. 3. Уровень TNF-α в сыворотке крови белых крыс в условиях экспериментального «социального» стресса под влиянием нейропептидов меланокортиновой структуры

- животные с агрессивным типом поведения;
- животные с субмиссивным типом поведения.

Note: ** – p ≤ 0.01 – relative to control; ## – p ≤ 0.01 – relative to the "social" stress group.

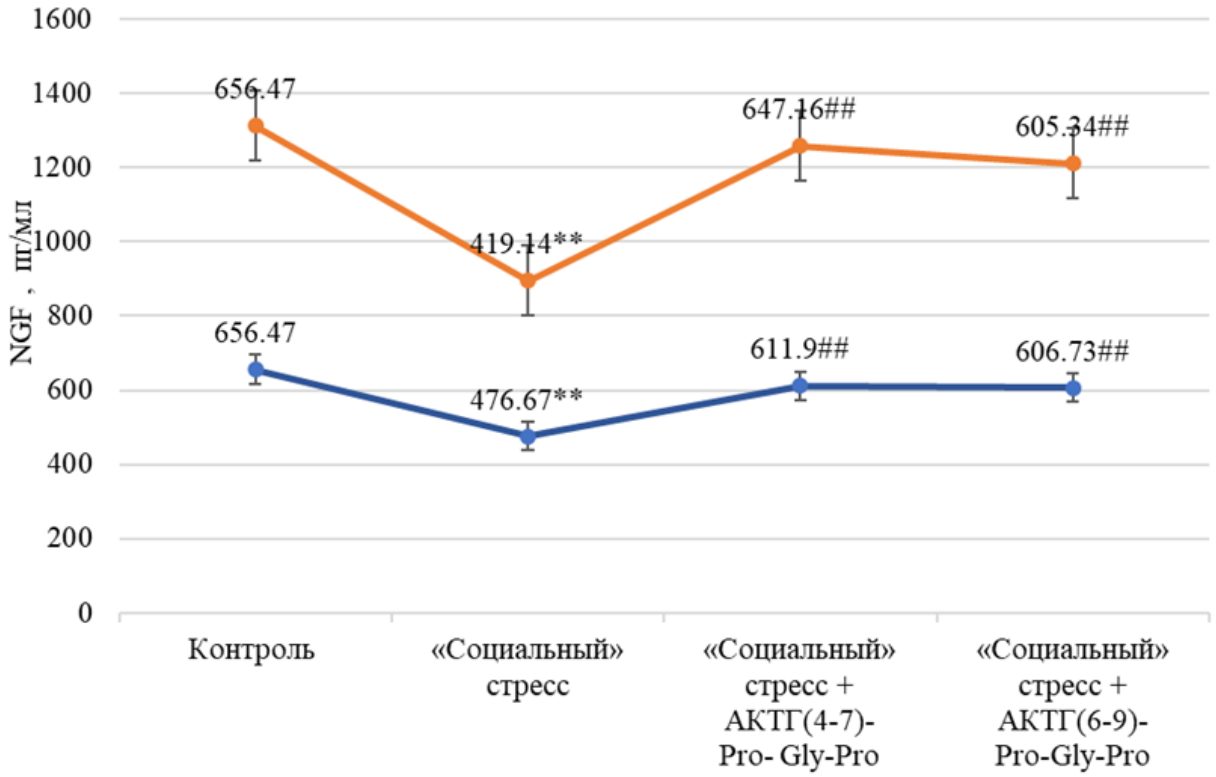
Fig. 3. TNF-α level in the blood serum of white rats under experimental "social" stress under the influence of melanocortin neuropeptides

- animals with aggressive type of behavior;
- animals with a submissive type of behavior.

Формирование «социального» стресса у животных с агрессивным типом поведения привело к увеличению уровня фактора некроза опухоли на 45% (p≤0,01) в сравнении с контрольной группой животных. На фоне введения меланокортиновых нейропептидов АКТГ(4-7)-Pro-Gly-Pro (Семакс) и АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro было отмечено снижение данного показателя на 27% (p≤0,01) и 23% (p≤0,01) соответственно по отношению к стрессированным животным.

В группе крыс с субмиссивным типом поведения при формировании стресса уровень TNF-α увеличился на 52% (p≤0,01) в сравнении с контролем. Соединения АКТГ(4-7)-Pro-Gly-Pro (Семакс) и АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro вызвали снижение данного показателя на 33% (p≤0,01) и 24% (p≤0,01) по отношению к группе «социального» стресса.

