

ISSN 2658-6533

НАУЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

RESEARCH RESULTS IN BIOMEDICINE

9(4) 2023

16+

сетевой научный рецензируемый журнал
online scholarly peer-reviewed journal

Сайт журнала:
rrmedicine.ru



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 9, №4. 2023

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



Volume 9, №4. 2023

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: Юрлов 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

Нженке 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

Полонников А.В., доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», Курск, РФ

Прошаев К.И., доктор медицинских наук, профессор, АНО «Научно-исследовательский медицинский центр «ГЕРОНОТОЛОГИЯ»», 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. Prashchayeu, 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), Queen Mary University of London, London, UK

M.B. Khamoshina, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

E.K. Khushnutdinova, 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, Лондонский университет королевы Марии, 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

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

ГЕНЕТИКА

GENETICS

Р.Н. Мустафин, Э.К. Хуснудинова Перспективы исследования ретроэлементов в терапии COVID-19 (обзор)	Rustam N. Mustafin, Elza K. Khusnudinova Prospects for the investigation of retroelements for COVID-19 therapy (review)	422	422
Yuliya D. Smirnova, Mariya V. Gryaznova, Inna Yu. Burakova, Mikhail Yu. Syromyatnikov, Tatyana N. Sviridova, Olga P. Lebedeva, Alexander Y. Maslov, Vasily N. Popov Study of microbiome aberrations in patients with irritable bowel syndrome with diarrhea by next generation sequencing	Yuliya D. Smirnova, Mariya V. Gryaznova, Inna Yu. Burakova, Mikhail Yu. Syromyatnikov, Tatyana N. Sviridova, Olga P. Lebedeva, Alexander Y. Maslov, Vasily N. Popov Study of microbiome aberrations in patients with irritable bowel syndrome with diarrhea by next generation sequencing	446	446
Ю.Э. Азарова, А.В. Гуреева, М.И. Постникова, В.В. Макаренко, Е.Ю. Клесова, А.В. Полоников Связь одноклеточного полиморфизма rs4880 гена SOD2 с развитием микрососудистых осложнений сахарного диабета 2-го типа	Iuliia E. Azarova, Anastasia V. Gureeva, Mariia I. Postnikova, Victor V. Makarenko, Elena Yu. Klyosova, Alexey V. Polonikov The link of single nucleotide polymorphism rs4880 of the SOD2 gene to the development of microvascular complications of type 2 diabetes mellitus	461	461
Г.Р. Аюпова, Р.И. Хусаинова Клинико-генетическая характеристика муковисцидоза в Республике Башкортостан	Guzel R. Ayupova, Rita I. Khusainova Clinical and genetic characteristics of cystic fibrosis in the Republic of Bashkortostan	474	474
И.Н. Безменова, И.В. Аверьянова Варианты полиморфизма гена NOS3 и основные характеристики вариабельности сердечного ритма у жителей-северян	Irina N. Bezmenova, Inessa V. Averyanova NOS3 gene polymorphism variants and main characteristics of heart rate variability in Northerners	486	486

ФАРМАКОЛОГИЯ,
КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

PHARMACOLOGY

Zhanna V. Dzampaeva, Fatima S. Datieva, Sergey V. Skupnevskiy, Mikhail L. Blagonravov Seasonal periodontal microcirculation by combined stress in rats corrected with complex phytoadaptogens	Zhanna V. Dzampaeva, Fatima S. Datieva, Sergey V. Skupnevskiy, Mikhail L. Blagonravov Seasonal periodontal microcirculation by combined stress in rats corrected with complex phytoadaptogens	500	500
Mahardian Rahmadi, Ahmad D. Nurhan, Maulidany R.D. Ananda, Annisa D.S. Ramadhani, Zuhaela Iqbal, Santhra S. Balan Curcumin Ameliorates High-Fat Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Regulating Endoplasmic Reticulum Stress in The Liver	Mahardian Rahmadi, Ahmad D. Nurhan, Maulidany R.D. Ananda, Annisa D.S. Ramadhani, Zuhaela Iqbal, Santhra S. Balan Curcumin Ameliorates High-Fat Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Regulating Endoplasmic Reticulum Stress in The Liver	512	512

КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

MEDICINE

Stefano Mancin, Marco E. Sguanci, Francesco Reggiani, Francesca Vecchio, Michela Piredda, Maria G. De Marinis Assessment of malnutrition risk in post-stroke patients: a systematic literature review	524	Stefano Mancin, Marco E. Sguanci, Francesco Reggiani, Francesca Vecchio, Michela Piredda, Maria G. De Marinis Assessment of malnutrition risk in post-stroke patients: a systematic literature review	524
Marina S. Ponomarenko, Evgeny A. Reshetnikov, Maria M. Churnosova, Yuliya N. Reshetnikova, Vladimir I. Churnosov, Irina V. Ponomarenko Comorbidity and syntropy of benign proliferative diseases of the female reproductive system: non-genetic, genetic, and epigenetic factors (review)	544	Marina S. Ponomarenko, Evgeny A. Reshetnikov, Maria M. Churnosova, Yuliya N. Reshetnikova, Vladimir I. Churnosov, Irina V. Ponomarenko Comorbidity and syntropy of benign proliferative diseases of the female reproductive system: non-genetic, genetic, and epigenetic factors (review)	544
А.В. Чернов, Н.А. Щетинина, В.А. Негребецкий Особенности психологического дефицитарного профиля пожилых пациентов с возрастассоциированной коморбидной кардиопатологией	557	Aleksey V. Chernov, Nadezhda A. Shchetinina, Viktor A. Negrebetskiy Features of the psychological deficit profile of elderly patients with age-associated comorbid cardiopathology	557

ГЕНЕТИКА GENETICS



DOI: 10.18413/2658-6533-2023-9-4-0-1

УДК 578.76

Перспективы исследования ретроэлементов в терапии COVID-19 (обзор)

Р.Н. Мустафин¹ , Э.К. Хуснутдинова^{2,3}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет»,
ул. Ленина, д.3, г. Уфа, 450008, г. Уфа, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук,
пр-т. Октября, д. 71, г. Уфа, 450054, Российская Федерация

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уфимский университет науки и технологий»,
ул. Заки Валиди, д. 32, г. Уфа, 450076, Российская Федерация

Автор для переписки: Р.Н. Мустафин (ruji79@mail.ru)

Резюме

Актуальность: Поиск методов лечения COVID-19 с использованием генетических достижений может стать основой для эффективной борьбы с данной вирусной инфекцией. Таргетная терапия с применением некодирующих РНК отвечает условиям современной персонализированной медицины, поскольку позволяет диагностировать вовлеченные в патогенез COVID-19 молекулярные механизмы и точно воздействовать на них. **Цель исследования:** Определить наиболее значимые эпигенетические звенья патогенеза COVID-19, воздействие на которые перспективно для разработки таргетной терапии. **Материалы и методы:** Использованы базы данных Scopus, WoS, PubMed для анализа роли микроРНК, длинных некодирующих РНК, ретроэлементов в развитии COVID-19. **Результаты:** Согласно проанализированной литературе, длинные некодирующие РНК и при-микроРНК способны транслироваться с образованием функциональных пептидов, которые регулируют экспрессию собственных и других генов. В патогенезе COVID-19 важную роль играют эпигенетические факторы, что отражается в изменении экспрессии определенных некодирующих РНК у пациентов в зависимости от степени тяжести и характера течения болезни. Это может быть обусловлено участием ретроэлементов в противовирусном ответе и его неэффективности при старении. Результатом являются более тяжелые формы COVID-19 у пожилых людей с развитием цитокинового шторма, несмотря на наличие физиологического иммунодефицита. **Заключение:** Поскольку особенности экспрессии специфических некодирующих РНК у пожилых больных COVID-19 отражают регуляторный дисбаланс транспозонов, перспективна разработка пептидов, влияющих на экспрессию микроРНК, длинных некодирующих РНК и ретроэлементов. Данный подход мог бы стать основой не только для эффективного лечения возрастных пациентов, но и для продления их

жизни в связи с влиянием на эпигенетические механизмы старения. Для этого необходимо определение спектра действия синтезируемых для терапии COVID-19 пептидов.

Ключевые слова: вирусы; длинные некодирующие РНК; микроРНК; пептиды; COVID-19; SARS-CoV-2

Для цитирования: Мустафин РН, Хуснудинова ЭК. Перспективы исследования ретроэлементов в терапии COVID-19 (обзор). Научные результаты биомедицинских исследований. 2023;9(4):422-445. DOI: 10.18413/2658-6533-2023-9-4-0-1

Prospects for the investigation of retroelements for COVID-19 therapy (review)

Rustam N. Mustafin¹ , Elza K. Khusnudinova^{2,3} 

¹ Bashkir State Medical University,
3 Lenin St., Ufa, 450008, Russia

² Ufa Scientific Center, RAS,
71 Oktyabrya Ave., Ufa, 450054, Russia

³ Ufa University of Science and Technology,
32 Zaki Validi St., Ufa, 450076, Russia

Corresponding author: Rustam N. Mustafin (ruji79@mail.ru)

Abstract

Background: The search for methods to detect COVID-19 using genetic advances can become the basis for an effective fight against this viral infection. Targeted therapy using non-coding RNAs meets the conditions of modern personalized medicine, since it will allow diagnosing the molecular mechanisms involved in the pathogenesis of COVID-19 and specifically affecting them. **The aim of the study:** To determine the most significant epigenetic links in the pathogenesis of COVID-19, the impact on which is promising for the development of targeted therapy. **Materials and methods:** We used the Scopus, WoS, PubMed databases to analyze the role of miRNAs, long non-coding RNAs, and retroelements in the development of COVID-19. **Results:** According to the analyzed literature, long noncoding RNAs and pri-miRNAs can be translated into functional peptides that regulate the expression of their own and other genes. Epigenetic factors play an important role in the pathogenesis of COVID-19. This is reflected in changes in the expression of certain non-coding RNAs in patients depending on the severity and nature of the course of the disease. This may be due to the involvement of retroelements in the antiviral response and its ineffectiveness in aging. The result is more severe forms of COVID-19 in elderly and senile people with the development of a cytokine storm, despite the presence of physiological immunodeficiency. **Conclusion:** Since the features of the expression of specific non-coding RNAs in elderly patients with COVID-19 reflect the regulatory imbalance of transposons, the development of peptides that affect the expression of microRNAs, long non-coding RNAs, and retroelements is promising. This approach could become the basis not only for the effective treatment of age-related patients, but also for prolonging their life due to the effect on the epigenetic mechanisms of aging. To do this, it is necessary to determine the action spectrum of peptides synthesized for the treatment of COVID-19.

Keywords: viruses; long non-coding RNAs; miRNAs; peptides; COVID-19; SARS-CoV-2

For citation: Mustafin RN, Khusnudinova EK. Prospects for the investigation of retroelements therapy for COVID-19 (review). Research Results in Biomedicine. 2023;9(4):422-445. Russian. DOI: 10.18413/2658-6533-2023-9-4-0-1

Введение. Коронавирусы относятся к подсемейству *Coronavirinae*, семейства *Coronaviridae*, отряда *Nidovirales* и являются крупнейшими из известных одноцепочечных «плюс-нитевых» РНК-вирусов (используют свой геном непосредственно в качестве мРНК). Их диаметр достигает 160 нм, а общая длина генома в среднем 32000 п.н. Подсемейство *Coronavirinae* включает роды *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* и *Deltacoronavirus*. SARS-CoV-2, вызывающий COVID-19 (human coronavirus disease 19), относится к роду *Betacoronavirus* [1]. Структура SARS-CoV-2 соответствует специфическим характеристикам известных коронавирусов: более 67% генома на 5'-конце входит в состав открытой рамки считывания ORF1ab и кодирует orf1-ab-полипротеины. Остальная часть РНК вируса на 3'-конце содержит гены структурных белков: поверхностные (S), мембранные (M), оболочечные (E) и нуклеокапсидные (N), а также 6 дополнительных белков, продуктов трансляции ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b и ORF8 [2].

COVID-19 характеризуется высокой смертностью и большим количеством осложнений. Наиболее характерными из них являются гипериммунные реакции, такие как «цитокиновый шторм», детский мультисистемный воспалительный синдром, иммуноопосредованные кожные и неврологические заболевания наряду с аутоиммунными проявлениями с нарушением регуляции механизмов свертывания крови [3]. Данные изменения могут быть обусловлены влиянием вирусных инфекций на транспозоны (мобильные генетические элементы (МГЭ)), которые участвуют в регуляции иммунной системы и экспрессии генов хозяина [4]. МГЭ являются спе-

цифическими структурно-функциональными участками генома, которые способны перемещаться в новый локус путем «вырезания и вставки» (ДНК-транспозоны) или «копирования и вставки» (ретроэлементы (РЭ)). Последние наиболее распространены у млекопитающих и используют промежуточную мРНК для обратной транскрипции и встраивания кДНК в геном хозяина [5].

МГЭ являются неотъемлемой частью ДНК практически всех эукариот и составляют более 40% генома человека [6]. Сохранение такого количества МГЭ в ходе эволюции связано с их использованием для контроля экспрессии (используются в качестве сайтов связывания с транскрикционными факторами [7, 8]) и эпигенетической регуляции различных генов с помощью процессируемых из их транскриптов некодирующих РНК (нкРНК): микроРНК [9] и длинных нкРНК [10]. Одомашнивание МГЭ в эволюции привело к образованию из них альтернативных экзонов [11] белок-кодирующих генов (БГК) и, соответственно, возникновения новых функциональных доменов белков. Кроме того, гены крупных МГЭ в эволюции оказались источниками большого количества эволюционно молодых белок-кодирующих генов [7, 12]. Нужно отметить также способность нкРНК, образуемых из МГЭ, помимо собственной регуляторной функции, связываться с рибосомами и формировать пептиды, участвующие в тех же биологических процессах, что и их нкРНК-предшественники (Рис. 1). Так, при-микроРНК транслируются с образованием miPEP (microRNA-encoded peptides), которые способны регулировать не только определенные биологические реакции, но также транскрипцию генов микроРНК, источников собственных при-микроРНК [13].

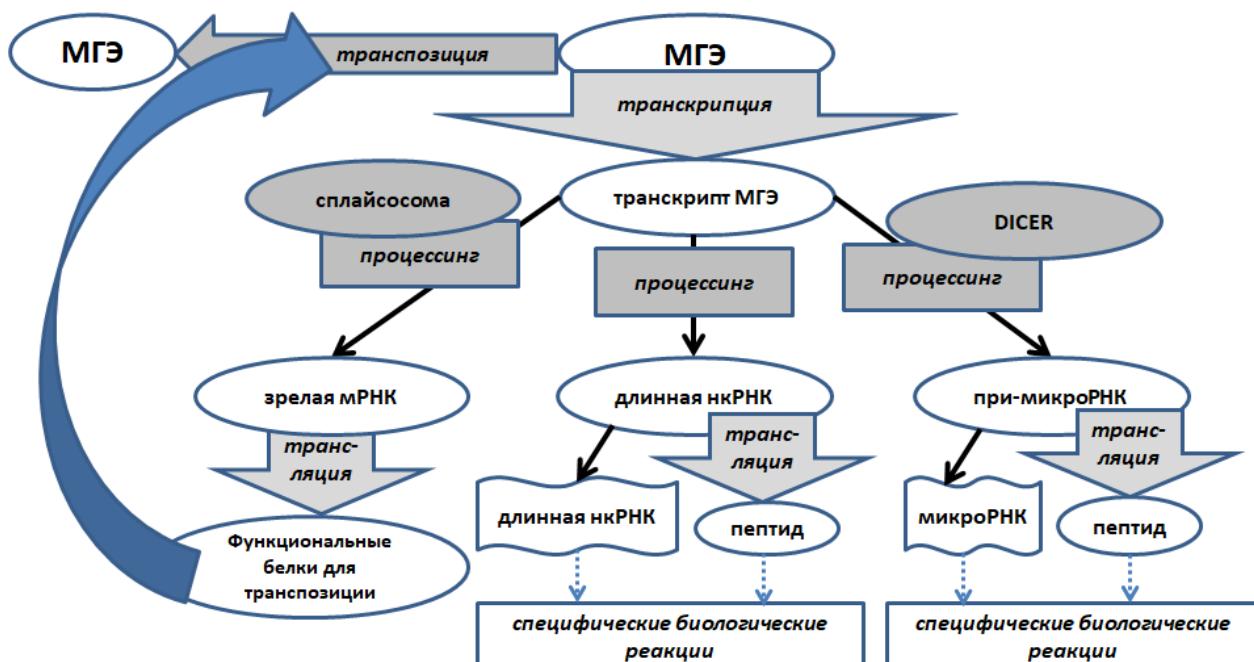


Рис. 1. Схема полифункциональности продуктов экспрессии МГЭ (мобильных генетических элементов).

Fig. 1. Scheme of multifunctionality of transposable elements.

Цель исследования. Определить наиболее значимые эпигенетические звенья патогенеза COVID-19, воздействие на которые перспективно для разработки таргетной терапии. Поскольку РЭ являются важными источниками микроРНК и длинных нкРНК, сделан акцент на поиск взаимосвязи РЭ с данными молекулами и с вирусом SARS-CoV-2.

Материалы и методы исследования. Использованы базы данных Scopus, WoS, PubMed для анализа роли микроРНК, длинных некодирующих РНК, ретроэлементов в развитии COVID-19. Для нахождения необходимой информации в поисковике были введены сочетания терминов «SARS-CoV-2 retroelements», «SARS-CoV-2 transposons», «SARS-CoV-2 transposable elements», «SARS-CoV-2 HERV», «SARS-CoV-2 LINE-1», «SARS-CoV-2 Alu», «COVID-19 miRNA», «COVID-19 lncRNA», «SARS-CoV-2 miRNA», «SARS-CoV-2 lncRNA», «retroelements miRNA», «retroelements lncRNA», «transposable elements miRNA», «transposable elements lncRNA». Проведен анализ 987 источников

литературы, из которых для написания данной статьи были использованы 97 источников.

Результаты и их обсуждение

Роль мобильных генетических элементов в развитии COVID-19

Воздействие МГЭ на течение COVID-19 отмечено на всех этапах болезни, начиная с проникновения вируса в клетки. Ангиотензин-превращающий фермент 2 (ACE2 – angiotensin-converting enzyme 2) является рецептором для прохождения SARS-CoV-2 в эндотелиоциты [14]. В норме ACE2 необходим для деградации аниготензина-II. Поэтому дефицит ACE2 (истощение вследствие связывания с вирусом) ведет к избыточной стимуляции рецепторов ангиотензина 2 (AT1R) и последующим повреждениям эндотелиальных клеток с васкулопатией, а также тромбозам с коагулопатией. Это, в свою очередь, приводит к системному воспалению [15]. В инtronах гена ACE2 располагаются Alu-элементы (неавтономные РЭ) [14], а также РЭ MIRb, служащий промотором для образования альтернативной нестабильной изо-

формы белка MIRb-ACE2, выработка которого индуцируется интерфероном (IFN). В то же время, основная изоформа ACE2 нечувствительна к IFN [16], хотя продукты экспрессии открытых рамок считывания ORF3b, ORF6, ORF7, ORF8 вируса SARS-CoV-2 ингибируют синтез IFNI и IFNII, что является основанием для применения IFN в лечении COVID-19 [17].

Необходимо отметить, что тяжелые формы COVID-19 и цитокиновый штурм чаще встречаются у людей пожилого и старческого возраста [18] (что отражается на смертности от 0,01% в 25 лет до 15% в 85 лет [19]), для которых характерно развитие асептического воспаления вследствие повышенной выработкой IFNI. Стимулом для экспрессии IFNI служат активирующиеся при старении HERV [20] – их белковые продукты распознаются Толл-подобными рецепторами (TLR) в качестве патоген-ассоциированного молекулярного паттерна [21]. С этих позиций с возрастом должна снижаться восприимчивость к инфицированию SARS-CoV-2, который чувствителен к противовирусному воздействию IFNI [17]. Однако клинические исследования показывают более частое развитие COVID-19 у пожилых [22]. Кроме того, при старении животных [23] и человека [24, 25] снижаются функции иммунитета, что также не согласуется с большей распространностью у пожилых пациентов цитокинового штурма [26], проявляющегося повышенными уровнями провоспалительных цитокинов со снижением количества Т-лимфоцитов [27]. Перечисленные, казалось бы, противоречия, в действительности отражают сложные пути функционирования МГЭ в регуляции экспрессии генов в онтогенезе. До начала старения активация МГЭ строго за-программирована, и вирусные инфекции в норме способствуют эффективному иммунному ответу. У людей пожилого и старческого возраста происходит патологическая активация МГЭ, которая ведет к дисбалансу во всех органах и системах, в том числе эндокринной [28] и иммунной, что, несмотря на гиперпродукцию IFN и физиологический возрастной иммунодефицит,

способствует патологическому иммунному ответу. Это связано с ролью МГЭ в функционировании иммунной системы. Например, RAG1 и RAG2 V(D)J рекомбинации произошли от ДНК-транспозонов [29].

Эндогенные ретровирусы (ERV), которые относятся к LTR (long terminal repeats) содержащим РЭ (LTR-РЭ) [5], занимая 8% генома человека [3], сформировали в эволюции транскрипционные сети, лежащие в основе интерферонового ответа. В различных филогенетических ветвях млекопитающих, независимо друг от друга, ERV образовывали многочисленные IFN-индукцируемые энхансеры [30]. ERV участвуют также в регуляции иммунной системы человека, так как являются энхансерами для гена HLA-G [31]. HERV-K102 экспрессируются активированными моноцитами и выходят в вакуоли, связанными с их поверхностями, превращая клетки в «пенистые». Высвобождение HERV-K102 происходит только при лизисе макрофагов. При этом HERV-K102 защищают клетки человека от вирусных инфекций и злокачественных новообразований [24]. Патологическая экспрессия HERV-W моноцитами и лимфоцитами наблюдается при рассеянном склерозе [32], в этиопатогенезе которого предполагается роль коронавирусов [33], в том числе SARS-CoV-2 [34].

Влияние инфекции SARS-CoV-2 на ретроэлементы

HERV являются останками древних экзогенных ретровирусов, внедрившихся в геном животных в ходе эволюции. При этом некоторые гены HERV были одомашнены клетками хозяев для выполнения важнейших функций, таких как образование плаценты. К ним относится произошедший от ENV (кодирует оболочку ретровируса) ген Syncytin, который оказался вовлечен в патогенез психических симптомов COVID-19 [35]. Было проведено исследование влияния коронавирусных инфекций на МГЭ в первичных образцах пациентов и клеточных линиях с помощью секвенирования РНК. В результате выявлено, что в зависимости от типа инфицированных клеток и инфекционного агента (SARS, MERS, RSV,

HPIV3 или IAV) усиливается или ослабляется транскрипция специфических РЭ. При этом дифференциально экспрессируемые МГЭ при инфекции SARS-CoV-2 были обогащены сайтами связывания с транскрипционными факторами, которые участвуют в иммунном ответе. У больных COVID-19 выявлено снижение уровней не только HERV, но и L1 в периферических моноцитах и значительное усиление экспрессии этих РЭ в жидкости бронхоальвеолярного лаважа [4]. Более того, было показано усиление экспрессии HERV клетками бронхиального эпителия с индуцированным в них старением, что свидетельствовало о вероятной роли патологической активации РЭ как фактора более тяжелого течения COVID-19 [36]. Анализ транскриптома клеток, полученных из тканей легкого людей, инфицированных MERS-CoV, SARS-CoV и SARS-CoV-2 показал усиленную экспрессию РЭ с активацией генов *TET* (ten-eleven translocation). Белковые продукты *TET* катализируют деметилирование ДНК – превращение 5-метилцитозина в 5-гидроксиметилцитозин. В клетках кишечника пораженных SARS-CoV-2 людей также выявлена активация РЭ. Этим можно объяснить развитие более тяжелых форм инфекции у пациентов с изначально повышенным уровнем экспрессии РЭ (например, онкологических больных или пожилых людей) [6].

Активация РЭ под влиянием SARS-CoV-2, наиболее вероятно, первоначально является функцией, направленной на защиту от вирусной инфекции. Соответственно, истощение РЭ у пациентов с нормальной их функцией (растущие организмы) в ходе инфекции должно коррелировать с худшим прогнозом COVID-19. Действительно, при исследовании детей, инфицированных SARS-CoV-2, выявлено повышение экспрессии HERV наряду с IFNI, IFNII, TRIM28, SETDB1 при легком течении, и их снижение при тяжелых формах COVID-19 [37]. Важно отметить, что ERV выполняют защиту хозяев от вирусных инфекций, вызванных эволюционно наиболее родственными HERV экзогенными ретровирусами. Продукты генов *env*

используются в качестве факторов рестрикции против экзогенных ретровирусов у кур, овец, мышей и кошек. Предполагается наличие подобных механизмов и в геномах других организмов, в том числе человека [38]. В экспериментах на мышах с нокдауном генов рецепторов TLR определена также роль ERV в защите от вируса простого герпеса HSV-2 [39]. Противовирусная эффективность РЭ связана также с эффектом нкРНК, образующихся при процессинге их транскриптов. Так, у мышей ERV являются источниками длинной нкРНК Inc-EPAV, которая повышает экспрессию генов противовирусного ответа путем стимулирования NF-κB [40]. Происходящий от гена *gag* эндогенных ретровирусов рестрикционный ген *Fv1* активно ингибитирует вирус лейкоза мышей MLV, а также вирус инфекционной анемии лошадей EIAV, синцитиальный вирус кошек FFV, лентивирусы и спумавирусы [41].