На рисунке 4 показаны результаты, отражающие влияние меланокортинов на уровень NGF в сыворотке крови белых крыс в условиях «социального» стресса.



Примечание: ** – p ≤ 0,01 – относительно контроля; ## – p ≤ 0,01 – относительно группы «социальный» стресс

Рис. 4. Уровень NGF в сыворотке крови белых крыс в условиях экспериментального «социального» стресса под влиянием нейропептидов меланокортиновой структуры

- животные с агрессивным типом поведения;
- животные с субмиссивным типом поведения.

Note: ** – p ≤ 0.01 – relative to control; ## – p ≤ 0.01 – relative to the "social" stress group

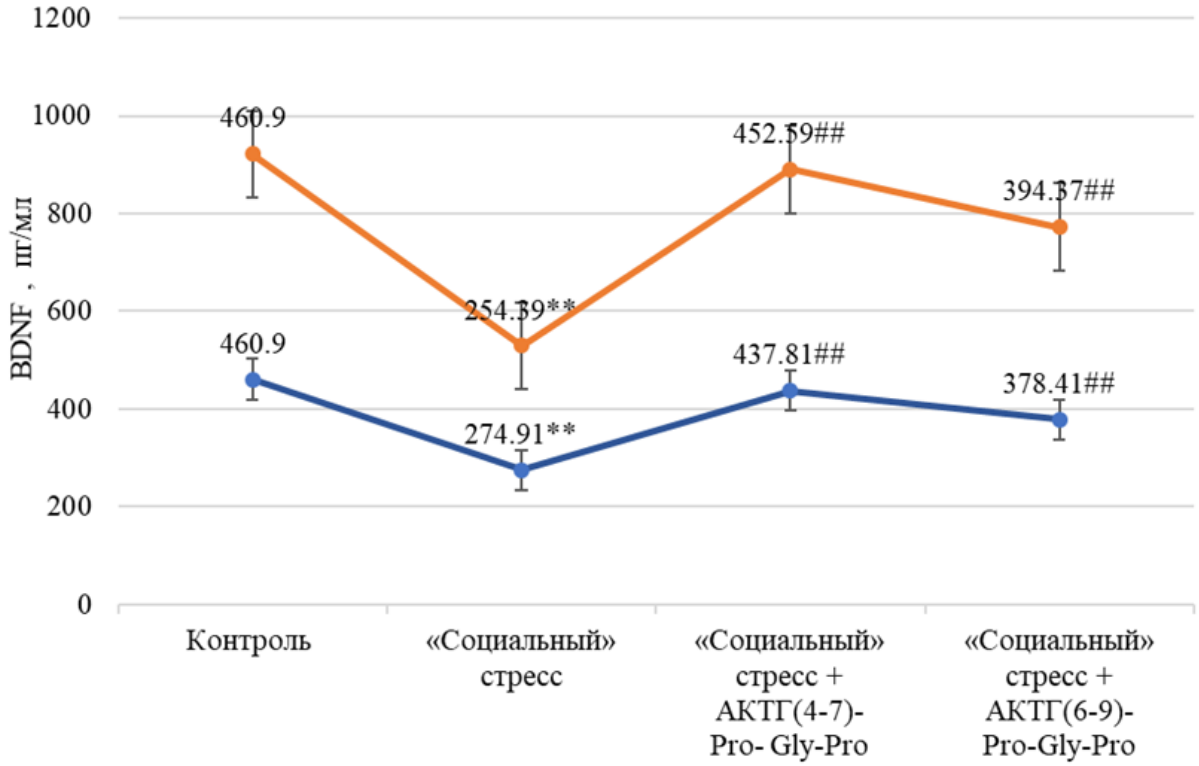
Fig. 4. NGF level in the blood serum of white rats under experimental "social" stress under the influence of melanocortin neuropeptides

- animals with aggressive type of behavior;
- animals with a submissive type of behavior.

В группе животных с «социальным» стрессом и агрессивным типом поведения наблюдалось снижение уровня NGF на 28% (p≤0,01) в сравнении с интактными животными. При введении меланокортинов АКТГ(4-7)-Pro-Gly-Pro (Семакс) и АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro было отмечено повышение уровня исследуемого фактора на 28% (p≤0,01) и 27% (p≤0,01) соответственно в сравнении с группой «социального» стресса.

Формирование «социального» стресса в группе животных с субмиссивным типом поведения привело к снижению уровня NGF на 36% (p≤0,01) в сравнении с контрольной группой. На фоне введения меланокортинов АКТГ(4-7)-Pro-Gly-Pro (Семакс) и АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro было отмечено повышение уровня фактора роста нервов на 55% (p≤0,01) и 44% (p≤0,01) соответственно по сравнению с группой «социальный» стресс.

На рисунке 5 представлены результаты, отражающие влияние меланокортинов на уровень нейротрофического фактора BDNF в сыворотке крови белых крыс в условиях «социального» стресса.



Примечание: ** – $p \leq 0,01$ – относительно контроля; ## – $p \leq 0,01$ – относительно группы «социальный» стресс

Рис. 5. Уровень BDNF в сыворотке крови белых крыс в условиях экспериментального «социального» стресса под влиянием нейропептидов меланокортиновой структуры

- животные с агрессивным типом поведения;
- животные с субмиссивным типом поведения.

Note: ** – $p \leq 0.01$ – relative to control; ## – $p \leq 0.01$ – relative to the "social" stress group

Fig. 5. The level of BDNF in the blood serum of white rats under experimental "social" stress under the influence of melanocortin neuropeptides

- animals with aggressive type of behavior;
- animals with a submissive type of behavior.

В группе стрессированных животных с агрессивным типом поведения было отмечено снижение уровня нейротрофического фактора головного мозга на 40% ($p \leq 0,01$) в сравнении с контрольной группой. Введение соединений АКТГ(4-7)-Pro-Gly-Pro (Семакс) и АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro способствовали увеличению уровня мозгового нейротрофического фактора по отношению к стрессированной группе животных на 60% ($p \leq 0,01$) и 38% ($p \leq 0,01$) соответственно.

В группе стрессированных крыс с субмиссивным типом поведения было отмечено снижение уровня BDNF на 45% ($p \leq 0,01$) в сравнении с контрольными животными. При введении меланокортиновых соединений также отмечались изменения уровня исследуемого нейротрофического фактора в виде его статистически значимого повышения ($p \leq 0,01$): на фоне АКТГ(4-7)-Pro-Gly-Pro (Семакс) – на 78% и АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro – 55% по отношению к группе животных, подверженных воздействию «социального» стресса.

В результате проведения данного исследования было установлено, что «социальный» стресс сопровождается снижением уровня BDNF и NGF, что связано с изменением нейропластичности с последующим

угнетением нейрогенеза. В ряде экспериментальных работ доказано, что BDNF обладает выраженными нейропротекторными свойствами, способствуя угнетению клеточного апоптоза, препятствуя, в свою очередь, гибели нейронов и стимулируя рост холинергических нервных волокон [20]. В эксперименте установлено, что в условиях «социального» стресса наряду со снижение уровней нейротрофических факторов наблюдается повышение уровней каспазы-3 и каспазы-8, а также TNF-α сыворотки крови белых крыс, что свидетельствует об усиление апоптотических процессов [13, 14]. Существенная роль нейротрофических факторов в индукции или торможении апоптоза доказана и в других экспериментальных работах. Установлено, что NGF тормозит апоптоз при ряде нейродегенеративных заболеваниях [20]. Кроме того, доказано, что фактор роста нервов и нейротрофический фактор головного мозга реализуют свое действие через генетические механизмы индукции апоптотических процессов [22].

Снижение экспрессии нейротрофических факторов в результате стрессогенных воздействий различной природы и восстановление его уровня продолжительным введением средств коррекции привели к созданию нейротрофической гипотезы развития стресс-индуцированной депрессии, согласно которой изменение уровня нейротрофических факторов является ключевым механизмом формирования и разработки подходов к лечению подобных нарушений [17]. Установленная в данном исследовании корригирующая активность меланокортиновых нейропептидов в отношении уровня нейротрофических факторов при «социальном» стрессе свидетельствует о проявлении АКТГ(4-7)-Pro-Gly-Pro (Семакс) и АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro выраженных антистрессорных и нейропротекторных эффектов, что сопровождается восстановлением уровней фактора роста нервов и нейротрофического фактора головного мозга [28].