HERV активируются в ответ на инфекционные агенты, способствуя не только защите от вирусов, но и приводя к различным иммунопатологическим эффектам. Была определена повышенная экспрессия гена *env* HERV-W в лейкоцитах крови больных COVID-19 по сравнению со здоровым контролем. При этом уровень экспрессии коррелировал с концентрациями цитокинов в крови, дифференцировкой и истощением Т-лимфоцитов. Более тяжелое течение пневмонии и выработка маркеров воспаления при COVID-19 развивались у пациентов с высокой долей HERV-W *env*-позитивных лимфоцитов. Та же закономерность выявлена в отношении респираторных осложнений у госпитализированных больных. В связи с иммуно- и нейропатогенностью белка HERV-W ENV, предполагается его использование в качестве биомаркера тяжести течения COVID-19 [3, 32]. Патологическая активация РЭ, приводящая к цитокиновому штурму и другим осложнениям под влиянием SARS-CoV-2, наиболее вероятна для людей пожилого и старческого возраста, поскольку при старении происходит дерепрессия HERV [20], а их

продукты способствуют асептическому воспалению в тканях [21].

Помимо непосредственного влияния SARS-CoV-2 на РЭ, вирус может изменять их экспрессию за счет воздействия на нкРНК, мишениями которых являются транскрипты РЭ. Это связано с эволюционным происхождением генов длинных нкРНК [10, 42] и микроРНК [43] от МГЭ. Исследование данных механизмов наиболее перспективно в связи с возможностью модулирования течения COVID-19 путем таргетного воздействия с помощью нкРНК. Значительным потенциалом в этом отношении обладает miR-200c, которая необходима для проникновения вируса в клетки. Данная микроРНК подавляет экспрессию гена ACE2 за счет присоединения к 3'-нетранслируемой области его мРНК [44]. Не менее важна miR-98-5p, мишенью которой является мРНК гена TMPRSS2, экспрессируемого эндотелиальными клетками и необходимого для слияния вирусной и клеточной мембран [45]. В 2020 году в сыворотке крови больных COVID-19 (в сравнении со здоровым контролем) было выявлено повышение уровней 35 и снижение – 38 различных микроРНК по сравнению со здоровым контролем. Мишениями данных молекул являются транскрипты генов пептидаз, протеинкиназ и убиквитиновой системы [46].

Экспрессия специфических микроРНК различается у пациентов с разной тяжестью COVID-19, что говорит об их влиянии на течение болезни. Были идентифицированы более высокие уровни miR-15b-5p, miR-486-3p, miR-486-5p и более низкие – miR-181a-2-3p, miR-31-5p, miR-99a-5p только при тяжелом течении COVID-19 (без их изменений при легком и средней тяжести) по сравнению с контролем [47]. В 2022 году опубликованы результаты исследования микроРНК в плазме крови 96 больных COVID-19, для которых была характерна выраженная дифференциальная экспрессия 200 различных микроРНК, 75 из которых оказались специфичными для легкого и бессимптомного течения инфекции. Для пациентов с тяжелой

формой COVID-19 определен высокий уровень экспрессии 137 микроРНК по сравнению с пациентами со средней тяжестью болезни [48]. Кроме того, идентифицированы высокоспецифичные для COVID-19 микроРНК, которые могут быть использованы в качестве биомаркеров данной инфекции. К ним относится miR-155 (90% чувствительности и 100% специфичности), уровень экспрессии которой прямо коррелирует со степенью тяжести и смертностью при COVID-19 [49]. Сходными свойствами обладают miR-320b и miR-483-5p [50]. Перспективно исследование специфических микроРНК для разработки таргетной терапии COVID-19. Предполагается использовать miR-1307-3p, miR-3613-5p, которые подавляют размножение SARS-CoV-2 за счет взаимодействия с 3'-нетранслируемыми областями его генов [51].

Перспективы исследования влияния ретроэлементов на COVID-19

Несмотря на защитный механизм активации РЭ в ответ на коронавирусную инфекцию, ферменты РЭ могут быть использованы для обратной транскрипции (ревертаза) и инсерции (эндонуклеаза) SARS-CoV-2 в ДНК хозяина. Этим можно объяснить повторные позитивные тесты ПЦР на SARS-CoV-2 у больных после перенесенной COVID-19. В эксперименте на культуре клеток человека было показано, что ДНК-копии вируса SARS-CoV-2 могут интегрировать в геномы инфицированных клеток. В результате наблюдается дупликация целевых сайтов (фланкирующих данные копии), консенсусные нуклеотидным последовательностям узнавания эндонуклеазы L1 в области инсерции, что согласуется с механизмами, при которых используются обратная транскриптаза и эндонуклеаза L1 элементов. Кроме того, в образцах тканей, взятых у отдельных больных COVID-19, были выявлены значительные фракции вирусных последовательностей, транскрибированных из интегрированных ДНК-копий, образующих химерные транскрипты вируса и хозяина [52], которые могут быть образованы и другими путями.

Описана возможность образования химерных молекул между SARS-CoV-2 и молекулами РНК – транскриптами ядерного и митохондриального генома человека [53].

Нужно отметить, что РЭ эффективно взаимодействуют не только с экзогенными вирусами, но и с эволюционно неродственными РЭ, о чем говорят данные филогенетических исследований. Так, 135 из 213 членов семейства HERV-W характеризуются не прямыми ретровирусными интеграциями, а образованием процессированных псевдогенов с использованием ферментов L1 элементов [54]. Это свидетельствует об отсутствии выраженной селективности ферментов L1 при формировании молекул кДНК и потенциальном использовании их экзогенными РНК-вирусами для обратной транскрипции и интеграции. Помимо ретровирусов, для которых встраивание в геном хозяина является необходимым этапом жизненного цикла, способность к инсерциям с помощью ферментов РЭ выявлена и у ряда других РНК-содержащих вирусов: лимфоцитарного хориоменингита LCMV [55], везикулярного стоматита VSV [56], плюс-нитевого РНК-вируса диареи крупного рогатого скота BVDV (с рекомбинацией с РНК хозяев) [57], арбовирусов у комаров [58]. Более того, были идентифицированы эндогенные вирусные элементы, возникшие в результате интеграций обратнотранскрибированных кДНК копий РНК-вирусов семейств *Filoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Reoviridae* и *Flaviviridae* (жизненный цикл которых происходит в цитоплазме, подобно SARS-CoV-2) в геномы половых клеток животных, и сохраняющиеся в эволюции в ряде поколений [59]. Даже у человека и других млекопитающих обнаружены эндогенные вирусные элементы, гомологичные вирусам семейства *Filoviridae* [60] и гену нуклеопротеина вируса из семейства *Bornaviridae*, передающиеся вертикально [61]. При сравнительном исследовании одноцепочечных РНК-вирусов с геномами позвоночных, у 19 видов были определены эндогенные вирусные элементы, произошедшие в эволюции от 4 известных семейств вирусов около 40 млн лет назад.

Среди них плюс-нитевые РНК-вирусы семейства *Flaviviridae* [62].

Помимо участия в возможной интеграции вируса в геном человека, активированные под влиянием коронавирусов L1-элементы могут служить индукторами для выработки аутоантител против ткани легкого. В частности, при исследовании больных SARS, у 40,9% из них были выявлены антитела к эндонуклеазе L1, которые экспрессировались в ткани легкого [63]. Поскольку у больных COVID-19 также были определены повышенные уровни L1 (активированные под влиянием вируса SARS-CoV-2) в ткани легкого, можно предположить сходный механизм их влияния на развитие аутоиммuno-воспалительных процессов [4, 6, 36]. Было показано, что не только экзогенные вирусы, но и взвешенные в воздухе твердые частицы способны вызывать в эпителии бронхов гипометилирование и активацию L1, а также Alu-элементов [64]. Структурные особенности транскриптов Alu, в свою очередь, запускают врожденные иммунные ответы с патологическими реакциями. В норме двуцепочечные РНК Alu-элементов подвергаются дезаминированию аденоцина в инозин (A-to-I редактирование), воздействию эндорибонуклеаз и секвестрации РНК-связывающими белками. У больных COVID-19 (а также при гриппе и рассеянном склерозе) происходит потеря A-to-I редактирования, что инициирует воспалительные процессы [65] и более тяжелое течение инфекции. В результате неизмененные транскрипты Alu образуют двуцепочечные молекулы, индуцирующие транскрипционный ответ регуляторного фактора интерферона и NF-кБ со стимуляцией генов *IFN*, *IL6* и *IL8*. Предлагается использовать коррекцию данных изменений для предотвращения цитокинового шторма у больных COVID-19 [66].

Расположение Alu в области интрона гена *ACE2* с участием в регуляции его активности предполагает роль Alu в патогенезе COVID-19. В частности, полиморфные варианты Alu в гене *ACE2* могут влиять на индивидуальные особенности ответа на SARS-CoV-2 [14]. Учитывая глобальное

распространение Alu в геноме человека, наиболее вероятно воздействие данных РЭ, расположенных и в других генах, в том числе иммунного ответа. Например, при сравнении распределения инсерций Alu в области гена HLA-DRB1 выявлены значительные отличия полиморфных аллелей в 12 минорных этнических популяциях Китая [67].

Регуляторная роль МГЭ отражается на индивидуальных особенностях противо-вирусного ответа в связи со специфическим распределением МГЭ в геноме, что может отражаться на различных показателях смертности от COVID-19, характере течения болезни, заболеваемости и восприимчивости. Действительно, даже полиморфизм распределения Alu в гене ACE1, который не служит рецептором для SARS-CoV-2, но является аналогом ACE2, влияет на смертность от COVID-19 [68]. Поскольку на течение вирусной инфекции влияют различные гены, участвующие в управлении онтогенезом, в регуляции которых вовлечены множество МГЭ [69], их специфические инсерции вероятно могут отражаться на популяционных особенностях течения COVID-19. Еще в 2013 году было проведено исследование распределения МГЭ в геномах разных популяций людей и определено 12 специфических инсерций HERV-K [70]. При изучении полиморфных инсерций МГЭ по 16192 локусам у 2504 человек из 26 популяций были показаны специфические различия по инсерциям в зависимости от мест проживания популяций [71]. Характерные для разных популяций распределения МГЭ в геномах были выявлены также при исследовании 14384 инсерций у 1511 человек из 15 популяций [72]. Подобные работы были бы перспективны для выявления специфических РЭ, наиболее достоверно вовлеченных в развитие тяжелых форм COVID-19, поскольку на экспрессию РЭ можно регуляторно воздействовать таргетной терапией с помощью микроРНК.

Таким образом, РЭ могут влиять на развитие COVID-19. Роль РЭ в развитии COVID-19 может быть опосредована экспрессией происходящих от них микроРНК.

Нами проведен анализ базы данных MDTE DB о возникших от РЭ микроРНК [43], экспрессия которых специфически изменяется при COVID-19. Было выявлено, что семейство miR-31 (низкий уровень у больных COVID-19) [47] произошло от LINE-2a [43], miR-320b (повышенный уровень при COVID-19) [48, 50] – от LINE-2 [43], miR-5695 (повышен уровень при COVID-19) [46] – от LTR/ERV1 [43], miR-340 (снижается уровень при COVID-19) [46] – от ДНК-транспозона TcMar-Mariner [43], miR-4525 (значительно ассоциирован повышенный уровень с COVID-19) [48] – от LTR/ERV1 [43], miR-4661 (значительно ассоциирован повышенный уровень с COVID-19) [48] – от LTR/Gypsy [43], miR-548a-3 [48] – от LTR/ERVL-MaLR [43].

Потенциал исследования взаимосвязи микроРНК и COVID-19

Было показано, что из генома SARS-CoV-2 образуются короткие РНК длиной 20 нуклеотидов, которые ингибируют трансляцию белков человека, вовлеченных в метаболизм кислорода, функционирование иммунной системы и обоняние. Одним из механизмов этого эффекта оказалась гибридизация последовательности РНК белка S SARS-CoV-2 с молекулами мРНК бета-глобина и интерферонов I типа [73]. С помощью программы VMiR Analyzer в геноме SARS-CoV-2 было выявлено 898 потенциальных пре-микроРНК, при отборе которых системой HuntMi более точно определено 45 кандидатных вирусных пре-микроРНК (средняя длина 78 нуклеотидов), из которых 30 – в прямой ориентации, 15 – в обратной. Дальнейший анализ с использованием программы MatureBayes позволил выявить 90 предполагаемых зрелых микроРНК. Количественная ПЦР в клетках Vero E6, инфицированных SARS-CoV-2, показала высокие уровни MR147-3р, MR369-3р, MR66-3р и MR359-5р, которые не экспрессировались в неинфицированных клетках (контроль). При вирусной инфекции SARS-CoV-2 синтезирует на высоком уровне miR-147-3р, которая значительно снижает экспрессию в клетках человека генов (способ-

ствую аномальной активации иммунной системы), таких как *EXOC7* (Exocyst Complex Component 7), *TFE3* (Transcription factor E3), *RAD9A* (RAD9 Checkpoint Clamp Component A). Последний кодирует белок контрольной точки клеточного цикла и регулирует гибель клеток, способствуя апоптозу [74]. Специфические микроРНК человека взаимодействуют с молекулами вируса SARS-CoV-2, опосредуя определенные патологические эффекты. Так, S-белок SARS-CoV-2 способен модифицировать в клетках человека экзосомный транспорт в отдаленные неинфицированные ткани и органы, инициируя катастрофический иммунный каскад в ЦНС. При этом клетки с трансинфекцией SARS-CoV-2 высвобождают значительное количество экзосом, нагруженных miR-148a и miR-590, которые усваиваются микроглией человека и подавляют экспрессию гена-мишени *USP33* (кодирует убиквитин-специфическую пептидазу 33) с нижележащими уровнями *IRF9* (кодирует регуляторный фактор интерферона 9). Поглощение экзосом регулирует также экспрессию генов, кодирующих *TNF α* , *NF- κ B*, *IFN- β* , что ведет к повреждениям ЦНС через гиперактивацию микроглии человека [75].

Найдены микроРНК человека, которые связываются с комплементарными последовательностями вирусных РНК SARS-CoV-2 и разрушают вирусную РНК, ингибируя тем самым экспрессию вирусного белка. К ним относятся miR-148a, miR-17, miR-214, miR-223, miR-574-5p, miR98 [76], miR-15a-5p, miR-15b-5p, miR-30b-5p, miR-409-3p, miR-505-3p, miR-548d-3p [77]. В РНК-геноме SARS-CoV-2 в 5'- и 3'-негранулируемых областях определены различные мишени для микроРНК человека. При этом мутации вирусного генома могут вызывать создание или потерю сайтов связывания с микроРНК, что играет решающую роль в патогенности SARS-CoV-2. Например, область NSP3 генома SARS-CoV-2 является мишенью для miR-197-5p. При мутации в данной области miR-197-5p неспособна связываться с вирусом и вызывать деградацию его транскрипта [76]. Поэтому необходимо секвенирование генома

SARS-CoV-2 для более эффективного применения таргетной терапии с помощью нкРНК. В 2020 году были предложены miR-512-3p, miR-516b-5p, miR-517-3p, ингибирующие вирусы, для создания вакцины против SARS-CoV-2. Данные микроРНК способствуют аутофагии инфицированных клеток [78].

МикроРНК, способствующие развитию COVID-19 могут быть использованы в качестве мишней для использования антимикроРНК в лечении болезни. Так, в крови и моче больных COVID-19 циркулирует miR-2392 (не определяется у здоровых лиц), которая может служить диагностическим маркером болезни и как объект для терапевтического воздействия. В эксперименте на хомяках было разработано воздействие на miR-2392, ингибирующее течение вирусной инфекции, что потенциально может быть использовано для лечения COVID-19 у человека. MiR-2392, экспрессия которой специфически повышается при COVID-19, способствует прогрессированию болезни за счет подавления экспрессии митохондриальных генов, усиления гипоксии, гликозилиза и воспаления [79]. Кроме того, микроРНК человека влияют на восприимчивость к COVID-19, поскольку микроРНК необходимы для регуляции клеточных рецепторов для вирусной инвазии. Например, miR-98-5p и let-7a-g/I специфически подавляют экспрессию *TMPRSS2*. При этом синтез let-7a-g/I стимулируется эстрогенами, поскольку ген *let-7a-g/I* расположен внутри гена, регулируемого эстрadiолом [80]. Под влиянием данного гормона находится и miR-98-5p, которая подавляет экспрессию не только *TMPRSS2*, но и *IL6* [81]. Соответственно, эти микроРНК могут быть потенциальными мишениями для профилактики и лечения COVID-19.

МикроРНК являются нестабильными молекулами, поэтому проблемой их применения является возможность доставки в клетки и сохранение биологического эффекта. Кроме того, вероятность комплементарного связывания не только с вирусными нуклеотидными последовательностями, но и с мРНК хозяина может стать причиной побочных эффектов. В связи с этим

перспективно использование более стабильных молекул, обладающих высокой специфичностью воздействия исключительно на вирус SARS-CoV-2. Данными свойствами обладают пептиды, транслируемые из при-микроРНК, зрелые молекулы микроРНК которых оказывают влияние на вирус. Разработка подобных молекул имеет высокий потенциал применения, поскольку пептиды широко используются в современной медицине. Описана возможность пространственного взаимодействия пептидов с молекулами нуклеотидов генома [82]. Поскольку последовательность РНК вируса SARS-CoV-2 обладает специфическими особенностями, перспективно изучение связывания с геномом вируса определенных пептидов, которые обладали бы

наибольшей специфичностью в отношении противовирусной терапии.

Потенциал использования пептидов в терапии COVID-19

Поскольку на вирусную инфекцию могут воздействовать микроРНК, а их продукты трансляции (пептиды miPEP) способны индуцировать те же биологические пути, перспективна разработка таких пептидов для лечения COVID-19 (Рис. 2).

Для этого необходимо сравнительное исследование эффективности miPEP у пожилых и молодых пациентов и определение их возможной геропротекторной активности. Наиболее изучены miPEP, влияющие на развитие неоплазм в связи с их перспективностью в практическом применении в онкологии.

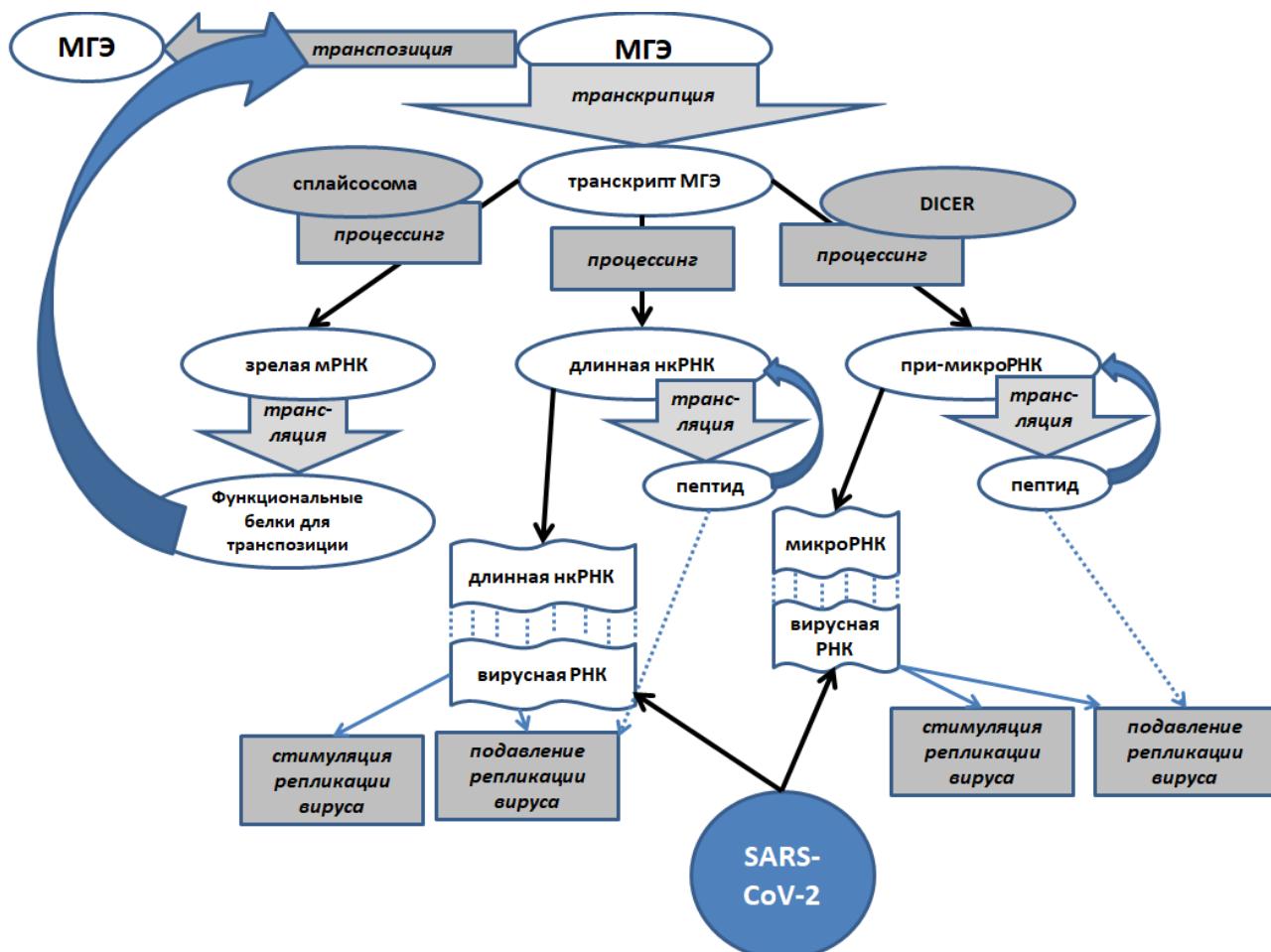


Рис. 2. Схема влияния длинных нкРНК, микроРНК и образуемых при их трансляции пептидов на SARS-CoV-2.

Fig. 2. Scheme of the influence of lncRNAs, miRNAs, and the peptides synthesized during their translation on SARS-CoV-2.

Так, пептид, транслируемый из длинной нкРНК HOXB-AS3, ингибирует рак ободочной кишки путем воздействия на альтернативный сплайсинг пируваткиназы-M [83]. Из при-микроРНК miR-200a и miR-200b транслируются пептиды miPEP-200a и miPEP-200b соответственно. Они подавляют экспрессию бета-катенина, Е-кадгерины и виментина, ингибируя миграцию клеток рака простаты за счет подавления процесса эпителиально-мезенхимального перехода [84]. Нужно отметить, что miR-200a и miR-200b вовлечены в те же пути канцерогенеза [85, 86]. MiPEP-133 транслируемый из pri-miRNA-34a, усиливает экспрессию онкосупрессорного белка p53, который регулирует транскрипцию pri-miR-34a, что свидетельствует также о взаиморегуляции пептидов и различных белков [87]. Нахождение подобных связей для специфических пептидов, образуемых при трансляции длинных нкРНК и при-микроРНК перспективно в отношении COVID-19 для разработки новых эффективных способов лечения болезни. Поскольку в патогенезе COVID-19 играют роль иммунные нарушения, важно нахождение miPEP, способных регулировать данные процессы. Так, выявлено, что miPEP-155 ингибирует аутоиммунное воспаление путем подавления презентации антигена клетками [88]. При этом miR-155, из при-микроРНК которой транслируется miPEP-155, вовлечена в регуляцию врожденного и приобретенного иммунитета [89]. Помимо miPEP огромным терапевтическим потенциалом обладают пептиды, транслируемые из длинных нкРНК и кольцевых РНК. Например, кодируемые кольцевыми РНК пептиды FBXW7-185aa, PINT-87aa, SHPRH-146aa используются для подавления роста глиомы [13].