Наряду с этим, установлено, что введение нейропептидных соединений АКТГ(4-7)-Pro-Gly-Pro (Семакс) и АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro на фоне «социального» стресса способствует снижению уровня апоптотических показателей – капсазы-3, каспазы-8 и фактора некроза опухоли, что опосредовано, возможным, ингибированием каспаза-зависимого каскада реакций разрушения клеточных структур путем, гидролиза ядерной ламины, расщепления адгезивных белков и разрушения цитоскелета [29, 30]. Данный путь, наряду с каспазами, реализуется с участием рецепторов клеточной гибели, к которым относятся фактор некроза опухолей. Установлено, что нейропептидные соединения в условиях «социального» стресса вызывают выраженное ингибирование процессов свободнорадикального окисления и снижают концентрацию провоспалительных цитокинов таких как IL–1β, IL–6 и TNF-α [22, 23]. На основании полученных результатов можно сделать вывод о наличие у меланокортинов антиапоптотического действия за счет влияния на уровень каспаз, концентрацию провоспалительных цитокинов и ингибирование процессов перекисного окисления липидов [23].

Заключение. Таким образом, проведенное исследование позволило установить наличие у меланокортиновых нейропептидов АКТГ(4-7)-Pro-Gly-Pro (Семакс) и АКТГ(6-9)-Pro-Gly-Pro антиапоптотической активности за счет ингибирования каспаза-зависимого каскада реакций апоптоза, а также выраженного стресс-протекторного действия за счет восстановления уровня нейротрофических факторов мозга, что актуализирует дальнейшее детальное изучение каспаза-зависимого и опосредованного нейротрофическими факторами механизма антистрессорного эффекта меланокортинов.

Информация о финансировании

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант РФФИ № 19-04-00461.

Financial support

The work was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research, RFBR grant No. 19-04-00461.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors have no conflict of interest to declare.

Список литературы

1. Benham G, Charak R. Stress and sleep remain significant predictors of health after controlling for negative affect. Stress and Health. 2019;35(1):59-68. DOI: https://doi.org/10.1002/smi.2840

2. Cohen S, Gianaros APJ, Manuck SB. Stage Model of Stress and Disease. Perspectives on Psychological Science. 2016;11(4):56-63. DOI: https://doi.org/10.1177/1745691616646305

3. Magariños AM, Schaafsma SM, Pfaff DW. Impacts of stress on reproductive and social behaviors. Frontiers in Neuroendocrinology. 2018;49:86-90. DOI: https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2018.01.002

4. O'Connor DB, Thayer JF, Vedhara K. Stress and Health: A Review of Psychobiological Processes. Annual Review of Psychology. 2021;72:663-688. DOI: https://doi.org/10.1146/annurev-psych-062520-122331

5. Майборода АА. Апоптоз: гены и белки. Сибирский медицинский журнал. 2013;3:130-135.

6. Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals – A review. Brazilian Journal of Biology. 2021;81(4):1133-1143. DOI: https://doi.org/10.1590/1519-6984.228437

7. Дятлова АС, Дудков АВ, Линькова НС, и др. Молекулярные маркеры каспаза-зависимого и митохондриального апоптоза: роль в развитии патологии и в процессах клеточного старения. Успехи современной биологии. 2018;138(2):126-137. DOI: https://doi.org/10.7868/S0042132418020023

8. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. Cell Biology International. 2019;43(6):582-592. DOI: https://doi.org/10.1002/cbin.11137

9. Jacotot É. Caspase inhibition: From cellular biology and thanatology to potential clinical agents. Médecine sciences (Paris). 2020;36(12):1143-1154. DOI: https://doi.org/10.1051/medsci/2020222

10. Munoz-Pinedo CA, Lopez-Rivas A. A role for caspase-8 and TRAIL-R2/DR5 in ER-stress-induced apoptosis. Cell Death and Differentiation. 2018;25:226. DOI: https://doi.org/10.1038/cdd.2017.155

11. Furusawa Y, Iizumi T, Fujiwara Y, et al. Inhibition of checkpoint kinase 1 abrogates G2/M checkpoint activation and T. promotes apoptosis under heat stress. Apoptosis. 2012;17:102-112. DOI: https://doi.org/10.1007/s10495-011-0660-7

12. Kumar S. Caspase function in programmed cell death. Cell Death and Differentiation. 2007;14:32-43. DOI: https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402060

13. D'Sa-Eipper C, Roth KA. Caspase regulation of neuronal progenitor cell apoptosis. Developmental Neuroscience. 2000;22(1-2):116-124. DOI: https://doi.org/10.1159/000017433

14. Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. Bioscience Reports. 2019;39(1):BSR20180992. DOI: https://doi.org/10.1042/BSR20180992

15. Кузник БИ, Давыдов СО, Ланда ИВ. Фактор роста нервов (NGF) и его роль в условиях нормы и патологии. Успехи физиологических наук. 2019;50(4):64-80. DOI: https://doi.org/10.1134/S0301179819040052

16. Santucci D, Racca A, Alleva E. When Nerve Growth Factor Met Behavior. Recent Advances in NGF and Related Molecules. 2021;1331:205-214. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-74046-7_13

17. Крыжановская СЮ, Запара МА, Глазачев ОС. Нейротрофины и адаптация к средовым стимулам: возможности расширения «терапевтического потенциала» (краткий обзор). Вестник международной академии наук (русская секция). 2020;1:36-43.

18. Левчук ЛА, Вялова НМ, Михалицкая ЕВ, и др. Роль BDNF в патогенезе неврологических и психических расстройств. Современные проблемы науки и образования. 2018;6:58.

19. Острова ИВ, Голубева НВ, Кузовлев АН, и др. Прогностическая значимость и терапевтический потенциал мозгового нейротрофического фактора BDNF при повреждении головного мозга (обзор). Общая реаниматология. 2019;15(1):70-86. DOI: https://doi.org/10.15360/1813-9779-2019-1-70-86

20. Duman RS, Deyama S, Fogaça MV. Role of BDNF in the pathophysiology and treatment of depression: Activity-dependent effects distinguish rapid-acting antidepressants. European Journal of Neuroscience. 2021;53(1):126-139. DOI: https://doi.org/10.1111/ejn.14630

21. Carr R, Frings S. Neuropeptides in sensory signal processing. Cell and Tissue Research. 2019;375(1):217-225. DOI: https://doi.org/10.1007/s00441-018-2946-3

22.Kanunnikova NP. Neuroprotective properties of neuropeptides. Journal of the Grodno State Medical University. 2017;15(5):492-498. DOI: http://dx.doi.org/10.25298/2221-8785-2017-15-5-492-498

23.Samotrueva MA, Yasenyavskaya AL, Murtalieva VK, et al. Experimental Substantiation of Application of Semax as a Modulator of Immune Reaction on the Model of "Social" Stress. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2019;166(6):754-758. DOI: https://doi.org/10.1007/s10517-019-04434-y

24.Vyunova TV, Andreeva LA, Shevchenko KV, et al. An integrated approach to study the molecular aspects of regulatory peptides biological mechanism. Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals. 2019;62(12):812-822. DOI: https://doi.org/10.1002/jlcr.3785

25.Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета европейского союза о защите животных, использующихся для научных целей. [Электронный ресурс] [дата обращения 11.10.2021]. URL: https://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Directive_201063_rus.pdf

26.Avgustinovich DF, Kovalenko IL, Kudryavtseva NN. A model of anxious depression: persistence of behavioral pathology. Neuroscience and Behavioral Physiology. 2005;35(9):917-924. DOI: https://doi.org/10.1007/s11055-005-0146-6

27.Koolhaas JM, De Boer SF, Buwalda B, et al. Social stress models in rodents: Towards enhanced validity. Neurobiology of Stress. 2017;6:104-112. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2016.09.003

28.Ясенявская АЛ, Самотруева МА, Мясоедов НФ, и др. Влияние семакса на уровень интерлейкина-1β в условиях "социального" стресса. Медицинский академический журнал. 2019;9(1S):192-194. DOI: https://doi.org/10.17816/MAJ191S1192-194

29.Fricker LD. Carboxypeptidase E and the Identification of Novel Neuropeptides as Potential Therapeutic Targets. Advances in Pharmacology. 2018;82:85-102. DOI: https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.09.001

30.Thiele TE. Neuropeptides and Addiction: An Introduction. International Review of Neurobiology. 2017;136:1-3. DOI: https://doi.org/10.1016/bs.irn.2017.07.001

References

1. Benham G, Charak R. Stress and sleep remain significant predictors of health after controlling for negative affect. Stress and Health. 2019;35(1):59-68. DOI: https://doi.org/10.1002/smi.2840

2. Cohen S, Gianaros APJ, Manuck SB. Stage Model of Stress and Disease. Perspectives on Psychological Science. 2016;11(4):56-63. DOI: https://doi.org/10.1177/1745691616646305