Нужно отметить уникальную способность некоторых коротких пептидов в составе белков оказывать регуляторное воздействие на микроРНК. Например, богатые GW (дипептид глицина и триптофана) белки напрямую взаимодействуют с AGO. Последние, в свою очередь, служат гидами для микроРНК в отношении их целевых

мРНК. При этом содержащие GW белки координируют данные процессы, обеспечивая эффективный сайленсинг генов. В эксперименте было обнаружено, что короткий пептид GW также содержит домен взаимодействия с AGO и может быть использован для изоляции эндогенных белковых комплексов AGO. Внутри клетки такие короткие пептиды конкурируют с содержащими GW эндогенными белками за связывание с AGO и могут быть использованы для ингибирования микроРНК [90]. Можно предположить, что одним из механизмов регуляторного воздействия пептидов на кодирующие их гены нкРНК является не только прямое их взаимодействие с последовательностями ДНК [82], но также специфическое связывание с собственными микроРНК с образованием функциональных РНП, которые принимают активное участие в тех же биологических реакциях. Кроме того, данный комплекс РНП может играть роль в транскрипционной регуляции собственных и других генов. В литературе пока не описано таких взаимодействий, происходящих в естественных условиях в клетках. Однако экспериментально синтезированы подобные комплексные молекулы, которые оказались весьма эффективными. Еще в 2013 году были опубликованы результаты использования пептидов-переносчиков, проникающих через клетки для доставки в них микроРНК. Так, пептид, названный низкомолекулярным протамином (LMWP), в комплексе с miR-29b был эффективно применен для трансфекции мезенхимальных стволовых клеток и стимулировал дифференцировку остеобластов [91].

В 2018 сообщалось об эффективной целенаправленной доставке в ткань опухоли и в клетки HeLa самособирающегося нанокомплекса, образованного миметиками микроРНК (онкосупрессорная miR-34a) с функциональным пептидным конъюгатом (FA-R9-FPcas3). В результате индуцировался апоптоз клеток HeLa и подавлялся рост опухоли в эксперименте на живых мышах [92]. Подходящей системой доставки для микроРНК являются амфипати-

ческие пептиды N-TER, которые способствуют нековалентному комплексообразованию за счет электростатических взаимодействий между обоими компонентами. Кроме того, комплекс пептида N-TER с нуклеиновой кислотой характеризуется клеточной адгезией с поглощением через клеточные мембранны и внутриклеточным высвобождением микроРНК. На культуре клеток 3T3-L1 был продемонстрирован антиадипогенный эффект комплекса пептида N-TER с miR-27a, который вызывал уменьшение образования липидных капель в зрелых адипоцитах [93]. В 2019 году был синтезирован нанокомплекс пептид/микроРНК (пептид TatBim и miR-34a), введение которого в клетки вызывало их апоптоз [94]. В 2021 году представлена эффективность пептида RP1R3V6 в качестве переносчика anti-microRNA-92 олигонуклеотида AMO92a в легочную ткань крыс с моделированным острым повреждением легких (поскольку miR-92 стимулирует данную патологию). При этом пептид оказывал дополнительное противовоспалительное действие за счет антагонизма с рецепторами конечных продуктов гликирования RAGE, подавления фактора некроза опухоли TNF- α в активированных липополисахаридами макрофагальных клетках [95].

Согласно данным NGS, более 10000 длинных нкРНК в геномах млекопитающих содержат короткую ORF (small ORF), которая связана с активной трансляцией. При помощи полногеномных высокопроизводительных методов были идентифицированы потенциальные микропептиды, закодированные в small ORF длинных нкРНК, участвующих в иммунном противовирусном ответе, выявлены десятки потенциальных кандидатов. Из них 4 пептида, экспрессируемые в ответ на вирусные инфекции, оказались наиболее консервативными и перспективными объектами для дальнейшего изучения: MMP24-AS1, ZFAS1, RP11-622K12.1, MIR22HG [96]. Была показана также способность вирусных кольцевых РНК транслироваться с образованием функциональных пептидов – данное свойство перспективно исследовать у SARS-

CoV-2 для возможного таргетного терапевтического воздействия. Так, при инфекции двуцепочечными РНК-содержащими реовирусами выявлена кольцевая вирусная РНК vcircRNA_000048, которая транслируется в состоящий из 21 аминокислоты пептид, ослабляющий репликацию вируса [97]. Поскольку образование таких молекул для самого вируса не выгодно, можно предположить, что в их синтезе участвуют защитные системы хозяина, использование которых перспективно для проектирования новых методов противовирусной терапии.

Заключение. В настоящее время имеются прямые и косвенные свидетельства влияния РЭ на патогенез COVID-19 (Рис. 3). Получены доказательства того, что SARS-CoV-2 в эпителиальных клетках бронхов больных вызывает активацию РЭ, наиболее выраженную в состаренных клетках. Это согласуется с более тяжелым течением COVID-19 у пациентов пожилого возраста, поскольку при старении происходит дисрегуляция РЭ, которые индуцируют иммунную систему для развития асептического воспаления и гиперпродукции интерферона. То есть при первоначально имеющихся изменениях активности РЭ как при физиологическом старении, так и при сопутствующей патологии, при которой происходит дисрегуляция РЭ, SARS-CoV-2 усугубляют ее, а также влияют на другие РЭ в геноме. Поскольку РЭ играют важную роль в функционировании иммунной системы, их дисрегуляция коррелирует с вероятностью развития цитокинового шторма. Полученные данные свидетельствуют о перспективном исследовании роли РЭ в патогенезе COVID-19, поскольку изменения активации РЭ обратимы и могут быть модулированы воздействием микроРНК и длинных нкРНК, которые являются также перспективными прогностическими молекулами в диагностике COVID-19. Ключевыми источниками нкРНК служат МГЭ, которые также могут быть применены в качестве биомаркеров прогрессирования и тяжести болезни. Имеются свидетельства о роли РЭ в интеграции SARS-CoV-2 в геном человека, что согласуется с

проанализированными литературными данными об интеграции других РНК-вирусов, в том числе плюс-нитевых, реплицирующихся в цитоплазме клеток. Возможной причиной активации РЭ под влиянием SARS-CoV-2 является защитная реакция РЭ от экзогенных вирусных инфекций, а также наличие между ними идентичных

нуклеотидных последовательностей. Поэтому перспективен поиск специфических локусов в составе SARS-CoV-2, сходных с определенными РЭ в геноме человека. Это могло бы стать основой для проектирования направленных на данные локусы миРНК и их miPEP в таргетной терапии COVID-19.



Рис. 3. Схема путей влияния ретроэлементов на COVID-19 (БКГ – белок-кодирующие гены).
Fig. 3. Scheme of pathways of influence of retroelements on COVID-19.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки РФ (№AAAA-A16-116020350032-1) при частичной поддержке мегагранта Правительства Республики Башкортостан и гранта Российского научного фонда (проект № 17-78-30028).

Financial support

Our study was carried out within the framework of the state task of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (No. AAAA-A16-116020350032-1) and partially supported by the mega-grant from the Republic of Bashkortostan Ministry and grant from the Russian Science Foundation (project No. 17-78-30028).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors have no conflict of interest to declare.

Список литературы

- Ceraolo C, Giorgi FM. Genomic variance of the 2019-nCoV coronavirus. *Journal of Medical Virology*. 2020;92(5):522-528. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.25700>
- Khalilany RA, Safdar M, Ozaslan M. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. *Gene Reports*. 2020;19:100682. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100682>
- Balestrieri E, Minutolo A, Petrone V, et al. Evidence of the pathogenic HERV-W envelope expression in T-lymphocytes in association with the respiratory outcome of COVID-19 patients. *eBioMedicine*. 2021;66:103341. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103341>
- Marston JL, Greenig M, Singh M, et al. SARS-CoV-2 infection mediates differential expression of human endogenous retroviruses and long interspersed nuclear elements. *JCI insight*. 2021;6(24):e147170. DOI: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.147170>
- Lu JY, Shao W, Chang L, et al. Genomic Repeats Categorize Genes with Distinct Functions for Orchestrated Regulation. *Cell Reports*.

- 2020;30(10):3296-3311.e5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.048>
6. Yin Y, Liu XZ, He X, et al. Exogenous Coronavirus Interacts With Endogenous Retrotransposon in Human Cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021;11:609160. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.609160>
7. Feschotte C. Transposable elements and the evolution of regulatory networks. *Nature Reviews Genetics*. 2008;9:397-405. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg2337>
8. Ito J, Sugimoto H, Nakaoka H. Systematic identification and characterization of regulatory elements derived from human endogenous retroviruses. *PLoS Genetics*. 2017;13:e1006883. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006883>
9. Qin S, Jin P, Zhou X, et al. The Role of Transposable Elements in the Origin and Evolution of MicroRNAs in Human. *PLoS ONE*. 2015;10:e0131365. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131365>
10. Johnson R, Guigo R. The RIDL hypothesis: transposable elements as functional domains of long noncoding RNAs. *RNA*. 2014;20:959-76. DOI: <https://doi.org/10.1261/rna.044560.114>
11. Abascal F, Tress ML, Valencia A. Alternative splicing and co-option of transposable elements: the case of TMPO/LAP2α and ZNF451 in mammals. *Bioinformatics*. 2015;31(14):2257-2261. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv132>
12. Alzohairy AM, Gyulai G, Jansen RK, et al. Transposable elements domesticated and neofunctionalized by eukaryotic genomes. *Plasmid*. 2013;69(1):1-15. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2012.08.001>
13. Wang J, Zhu S, Meng N, et al. ncRNA-Encoded Peptides or Proteins and Cancer. *Molecular Therapy*. 2019;27(10):1718-1725. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.09.001>
14. Li M, Schifanella L, Larsen PA. Alu retrotransposons and COVID-19 susceptibility and morbidity. *Human Genomics*. 2021;15:2. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40246-020-00299-9>
15. Senchenkova EY, Russell J, Vital SA, et al. A critical role for both CD40 and VLA5 in angiotensin II-mediated thrombosis and inflammation. *FASEB Journal*. 2018;32(6):3448-56. DOI: <https://doi.org/10.1096/fj.201701068R>
16. Ng KW, Attig J, Bolland W, et al. Tissue-specific and interferon-inducible expression of nonfunctional ACE2 through endogenous retroelement co-option. *Nature Genetics*. 2020;52:1294-1302. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41588-020-00732-8>
17. Ramasamy S, Subbian S. Critical Determinants of Cytokine Storm and Type I Interferon Response in COVID-19 Pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2021;34(3):e00299-20. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00299-20>
18. Del Sole F, Farvomeni A, Loffredo L, et al. Features of severe COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Clinical Investigation*. 2020;50(10):e13378. DOI: <https://doi.org/10.1111/eci.13378>
19. Levin AT, Hanage WP, Owusu-Boaitey N, et al. Assessing age specificity of infection fatality rates for COVID-19: systematic review, meta-analysis, and public policy implications. *European Journal of Epidemiology*. 2020;35:1123-1138. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10654-020-00698-1>
20. Cardelli M. The epigenetic alterations of endogenous retroelements in aging. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2018;174:30-46. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mad.2018.02.002>
21. Feng E, Balint E, Poznanski SM, et al. Aging and Interferons: Impacts on Inflammation and Viral Disease Outcomes. *Cells*. 2021;10(3):708. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells10030708>
22. Li J, Huang DQ, Zou B, et al. Epidemiology of COVID-19: A systematic review and meta-analysis of clinical characteristics, risk factors, and outcomes. *Journal of Medical Virology*. 2021;93(3):1449-1458. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.26424>
23. Peters A, Delhey K, Nakagawa S, et al. Immunosenescence in wild animals: meta-analysis and outlook. *Ecology Letters*. 2019;22(10):1709-1722. DOI: <https://doi.org/10.1111/ele.13343>
24. Laderoute MP. A new paradigm about HERV-K102 particle production and blocked release to explain cortisol mediated immunosenescence and age-associated risk of chronic disease. *Discovery medicine*. 2015;20(112):379-391.
25. Ray D, Yung R. Immune senescence, epigenetics and autoimmunity. *Clinical Immunology*. 2018;196:59-63. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2018.04.002>
26. Meftahi GH, Jangravi Z, Sahraei H, et al. The possible pathophysiology mechanism of cytokine storm in elderly adults with COVID-19 infection: the contribution of “inflame-aging”. *Inflammation Research*. 2020;69:825-839. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00011-020-01372-8>

27. Mulchandani R, Lyngdoh T, Kakkar AK. Deciphering the COVID-19 cytokine storm: Systematic review and meta-analysis. *European Journal of Clinical Investigation.* 2021;51(1):e13429. DOI: <https://doi.org/10.1111/eci.13429>
28. Мустафин РН, Хуснутдинова ЭК. Влияние транспозонов на эндокринную регуляцию старения. Успехи геронтологии. 2020;33(3):418-428.
29. Huang S, Tao X, Yuan S, et al. Discovery of an Active RAG Transposon Illuminates the Origins of V(D)J Recombination. *Cell.* 2016;166(1):102-114. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.032>
30. Chuong EB, Elde NC, Feschotte C. Regulatory evolution of innate immunity through co-option of endogenous retroviruses. *Science.* 2016;351(6277):1083-1087. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aad54>
31. Chuong EB. The placenta goes viral: Retroviruses control gene expression in pregnancy. *PLoS Biology.* 2018;16:e3000028. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000028>
32. Garcia-Montojo M, Nath A. HERV-W envelope expression in blood leukocytes as a marker of disease severity of COVID-19. *eBioMedicine.* 2021;67:103363. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103363>
33. Yeh EA, Collins A, Cohen ME, et al. Detection of coronavirus in the central nervous system of a child with acute disseminated encephalomyelitis. *Pediatrics.* 2004;113(1):e73-e76. DOI: <https://doi.org/10.1542/peds.113.1.e73>
34. Bellucci G, Rinaldi V, Buscarinu MC, et al. Multiple Sclerosis and SARS-CoV-2: Has the Interplay Started. *Frontiers in Immunology.* 2021;12:755333. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.755333>
35. Durnaoglu S, Lee SK, Ahnn J. Syncytin, envelope protein of human endogenous retrovirus (HERV): no longer ‘fossil’ in human genome. *Animal Cells and Systems.* 2022;25(6):358-368. DOI: <https://doi.org/10.1080/19768354.2021.2019109>
36. Kitsou K, Kotanidou A, Paraskevis D, et al. Upregulation of Human Endogenous Retroviruses in Bronchoalveolar Lavage Fluid of COVID-19 Patients. *Microbiology spectrum.* 2021;9(2):e026021. DOI: <https://doi.org/10.1128/Spectrum.01260-21>
37. Tovo PA, Garazzino S, Dapra V, et al. COVID-19 in Children: Expressions of Type I/II/III Interferons, TRIM28, SETDB1, and Endogenous Retroviruses in Mild and Severe Cases. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021;22(14):7481. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22147481>
38. Malfavon-Borja R, Feschotte C. Fighting fire with fire: endogenous retrovirus envelopes as restriction factors. *Journal of Virology.* 2015;89(80):4047-4050. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.03653-14>
39. Jayewickreme R, Mao T, Philbrick W, et al. Endogenous Retroviruses Provide Protection Against Vaginal HSV-2 Disease. *Frontiers in Immunology.* 2022;12:758721. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.758721>
40. Zhou B, Qi F, Wu F, et al. Endogenous retrovirus-derived long noncoding RNA enhances innate immune responses via derepressing RELA expression. *mBio.* 2019;10(4):e00937-19. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.00937-19>
41. Yap MW, Colbeck E, Ellis SA, et al. Evolution of the retroviral restriction gene Fv1: inhibition of non-MLV retroviruses. *PLoS Pathogens.* 2014;10:e1003968. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003968>
42. Kapusta A, Kronenberg Z, Lynch VJ, et al. Transposable elements are major contributors to the origin, diversification, and regulation of vertebrate long noncoding RNAs. *PLoS Genetics.* 2013;9:e1003470. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003470>
43. Wei G, Qin S, Li W, et al. MDTE DB: a database for microRNAs derived from Transposable element. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics.* 2016;13(6):1155-1160. DOI: <https://doi.org/10.1109/TCBB.2015.2511767>
44. Lu D, Chatterjee S, Xiao K, et al. MicroRNAs targeting the SARS-CoV-2 entry receptor ACE2 in cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 2020;148:46-49. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.08.017>
45. Matarese A, Gambardella J, Sardu C, et al. miR-98 regulates TMPRSS2 expression in human endothelial cells: key implications for COVID-19. *Biomedicines.* 2020;8(11):462. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines8110462>
46. Li C, Hu X, Li L, et al. Differential microRNA expression in the peripheral blood from human patients with COVID-19. *Journal of Clinical Laboratory Analysis.* 2020;34(10):e23590. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcla.23590>
47. Tang H, Gao Y, Li Z, et al. The noncoding and coding transcriptional landscape of the peripheral immune response in patients with COVID-19. *Clinical and Translational Science.* 2020;10(6):e200. DOI: <https://doi.org/10.1002/ctm2.200>

48. Fernandez-Pato A, Vireda-Berdices A, Resino S, et al. Plasma miRNA profile at COVID-19 onset predicts severity status and mortality. *Emerging Microbes and Infections.* 2022;11(1):676-688. DOI: <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2038021>
49. Haroun RAH, Osman WH, Amin RE, et al. Circulating plasma miR-155 is a potential biomarker for the detection of SARS-CoV-2 infection. *Pathology.* 2022;54(1):104-110. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2021.09.006>
50. Giuliani A, Matacchione G, Ramini D, et al. Circulating miR-320b and miR-483-5p levels are associated with COVID-19 in-hospital mortality. *Mechanisms of Ageing and Development.* 2022;202:111636. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mad.2022.111636>
51. Chen L, Zhong L. Genomics functional analysis and drug screening of SARS-CoV-2. *Genes and Diseases.* 2020;7(4):542-550. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.04.002>
52. Zhang L, Richards A, Barrasa MI, et al. Reverse-transcribed SARS-CoV-2 RNA can integrate into the genome of cultured human cells and can be expressed in patient-derived tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2021;118(21):e2105968118. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2105968118>
53. Kazachenka A, Kassiotis G. SARS-CoV-2-Host Chimeric RNA-Sequencing Reads Do Not Necessarily Arise From Virus Integration Into the Host DNA. *Frontiers in Microbiology.* 2021;12:676693. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.676693>
54. Grandi N, Cadeddu M, Blomberg J, et al. Contribution of type W human endogenous retroviruses to the human genome: characterization of HERV-W proviral insertions and processed pseudogenes. *Retrovirology.* 2016;13:67. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12977-016-0301-x>
55. Geuking MB, Weber J, Dewannieux M, et al. Recombination of retrotransposon and exogenous RNA virus results in nonretroviral cDNA integration. *Science.* 2009;323(5912):393-396. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1167375>
56. Shimizu A, Nakatani Y, Nakamura T, et al. Characterisation of Cytoplasmic DNA complementary to non-retroviral RNA viruses in human cells. *Scientific Reports.* 2014;4:5074. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep05074>
57. Austermann-Busch S, Becher P. RNA structural elements determine frequency and sites of nonhomologous recombination in an animal plus-strand RNA virus. *Journal of Virology.* 2012;86(13):7393-7402. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00864-12>
58. Olson KE, Bonizzoni M. Nonretroviral integrated RNA viruses in arthropod vectors: an occasional event or something more. *Current Opinion in Insect Science.* 2017;22:45-53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.05.010>
59. Katzourakis A, Gifford RJ. Endogenous Viral Elements in Animal Genomes. *PLoS Genetics.* 2010;6:e1001191. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001191>
60. Taylor DJ, Leach RW, Bruenn J. Filoviruses are ancient and integrated into mammalian genomes. *BMC Evolutionary Biology.* 2010;10:193. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-193>
61. Horie M, Honda T, Suzuki Y, et al. Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature.* 2010;463:84-87. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature08695>
62. Belyi VA, Levine AJ, Skalka AM. Unexpected inheritance: multiple integrations of ancient bornavirus and ebolavirus/marburgvirus sequences in vertebrate. *PLoS Pathogens.* 2010;6:e1001030. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001030>
63. He WP, Shu CI, Li BA, et al. Human LINE1 endonuclease domain as a putative target of SARS-associated autoantibodies involved in the pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. *Chinese Medical Journal.* 2008;121:608-614.
64. Lee JY, Lee WK, Kim DS. Particulate matter-induced hypomethylation of Alu and LINE1 in normal human bronchial epithelial cells and epidermal keratinocytes. *Genes and Environment.* 2022;44(1):8. DOI: <https://doi.org/10.1186/s41021-022-00235-4>
65. Aune TM, Tossberg JT, Heinrich RM, et al. Alu RNA Structural Features Modulate Immune Cell Activation and A-to-I Editing of Alu RNAs Is Diminished in Human Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in Immunology.* 2022;13:818023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.818023>
66. Crooke 3rd PS, Tossberg JT, Porter KP, et al. Cutting Edge: Reduced Adenosine-to-Inosine Editing of Endogenous Alu RNAs in Severe COVID-19 Disease. *Journal of Immunology.* 2021;206(8):1691-1696. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2001428>
67. Cun Y, Shi L, Kulski JK, et al. Haplotype Associations and Differentiation of MHC Class II Polymorphic Alu Insertions at Five Loci With HLA-DRB1 Alleles in 12 Minority Ethnic Populations in China. *Frontiers in Genetics.*

- 2021;12:636236. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.636236>
68. Yamamoto N, Aiumi Y, Nishida N, et al. SARS-CoV-2 infections and COVID-19 mortalities strongly correlate with ACE1 I/D genotype. *Gene.* 2020;758:144944. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144944>
69. Мустафин РН, Хуснутдинова ЭК. Роль транспозонов в эпигенетической регуляции онтогенеза. *Онтогенез.* 2018;49(2):69-90. DOI: <https://doi.org/10.7868/S0475145018020015>
70. Shin W, Lee J, Son SY, et al. Human-specific HERV-K insertion causes genomic variations in the human genome. *PLoS ONE.* 2013;8:e60605. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060605>
71. Rishishwar L, Tellez Villa CE, Jordan IK. Transposable element polymorphisms recapitulate human evolution. *Mobile DNA.* 2015;6:21. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13100-015-0052-6>
72. Rishishwar L, Wang L, Wang J, et al. Evidence for positive selection on recent human transposable element insertions. *Gene.* 2018;675:69-79. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.06.077>
73. Demongeot J, Seligmann H. SARS-CoV-2 and miRNA-like inhibition power. *Medical Hypotheses.* 2020;144:110245. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110245>
74. Liu Z, Wang J, Ge Y, et al. SARS-CoV-2 encoded microRNAs are involved in the process of virus infection and host immune response. *Journal of Biomedical Research.* 2021;35(3):216-227. DOI: <https://doi.org/10.7555/JBR.35.20200154>
75. Mishra R, Banerjea AC. SARS-CoV-2 Spike Targets USP33-IRF9 Axis via Exosomal miR-148a to Activate Human Microglia. *Frontiers in Immunology.* 2021;12:656700. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.656700>
76. Rad AH, McLellan AD. Implications of SARS-CoV-2 Mutations for Genomic RNA Structure and Host microRNA Targeting. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020;21(13):4807. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21134807>
77. Fulzele S, Sahay B, Yusufi I, et al. COVID-19 Virulence in Aged Patients might be Impacted by the Host Cellular MicroRNAs Abundance/Profile. *Aging and Disease.* 2020;11(3):509-522. DOI: <https://doi.org/10.14336/AD.2020.0428>
78. Kreis NN, Ritter A, Louwen F, et al. A Message from the Human Placenta: Structural and Immunomodulatory Defense Against SARS-CoV-2. *Cells.* 2020;9(8):1777. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells9081777>
79. McDonald JT, Enguita FJ, Taylor D, et al. Role of miR-2392 in driving SARS-CoV-2 infection. *Cell Reports.* 2021;37(3):109839. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109839>
80. Howard EW, Yang X. microRNA Regulation in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer and Endocrine Therapy. *Biological Procedures Online.* 2018;20:17. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12575-018-0082-9>
81. Pontecorvi G, Bellenghi M, Ortona E, et al. microRNAs as New Possible Actors in Gender Disparities of Covid-19 Pandemic. *Acta Physiologica.* 2020;230(1):e13538. DOI: <https://doi.org/10.1111/apha.13538>
82. Хавинсон BX, Соловьев АЮ, Шатаева ЛК. Молекулярный механизм взаимодействия олигопептидов и двойной спирали ДНК. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2006;141(4):443-447. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10517-006-0198-9>
83. Huang JZ, Chen M, Chen D, et al. A Peptide Encoded by a Putative lncRNA HOXB-AS3 Suppresses Colon Cancer Growth. *Molecular Cell.* 2017;68(1):171-184. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.015>
84. Fang J, Morsalin S, Rao VN, et al. Decoding of Non-Coding DNA and Non-Coding RNA: Pri-Micro RNA-Encoded Novel Peptides Regulate Migration of Cancer Cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Pharmacology.* 2017;3(1):23-27. DOI: <https://doi.org/10.1166/jpsc.2017.1070>
85. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nature Cell Biology.* 2008;10:593-601. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncb1722>
86. Zuberi M, Mir R, Das J, et al. Expression of serum miR-200a, miR-200b, and miR-200c as candidate biomarkers in epithelial ovarian cancer and their association with clinicopathological features. *Clinical and Translational Oncology.* 2015;17:779-87. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12094-015-1303-1>
87. Kang M, Tang B, Li J, et al. Identification of miPEP133 as a novel tumor-suppressor microprotein encoded by miR-34a pri-miRNA. *Molecular Cancer.* 2020;19:143. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01248-9>
88. Niu L, Lou F, Sun Y, et al. A micropeptide encoded by lncRNA MIR155HG suppresses autoimmune inflammation via modulating antigen presentation. *Science advances.*