3. Magariños AM, Schaafsma SM, Pfaff DW. Impacts of stress on reproductive and social behaviors. Frontiers in Neuroendocrinology. 2018;49:86-90. DOI: https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2018.01.002

4. O'Connor DB, Thayer JF, Vedhara K. Stress and Health: A Review of Psychobiological Processes. Annual Review of Psychology. 2021;72:663-688. DOI: https://doi.org/10.1146/annurev-psych-062520-122331

5. Mayboroda AA. Apoptosis: genes and proteins. Siberian Medical Journal. 2013;3:130-135. Russian.

6. Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals – A review. Brazilian Journal of Biology. 2021;81(4):1133-1143. DOI: https://doi.org/10.1590/1519-6984.228437

7. Dyatlova AS, Dudkov AV, Lin'kova NS, et al. Molecular markers of caspase-dependent and mitochondrial apoptosis: role in the development of pathology and in the processes of cellular aging. Uspekhi sovremennoy biologii. 2018;138(2):126-137. Russian. DOI: https://doi.org/10.7868/S0042132418020023

8. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. Cell Biology International. 2019;43(6):582-592. DOI: https://doi.org/10.1002/cbin.11137

9. Jacotot É. Caspase inhibition: From cellular biology and thanatology to potential clinical agents. Médecine sciences (Paris). 2020;36(12):1143-1154. DOI: https://doi.org/10.1051/medsci/2020222

10.Munoz-Pinedo CA, Lopez-Rivas A. A role for caspase-8 and TRAIL-R2/DR5 in ER-stress-induced apoptosis. Cell Death and Differentiation. 2018;25:226. DOI: https://doi.org/10.1038/cdd.2017.155

11.Y, Iizumi T, Fujiwara Y, et al. Inhibition of checkpoint kinase 1 abrogates G2/M checkpoint activation and T. promotes apoptosis under heat stress. Apoptosis. 2012;17:102-112. DOI: https://doi.org/10.1007/s10495-011-0660-7

12.Kumar S. Caspase function in programmed cell death. Cell Death and Differentiation. 2007;14:32-43. DOI: https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402060

13.D'Sa-Eipper C, Roth KA. Caspase regulation of neuronal progenitor cell apoptosis. Developmental Neuroscience. 2000;22(1-2):116-124. DOI: https://doi.org/10.1159/000017433

14.Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. Bioscience Reports. 2019;39(1):BSR20180992. DOI: https://doi.org/10.1042/BSR20180992

15.Kuznik BI, Davydov SO, Landa IV. Nerves growth factor (NGF) and its role in normal and pathology conditions. Uspekhi fiziologicheskikh nauk. 2019;50(4):64-80. Russian. DOI: https://doi.org/10.1134/S0301179819040052

16.Santucci D, Racca A, Alleva E. When Nerve Growth Factor Met Behavior. Recent Advances in NGF and Related Molecules. 2021;1331:205-214. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-74046-7_13

17.Kryzhanovskaya SYu, Zapara MA, Glazachev OS. Neurotrophins and adaptation to environmental stimuli: opportunities for expanding "therapeutic capacity" (mini-review). Herald of the International Academy of Science. Russian Section. 2020;1:36-43. Russian.

18.Levchuk LA, Vyalova NM, Mikhalitskaya EV, et al. The role of BDNF in the pathogenesis of neurological and mental disorders. Modern problems of science and education. 2018;6:58. Russian.

19.Ostrova IV, Golubeva NV, Kuzovlev AN, et al. Prognostic Value and Therapeutic Potential of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in Brain Injuries (Review). General Reanimatology. 2019;15(1):70-86. Russian. DOI: https://doi.org/10.15360/1813-9779-2019-1-70-86

20.Duman RS, Deyama S, Fogaça MV. Role of BDNF in the pathophysiology and treatment of depression: Activity-dependent effects distinguish rapid-acting antidepressants. European Journal of Neuroscience. 2021;53(1):126-139. DOI: https://doi.org/10.1111/ejn.14630

21.Carr R, Frings S. Neuropeptides in sensory signal processing. Cell and Tissue Research. 2019;375(1):217-225. DOI: https://doi.org/10.1007/s00441-018-2946-3

22.Kanunnikova NP. Neuroprotective properties of neuropeptides. Journal of the Grodno State Medical University. 2017;15(5):492-498. DOI: http://dx.doi.org/10.25298/2221-8785-2017-15-5-492-498

23.Samotrueva MA, Yasenyavskaya AL, Murtalieva VK, et al. Experimental Substantiation of Application of Semax as a Modulator of Immune Reaction on the Model of "Social" Stress. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2019;166(6):754-758. DOI: https://doi.org/10.1007/s10517-019-04434-y

24.Vyunova TV, Andreeva LA, Shevchenko KV, et al. An integrated approach to study the molecular aspects of regulatory peptides biological mechanism. Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals. 2019;62(12):812-822. DOI: https://doi.org/10.1002/jlcr.3785

25.Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes [Internet]. [cited 2021 Oct 11]. Russian. Available from: https://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Directive_201063_rus.pdf

26.Avgustinovich DF, Kovalenko IL, Kudryavtseva NN. A model of anxious depression: persistence of behavioral pathology. Neuroscience and Behavioral Physiology. 2005;35(9):917-924. DOI: https://doi.org/10.1007/s11055-005-0146-6

27.Koolhaas JM, De Boer SF, Buwalda B, et al. Social stress models in rodents: Towards enhanced validity. Neurobiology of Stress. 2017;6:104-112. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2016.09.003

28.Yasenyavskaya AL, Samotrueva MA, Myasoedov NF, et al. The effect of semax on the level of interleukin-1ß in conditions of "social" stress. Medical Academic Journal. 2019;9(1S):192-194. Russian. DOI: https://doi.org/10.17816/MAJ191S1192-194

29.Fricker LD. Carboxypeptidase E and the Identification of Novel Neuropeptides as Potential Therapeutic Targets. Advances in Pharmacology. 2018;82:85-102. DOI: https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.09.001

30.Thiele TE. Neuropeptides and Addiction: An Introduction. International Review of Neurobiology. 2017;136:1-3. DOI: https://doi.org/10.1016/bs.irn.2017.07.001

Статья поступила в редакцию 11 октября 2021 г.
Поступила после доработки 21 февраля 2022 г.
Принята к печати 11 апреля 2022 г.

Received 11 October 2021
Revised 21 February 2022
Accepted 11 April 2022

Информация об авторах

Анна Леонидовна Ясенявская, кандидат медицинских наук, доцент, руководитель Научно-

исследовательского центра, доцент кафедры фармакогнозии, фармацевтической технологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет», г. Астрахань, Российская Федерация, E-mail: yasen_9@mail.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2998-2864.

Александра Александровна Цибизова, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакогнозии, фармацевтической технологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет», г. Астрахань, Российская Федерация, E-mail: sasha3633@yandex.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9994-4751.

Людмила Александровна Андреева, руководитель сектора, ФГБУ Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: landr@img.ras.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3927-8590.

Николай Федорович Мясоедов, доктор химических наук, профессор, академик РАН, руководитель отдела, ФГБУ Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: nfm@img.ras.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1294-102X.

Ольга Александровна Башкина, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой факультетской педиатрии ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет», г. Астрахань, Российская Федерация, E-mail: bashkina1@mail.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4168-4851.

Марина Александровна Самотруева, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой фармакогнозии, фармацевтической технологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет», г. Астрахань, Российская Федерация, E-mail: ms1506@mail.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5336-4455.

Information about the authors

Anna L. Yasenyavskaya, Cand. Sci. (Medicine), Associate Professor, Head of the Research Center, Associate Professor at the Department of Pharmacognosy, Pharmaceutical Technology and Biotechnology, Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia, E-mail: yasen_9@mail.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2998-2864.

Alexandra A. Tsybizova, Cand. Sci. (Pharmacy), Associate Professor at the Department of Pharmacognosy, Pharmaceutical Technology and Biotechnology, Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia, E-mail: sasha3633@yandex.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9994-4751.

Lyudmila A. Andreeva, Head of the Sector, Institute of Molecular Genetics of the National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russia, E-mail: landr@img.ras.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3927-8590.

Nikolay F. Myasoedov, Doct. Sci. (Chemistry), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Head of Department, Institute of Molecular Genetics of the National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russia, E-mail: nfm@img.ras.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1294-102X.

Olga A. Bashkina, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Head of the Department of Faculty Pediatrics, Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia, E-mail: bashkina1@mail.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4168-4851.

Marina A. Samotrueva, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Head of the Department of Pharmacognosy, Pharmaceutical Technology and Biotechnology, Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia, E-mail: ms1506@mail.ru, ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5336-4455.