- 2020;6(21):eaaz2059. DOI:
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz2059>
89. Testa U, Pelosi E, Castelli G, et al. miR-146 and miR-155: Two Key Modulators of Immune Response and Tumor Development. *Non-coding RNA*. 2017;3(3):22. DOI:
<https://doi.org/10.3390/ncrna3030022>
90. Danner J, Pai B, Wankerl L, et al. Peptide-Based Inhibition of miRNA-Guided Gene Silencing. In: Schmidt M, editor. *Drug Target miRNA. Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press; 2017;1517:199-210. DOI:
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6563-2_14
91. Suh JS, Lee JY, Choi YS, et al. Peptide-mediated intracellular delivery of miRNA-29b for osteogenic stem cell differentiation. *Biomaterials*. 2013;34(17):4347-4359. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.02.039>
92. Xiao X, Wang X, Wang Y, et al. Multi-Functional Peptide-MicroRNA Nanocomplex for Targeted MicroRNA Delivery and Function Imaging. *Chemistry - A European Journal*. 2018;24(9):2277-2285. DOI:
<https://doi.org/10.1002/chem.201705695>
93. Shachner-Nedherer AL, Werzer O, Kornmueller K, et al. Biological Activity Of miRNA-27a Using Peptid-based Drug Delivery Systems. *International Journal of Nanomedicine*. 2019;14:7795-7808. DOI:
<https://doi.org/10.2147/IJN.S208446>
94. Kim H, Kitamatsu M, Ohtsuki T. Comined apoptic effects of peptide and miRNA in a peptide/miRNA nanocomplex. *Journal of Bio-science and Bioengineering*. 2019;128(1):110-116. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.01.003>
95. Zhuang C, Piao C, Choi M, et al. Delivery of MiRNA-92a Inhibitor Using RP1-Linked Peptide Elicits Anti-Inflammatory Effects in an Acute Lung Injury Model. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2021;17(7):1273-1283. DOI:
<https://doi.org/10.1166/jbn.2021.3102>
96. Razooky BS, Obermayer B, O'May JB, et al. Viral Infection Identifies Micropeptides Differentially Regulated in smORF-Containing lncRNAs. *Genes*. 2017;8(8):206. DOI:
<https://doi.org/10.3390/genes8080206>
97. Zhang Y, Zhu M, Zhang X, et al. Micropeptide vsp21 translated by Reovirus circular RNA 000048 attenuates viral replication. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022;209A:1179-1187. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.136>

References

1. Ceraolo C, Giorgi FM. Genomic variance of the 2019-nCoV coronavirus. *Journal of Medical Virology*. 2020;92(5):522-528. DOI:
<https://doi.org/10.1002/jmv.25700>
2. Khailany RA, Safdar M, Ozaslan M. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. *Gene Reports*. 2020;19:100682. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100682>
3. Balestrieri E, Minutolo A, Petrone V, et al. Evidence of the pathogenic HERV-W envelope expression in T-lymphocytes in association with the respiratory outcome of COVID-19 patients. *eBioMedicine*. 2021;66:103341. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103341>
4. Marston JL, Greenig M, Singh M, et al. SARS-CoV-2 infection mediates differential expression of human endogenous retroviruses and long interspersed nuclear elements. *JCI insight*. 2021;6(24):e147170. DOI:
<https://doi.org/10.1172/jci.insight.147170>
5. Lu JY, Shao W, Chang L, et al. Genomic Repeats Categorize Genes with Distinct Functions for Orchestrated Regulation. *Cell Reports*. 2020;30(10):3296-3311.e5. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.048>
6. Yin Y, Liu XZ, He X, et al. Exogenous Coronavirus Interacts With Endogenous Retrotransposon in Human Cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021;11:609160. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.609160>
7. Feschotte C. Transposable elements and the evolution of regulatory networks. *Nature Reviews Genetics*. 2008;9:397-405. DOI:
<https://doi.org/10.1038/nrg2337>
8. Ito J, Sugimoto H, Nakaoka H. Systematic identification and characterization of regulatory elements derived from human endogenous retroviruses. *PLoS Genetics*. 2017;13:e1006883. DOI:
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006883>
9. Qin S, Jin P, Zhou X, et al. The Role of Transposable Elements in the Origin and Evolution of MicroRNAs in Human. *PLoS ONE*. 2015;10:e0131365. DOI:
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131365>
10. Johnson R, Guigo R. The RIDL hypothesis: transposable elements as functional domains of long noncoding RNAs. *RNA*. 2014;20:959-76. DOI: <https://doi.org/10.1261/rna.044560.114>
11. Abascal F, Tress ML, Valencia A. Alternative splicing and co-option of transposable elements: the case of TMPO/LAP2α and ZNF451 in mammals. *Bioinformatics*. 2015;31(14):2257-

2261. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv132>
12. Alzohairy AM, Gyulai G, Jansen RK, et al. Transposable elements domesticated and neofunctionalized by eukaryotic genomes. *Plasmid.* 2013;69(1):1-15. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2012.08.001>
13. Wang J, Zhu S, Meng N, et al. ncRNA-Encoded Peptides or Proteins and Cancer. *Molecular Therapy.* 2019;27(10):1718-1725. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.09.001>
14. Li M, Schifanella L, Larsen PA. Alu retrotransposons and COVID-19 susceptibility and morbidity. *Human Genomics.* 2021;15:2. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40246-020-00299-9>
15. Senchenkova EY, Russell J, Vital SA, et al. A critical role for both CD40 and VLA5 in angiotensin II-mediated thrombosis and inflammation. *FASEB Journal.* 2018;32(6):3448-56. DOI: <https://doi.org/10.1096/fj.201701068R>
16. Ng KW, Attig J, Bolland W, et al. Tissue-specific and interferon-inducible expression of nonfunctional ACE2 through endogenous retroelement co-option. *Nature Genetics.* 2020;52:1294-1302. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41588-020-00732-8>
17. Ramasamy S, Subbian S. Critical Determinants of Cytokine Storm and Type I Interferon Response in COVID-19 Pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews.* 2021;34(3):e00299-20. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00299-20>
18. Del Sole F, Farvomeni A, Loffredo L, et al. Features of severe COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Clinical Investigation.* 2020;50(10):e13378. DOI: <https://doi.org/10.1111/eci.13378>
19. Levin AT, Hanage WP, Owusu-Boaitey N, et al. Assessing age specificity of infection fatality rates for COVID-19: systematic review, meta-analysis, and public policy implications. *European Journal of Epidemiology.* 2020;35:1123-1138. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10654-020-00698-1>
20. Cardelli M. The epigenetic alterations of endogenous retroelements in aging. *Mechanisms of Ageing and Development.* 2018;174:30-46. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mad.2018.02.002>
21. Feng E, Balint E, Poznanski SM, et al. Aging and Interferons: Impacts on Inflammation and Viral Disease Outcomes. *Cells.* 2021;10(3):708. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells10030708>
22. Li J, Huang DQ, Zou B, et al. Epidemiology of COVID-19: A systematic review and meta-analysis of clinical characteristics, risk factors, and outcomes. *Journal of Medical Virology.* 2021;93(3):1449-1458. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.26424>
23. Peters A, Delhey K, Nakagawa S, et al. Immunosenescence in wild animals: meta-analysis and outlook. *Ecology Letters.* 2019;22(10):1709-1722. DOI: <https://doi.org/10.1111/ele.13343>
24. Laderoute MP. A new paradigm about HERV-K102 particle production and blocked release to explain cortisol mediated immunosenescence and age-associated risk of chronic disease. *Discovery medicine.* 2015;20(112):379-391.
25. Ray D, Yung R. Immune senescence, epigenetics and autoimmunity. *Clinical Immunology.* 2018;196:59-63. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2018.04.002>
26. Meftahi GH, Jangravi Z, Sahraei H, et al. The possible pathophysiology mechanism of cytokine storm in elderly adults with COVID-19 infection: the contribution of "inflame-aging". *Inflammation Research.* 2020;69:825-839. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00011-020-01372-8>
27. Mulchandani R, Lyngdoh T, Kakkar AK. Deciphering the COVID-19 cytokine storm: Systematic review and meta-analysis. *European Journal of Clinical Investigation.* 2021;51(1):e13429. DOI: <https://doi.org/10.1111/eci.13429>
28. Mustafin RN, Khusnutdinova EK. The role of transposable elements in endocrine changes during aging. *Advances in Gerontology.* 2020;33(3):418-428. Russian.
29. Huang S, Tao X, Yuan S, et al. Discovery of an Active RAG Transposon Illuminates the Origins of V(D)J Recombination. *Cell.* 2016;166(1):102-114. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.032>
30. Chuong EB, Elde NC, Feschotte C. Regulatory evolution of innate immunity through co-option of endogenous retroviruses. *Science.* 2016;351(6277):1083-1087. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aad54>
31. Chuong EB. The placenta goes viral: Retroviruses control gene expression in pregnancy. *PLoS Biology.* 2018;16:e3000028. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000028>
32. Garcia-Montojo M, Nath A. HERV-W envelope expression in blood leukocytes as a marker of disease severity of COVID-19. *eBiomedicine.* 2021;67:103363. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103363>
33. Yeh EA, Collins A, Cohen ME, et al. Detection of coronavirus in the central nervous system

of a child with acute disseminated encephalomyelitis. *Pediatrics*. 2004;113(1):e73-e76. DOI: <https://doi.org/10.1542/peds.113.1.e73>

34. Bellucci G, Rinaldi V, Buscarini MC, et al. Multiple Sclerosis and SARS-CoV-2: Has the Interplay Started. *Frontiers in Immunology*. 2021;12:755333. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.755333>

35. Durnaoglu S, Lee SK, Ahnn J. Syncytin, envelope protein of human endogenous retrovirus (HERV): no longer ‘fossil’ in human genome. *Animal Cells and Systems*. 2022;25(6):358-368. DOI: <https://doi.org/10.1080/19768354.2021.2019109>

36. Kitsou K, Kotanidou A, Paraskevis D, et al. Upregulation of Human Endogenous Retroviruses in Bronchoalveolar Lavage Fluid of COVID-19 Patients. *Microbiology spectrum*. 2021;9(2):e026021. DOI: <https://doi.org/10.1128/Spectrum.01260-21>

37. Tovo PA, Garazzino S, Dapra V, et al. COVID-19 in Children: Expressions of Type I/II/III Interferons, TRIM28, SETDB1, and Endogenous Retroviruses in Mild and Severe Cases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(14):7481. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22147481>

38. Malfavon-Borja R, Feschotte C. Fighting fire with fire: endogenous retrovirus envelopes as restriction factors. *Journal of Virology*. 2015;89(80):4047-4050. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.03653-14>

39. Jayewickreme R, Mao T, Philbrick W, et al. Endogenous Retroviruses Provide Protection Against Vaginal HSV-2 Disease. *Frontiers in Immunology*. 2022;12:758721. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.758721>

40. Zhou B, Qi F, Wu F, et al. Endogenous retrovirus-derived long noncoding RNA enhances innate immune responses via derepressing RELA expression. *mBio*. 2019;10(4):e00937-19. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.00937-19>

41. Yap MW, Colbeck E, Ellis SA, et al. Evolution of the retroviral restriction gene Fv1: inhibition of non-MLV retroviruses. *PLoS Pathogens*. 2014;10:e1003968. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003968>

42. Kapusta A, Kronenberg Z, Lynch VJ, et al. Transposable elements are major contributors to the origin, diversification, and regulation of vertebrate long noncoding RNAs. *PLoS Genetics*. 2013;9:e1003470. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003470>

43. Wei G, Qin S, Li W, et al. MDTE DB: a database for microRNAs derived from Transposable element. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*. 2016;13(6):1155-1160. DOI: <https://doi.org/10.1109/TCBB.2015.2511767>

44. Lu D, Chatterjee S, Xiao K, et al. MicroRNAs targeting the SARS-CoV-2 entry receptor ACE2 in cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2020;148:46-49. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmcc.2020.08.017>

45. Matarese A, Gambardella J, Sardu C, et al. miR-98 regulates TMPRSS2 expression in human endothelial cells: key implications for COVID-19. *Biomedicines*. 2020;8(11):462. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines8110462>

46. Li C, Hu X, Li L, et al. Differential microRNA expression in the peripheral blood from human patients with COVID-19. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2020;34(10):e23590. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcla.23590>

47. Tang H, Gao Y, Li Z, et al. The noncoding and coding transcriptional landscape of the peripheral immune response in patients with COVID-19. *Clinical and Translational Science*. 2020;10(6):e200. DOI: <https://doi.org/10.1002/ctm2.200>

48. Fernandez-Pato A, Vireda-Berdices A, Resino S, et al. Plasma miRNA profile at COVID-19 onset predicts severity status and mortality. *Emerging Microbes and Infections*. 2022;11(1):676-688. DOI: <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2038021>

49. Haroun RAH, Osman WH, Amin RE, et al. Circulating plasma miR-155 is a potential biomarker for the detection of SARS-CoV-2 infection. *Pathology*. 2022;54(1):104-110. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2021.09.006>

50. Giuliani A, Matachione G, Raimini D, et al. Circulating miR-320b and miR-483-5p levels are associated with COVID-19 in-hospital mortality. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2022;202:111636. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mad.2022.111636>

51. Chen L, Zhong L. Genomics functional analysis and drug screening of SARS-CoV-2. *Genes and Diseases*. 2020;7(4):542-550. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.04.002>

52. Zhang L, Richards A, Barrasa MI, et al. Reverse-transcribed SARS-CoV-2 RNA can integrate into the genome of cultured human cells and can be expressed in patient-derived tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

- 2021;118(21):e2105968118. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2105968118>
- 53.Kazachenka A, Kassiotis G. SARS-CoV-2-Host Chimeric RNA-Sequencing Reads Do Not Necessarily Arise From Virus Integration Into the Host DNA. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12:676693. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.676693>
- 54.Grandi N, Cadeddu M, Blomberg J, et al. Contribution of type W human endogenous retroviruses to the human genome: characterization of HERV-W proviral insertions and processed pseudogenes. *Retrovirology*. 2016;13:67. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12977-016-0301-x>
- 55.Geuking MB, Weber J, Dewannieux M, et al. Recombination of retrotransposon and exogenous RNA virus results in nonretroviral cDNA integration. *Science*. 2009;323(5912):393-396. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1167375>
- 56.Shimizu A, Nakatani Y, Nakamura T, et al. Characterisation of Cytoplasmic DNA complementary to non-retroviral RNA viruses in human cells. *Scientific Reports*. 2014;4:5074. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep05074>
- 57.Austermann-Busch S, Becher P. RNA structural elements determine frequency and sites of nonhomologous recombination in an animal plus-strand RNA virus. *Journal of Virology*. 2012;86(13):7393-7402. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00864-12>
- 58.Olson KE, Bonizzoni M. Nonretroviral integrated RNA viruses in arthropod vectors: an occasional event or something more. *Current Opinion in Insect Science*. 2017;22:45-53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.05.010>
- 59.Katzourakis A, Gifford RJ. Endogenous Viral Elements in Animal Genomes. *PLoS Genetics*. 2010;6:e1001191. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001191>
- 60.Taylor DJ, Leach RW, Bruenn J. Filoviruses are ancient and integrated into mammalian genomes. *BMC Evolutionary Biology*. 2010;10:193. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-193>
- 61.Horie M, Honda T, Suzuki Y, et al. Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature*. 2010;463:84-87. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature08695>
- 62.Belyi VA, Levine AJ, Skalka AM. Unexpected inheritance: multiple integrations of ancient bornavirus and ebolavirus/marburgvirus sequences in vertebrate. *PLoS Pathogens*. 2010;6:e1001030. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001030>
- 63.He WP, Shu CI, Li BA, et al. Human LINE1 endonuclease domain as a putative target of SARS-associated autoantibodies involved in the pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. *Chinese Medical Journal*. 2008;121:608-614.
- 64.Lee JY, Lee WK, Kim DS. Particulate matter-induced hypomethylation of Alu and LINE1 in normal human bronchial epithelial cells and epidermal keratinocytes. *Genes and Environment*. 2022;44(1):8. DOI: <https://doi.org/10.1186/s41021-022-00235-4>
- 65.Aune TM, Tossberg JT, Heinrich RM, et al. Alu RNA Structural Features Modulate Immune Cell Activation and A-to-I Editing of Alu RNAs Is Diminished in Human Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in Immunology*. 2022;13:818023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.818023>
- 66.Crooke 3rd PS, Tossberg JT, Porter KP, et al. Cutting Edge: Reduced Adenosine-to-Inosine Editing of Endogenous Alu RNAs in Severe COVID-19 Disease. *Journal of Immunology*. 2021;206(8):1691-1696. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2001428>
- 67.Cun Y, Shi L, Kulski JK, et al. Haplotype Associations and Differentiation of MHC Class II Polymorphic Alu Insertions at Five Loci With HLA-DRB1 Alleles in 12 Minority Ethnic Populations in China. *Frontiers in Genetics*. 2021;12:636236. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.636236>
- 68.Yamamoto N, Ariumi Y, Nishida N, et al. SARS-CoV-2 infections and COVID-19 mortalities strongly correlate with ACE1 I/D genotype. *Gene*. 2020;758:144944. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144944>
- 69.Mustafin RN, Khusnutdinova EK. The role of transposons in epigenetic regulation of ontogenesis. *Russian Journal of Developmental Biology*. 2018;49(2):69-90. Russian. DOI: <https://doi.org/10.7868/S0475145018020015>
- 70.Shin W, Lee J, Son SY, et al. Human-specific HERV-K insertion causes genomic variations in the human genome. *PLoS ONE*. 2013;8:e60605. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060605>
- 71.Rishishwar L, Tellez Villa CE, Jordan IK. Transposable element polymorphisms recapitulate human evolution. *Mobile DNA*. 2015;6:21. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13100-015-0052-6>
- 72.Rishishwar L, Wang L, Wang J, et al. Evidence for positive selection on recent human transposable element insertions. *Gene*. 2018;675:69-79. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.06.077>

73. Demongeot J, Seligmann H. SARS-CoV-2 and miRNA-like inhibition power. *Medical Hypotheses*. 2020;144:110245. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110245>
74. Liu Z, Wang J, Ge Y, et al. SARS-CoV-2 encoded microRNAs are involved in the process of virus infection and host immune response. *Journal of Biomedical Research*. 2021;35(3):216-227. DOI: <https://doi.org/10.7555/JBR.35.20200154>
75. Mishra R, Banerjea AC. SARS-CoV-2 Spike Targets USP33-IRF9 Axis via Exosomal miR-148a to Activate Human Microglia. *Frontiers in Immunology*. 2021;12:656700. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.656700>
76. Rad AH, McLellan AD. Implications of SARS-CoV-2 Mutations for Genomic RNA Structure and Host microRNA Targeting. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(13):4807. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21134807>
77. Fulzele S, Sahay B, Yusufi I, et al. COVID-19 Virulence in Aged Patients might be Impacted by the Host Cellular MicroRNAs Abundance/Profile. *Aging and Disease*. 2020;11(3):509-522. DOI: <https://doi.org/10.14336/AD.2020.0428>
78. Kreis NN, Ritter A, Louwen F, et al. A Message from the Human Placenta: Structural and Immunomodulatory Defense Against SARS-CoV-2. *Cells*. 2020;9(8):1777. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells9081777>
79. McDonald JT, Enguita FJ, Taylor D, et al. Role of miR-2392 in driving SARS-CoV-2 infection. *Cell Reports*. 2021;37(3):109839. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109839>
80. Howard EW, Yang X. microRNA Regulation in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer and Endocrine Therapy. *Biological Procedures Online*. 2018;20:17. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12575-018-0082-9>
81. Pontecorvi G, Bellenghi M, Ortona E, et al. microRNAs as New Possible Actors in Gender Disparities of Covid-19 Pandemic. *Acta Physiologica*. 2020;230(1):e13538. DOI: <https://doi.org/10.1111/apha.13538>
82. Khavinson VKh, Solovyov AYu, Shataeva LK. Molecular mechanism of interaction between oligopeptides and double-stranded DNA. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2006;141(4):443-447. Russian. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10517-006-0198-9>
83. Huang JZ, Chen M, Chen D, et al. A Peptide Encoded by a Putative lncRNA HOXB-AS3 Suppresses Colon Cancer Growth. *Molecular Cell*. 2017;68(1):171-184. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.015>
84. Fang J, Morsalin S, Rao VN, et al. Decoding of Non-Coding DNA and Non-Coding RNA: Pri-Micro RNA-Encoded Novel Peptides Regulate Migration of Cancer Cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Pharmacology*. 2017;3(1):23-27. DOI: <https://doi.org/10.1166/jpsc.2017.1070>
85. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nature Cell Biology*. 2008;10:593-601. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncb1722>
86. Zuberi M, Mir R, Das J, et al. Expression of serum miR-200a, miR-200b, and miR-200c as candidate biomarkers in epithelial ovarian cancer and their association with clinicopathological features. *Clinical and Translational Oncology*. 2015;17:779-87. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12094-015-1303-1>
87. Kang M, Tang B, Li J, et al. Identification of miPEP133 as a novel tumor-suppressor microprotein encoded by miR-34a pri-miRNA. *Molecular Cancer*. 2020;19:143. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01248-9>
88. Niu L, Lou F, Sun Y, et al. A micropeptide encoded by lncRNA MIR155HG suppresses autoimmune inflammation via modulating antigen presentation. *Science advances*. 2020;6(21):eaaz2059. DOI: <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz2059>
89. Testa U, Pelosi E, Castelli G, et al. miR-146 and miR-155: Two Key Modulators of Immune Response and Tumor Development. *Non-coding RNA*. 2017;3(3):22. DOI: <https://doi.org/10.3390/ncrna3030022>
90. Danner J, Pai B, Wankerl L, et al. Peptide-Based Inhibition of miRNA-Guided Gene Silencing. In: Schmidt M, editor. *Drug Target miRNA. Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press; 2017;1517:199-210. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6563-2_14
91. Suh JS, Lee JY, Choi YS, et al. Peptide-mediated intracellular delivery of miRNA-29b for osteogenic stem cell differentiation. *Biomaterials*. 2013;34(17):4347-4359. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.02.039>
92. Xiao X, Wang X, Wang Y, et al. Multi-Functional Peptide-MicroRNA Nanocomplex for Targeted MicroRNA Delivery and Function Imaging. *Chemistry – A European Journal*.

- 2018;24(9):2277-2285. DOI:
<https://doi.org/10.1002/chem.201705695>
- 93.Shachner-Nedherer AL, Werzer O, Kornmueller K, et al. Biological Activity Of miRNA-27a Using Peptid-based Drug Delivery Systems. International Journal of Nanomedicine. 2019;14:7795-7808. DOI:
<https://doi.org/10.2147/IJN.S208446>
- 94.Kim H, Kitamatsu M, Ohtsuki T. Compined apoptic effects of peptide and miRNA in a peptide/miRNA nanocomplex. Journal of Bio-science and Bioengineering. 2019;128(1):110-116. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.01.003>
- 95.Zhuang C, Piao C, Choi M, et al. Delivery of MiRNA-92a Inhibitor Using RP1-Linked Peptide Elicits Anti-Inflammatory Effects in an Acute Lung Injury Model. Journal of Biomedical Nanotechnology. 2021;17(7):1273-1283. DOI: <https://doi.org/10.1166/jbn.2021.3102>
- 96.Razooky BS, Obermayer B, O'May JB, et al. Viral Infection Identifies Micropeptides Differentially Regulated in smORF-Containing lncRNAs. Genes. 2017;8(8):206. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes8080206>
- 97.Zhang Y, Zhu M, Zhang X, et al. Micropeptide vsp21 translated by Reovirus circular RNA 000048 attenuates viral replication. International Journal of Biological Macromolecules. 2022;209A:1179-1187. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.136>

Статья поступила в редакцию 13 сентября 2022 г.

Поступила после доработки 5 декабря 2022 г.
Принята к печати 23 апреля 2023 г.

Received 13 September 2022

Revised 5 December 2022

Accepted 23 April 2023

Информация об авторах

Рустам Наилевич Мустафин, кандидат биологических наук, доцент кафедры медицинской генетики и фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», г. Уфа, Российская Федерация, E-mail: ruji79@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4091-382X>.

Эльза Камилевна Хуснутдинова, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент Российской академии образования, академик Академии Наук Республики Башкортостан, директор Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения ФГБНУ Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук; заведующий кафедрой генетики и фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Уфимский университет науки и технологий», г. Уфа, Российская Федерация, E-mail: elzakh@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2987-3334>.

Information about the authors

Rustam N. Mustafin, Cand. Sci. (Biology), Associate Professor of the Department of Medical Genetics and Fundamental Medicine, Bashkir State Medical University, Ufa, Russia, E-mail: ruji79@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4091-382X>.

Elza K. Khusnutdinova, Doct. Sci. (Biology), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Education, Academician of the Academy of Sciences of the Republic of Bashkortostan, Director of the Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center of RAS; Head of the Department of Genetics and Fundamental Medicine, Ufa University of Science and Technology, Ufa, Russia, E-mail: elzakh@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2987-3334>.



DOI: 10.18413/2658-6533-2023-9-4-0-2

УДК 579.61

Study of microbiome aberrations in patients with irritable bowel syndrome with diarrhea by next-generation sequencing

Yuliya D. Smirnova^{1,2} , Mariya V. Gryaznova^{1,2} , Inna Yu. Burakova^{1,2} ,
Mikhail Yu. Syromyatnikov^{1,2} , Tatyana N. Sviridova^{3,4} ,
Olga P. Lebedeva^{1,5} , Alexander Y. Maslov⁶ , Vasily N. Popov^{1,2}

¹ Voronezh State University of Engineering Technologies,
19 Revolutsii Ave., Voronezh, 394036, Russia

² Voronezh State University,

1 Universitetskaya Sq., Voronezh, 394018, Russia

³ Burdenko Voronezh State Medical University,
10 Studentskaya St., Voronezh, 394036, Russia

⁴ Olympus of Health Family Medicine Center,
23/1 Teatralnaya St., Voronezh, 394036, Russia

⁵ Belgorod State National Research University,
85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia

⁶ Albert Einstein College,

1300 Morris Park Avenue, Bronx, New York, 10461, USA

Corresponding author: Mikhail Yu. Syromyatnikov (syromyatnikov@bio.vsu.ru)

Abstract

Background: Irritable bowel syndrome (IBS) is a common functional disorder of the gastrointestinal tract (GIT). Despite the prevalence of this disease, our understanding of the etiology remains limited. However, there is no doubt that microbial factors play a key role in the pathophysiology of IBS. **The aim of the study:** To investigate the microbiological composition of the intestines of patients with IBS-D. **Materials and methods:** We used the next-generation sequencing (NGS) method, aimed at targeted sequencing of the hypervariable region V3 of the *16S rRNA* gene, which allowed us to study in detail the changes in the microbiome composition in patients. **Results:** An increase in the number of members of the genera *Streptococcus* and *Haemophilus* was revealed in the group of patients with IBS-D, they are mainly represented by opportunistic pathogens and are associated with the development of IBS. At the same time, there was a decrease in bacterial genera: *Ruminococcaceae NK4A214*, *Butyrimonas*, *Christensenellaceae R-7*, *Ruminococcaceae DTU089*, *Coprobacter*, *Enterococcus* and *Sciscionella* compared to the healthy group. Significant results were also obtained in the correlation analysis between bacteria, showing the relationship of bacteria associated with IBS. **Conclusion:** Genetic analysis revealed significant differences between the groups of healthy and IBS patients in the composition of the bacterial microbiome. Our results show that the composition of the gut microbiome changes in people with IBS. Thus, this study contributes to understanding the development of IBS-D in terms of microbiome changes.

Keywords: microbiome; *16S rRNA*; sequencing; irritable bowel syndrome

For citation: Smirnova YuD, Gryaznova MV, Burakova IYu, et al. Study of microbiome aberrations in patients with irritable bowel syndrome with diarrhea by next-generation sequencing. Research Results in Biomedicine. 2023;9(4):446-460. DOI: 10.18413/2658-6533-2023-9-4-0-2

Introduction. IBS is a common functional disorder of the GIT, and it is now clear that this pathology is associated with immune activation and changes in the composition and functions of the intestinal microbiota and the intestinal mucosal barrier [1]. According to studies, the amount of the population worldwide suffering from IBS ranges from 9% to 23%, while the pathophysiology of this disease is still not fully understood [2]. IBS significantly affects the quality of a patient's life and causes several problems in diagnosis and treatment [3]. The diagnosis of IBS is not confirmed by specific tests or structural abnormalities. The Rome IV criteria are currently the gold standard for IBS diagnosing [4]. The use of intestinal biomarkers in clinical practice can become critical to the precise diagnosis of IBS. Gut microbial biomarkers have been reported to have great potential for detecting inflammatory bowel disease (IBD), colorectal cancer, and autoimmune hepatitis [5].

There are three types of IBS depending on the predominant symptom: diarrhea-predominant (IBS-D), constipation-predominant (IBS-C) and IBS with mixed symptoms of both constipation and diarrhea (IBS-M) [6]. In all appearances, IBS-D is the most common subtype, affecting approximately 40% of patients [7]. Emerging evidence suggests that abnormal changes in the gut microbiota are strongly associated with IBS-D [8]. Despite a large number of studies, there is still no universal algorithm for IBS-D treatment [9]. The diagnosis of IBS-D is primarily based on clinical characteristics, and there are no objective diagnostic tests or validated biomarkers for the diagnosis of IBS-D [10].

The aim of the study. Our research is aimed to study the microbiological composition of the intestines of patients with IBS-D using *16S rRNA* gene sequencing on the Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) platform. This work contributes to a better understanding of clinical features and interactions of the IBS-D microbiome and also highlights the

potential applications of bacterial biomarkers in the early diagnosis of IBS.

Materials and methods. A total of 20 patients took part in the study. Ten patients were diagnosed with IBS-D based on a complex of complaints, anamnesis data and clinical symptoms (classified using the Rome IV criteria (2016) for irritable bowel syndrome), as well as laboratory diagnostic data, including the following methods: clinical and biochemical blood tests, determination of antibodies to tissue transglutaminase, gliadin, IgA, IgG in blood serum, determination of the level of thyroid hormones, fecal analysis to detect latent blood, fecal analysis to detect bacteria of the intestinal group (*Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia* spp.); toxins A and B of *Clostridium difficile*; coprogram; analysis of faeces for fecal calprotectin, as well as instrumental research methods: hydrogen breath test with lactulose; ultrasound examination of the abdominal organs. Women were additionally consulted by a gynecologist, according to the indications of pelvic organs ultrasound examination. Ten healthy people without gastrointestinal symptoms were selected with the same method. The selection of patients was carried out at the Olympus of Health Clinic (Voronezh, Russia). All participants gave written consent to the use of their anonymized personal data for research purposes before the examination at the clinic. All procedures were conducted by the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and the Helsinki Declaration of 1964 and later versions. Informed consent or a substitute was obtained from all patients for their participation in the study. The experiment was carried out by the recommendations of the Biomedical Research Ethics Committee of Voronezh State University (protocol No. 42-03 of 10/11/2021).

Fecal samples were obtained from all patients, each sample (approximately 1 gram) was collected into an Eppendorf tube using disinfected plastic equipment after defecation.

The samples were immediately cooled and transported in compliance with temperature control to the laboratory.

To study the microbiome composition of faeces obtained from participants examination, DNA was isolated from samples using the ZymoBiotics DNA Miniprep Kit (Zymo Research, Los Angeles, CA, USA) according to the protocol. During the DNA extraction step, we added a sample containing Milli-Q water used in the laboratory as a negative control. This sample was further treated in the same way as the test samples and was sequenced and analyzed. This step is necessary to exclude contamination of the studied samples during the bioinformatic analysis of sequencing data, which allows obtaining an accurate picture of the microbiome. To study the microbiome, we chose the hypervariable region V3 of the *16S rRNA* gene. We used a pair of universal primers 337F, 518R for targeted amplification of the study area. Amplification was performed using 5×ScreenMix-HS Master Mix kit (Evrogen, Moscow, Russia) under the following temperature conditions: 94 °C for 4 min; 37 cycles of 94 °C for 30s, 53 °C for 30s, and 72 °C for 30s; and final elongation at 72 °C for 5 min. Then we proceeded to prepare sequencing libraries for the Ion Torrent PGM platform. For this, we used the commercial NEB-Next Fast DNA Library Prep Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. The libraries were barcoded using NEXTflex DNA Barcodes – Ion Torrent-Compatible – 64 adapters (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA). The libraries were then purified with MPureXP magnetic particles (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) and quality controlled by qPCR using the Ion Torrent Platforms Library Quantification Kit (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA). Sequencing was performed on the Ion Torrent PGM system using the Ion PGM Hi-Q View OT2 Kit (ThermoFisher Scientific, Madison, WI, USA) and the Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific, Madison, WI, USA) reagents.

Sequences for each sample were obtained in BAM format. For further analysis, we converted the files to the FASTQ format

(FileExporter plugin). Raw sequencing data were available from the NCBI BioProject database (BioProjectID: PRJNA 817720). Bioinformatics processing and phylogenetic analysis of the obtained data were performed using the R programming language in the R-studio environment (VSEARCH v.2.8.2 software). All received reads were subjected to the processes of filtering low-quality sequencing reads, as well as trimming the reads to a constant length and demultiplexing. Filtering was carried out using the maximum expected error threshold equal to 1.0 (DADA2 package). At the end of these manipulations, we performed dereplication, which combined all identical sequencing reads into unique sequences. Then we proceeded to search for operational taxonomic units (OTUs). Taxonomy at the genus level was determined with 100% identity with amplicon sequence variants using version 132 of the SILVA database (<https://www.arb-silva.de>, accessed 30 August 2022). Using the phyloseq package, we combined the obtained phylogenetic data. At this stage, we carried out the identification and subsequent removal of possible laboratory contaminants (decontam package). After that we proceeded to taxonomic filtering, assessment of the prevalence in samples of individual taxa and agglomeration (phyloseq package).

To compare relative abundances between experimental groups, we used the generalized linear modelling (GLM) method implemented in the DeSEQ2 R package. P-values for each OTU are obtained using with Benjamini-Hochberg multiple inference correction. Alpha diversity for each group was calculated with the Shannon and Chao1 indexes. We use the nonparametric Mann-Whitney test and pairwise adjusted (Holm) p-values to assess differences in alpha diversity scores between groups. Beta diversity was represented by Principal Coordinate Analysis (PCoA), and the distance between the microbial compositions of the samples was calculated using Bray-Curtis dissimilarity. The presence of statistically significant differences in microbial composition between the two study groups was assessed using permutation multivariate analysis

of variance (PERMANOVA). Diversity visualization was performed using the phyloseq package. The correlation of the genera for each group was statistically analyzed using the Spearman correlation. All the used genera nodes were $R > |0.8|$ and $p \leq 0.05$.

Results and discussion. Progress in the development of high-throughput sequencing methods and bioinformatics tools has led to a shift from clinical microbiology to a genomic nature of research. NGS has expanded our understanding of the human microbiome by

allowing the detection and characterization of non-cultivable microbes [11]. This work included a study of the microbiome profile at the genus level in 20 patients who were divided into two equal groups. As a result of sequencing, we obtained 767362 reads in total, which corresponded to 229 genera. For further analysis, all bacterial genera, the total abundance of which was less than 0.005 for each research group, were combined into Other genus. Figure 1 shows the most common bacterial genera found in patients.

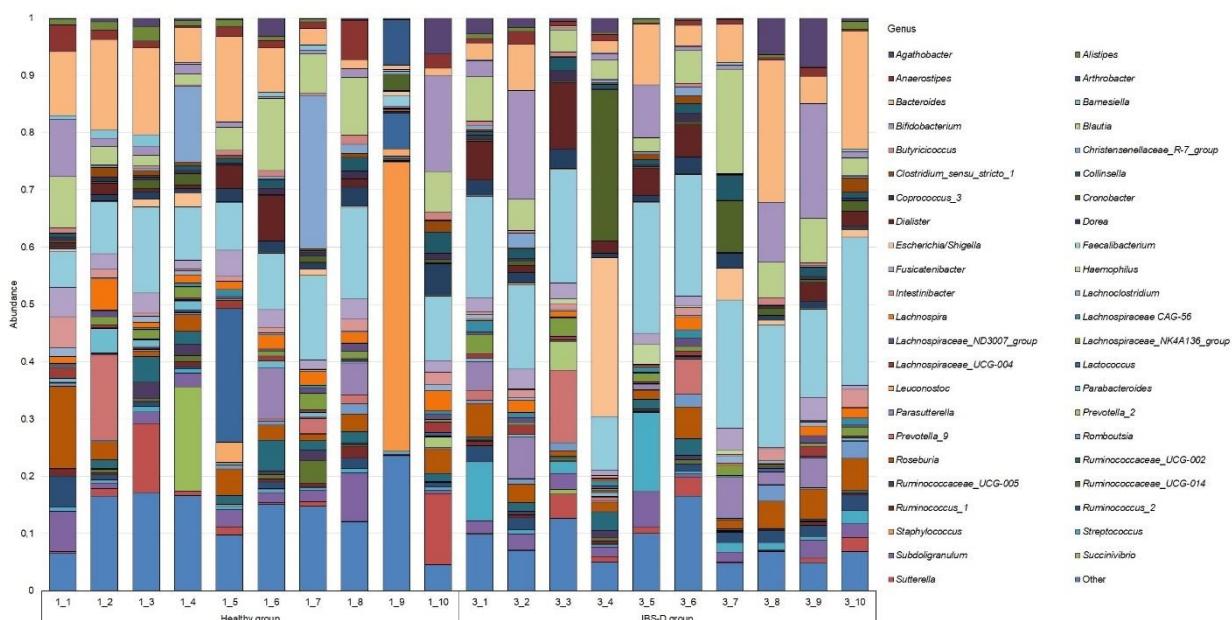


Fig. 1. The abundance of the top 46 most common bacterial genus in groups

The distribution of the most enriched genera was different between groups (Fig.2).

Members of the genus *Faecalibacterium* predominated in both groups, in the healthy group it was 0.1020 ± 0.0138 while in the disease group it was 0.1907 ± 0.0152 . The next largest genus in both cases is *Bacteroides* 0.0776 ± 0.0194 in the healthy group vs. 0.0844 ± 0.0258 in the IBS-D. The next in the healthy group were *Blautia* 0.0569 ± 0.0128 , *Staphylococcus* 0.0508 ± 0.0504 , *Christensenellaceae R-7 group* 0.0438 ± 0.0280 , *Roseburia* 0.0375 ± 0.0126 , *Bifidobacterium* 0.0348 ± 0.0174 , *Lactococcus* 0.0310 ± 0.0233 ,

Sutterella 0.0294 ± 0.0155 and *Subdoligranulum* 0.0284 ± 0.0086 . At the same time in the IBS-D group the next genus dominated: *Bifidobacterium* 0.0655 ± 0.0244 , *Blautia* 0.0636 ± 0.0145 , *Cronobacter* 0.0413 ± 0.0262 , *Dialister* 0.0383 ± 0.0111 , *Escherichia/Shigella* 0.0367 ± 0.0273 , *Roseburia* 0.0361 ± 0.0632 , *Streptococcus* 0.0336 ± 0.0148 and *Parasutterella* 0.0281 ± 0.0095 .

A comparative assessment of alpha diversity, calculated using the Shannon and Chao1 indexes, is shown in Figure 3.

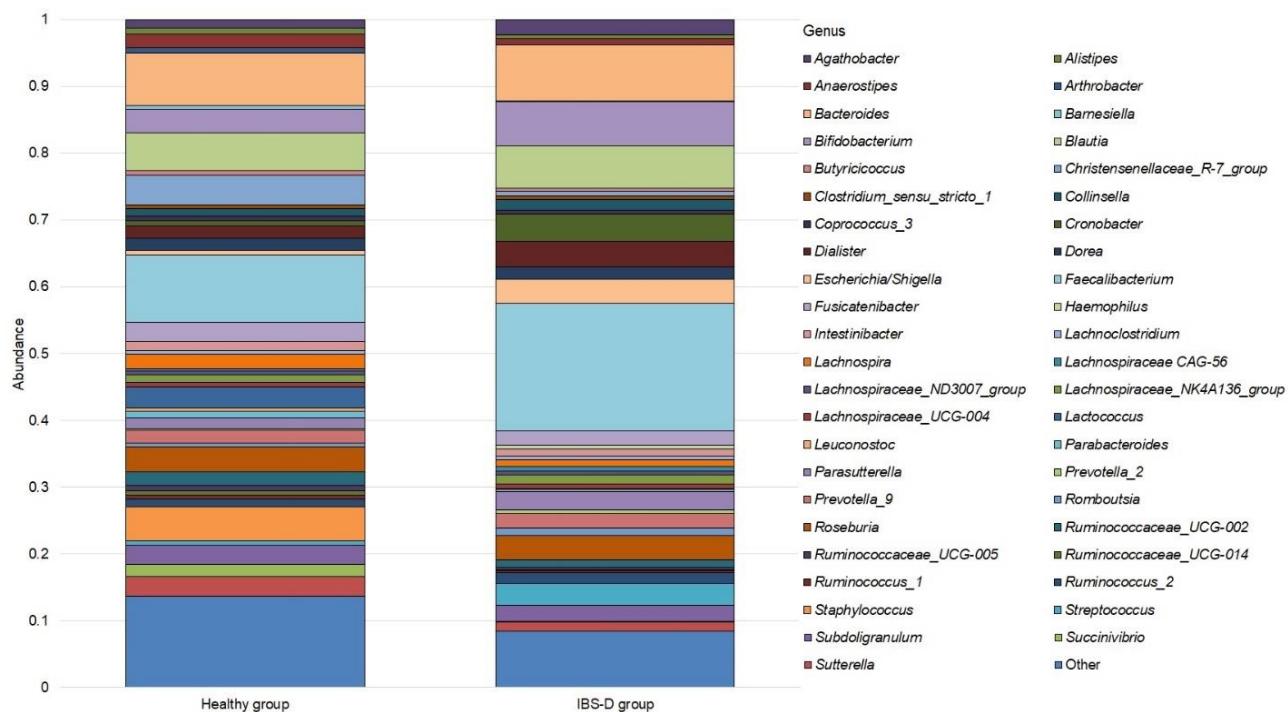


Fig. 2. Distribution of bacteria genera in each group

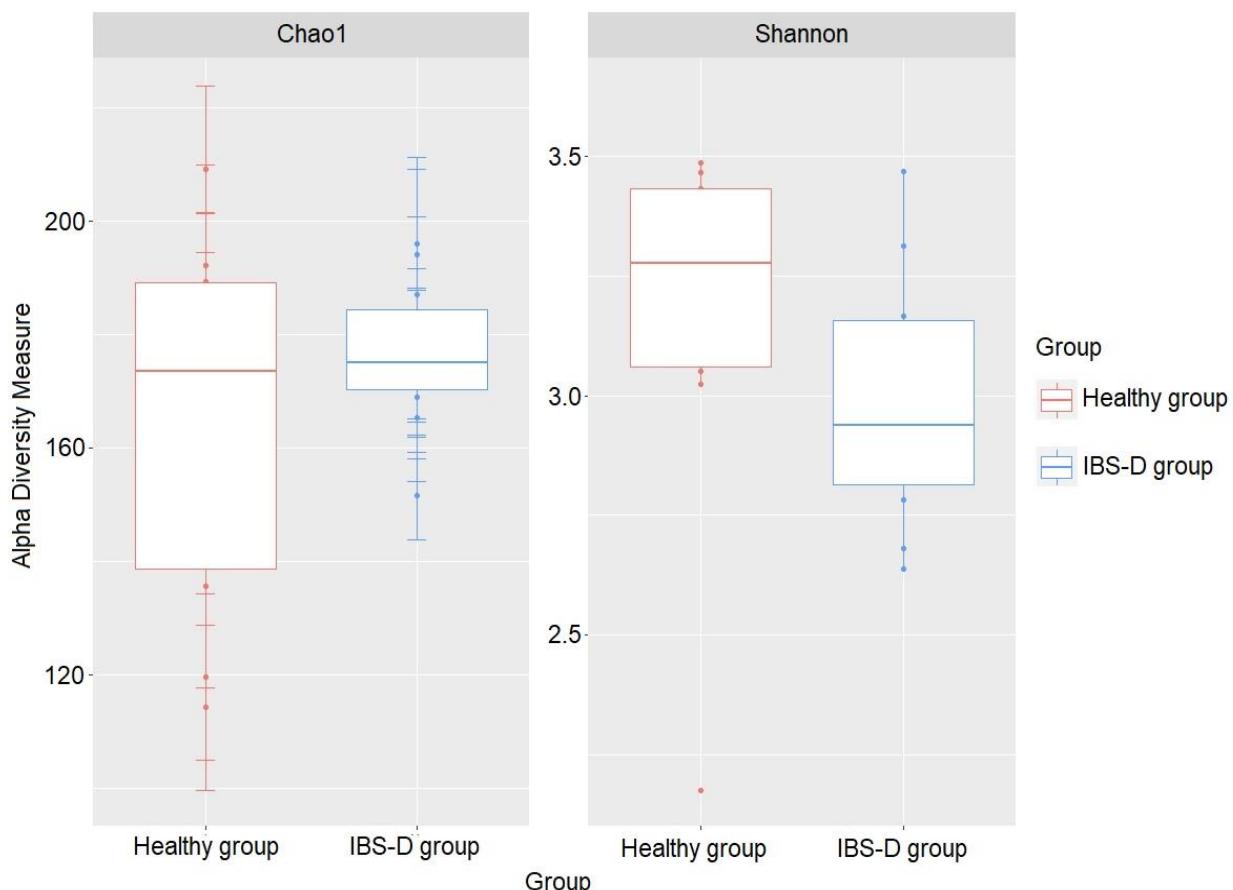


Fig. 3. Alpha diversity scores for the control group and the IBS-D group

There were no statistically significant differences in alpha diversity scores on both tests between groups (Shannon Index, non-parametric Mann-Whitney test with Holm. corrected p=0.32).

Beta diversity is shown by the dissimilarity

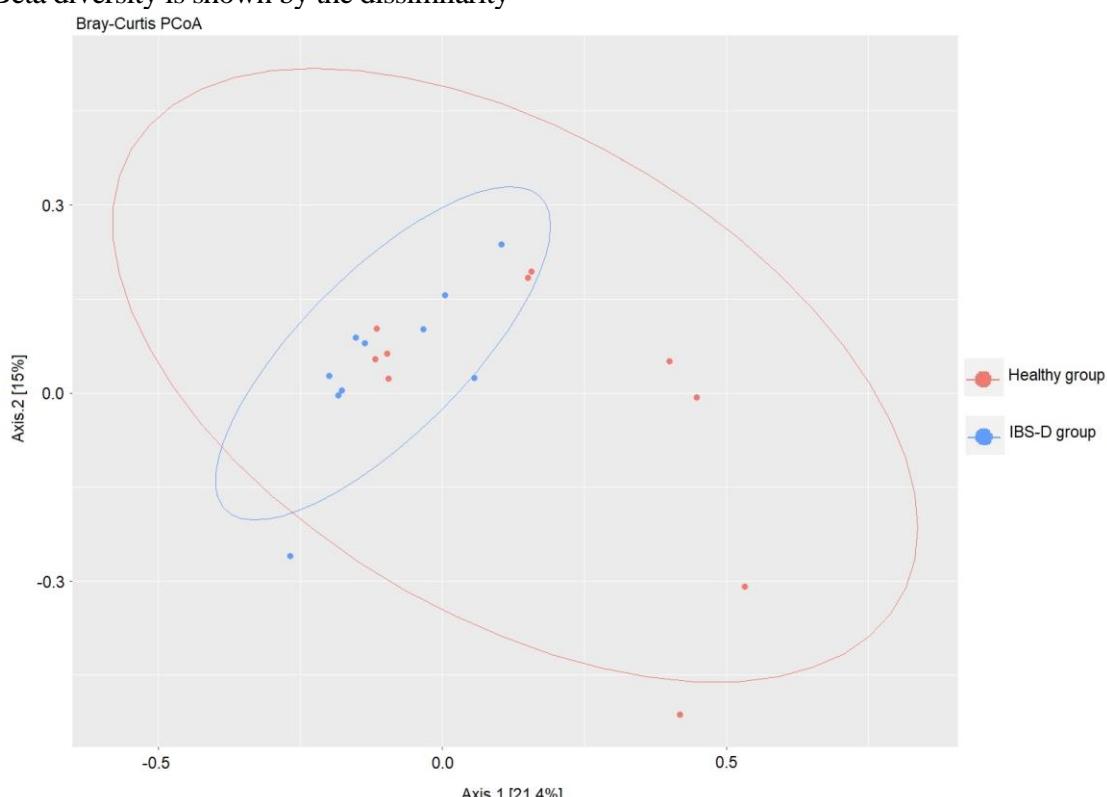


Fig. 4. Beta diversity for the control and the IBS-D is grouped by the bacterial compositional dissimilarities

Analysis of differences in microbiome composition in the IBS-D group compared with the healthy group at the genus level was performed using the DeSEQ2. P-values for each OTU are obtained using with Benjamini-Hochberg multiple inference correction. As a result, statistically significant differences were found for nine genera (Fig. 5).

According to the data obtained in the group of IBS-D patients, an increased number of two genus *Streptococcus* by 2.1586 times (p=0.0002) and *Haemophilus* by 4.6669 times (p=0.0001) was observed compared with the control. At the same time, in the group of patients, a decrease in the genera *Ruminococcaceae NK4A214 group* by 2.2899 times (p=0.0019), *Butyrimonas* by 2.7718 times (p=0.0015), *Christensenellaceae R-7 group* by 2.9933 times (p=0.0004), *Ruminococcaceae*

among samples according to the microbial composition depicted in the PCoA analysis (Bray-Curtis). According to our data the microbial composition of the healthy and the IBS-D groups was not different (Fig. 4).

DTU089 by 3.6969 times (p=0.0002), *Coprobacter* by 3.7335 times (p=0.0016), *Enterococcus* by 4.1824 times (p=0.0001) and *Sciscionella* by 7.3759 times (p=0.0006) was registered compared to the healthy group.

Spearman's correlation analysis using a two-tailed p-value showed that in the healthy group there is a complete correlation ($R=1.0$, $p<0.05$) between the genus *Kosakonia* and the genera *Ochrobactrum* (p=0.0111) and *Pseudochrobactrum* (p=0.0111); *Sporobacter* and *Alloscardovia* (p=0.0111); *Brevundimonas* and *Phyllobacterium* (p=0.0111). In the IBS-D group, we observed a complete correlation between the genera *Corynebacterium* and *Erysipelatoclostridium* (p=0.0001); the genus *Leucobacter* and the genera *Polymorphobacter* (p=0.0014) and *Phyllobacterium* (p=0.0014); *Polymorphobacter* and *Phyllobacterium* (p=0.0014).

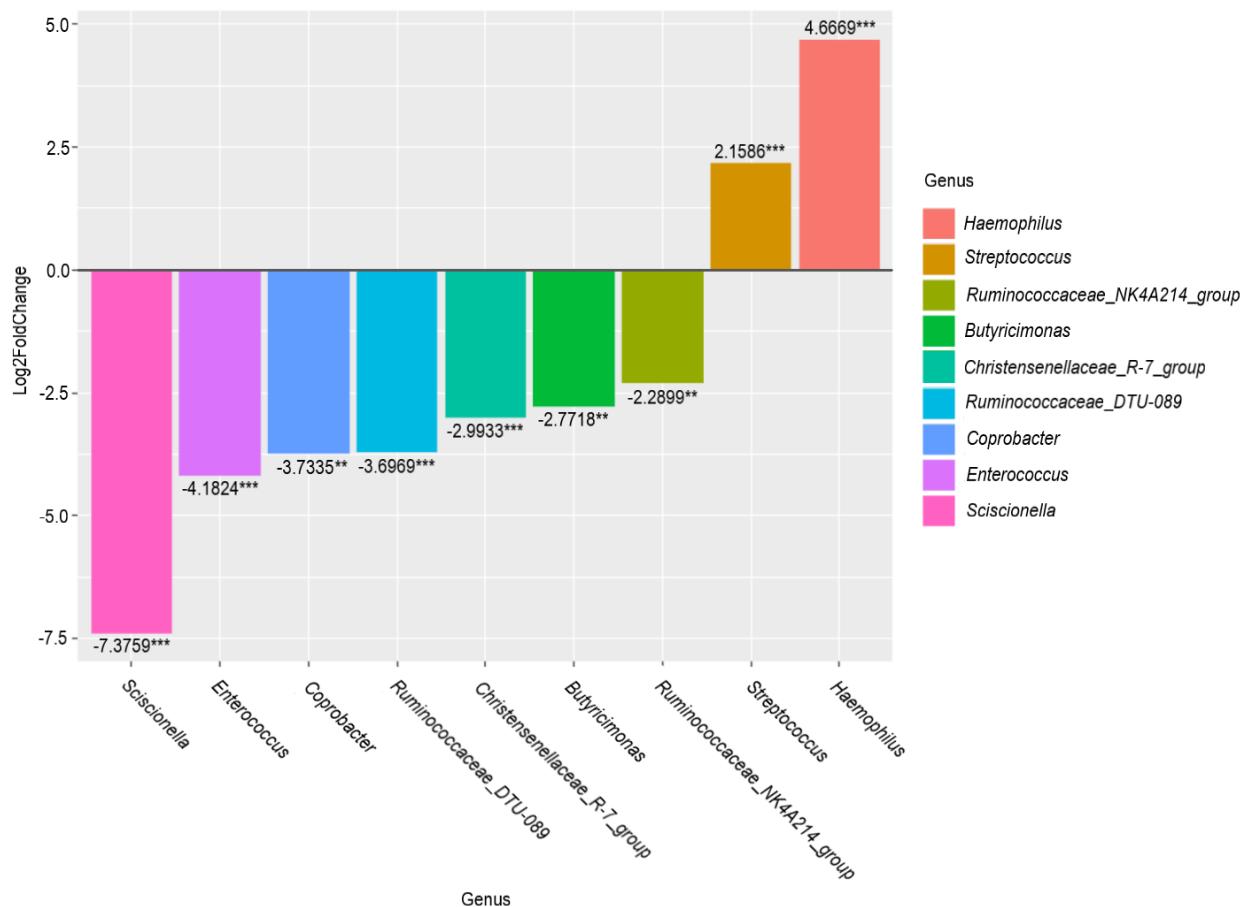


Fig. 5. Quantitative changes in the genetic composition of the intestinal microbiome in a group of IBS-D patients compared with the healthy group (**p < 0.01, ***p < 0.001)

The genus *Faecalibacterium*, which was characterized by the highest abundance in both groups, directly correlated in the control group with the genera *Tyzzerella* ($R=0.8061$, $p=0.0072$), *Peptococcus* ($R=0.8815$, $p=0.0014$), *Ruminococcaceae V9D2013 group* ($R=0.8283$, $p=0.0052$), *Negativibacillus* ($R=0.8182$, $p=0.0058$), *Ruminiclostridium 5* ($R=0.8571$, $p=0.0025$), *Oscillospira* ($R=0.8303$, $p=0.0047$), *Faecalitalea* ($R=0.8942$, $p=0.0011$), *Anaerofilum* ($R=0.8598$, $p=0.0029$). In the group of patients with IBS-D, *Faecalibacterium* was negatively correlated only with the genus *Anaerostipes* ($R=-0.8303$, $p=0.0047$).

The use of NGS methods aimed at targeted sequencing of hypervariable regions of the *16S rRNA* gene makes it possible to study in detail changes in the taxonomic composition compared to classical microbiological approaches.

Our study revealed changes in the composition of the gut microbiota in patients with

IBS-D. In particular, an increase in the number of bacteria of the genera *Streptococcus* and *Haemophilus* was found.

The genus *Streptococcus* belongs to phylum Firmicutes and consists of 104 recognized species, including both commensal and pathogenic microorganisms [12]. Since the limitation of our research method is the impossibility of identifying bacteria to the species, we cannot reliably state the number of which beneficial or pathogenic members of this genus increased. However, our results are consistent with previous findings that an increase in *Streptococcus* bacteria may cause IBS symptoms [13-16].

The genus *Haemophilus* belongs to the family *Pasteurellaceae* and the class Gammaproteobacteria [17]. Members of this genus are ubiquitous in the human oral cavity, upper respiratory tract and intestines [18]. The genus consists of a variety of species, including some

that are pathogenic to humans [19]. It was previously noted that in IBS, the content of bacteria of the genus *Haemophilus* increases [20, 21, 22]. In our study, we also observed an increase in the number of members of this genus. It can be concluded that most likely these bacteria do play an important role in the development of IBS.

We also observed a decrease in the number of bacteria of some genera, in particular *Ruminococcaceae NK4A214 group*. Microorganisms belonging to this genus are producers of butyrate [23]. Bacteria that produce short-chain fatty acids (SCFAs) are known to be generally reduced in the faeces of people with IBS compared to healthy people, consistent with our results [24].

We found a decrease in the members of the genus *Butyrimonas* in patients with IBS-D. Members of this genus are Gram-negative anaerobic bacteria belong to butyrate producers [25]. They are present in the intestinal tract of several mammals, including rats and humans [26]. A hypothesis based on research data suggests that *Butyrimonas* species have a positive effect on the host's energy metabolism and are also involved in commensal homeostasis between the gut microbiota and the health status of the host. Treatment of metabolic disorders with metformin and statins has been shown to significantly increase the relative abundance of *Butyrimonas* spp. in the intestine, which significantly correlated with metabolic parameters [27, 28]. However, the metabolic mechanisms by which *Butyrimonas* exerts metabolic improvements are not understood. According to some studies, bacteria of this genus have therapeutic potential and are used as one of the components of the prevention and treatment of IBS in patients [29]. Thus, our study also showed a positive effect on the human body and an exceptional correlation with IBS-D.

Also, the results of our study indicate the depletion of the genus *Christensenellaceae R-7 group* in patients with IBS-D. This genus belongs to the family *Christensenellaceae*, which was recently isolated from the human intestine and shows a strong relationship with the health of the host [30]. The relationship between the

high number of the *Christensenellaceae R-7 group* and normal body mass index (BMI) is known [30, 31]. *Christensenellaceae* family and the genus *Christensenellaceae R-7 group* in particular is also known to be depleted in IBD patients such as ulcerative colitis and Crohn's disease [32]. Several studies have also reported a reduction in the number of *Christensenellaceae* in IBS, a gastrointestinal disorder characterized by abdominal pain and abnormal bowel movements, compared with healthy individuals. Several studies have noted a positive correlation between *Christensenellaceae* and longer transit times or even constipation. In our study, we studied the microbiota in patients with IBS-D, which is characterized by diarrhea. Thus, our observations are consistent with the findings that *Christensenellaceae* is depleted under conditions associated with inflammation and rapid transit [33, 34, 35].

The *Ruminococcaceae* family has been identified as one of the biomarkers of healthy microbiota [36]. In our study, we found a decrease in the genus *Ruminococcaceae DTU-089* in the IBS-D patient group, however, no statistically significant aberrations were observed at the level of the *Ruminococcaceae* family compared to the healthy group. This genus is poorly researched and its role and mechanisms in the human gut are not fully understood. It is only known that some bacteria *Ruminococcaceae DTU-089* can produce methane [37]. The degree of methane production is associated with greater severity of constipation in IBS-C, however, in our study, the type of IBS associated with diarrhea was studied, which may explain the decrease in methane-producing microorganisms, particularly *Ruminococcaceae DTU-089* [38]. One study investigating the effects of arabinogalactan on the gut microbiome showed that it modulates the gut microbiome by significantly reducing Firmicutes and increasing Bacteroidetes and *Bifidobacterium* as well as *Ruminococcaceae DTU-089*. It can also modulate the metabolic functions of the gut microbiota [37]. Based on the available literature data, further studies of the genus *Ruminococcaceae DTU-089* and its

functional and metabolic effects in the human intestine are needed.

It is known that the bacterial genus *Coprobacter* belongs to the family *Porphyromonadaceae*, the order Bacteroidales and the type Bacteroidetes [38]. It is known that members of the genus *Coprobacter* are widely distributed in the human intestinal microbiota and are noted as a genus capable of producing propionic acid [39, 40]. In our study, this genus of bacteria showed a decrease in the population with IBS. However, the significance of members of the genus *Coprobacter* on human health is still not fully known.

Enterococcus is an important pathogen that can damage the intestinal mucosa and thereby cause dysfunction of the immune defenses in patients with IBS [41]. A systematic review of studies by Zhuang and colleagues (2017) found a higher level of *Enterococcus* in patients with IBS compared with healthy people [42]. However, according to the results of our study, a decrease in the number of this bacterial genus was noted in patients with diagnosed IBS in comparison with the healthy group.

The bacterial genus *Sciscionella*, first described in 2009, belongs to Gram-positive, aerobes, marine actinomycetes [43]. Data reporting an association of the genus *Sciscionella* with symptoms of IBS has not been described. According to the results of our study, in the IBS-D group, members of this genus decreased in comparison with the control group. Previously, this bacterial genus was associated with the development of infection in humans [44]. Also, in a study by Sáez-Nieto et al. (2021), the genus *Sciscionella* was identified in isolates of clinical specimens [45].

Spearman's correlation analysis using a two-tailed p-value showed that in the healthy group there is a complete correlation ($R=1.0$, $p<0.05$) between the genus *Kosakonia* and the genera *Ochrobactrum* ($p=0.0111$) and *Pseudochrobactrum* ($p=0.0111$); *Sporobacter* and *Alloscardovia* ($p=0.0111$); *Brevundimonas* and *Phyllobacterium* ($p=0.0111$). In the IBS-D group, we observed a complete correlation between the genera *Corynebacterium* and *Erysip-*

pelatoclostridium ($p=0.0001$); the genus *Leucobacter* and the genera *Polymorphobacter* ($p=0.0014$) and *Phyllobacterium* ($p=0.0014$); *Polymorphobacter* and *Phyllobacterium* ($p=0.0014$).

The bacterial genera *Ochrobactrum* and *Pseudochrobactrum* belong to the family *Burkholderiaceae* [46, 47]. These genus shows resistance to antibiotics [48]. The bacterial genus *Ochrobactrum* is considered opportunistic for humans, producing the development of infection in an organism with a weakened immune system [49].

Members of the genus *Alloscardovia*, considered to be anaerobic bacteria, are referred to as *Bifidobacterium* and have been identified in various biological specimens: urine, blood, oral cavity, urethral specimens, tonsil and lung abscess specimen, and aorta [50, 51]. In turn, members of the genus are considered pathogenic for the body associated with infectious diseases [52, 53]. Also associated with infectious diseases is the bacterial genus *Brevundimonas* [54].

Members of the genus *Phyllobacterium* are nonpathogenic bacteria that were first isolated from leaf nodules of some plant families [55]. However, a high number of members of *Phyllobacterium* was noted in gastric carcinoma and cystic fibrosis, as well as in gastric cancer [56, 57, 58].

Members of the genus *Corynebacterium* are typical human skin bacteria often found in the nasal cavity [59]. Literature data on association with inflammatory processes in the body were not found. It is also known that the genus *Leucobacter* contains genes encoding glycoside hydrolases and carbohydrate binding modules that are directed to the breakdown of starch and oligosaccharides [60]. Previous studies have noted that patients with gout have an increased number of opportunistic microorganisms of the bacterial genus *Erysipelo-*
clostridium in the fecal microbiome [61]. But literature data confirming the relationship of these bacteria with intestinal health was not found. There are also no data on the association of the bacterial genera *Kosakonia*, *Sporobacter*, *Polymorphobacter* with the intestinal microbiome.

The genus *Faecalibacterium*, which was characterized by the highest abundance in both groups, directly correlated in the control group with the genera *Tyzzerella*, *Peptococcus*, *Ruminococcaceae V9D2013 group*, *Negativibacillus*, *Ruminiclostridium 5*, *Oscillospira*, *Faecalitalea*, *Anaerofilum*. Members of the genera *Tyzzerella*, *Peptococcus* and *Negativibacillus* are normal colonizers of the human intestine, but an increase in their number may be associated with the appearance of various pathologies, including the digestive tract [61-66]. Members of the genus *Ruminiclostridium 5* and *Oscillospira* can produce butyrate and are associated with positive effects on host health, a direct association of abundance with low fat, in addition to solid feedback with IBD [67, 68, 69]. *Faecalitalea* and *Anaerofilum* are also potentially beneficial bacterial genera that play an essential role in the pathogenesis of diabetes mellitus and reduce insulin secretion, as well as having an inverse relationship with overweight [70, 71].

In the group of patients with IBS-D, *Faecalibacterium* was negatively correlated only with the genus *Anaerostipes* which is considered one of the key intestinal genera associated with human health and disease, as its members are capable of producing butyrate, which is known to have beneficial effects on intestinal functions [72].

Thus, in the group with IBS, we observed an increase in such genera as *Streptococcus* and *Haemophilus*, which are mainly represented by opportunistic pathogens and, in accordance with the literature data, are associated with the development of IBS. At the same time, we found a decrease in SCFA-producing bacteria such as *Ruminococcaceae NK4A214 group*, *Butyrimonas* and *Coprobacter* in the group of IBS patients. Significant results were also obtained in the correlation analysis between bacteria, showing the relationship of bacteria associated with IBS. However, our study has a limitation of a relatively small sample size, but this is comparable to sample sizes in similar published studies. Together with previously published data, our results show that the composition of the gut microbiome changes in people with IBS.

Conclusion. We found significant differences between the groups of healthy and IBS patients in the composition of the bacterial microbiome. Thus, this study contributes to understanding the development of IBS-D in terms of microbiome changes, which may lead to the development of new strategies in the preventive diagnosis and treatment of this disease in the future. All this emphasizes the need for further work aimed at studying the microbiome composition and its contribution to the development of IBS-D.

Financial support

This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation in the framework of the "Science" national project (project FZGW-2020-0001, unique number of the Register of State Tasks 075001X39782002).

Conflict of interests

The authors have no conflict of interest to declare.

References

1. Raskov H, Burcharth J, Pommergaard HC, et al. Irritable bowel syndrome, the microbiota and the gut-brain axis. *Gut Microbes*. 2016;7(5):365-383. DOI: <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1218585>
2. Saha L. Irritable bowel syndrome: pathogenesis, diagnosis, treatment, and evidence-based medicine. *World Journal of Gastroenterology*. 2014;20(22):6759-6773. DOI: <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i22.6759>
3. Defrees DN, Bailey J. Irritable Bowel Syndrome: Epidemiology, Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Primary Care - Clinics in Office Practice*. 2017;44(4):655-671. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pop.2017.07.009>
4. Radovanovic-Dinic B, Tesic-Rajkovic S, Grgov S, et al. Irritable bowel syndrome - from etiopathogenesis to therapy. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*. 2018;162(1):1-9. DOI: <https://doi.org/10.5507/bp.2017.057>
5. Zhu X, Hong G, Li Y, et al. Understanding of the Site-Specific Microbial Patterns towards Accurate Identification for Patients with Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome. *Microbiology spectrum*. 2021;9(3):e0125521. DOI: <https://doi.org/10.1128/Spectrum.01255-21>

6. Holten KB, Wetherington A, Bankston L. Diagnosing the Patient with Abdominal Pain and Altered Bowel Habits: Is it Irritable Bowel Syndrome? *American Family Physician.* 2003;67(10):2157-2162.
7. Altomare A, Di Rosa C, Imperia E, et al. Diarrhea Predominant-Irritable Bowel Syndrome (IBS-D): Effects of Different Nutritional Patterns on Intestinal Dysbiosis and Symptoms. *Nutrients.* 2021;13(5):1506. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu13051506>
8. Zhan K, Zheng H, Li J, et al. Gut Microbiota-Bile Acid Crosstalk in Diarrhea-Irritable Bowel Syndrome. *BioMed Research International.* 2020;2020:3828249. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/3828249>
9. Lacy BE, Chey WD, Cash BD, et al. Eluxadoline Efficacy in IBS-D Patients Who Report Prior Loperamide Use. *American Journal of Gastroenterology.* 2017;112(6):924-932. DOI: <https://doi.org/10.1038/ajg.2017.72>
10. Kim J, Cho K, Kim JS, et al. Probiotic treatment induced change of inflammation related metabolites in IBS-D patients/double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Food Science and Biotechnology.* 2019;29:837-844. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00717-2>
11. Wensel CR, Pluznick JL, Salzberg SL, Sears CL. Next-generation sequencing: insights to advance clinical investigations of the microbiome. *Journal of Clinical Investigation.* 2022;132(7):e154944. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI154944>
12. Krzyściak W, Pluskwa KK, Jurczak A, et al. The pathogenicity of the *Streptococcus* genus. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 2013;32:1361-1376. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1914-9>
13. Mars RAT, Yang Y, Ward T, et al. Longitudinal Multi-omics Reveals Subset-Specific Mechanisms Underlying Irritable Bowel Syndrome. *Cell.* 2020;182(6):1460-1473. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.007>
14. Kassinens A, Krogjus-Kurikka L, Mäki vuokko H, et al. The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects. *Gastroenterology.* 2007;133(1):24-33. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.04.005>
15. Rajilić-Stojanović M, Biagi E, Heilig HG, et al. Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* 2011;141(5):1792-1801. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.07.043>
16. Xiao L, Liu Q, Luo M, et al. Gut Microbiota-Derived Metabolites in Irritable Bowel Syndrome. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2021;11:729346. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.729346>
17. Pozuelo M, Panda S, Santiago A, et al. Reduction of butyrate- and methane-producing microorganisms in patients with Irritable Bowel Syndrome. *Scientific Reports.* 2015;5:12693. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep12693>
18. Kerr GRD, Forbes KJ, Williams A, et al. An analysis of the diversity of *Haemophilus parainfluenzae* in the adult human respiratory tract by genomic DNA fingerprinting. *Epidemiology and Infection.* 1993;111(1):89-98. DOI: <https://doi.org/10.1017/s0950268800056715>
19. Fink DL, Geme JW. The Genus. *The Prokaryotes.* 2006;1034-1061.
20. Saulnier DM, Riehle K, Mistretta TA, et al. Gastrointestinal microbiome signatures of pediatric patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* 2011;141(5):1782-1791. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.06.072>
21. Mokha JS, Hyams JS. Irritable bowel syndrome. *Pediatric Neurogastroenterology: Gastrointestinal Motility and Functional Disorders in Children: Second Edition.* 2016;399-410.
22. Liu Y, Yuan X, Li L, et al. Increased IgE Immunoglobulin A Production and Immunoglobulin A-Coated Bacteria in Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome. *Clinical and Translational Gastroenterology.* 2020;11(3):e00146. DOI: <https://doi.org/10.14309/ctg.00000000000000146>
23. Chen Z, Radjabzadeh D, Chen L, et al. Association of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes With Gut Microbial Diversity: A Microbiome-Wide Analysis From Population Studies. *JAMA network open.* 2021;4(7):e2118811. DOI: <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.18811>
24. Fredericks E, Theunissen R, Roux S. Short chain fatty acids and monocarboxylate transporters in irritable bowel syndrome. *Turkish Journal of Gastroenterology.* 2020;31(12):840-847. DOI: <https://doi.org/10.5152/tjg.2020.19856>
25. Liu Y, Yu X, Yu L, Tian F, Zhao J, Zhang H, et al. *Lactobacillus plantarum CCFM8610* Alleviates Irritable Bowel Syndrome and Prevents Gut Microbiota Dysbiosis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Pilot Clinical Trial. *Engineering* 2021;7:376-385. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.06.026>

26. Sakamoto M, Tanaka Y, Benno Y, et al. Butyricimonas faecihominis sp. nov. and Butyricimonas paravirosa sp. nov., isolated from human faeces, and emended description of the genus Butyricimonas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2014;64(Pt_9):2992-2997. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijss.0.065318-0>
27. Lee H, Lee Y, Kim J, et al. Modulation of the gut microbiota by metformin improves metabolic profiles in aged obese mice. *Gut Microbes*. 2018;9(2):155-165. DOI: <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1405209>
28. Kim J, Lee H, An J, et al. Alterations in Gut Microbiota by Statin Therapy and Possible Intermediate Effects on Hyperglycemia and Hyperlipidemia. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10:1947. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01947>
29. Simrén M, Wold A, Adlerberth I, et al. inventors. Use of butyricimonas and/or oxalobacter for treating irritable bowel syndrome. Patent WO/2018/046485. 2018 Mar 15.
30. Waters JL, Ley RE. The human gut bacteria Christensenellaceae are widespread, heritable, and associated with health. *BMC Biology*. 2019;17(1):83. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0699-4>
31. Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, et al. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*. 2014;159(4):789-799. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.053>
32. Mancabelli L, Milani C, Lugli GA, et al. Identification of universal gut microbial biomarkers of common human intestinal diseases by meta-analysis. *FEMS Microbiology Ecology*. 2017;93(12):153. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsec/fix153>
33. Hollister EB, Cain KC, Shulman RJ, et al. Relationships of Microbiome Markers With Extraintestinal, Psychological Distress and Gastrointestinal Symptoms, and Quality of Life in Women With Irritable Bowel Syndrome. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2020;54(2):175-183. DOI: <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000001107>
34. Tigchelaar EF, Bonder MJ, Jankipersadsing SA, et al. Gut microbiota composition associated with stool consistency. *Gut*. 2016;65:540-542. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310328>
35. Jalanka J, Major G, Murray K, et al. The Effect of Psyllium Husk on Intestinal Microbiota in Constipated Patients and Healthy Controls. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(2):433. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20020433>
36. Lo Presti A, Zorzi F, Del Chierico F, et al. Fecal and mucosal microbiota profiling in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10:1655. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01655>
37. Chen O, Sudakaran S, Blonquist T, et al. Effect of arabinogalactan on the gut microbiome: A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial in healthy adults. *Nutrition*. 2021;90:111273. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2021.111273>
38. Chatterjee S, Park S, Low K, et al. The degree of breath methane production in IBS correlates with the severity of constipation. *American Journal of Gastroenterology*. 2007;102(4):837-841. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01072.x>
39. Chaplin AV, Efimov BA, Khokhlova EV, et al. Draft Genome Sequence of Coprobacter fastidiosus NSB1T. *Genome Announcements*. 2014;2(2):e00122-14. DOI: <https://doi.org/10.1128/genomea.00122-14>
40. Biasato I, Ferrocino I, Grego E, et al. Gut Microbiota and Mucin Composition in Female Broiler Chickens Fed Diets including Yellow Mealworm (*Tenebrio molitor*, L.). *Animals*. 2019;9(5):213. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani9050213>
41. Chen YJ, Wu H, Wu SD, et al. *Parasutterella*, in association with irritable bowel syndrome and intestinal chronic inflammation. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2018;33(11):1844-1852. DOI: <https://doi.org/10.1111/jgh.14281>
42. Zhuang X, Xiong L, Li L, et al. Alterations of gut microbiota in patients with irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2017;32(1):28-38. DOI: <https://doi.org/10.1111/jgh.13471>
43. Tian XP, Tang SK, Dong JD, et al. *Scissionella marina* gen. nov., sp. nov., a marine actinomycete isolated from a sediment in the northern South China Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2009;59(5):222-228. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijss.0.005231-0>
44. Sinha M, Shivaprakash MR, Chakrabarti A, et al. Bacteraemia caused by *Scissionella marina* in a lymphoma patient: phenotypi-

- cally mimicking Nocardia. *Journal of Medical Microbiology.* 2013;62(6):929-931. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.053561-0>
45. Sáez-Nieto JA, Carrasco G, Pino SD, et al. Identification and antimicrobial susceptibility of Streptomyces and other unusual Actinobacteria clinical isolates in Spain. *New Microbes and New Infections.* 2021;44:100946. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2021.100946>
46. Teyssier C, Marchandin H, De Buochberg MS, et al. Atypical 16S rRNA gene copies in Ochrobactrum intermedium strains reveal a large genomic rearrangement by recombination between rrn copies. *Journal of Bacteriology.* 2003;185(9):2901-2909. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.185.9.2901-2909.2003>
47. Metcalf JL, Wegener Parfrey L, Gonzalez A, et al. A microbial clock provides an accurate estimate of the postmortem interval in a mouse model system. *eLife.* 2013;2:e01104. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.01104>
48. Priest A. Antibiotic resistant bacteria in water environments in Louisville [dissertation]. Kentucky. College of Arts & Sciences Senior Honors Theses; 2018.
49. Teyssier C, Marchandin H, Jean-Pierre H, et al. Molecular and phenotypic features for identification of the opportunistic pathogens Ochrobactrum spp. *Journal of Medical Microbiology.* 2005;54(10):945-953. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46116-0>
50. Mahlen SD, Clarridge JE. Site and clinical significance of Alloscardovia omnicensis and Bifidobacterium species isolated in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology.* 2009;47(10):3289-3293. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00555-09>
51. Naidoo CC, Nyawo GR, Sulaiman I, et al. Anaerobe-enriched gut microbiota predicts pro-inflammatory responses in pulmonary tuberculosis. *eBioMedicine.* 2021;67:103374. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103374>
52. De Seta F, Campisciano G, Zanotta N, et al. The Vaginal Community State Types Microbiome-Immune Network as Key Factor for Bacterial Vaginosis and Aerobic Vaginitis. *Frontiers in Microbiology.* 2019;10:2451. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02451>
53. Kingkaw A, Nakphaichit M, Surattanon N, et al. Analysis of the infant gut microbiome reveals metabolic functional roles associated with healthy infants and infants with atopic dermatitis using metaproteomics. *PeerJ.* 2020;8:e9988. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.9988>
54. Dutta D, Lim SH. Bidirectional interaction between intestinal microbiome and cancer: opportunities for therapeutic interventions. *Biomarker Research.* 2020;8:31. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00211-6>
55. Flores-Félix JD, Silva LR, Rivera LP, et al. Plants Probiotics as a Tool to Produce Highly Functional Fruits: The Case of Phyllobacterium and Vitamin C in Strawberries. *PLoS ONE.* 2015;10(4):e0122281. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122281>
56. Ferreira RM, Pereira-Marques J, Pinto-Ribeiro I, et al. Gastric microbial community profiling reveals a dysbiotic cancer-associated microbiota. *Gut.* 2018;67:226-236. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314205>
57. Boutin S, Graeber SY, Weitnauer M, et al. Comparison of Microbiomes from Different Niches of Upper and Lower Airways in Children and Adolescents with Cystic Fibrosis. *PLoS ONE.* 2015;10(1):e0116029. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116029>
58. Liatsos C, Papaefthymiou A, Kyriakos N, et al. Helicobacter pylori, gastric microbiota and gastric cancer relationship: Unrolling the tangle. *World Journal of Gastrointestinal Oncology.* 2022;14(5):959-972. DOI: <https://doi.org/10.4251/wjgo.v14.i5.959>
59. Ramakrishnan VR, Hauser LJ, Frank DN. The sinonasal bacterial microbiome in health and disease. *Current Opinion in Otolaryngology and Head and Neck Surgery.* 2016;24(1):20-25. DOI: <https://doi.org/10.1097/MOO.0000000000000221>
60. Weon HY, Anandham R, Tamura T, et al. Leucobacter denitrificans sp. nov., isolated from cow dung. *Journal of Microbiology.* 2012;50:161-165. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12275-012-1324-1>
61. Yu D, Meng X, de Vos WM, et al. Implications of Gut Microbiota in Complex Human Diseases. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021;22(23):12661. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms222312661>
62. Kulinich A, Wang Q, Duan XC, et al. Biochemical characterization of the endo- α -N-acetylgalactosaminidase pool of the human gut symbiont *Tyzzerella nexilis*. *Carbohydrate Research.* 2020;490:107962. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.107962>
63. Daniel N, Choi B, Houde V, et al. Dietary Proteins Relevant to Human Consumption Impact the Development of Obesity and Type 2 Diabetes in Association with Major Changes in the Gut

Microbiota in a Mouse Model (OR27-03-19). Current Developments in Nutrition. 2019;3(1):nzz046.OR27-03-19. DOI: <https://doi.org/10.1093/cdn/nzz046.OR27-03-19>

64. Wang H, Wei CX, Min L, et al. Good or bad: gut bacteria in human health and diseases. Biotechnology and Biotechnological Equipment. 2018;32(5):1075-1080. DOI: <https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1481350>

65. Gryaznova MV, Solodskikh SA, Paneyina AV, et al. Study of microbiome changes in patients with ulcerative colitis in the Central European part of Russia. *Heliyon*. 2021;7(3):e06432. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06432>

66. Ricaboni D, Mailhe M, Vitton V, et al. "Negativibacillus massiliensis" gen. nov., sp. nov., isolated from human left colon. New Microbes and New Infections. 2017;17:36-38. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2016.11.002>

67. Louis P, Young P, Holtrop G, et al. Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA:acetate CoA-transferase gene. Environmental Microbiology. 2010;12(2):304-314. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02066.x>

68. Thompson RS, Gaffney M, Hopkins S, et al. Ruminiclostridium 5, Parabacteroides distasonis, and bile acid profile are modulated by prebiotic diet and associate with facilitated sleep/clock realignment after chronic disruption of rhythms. Brain, Behavior, and Immunity. 2021;97:150-166. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.07.006>

69. Yang J, Li Y, Wen Z, et al. Oscillospira - a candidate for the next-generation probiotics. Gut Microbes. 2021;13(1):1987783. DOI: <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1987783>

70. Ma Q, Li Y, Wang J, et al. Investigation of gut microbiome changes in type 1 diabetic mellitus rats based on high-throughput sequencing. Biomedicine and Pharmacotherapy. 2020;124:109873. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109873>

71. Koo SH, Chu CW, Khoo JJC, et al. A pilot study to examine the association between human gut microbiota and the host's central obesity. *JGH Open*. 2029;3(6):480-487. DOI: <https://doi.org/10.1002/jgh3.12184>

72. Morinaga K, Kusada H, Watanabe M, et al. Complete Genome Sequence of Anaerostipes caccae Strain L1-92T, a Butyrate-Producing Bacterium Isolated from Human Feces. *Microbiology Resource Announcements*. 2021;10(16):e00056-21. DOI: <https://doi.org/10.1128/mra.00056-21>

Received 11 February 2023

Revised 21 April 2023

Accepted 25 May 2023

Information about the authors

Yuliya D. Smirnova, Junior Researcher at the Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnology, Voronezh State University of Engineering Technologies; Post-graduate Student in Scientific Specialty 06.06.01 – Biology, Voronezh State University, Voronezh, Russia, E-mail: dyd16@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5820-1804>.

Mariya V. Gryaznova, Junior Researcher at the Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnology, Voronezh State University of Engineering Technologies; Post-graduate Student in Scientific Specialty 06.06.01 – Biology, Voronezh State University, Voronezh, Russia, E-mail: mariya-vg@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2076-3868>.

Inna Yu. Burakova, Post-graduate Student in Scientific Specialty 06.06.01 – Biology, Junior Researcher at the Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnology, Voronezh State University of Engineering Technologies; Junior Researcher at the Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh, Russia, E-mail: vitkalovai@inbox.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5881-0845>.

Mikhail Yu. Syromyatnikov, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher at the Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnology, Voronezh State University of Engineering Technologies; Associate Professor at the Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University, Voronezh, Russia, E-mail: syromyatnikov@bio.vsu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9028-0613>.

Tatyana N. Sviridova, Cand. Sci. (Medicine), Associate Professor at the Department of Therapeutic Disciplines of Institute of Continuing Professional Education, Burdenko Voronezh State Medical University; Leading Physician Gastroenterologist, Olympus of Health Family Medicine Center, Voronezh, Russia E-mail: tatoshka033@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7701-2112>.

Olga P. Lebedeva, Doct. Sci. (Medicine), Professor at the Department of Obstetrics and Gynecology, Belgorod National Research University, Belgorod; Senior Researcher at the Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnology, Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russia, E-mail: lebedeva@bsu.edu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7188-6780>.

Alexander Y. Maslov, Doct. Sci. (Medicine), Research, Associate Professor at the Department of Genetics, Albert Einstein College, New York, USA, E-mail: alex.maslov@einsteinmed.org, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5402-8891>.

Vasily N. Popov, Doct. Sci. (Biology), Professor,

Rector, Voronezh State University of Engineering Technologies; Head of the Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University, Voronezh, Russia, E-mail: pvn@vsuet.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1294-8686>.



DOI: 10.18413/2658-6533-2023-9-4-0-3

УДК 575.174.015.3:616.379-008.64-06

Связь однонуклеотидного полиморфизма rs4880 гена *SOD2* с развитием микрососудистых осложнений сахарного диабета 2-го типа

Ю.Э. Азарова¹ , А.В. Гуреева² , М.И. Постникова¹ , В.В. Макаренко¹ , Е.Ю. Клёсова¹ , А.В. Полонников¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет», ул. Карла Маркса, д. 3, г. Курск, 305041, Российская Федерация

² Государственный научный центр Российской Федерации Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии», ул. Дмитрия Ульянова, д. 11, г. Москва, 117292, Российская Федерация

Автор для переписки: Ю.Э. Азарова (azzzzar@yandex.ru)

Резюме

Актуальность: Ген супероксиддисмутазы 2 (*SOD2*) кодирует митохондриальный фермент, главной функцией которого является превращение супероксид-аниона в перекись водорода. Генетически детерминированное снижение активности фермента *SOD2* в случае однонуклеотидной замены rs4880 (A>G) может способствовать развитию нарушения редокс-баланса митохондрий бета-клеток поджелудочной железы и других тканей, имеющих патогенетическое значение для возникновения сахарного диабета 2 типа (СД2) и его микрососудистых осложнений. **Цель исследования:** Провести анализ ассоциаций миссенс-варианта rs4880 *SOD2*, приводящего к замене валина на аланин в белковом продукте гена, с риском развития СД2 и его микрососудистых осложнений – диабетической ретинопатии (ДР) и нефропатии (ДНФ). **Материалы и методы:** В исследование включено 3206 человек, жителей Центральной России, у 1579 из которых диагностирован СД2. При этом у 991 пациента с СД2 установлено наличие ДР, у 544 больных СД2 выявлена ДНФ. Генотипирование выполнено методом полимеразно-цепной реакции в реальном режиме времени на термоциклире CFX1000 Bio-Rad с использованием TaqMan зондов. Статистический анализ ассоциаций выполнен с помощью онлайн программы SNPStats. **Результаты:** Установлена ассоциация минорного аллеля G (OR=1,26, 95% CI=1,02-1,56, P=0,033), а также генотипов A/G и G/G rs4880 (OR=1,51, 95% CI=1,09-2,11, P=0,015) с риском развития ДР у больных СД2 женщин. Статистически значимых ассоциаций rs4880 с СД2 и с развитием ДНФ ни у мужчин, ни у женщин выявлено не было: P>0,05. По данным транскриптомного анализа поджелудочной железы, нервной и сосудистой тканей (GTEx Portal), вариантный аллель G связан со снижением экспрессии белка MRPL18, необходимого для транспортировки важнейшего компонента рибосом 5S pРНК из цитозоля в митохондрии и обеспечения рибосомального синтеза белка. **Заключение:** Носительство минорного аллеля rs4880-G является генетическим маркером повышенного риска развития диабетической ретинопатии у женщин с СД2.

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа; диабетическая ретинопатия; диабетическая нефропатия; однонуклеотидный полиморфизм; ген *SOD2*; супероксиддисмутаза 2

Для цитирования: Азарова ЮЭ, Гуреева АВ, Постникова МИ, и др. Связь однонуклеотидного полиморфизма rs4880 гена *SOD2* с развитием микрососудистых осложнений сахарного диабета 2-го типа. Научные результаты биомедицинских исследований. 2023;9(4):461-473. DOI: 10.18413/2658-6533-2023-9-4-0-3

The link of single nucleotide polymorphism rs4880 of the *SOD2* gene to the development of microvascular complications of type 2 diabetes mellitus

Iuliia E. Azarova¹ , Anastasia V. Gureeva² , Mariia I. Postnikova¹ , Victor V. Makarenko¹ , Elena Yu. Klyosova¹ , Alexey V. Polonikov¹ 

¹ Kursk State Medical University,
3 Karl Marx St., Kursk, 305041, Russia
² National Medical Research Center for Endocrinology,
1 Dmitry Ulyanov St., Moscow, 117292, Russia

Corresponding author: Iuliia E. Azarova (azzzzar@yandex.ru)

Abstract

Background: The superoxide dismutase 2 (*SOD2*) gene encodes a mitochondrial enzyme whose main function is to convert superoxide anion to hydrogen peroxide. A genetically determined decrease in the activity of the *SOD2* enzyme in the case of a single nucleotide variant rs4880 (A>G) may contribute to the development of redox imbalance in the mitochondria of beta cells of the pancreas and other tissues, which have pathogenic significance in the occurrence of type 2 diabetes mellitus (T2DM) and its microvascular complications. **The aim of the study:** To analyze the association of the missense variant rs4880 *SOD2*, leading to the replacement of valine with alanine in the protein product of the gene, with the risk of developing T2D and its microvascular complications – diabetic retinopathy (DR) and nephropathy (DNF). **Materials and methods:** The study included 3206 subjects, residents of Central Russia, 1579 of whom were diagnosed with T2D. At the same time, DR was detected in 991 patients with T2D, and DNF was detected in 544 patients with T2D. Genotyping was performed by real-time polymerase chain reaction on a Bio-Rad CFX1000 thermal cycler using TaqMan probes. Statistical analysis of associations was performed using the SNPStats online program. **Results:** An association was established for the minor allele G (OR=1.26, 95% CI=1.02-1.56, P=0.033), as well as genotypes A/G and G/G rs4880 (OR=1.51, 95% CI=1.09-2.11, P=0.015) with a risk of developing DR in females with T2D. No statistically significant associations with T2D and the development of DNF were identified: P>0.05. **Conclusion:** Carriage of the minor allele rs4880-G is a genetic marker of an increased risk of developing diabetic retinopathy in females with T2D.

Keywords: diabetes mellitus type 2; diabetic retinopathy; diabetic nephropathy; single nucleotide polymorphism; *SOD2* gene; superoxide dismutase 2

For citation: Azarova IE, Gureeva AV, Postnikova MI, et al. The link of single nucleotide polymorphism rs4880 of the *SOD2* gene to the development of microvascular complications of type 2 diabetes mellitus. Research Results in Biomedicine. 2023;9(3):461-473. Russian. DOI: 10.18413/2658-6533-2023-9-4-0-3

Введение. Сахарный диабет 2 типа (СД2) представляет собой серьезное хроническое заболевание, которое развивается на фоне дисфункции инсулин-продуцирующих бета-клеток поджелудочной железы и инсулорезистентности периферических тканей [1]. За последние двадцать лет общее число больных сахарным диабетом в мире выросло более чем в три раза – с 151 млн человек в 2000 г. до 537 млн человек в 2021 г., при этом абсолютное большинство пациентов имеют СД2 [2]. Если эта тенденция пандемического роста заболеваемости сохранится, то по прогнозам экспертов к 2030 г. число пациентов превысит 643 млн человек, что составит 11,3% населения Земного шара [3].

СД2 характеризуется нарушениями всех видов обмена веществ и входит в группу свободно-радикальной патологии, поскольку именно сдвиг в редокс-гомеостазе является движущей силой естественного течения заболевания и формирования его осложнений [4, 5, 6]. Хроническая гипергликемия, избыточное образование свободных радикалов НАДФН-оксидазами [7] и дыхательной цепью митохондрий [8], дефицит эндогенных антиоксидантов [9] являются главными факторами, приводящими к структурным и функциональным изменениям в сетчатке, нервных волокнах и сосудах различных тканей и органов, что, в частности, провоцирует развитие микрососудистых (диабетической ретинопатии (ДР) и диабетической нефропатии (ДНФ)) и макрососудистых (ишемическая болезнь сердца, острые нарушения мозгового кровообращения) осложнений СД2 [10, 11].

Исследования последних лет показали, что образование активных форм кислорода в митохондриях служит основой нескольких связанных с гипергликемией патогенетических механизмов развития болезни, таких как ингибирование глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, активация аутоокисления и полиолового пути метаболизма глюкозы, активация протеинкиназы С, 12/15-липоксигеназного пути, а также образования конечных продуктов гликации [12, 13, 14]. Перечисленные процессы способны усугублять окислительный стресс. Так, ферменты по-

лиолового пути расходуют НАДФН·Н⁺, тормозя его использование для восстановления окисленного димера клеточного антиоксиданта глутатиона в исходную активную мономерную форму [14]. В то же время взаимодействие конечных продуктов гликации с их рецепторами приводит к новому витку генерации активных форм кислорода [15], что грозит инициацией сигналинга белка p53 и, как следствие, высвобождением цитохрома с из внутренней мембраны митохондрий с запуском апоптоза клетки [16]. В этой связи первостепенное значение для защиты клетки в условиях избыточного окисления субстратов имеют митохондриальные изоформы антиоксидантных ферментов, к которым относится супероксиддисмутаза 2 (СОД2), катализирующая превращение супероксид-аниона в перекись водорода согласно уравнению: $2\text{H}^+ + 2\text{O}_2^- = \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ [17]. Фермент кодируется расположенным на длинном плече шестой хромосомы (6q25.3) геном *SOD2*. Согласно литературным данным, миссенс-вариант *SOD2* rs4880 (A>G) характеризуется заменой валина на аланин, что снижает ферментативную активность белка [17]. Ранее были описаны ассоциации варианта rs4880 с диабетической нефропатией у европейцев [18], японцев [19] и китайцев [20], однако валидационных исследований выявленной ассоциации в русской популяции выполнено не было, что обосновывает актуальность настоящей работы.

Цель исследования. Провести анализ ассоциаций миссенс-варианта rs4880 *SOD2* с риском развития СД2 и его микрососудистых осложнений – диабетической ретинопатии и нефропатии у жителей Центральной России.

Материалы и методы исследования. Дизайн исследования одобрен Региональным этическим комитетом при Курском государственном медицинском университете (выписка из протокола №10 от 12.12.2016 г.). Все пациенты дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Группа больных СД2 (1579 человек – 591 мужчина и 988 женщин, средний возраст $61,3 \pm 10,4$ года) была набрана из числа пациентов эндокринологического отделения Кур-

ской городской клинической больницы скорой медицинской помощи в период с 2016 по 2019 годы. Диагноз СД2 устанавливали врачи-эндокринологи на основании критерии ВОЗ [21]. При этом у 991 пациента с СД2 установлено наличие ДР, у 544 больных СД2 выявлена ДНФ. Группу контроля (1627 человек – 601 мужчина и 1026 женщин, средний возраст $60,8 \pm 6,4$ года) составили относительно здоровые доноры Курского областного клинического центра крови. Критерии включения и исключения из исследования были подробно изложены нами ранее [22]. У всех участников исследования был организован забор 5 мл крови натощак в вакуумные пробирки с ЭДТА для последующей фенольно-хлороформной экстракции геномной ДНК. Генотипирование выполнено методом полимеразно-цепной реакции в реальном режиме времени на термоциклиере C1000 Touch

Thermal Cycler CFX96 (Bio-Rad) с использованием TaqMan зондов. Праймеры и зонды были синтезированы компанией Синтол (Москва). Статистический анализ полученных данных проведен методом логистической регрессии с поправками на пол, возраст и индекс массы тела с помощью онлайн программы SNPStats [23]. Ассоциация считалась значимой при $P < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Распределение частот генотипов в исследуемой популяции соответствовало равновесию Харди-Вайнберга ($P > 0,05$). В таблице 1 приведены результаты расчета ассоциаций изучаемого однонуклеотидного варианта с предрасположенностью к СД2. Как видно из таблицы 1, носительство полиморфизма rs4880 не было связано с развитием СД2 ни в общей группе, ни отдельно у мужчин и женщин.

Частоты аллелей и генотипов rs4880 гена SOD2 больных СД2 и здоровых лиц

Table 1

Allele and genotype frequencies of rs4880 SOD2 gene in T2D patients and healthy subjects

Генотип/ аллель	Контроль n (%)	Больные СД2 n (%)	¹ OR (95% CI)	² P	
Общая выборка					
A/A	397 (25,2%)	411 (26,5%)	1,00	0,76	
A/G	783 (49,7%)	765 (49,2%)	1,03 (0,86-1,23)		
G/G	396 (25,1%)	378 (24,3%)			
G	50,0%	48,9%	0,96 (0,87-1,06)	0,42	
Мужчины					
A/A	146 (25,2%)	161 (27,6%)	1,00	0,66	
A/G	288 (49,6%)	287 (49,1%)	0,94 (0,71-1,25)		
G/G	146 (25,2%)	136 (23,3%)			
G	50,0%	47,9%	0,92 (0,78-1,08)	0,30	
Женщины					
A/A	251 (25,2%)	250 (25,8%)	1,00	0,80	
A/G	495 (49,7%)	478 (49,3%)	1,03 (0,81-1,32)		
G/G	250 (25,1%)	242 (24,9%)			
G	49,9%	49,6%	0,99 (0,87-1,12)	0,82	

Примечание: ¹OR (95% CI) – отношение шансов и доверительный интервал с поправкой на пол, возраст и ИМТ;

²P – уровень значимости с поправкой на пол, возраст и ИМТ.

Note: ¹OR (95% CI) – odds ratio and confidence interval adjusted for sex, age and BMI; ²P – level of significance adjusted for gender, age and BMI.

В таблице 2 показаны результаты анализа ассоциаций rs4880 с микросудистыми осложнениями СД2. Установлена ассоциация минорного аллеля G (OR=1,26, 95% CI=1,02-1,56, P=0,033), а также

генотипов A/G и G/G (OR=1,51, 95% CI=1,09-2,11, P=0,015) с риском развития ДР у больных СД2 женщин, тогда как статистически значимых ассоциаций с развитием ДНФ выявлено не было: P>0,05.

Таблица 2
Ассоциации rs4880 гена SOD2 с микрососудистыми осложнениями СД2
Table 2
Associations of rs4880 in SOD2 gene with T2D microvascular complications

Гено-тип/ аллель	Диабетическая ретинопатия				Диабетическая нефропатия			
	Больные СД2 без ДР n (%)	Больные СД2 с ДР n (%)	OR (95%CI) ¹	P ²	Больные СД2 без ДНФ n (%)	Больные СД2 с ДНФ n (%)	OR (95% CI) ¹	P ²
Общая группа больных СД2								
A/A	113 (28,3%)	261 (26,3%)	1,00	0,38 1,13 (0,86-1,47)	232 (26,6%)	146 (26,8%)	1,00	0,99 1,00 (0,77-1,30)
A/G	194 (48,6%)	483 (48,7%)			419 (48,1%)	272 (50%)		
G/G	92 (23,1%)	247 (25,0%)			220 (25,3%)	126 (23,2%)		
G	47,4%	49,3%	1,08 (0,92-1,27)		49,3%	48,2%	0,96 (0,82-1,11)	
Больные СД2 мужчины								
A/A	41 (23,3%)	88 (31,9%)	1,00	0,11 0,70 (0,44-1,09)	101 (27,1%)	32 (31,7%)	1,00	0,73 0,92 (0,56-1,51)
A/G	93 (52,8%)	126 (45,6%)			187 (50,1%)	43 (42,6%)		
G/G	42 (23,9%)	62 (22,5%)			85 (22,8%)	26 (25,7%)		
G	50,3%	45,3%	0,82 (0,63-1,07)		47,9%	47,0%	0,97 (0,71-1,32)	
Больные СД2 женщины								
A/A	72 (32,3%)	173 (24,2%)	1,00	0,015 1,51 (1,09-2,11)	131 (26,3%)	114 (25,7%)	1,00	0,84 1,03 (0,76-1,40)
A/G	101 (45,3%)	357 (49,9%)			232 (46,6%)	229 (51,7%)		
G/G	50 (22,4%)	185 (25,9%)			135 (27,1%)	100 (22,6%)		
G	45,1%	50,8%	1,26 (1,02-1,56)		50,4%	48,4%	0,92 (0,77-1,11)	

Примечание: ¹OR (95% CI) – отношение шансов и доверительный интервал с поправками на пол, возраст и ИМТ; ²P – уровень значимости ассоциации с поправками на пол, возраст и ИМТ; ДР – диабетическая ретинопатия; ДНФ – диабетическая нефропатия; СД2 – сахарный диабет 2 типа.

Note: ¹OR (95% CI) – odds ratio and confidence interval adjusted for gender, age and BMI; ²P – level of significance of association adjusted for gender, age and BMI; DR – diabetic retinopathy; DNF – diabetic nephropathy; T2DM – type 2 diabetes mellitus.

Анализ взаимодействий кодируемого геном SOD2 фермента с другими белками (Рис. 1), выполненный с использованием инструмента STRING, показал, что интерактом супероксиддисмутазы 2 включает в себя супероксиддисмутазу 1 (SOD1), катализу (CAT), глутатионпероксидазу 7 (GPX7), 1-альфа коактиватор рецептора гамма, активируемого пролифераторами пероксисом (PPARGC1A), дегликазу DJ-1 (PARK7), транскрипционный фактор (FOXO3), гистоновую деацетилазу (KAT2A) и WD-повтор содержащий белок

5 (WDR5). Анализ генных онтологий выявил основные функции описанной белковой сети: клеточный ответ на окислительный стресс ($FDR=1,38\times10^{-7}$), положительная регуляция биосинтеза активных форм кислорода ($FDR=0,00015$) и отрицательная регуляция индуцированного окислительным стрессом сигнального пути апоптоза ($FDR=0,0102$).

Как фермент, обеспечивающий устойчивость к окислительному стрессу, супероксиддисмутаза 2 является частью белкового интерактома (также включающего ша-

пероны, белки энергетического метаболизма, репарации ДНК и аутофагии), регу-

лирующих процессы старения и продолжительность жизни человека и других биологических видов (Рис. 2, KEGG Pathways).

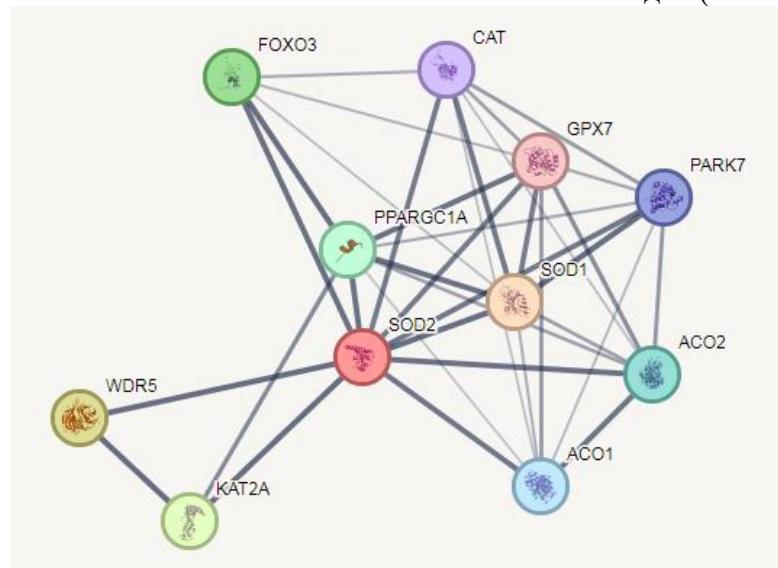


Рис. 1. Сеть белковых взаимодействий SOD2 (STRING.db)
Fig. 1. Network of SOD2 protein (STRING.db)

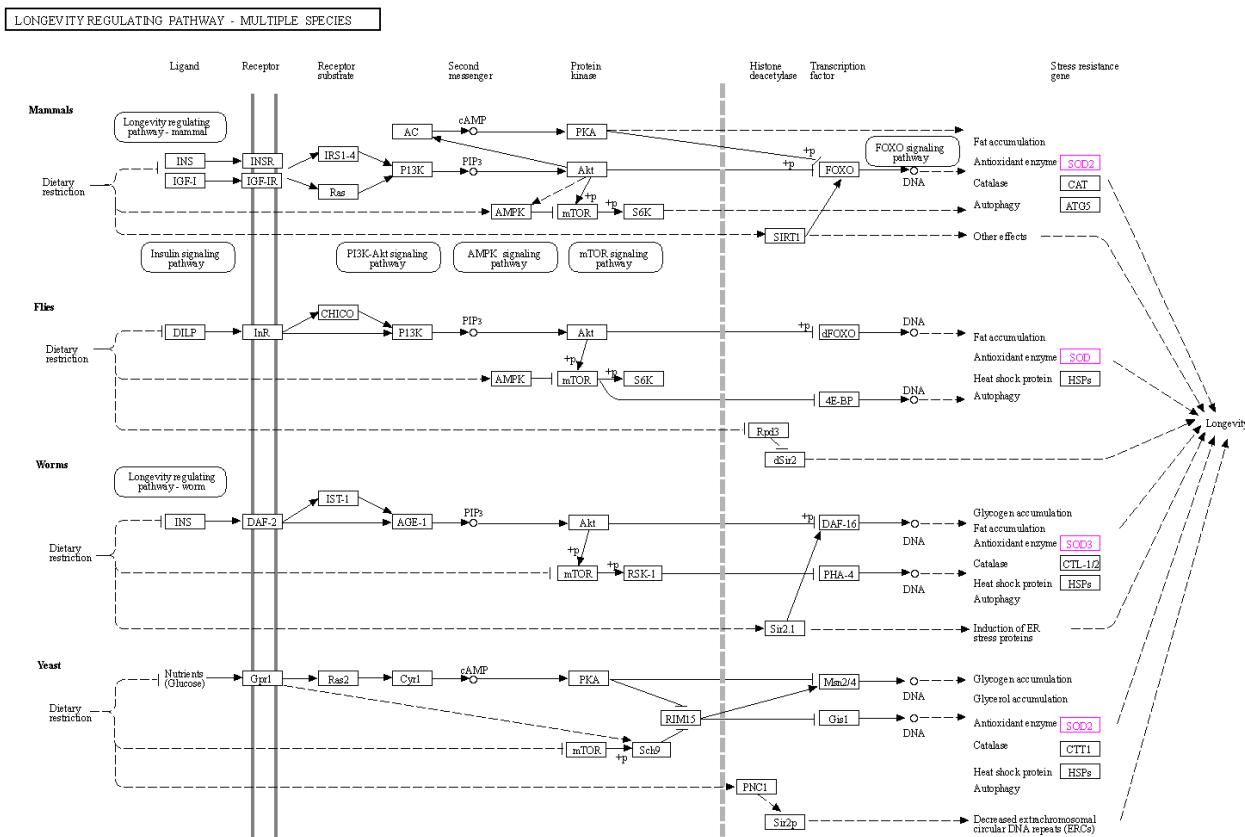


Рис. 2. Роль SOD2 в регуляции продолжительности жизни (<https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>)
Fig. 2. Role of SOD2 in longevity regulating pathway (<https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>)

Изучаемый однонуклеотидный вариант rs4880 (A>G) приводит к замене валина на аланин в 16-м положении полипептид-

ной цепи белкового продукта. В исследовании Bastaki [24] показано, что активность фермента у носителей генотипов A/A и A/G

была на 33% выше по сравнению с носителями генотипа G/G, однако в более ранней работе Sutton [25] были получены противоположные результаты. В этой связи нами был проведен биоинформационный анализ эффектов альтернативного аллеля rs4880-G на экспрессию *SOD2*. По данным транскриптомного анализа (GTEx Portal) аллель rs4880-G ассоциирован со снижением экспрессии гена *SOD2* в сердечной мышце (NES=-0,11, P=0,0000053). Этот же аллель связан со снижением экспрессии гена *MRPL18* в поджелудочной железе (NES=-0,19, P=0,000026), сердце (NES=-0,21, P=6,1×10⁻¹⁰), аорте (NES=-0,17, P=2,9×10⁻⁸), скелетной мышечной ткани (NES=-0,15, P=6,8×10⁻¹²), подкожной жировой клетчатке (NES=-0,24, P=6,2×10⁻¹⁸), большеберцовой артерии (NES=-0,19, P=1,5×10⁻¹⁶) и большеберцовом нерве (NES=-0,25, P=1,8×10⁻²¹). Следует отметить, что митохондриальный

рибосомальный белок L18 (MRPL18) необходим для транспортировки из цитозоля в митохондрии важнейшего компонента рибосом 5S pPHK, кодируемого не митохондриальной, а геномной ДНК (Uniprot, <https://www.uniprot.org/>). Снижение экспрессии *MRPL18* способно оказать негативное влияние на рибосомальный синтез белков в митохондриях тканей, патогенетически связанных с развитием СД2 и его осложнений.

По данным ресурса mqtl.db (<http://www.mqtlDb.org/>), депонирующего результаты анализа метилирования ДНК у человека в различные возрастные периоды жизни, влияние аллеля rs4880-G на метилирование CpG-островков в гене *SOD2* у взрослых людей носит неоднозначный характер: носительство минорного аллеля G ассоциировано с гипометилированием одних CpG-островков и с гиперметилированием других (Табл. 3).

Эффекты аллеля rs4880-G на метилирование CpG-островков в гене *SOD2* у взрослых людей (<http://www.mqtlDb.org/>)

Effects of the rs4880-G allele on CpG island methylation in the SOD2 gene in adults
(<http://www.mqtlDb.org/>)

Table 3

rs4880 Allele	CpG	CpG Position	beta	t-stat	Effect Size	p-value
G	cg20372956	160148392	-0,36324	-10,38395	0,00856	7,70e-24
G	cg13221458	160112632	0,62188	16,16896	0,02324	2,30e-51
G	cg27624424	160112604	0,24202	7,15197	0,00353	1,87e-12
G	cg14767165	160183909	-0,31423	-8,01196	0,00811	3,79e-15
G	cg17956964	160220921	-0,28553	-6,86246	0,00544	1,32e-11
G	cg10268548	160184041	-0,20660	-5,42599	0,01226	7,55e-08
G	cg25282410	160211355	0,25707	8,39913	0,00735	1,92e-16

Нами впервые установлена ассоциация rs4880 с диабетической ретинопатией у женщин с СД2. В литературе описаны ассоциации изучаемого полиморфного варианта с диабетической нефропатией при сахарном диабете 1 типа в популяции финнов и шведов [18], а также с диабетической нефропатией у больных СД2 японцев [19] и китайцев [20]. Недиабетические фенотипы, ассоциированные с rs4880, включают кардиомиопатию у пациентов с гемахроматозом [26], идиопатическую кардиомиопатию [27], плевральную мезотелиому [28], рак простаты [29] и болезнь Альцгеймера [30].

Семейство супероксиддисмутаз у человека включает в себя три изоформы – цитозольную супероксиддисмутазу 1, митохондриальную супероксиддисмутазу 2 и внеклеточную супероксиддисмутазу 3 [17]. Установленный нами факт ассоциации с ДР *loss-of-function* варианта rs4880 в гене, кодирующем супероксиддисмутазу 2, имеет непосредственное патогенетическое значение для развития этого осложнения СД2 ввиду того, что снижение каталитической активности фермента у носителей минорного аллеля rs4880-G способствует форми-

рованию окислительного стресса в митохондриях и их дисфункции. Показано, что хроническая гипергликемия индуцирует генерацию АФК в митохондриях, что изменяет экспрессию генов за счет ковалентной модификации транскрипционных факторов [31, 32] и вызывает увеличение содержания в сетчатке проапоптотических митохондриальных белков, таких как цитохром с и апоптоз-индуцирующий фактор (AIF) [33]. Действительно, исследования *in vitro* установили усиление фрагментации митохондрий и активацию апоптоза клеток в условиях гипергликемии [34]. Кроме того, в экспериментальной работе на мышах с СД2 выявлено значительное повышение генерации АФК в сетчатке, причем подавление синтеза АФК ингибировало опосредованный каспазой 3 апоптоз нейронов и замедляло потерю зрения [35]. Считается, что именно дисфункция митохондрий является причиной нейродегенерации сетчатки, предшествующей появлению сосудистых нарушений при ДР [36].

Заключение. Носительство минорного аллеля rs4880-G является генетическим маркером повышенного риска развития диабетической ретинопатии у женщин с СД2. Повышенный риск развития ДР у носительниц минорного аллеля rs4880-G может быть связан со снижением активности митохондриальной супероксиддисмутазы 2 как в результате аминокислотной замены валина на аланин, так и в результате отрицательного влияния аллеля G на экспрессию генов *SOD2* и *MRPL18* в сосудистой и нервной тканях, что способствует становлению митохондриальной дисфункции – важнейшего звена патогенеза ретинальной нейродегенерации и поражения сосудов сетчатки при сахарном диабете 2 типа.

Информация о финансировании

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 20-15-00227).

Financial support

The study was supported by the Russian Science Foundation (№20-15-00227).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The author has no conflict of interest to declare.

Список литературы

1. Дедов ИИ, Шестакова МВ, Викулова ОК, и др. Эпидемиологические характеристики сахарного диабета в Российской Федерации: клинико-статистический анализ по данным регистра сахарного диабета на 01.01.2021. Сахарный диабет. 2021;24(3):204-221. DOI: <https://doi.org/10.14341/DM12759>
2. 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>
3. Ali MK, Pearson-Stuttard J, Selvin E, et al. Interpreting global trends in type 2 diabetes complications and mortality. Diabetologia. 2022;65(1):3-13. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00125-021-05585-2>
4. Singh A, Kukreti R, Saso L, et al. Mechanistic Insight into Oxidative Stress-Triggered Signaling Pathways and Type 2 Diabetes. Molecules. 2022;27(3):950. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27030950>
5. Azarova I, Polonikov A, Klyosova E. Molecular Genetics of Abnormal Redox Homeostasis in Type 2 Diabetes Mellitus. International Journal of Molecular Sciences. 2023;24(5):4738. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24054738>
6. 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>
7. Vilas-Boas EA, Almeida DC, Roma LP. Lipotoxicity and β-cell failure in type 2 diabetes: Oxidative stress linked to NADPH oxidase and ER stress. Cells. 2021;10(12):3328. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells10123328>
8. Dai W, Jiang L. Dysregulated mitochondrial dynamics and metabolism in obesity, diabetes, and cancer. Frontiers in Endocrinology. 2019;10:570. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00570>

9. Darenkaya MA, Kolesnikova LI, Kolesnikov SI. Oxidative stress: pathogenetic role in diabetes mellitus and its complications and therapeutic approaches to correction. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2021;171(2):179-189. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10517-021-05191-7>
10. Iacobini C, Vitale M, Pesce C, et al. Diabetic complications and oxidative stress: A 20-year voyage back in time and back to the future. *Antioxidants*. 2021;10(5):727. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox10050727>
11. Papachristoforou E, Lambadiari V, Maratou E, et al. Association of glycemic indices (hyperglycemia, glucose variability, and hypoglycemia) with oxidative stress and diabetic complications. *Journal of Diabetes Research*. 2020;2020:7489795. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/7489795>
12. Du X, Matsumura T, Edelstein D, et al. Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation*. 2003;112:1049-1057. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI18127>
13. Garg SS, Gupta J. Polyol pathway and redox balance in diabetes. *Pharmacological Research*. 2022;182:106326. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106326>
14. Zhang ZY, Miao LF, Qian LL, et al. Molecular mechanisms of glucose fluctuations on diabetic complications. *Frontiers in Endocrinology*. 2019;10:640. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00640>
15. Ramasamy R, Shekhtman A, Schmidt AM. The RAGE/DIAPH1 signaling axis & implications for the pathogenesis of diabetic complications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(9):4579. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23094579>
16. Demirtas L, Guclu A, Erdur FM, et al. Apoptosis, autophagy & endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Indian Journal of Medical Research*. 2016;144(4):515-524. DOI: <https://doi.org/10.4103/0971-5916.200887>
17. Pourvali K, Abbasi M, Mottaghi A. Role of superoxide dismutase 2 gene Ala16Val polymorphism and total antioxidant capacity in diabetes and its complications. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*. 2016;8(2):48-56.
18. Möllsten A, Marklund SL, Wessman M, et al. A functional polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene and diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2007;56(1):265-269. DOI: <https://doi.org/10.2337/db06-0698>
19. Nomiyama T, Tanaka Y, Piao L, et al. The polymorphism of manganese superoxide dismutase is associated with diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients. *Journal of Human Genetics*. 2003;48(3):138-141. DOI: <https://doi.org/10.1007/s100380300021>
20. Liu L, Zheng T, Wang N, et al. The manganese superoxide dismutase Val16Ala polymorphism is associated with decreased risk of diabetic nephropathy in Chinese patients with type 2 diabetes. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2009;322(1-2):87-91. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11010-008-9943-x>
21. World Health Organization. Global report on diabetes: executive summary (No. WHO/NMH/NVI/16.3). World Health Organization; 2016.
22. Azarova I, Klyosova E, Polonikov A. Association between RAC1 gene variation, redox homeostasis and type 2 diabetes mellitus. *European Journal of Clinical Investigation*. 2022;52(8):13792. DOI: <https://doi.org/10.1111/eci.13792>
23. 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>
24. Bastaki M, Huen K, Manzanillo P, et al. Genotype-activity relationship for Mn-superoxide dismutase, glutathione peroxidase 1 and catalase in humans. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2006;16(4):279-286. DOI: <https://doi.org/10.1097/01.fpc.0000199498.08725.9c>
25. Sutton A, Imbert A, Igoudjil A, et al. The manganese superoxide dismutase Ala16Val dimorphism modulates both mitochondrial import and mRNA stability. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2005;15(5):311-319. DOI: <https://doi.org/10.1097/01213011-200505000-00006>
26. Valenti L, Conte D, Piperno A, et al. The mitochondrial superoxide dismutase A16V polymorphism in the cardiomyopathy associated with hereditary haemochromatosis. *Journal of Medical Genetics*. 2004;41(12):946-950. DOI: <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.019588>
27. Hiroi S, Harada H, Nishi H, et al. Polymorphisms in the SOD2 and HLA-DRB1 genes are associated with nonfamilial idiopathic dilated car-

diomyopathy in Japanese. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1999;261(2):332-339. DOI: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1036>

28. Landi S, Gemignani F, Neri M, et al. Polymorphisms of glutathione-S-transferase M1 and manganese superoxide dismutase are associated with the risk of malignant pleural mesothelioma. *International Journal of Cancer.* 2007;120(12):2739-2743. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.22590>

29. Choi JY, Neuhausen ML, Barnett MJ, et al. Iron intake, oxidative stress-related genes (MnSOD and MPO) and prostate cancer risk in CARET cohort. *Carcinogenesis.* 2008;29(5):964-970. DOI: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn056>

30. Wiener HW, Perry RT, Chen Z, et al. A polymorphism in SOD2 is associated with development of Alzheimer's disease. *Genes, Brain and Behavior.* 2007;6(8):770-775. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1601-183x.2007.00308.x>

31. Yao D, Taguchi T, Matsumura T, et al. High glucose increases angiopoietin-2 transcription in microvascular endothelial cells through methylglyoxal modification of mSin3A. *J Biol Chem.* 2007;282(42):31038-31045. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M704703200>

32. Hammes HP, Feng Y, Pfister F, et al. Diabetic retinopathy: targeting vasoregression. *Diabetes.* 2011;60(1):9-16. DOI: <https://doi.org/10.2337/db10-0454>

33. Abu-El-Asrar AM, Dralands L, Missothen L, et al. Expression of apoptosis markers in the retinas of human subjects with diabetes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science.* 2004;45(8):2760-2766. DOI: <https://doi.org/10.1167/iovs.03-1392>

34. Tien T, Zhang J, Muto T, et al. High glucose induces mitochondrial dysfunction in retinal muller cells: Implications for diabetic retinopathy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science.* 2017;58:2915-2921. DOI: <https://doi.org/10.1167/iovs.16-21355>

35. Sasaki M, Ozawa Y, Kurihara T, et al. Neurodegenerative influence of oxidative stress in the retina of a murine model of diabetes. *Diabetologia.* 2010;53:971-979. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1655-6>

36. Sohn EH, van Dijk HW, Jiao C, et al. Retinal neurodegeneration may precede microvascular changes characteristic of diabetic retinopathy in diabetes mellitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

America.

2016;113(9):E2655-E2664. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1522014113>

References

1. Dedov II, Shestakova MV, Vikulova OK, et al. Epidemiological characteristics of diabetes mellitus in the Russian Federation: clinical and statistical analysis according to the Federal diabetes register data of 01.01.2021. *Diabetes mellitus.* 2021;24(3):204-221. Russian. DOI: <https://doi.org/10.14341/DM12759>
2. 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>
3. Ali MK, Pearson-Stuttard J, Selvin E, et al. Interpreting global trends in type 2 diabetes complications and mortality. *Diabetologia.* 2022;65(1):3-13. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00125-021-05585-2>
4. Singh A, Kukreti R, Sasol L, et al. Mechanistic Insight into Oxidative Stress-Triggered Signaling Pathways and Type 2 Diabetes. *Molecules.* 2022;27(3):950. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27030950>
5. Azarova I, Polonikov A, Klyosova E. Molecular Genetics of Abnormal Redox Homeostasis in Type 2 Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences.* 2023;24(5):4738. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24054738>
6. 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>
7. Vilas-Boas EA, Almeida DC, Roma LP. Lipotoxicity and β -cell failure in type 2 diabetes: Oxidative stress linked to NADPH oxidase and ER stress. *Cells.* 2021;10(12):3328. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells10123328>
8. Dai W, Jiang L. Dysregulated mitochondrial dynamics and metabolism in obesity, diabetes, and cancer. *Frontiers in Endocrinology.* 2019;10:570. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00570>
9. Darenetskaya MA, Kolesnikova LI, Kolesnikov SI. Oxidative stress: pathogenetic role in diabetes mellitus and its complications and therapeutic approaches to correction. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2021;171(2):179-

189. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10517-021-05191-7>
10. Iacobini C, Vitale M, Pesce C, et al. Diabetic complications and oxidative stress: A 20-year voyage back in time and back to the future. *Antioxidants.* 2021;10(5):727. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox10050727>
11. Papachristoforou E, Lambadiari V, Maratou E, et al. Association of glycemic indices (hyperglycemia, glucose variability, and hypoglycemia) with oxidative stress and diabetic complications. *Journal of Diabetes Research.* 2020;2020:7489795. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/7489795>
12. Du X, Matsumura T, Edelstein D, et al. Inhibition of GAPDH activity by poly (ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation.* 2003;112:1049-1057. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI18127>
13. Garg SS, Gupta J. Polyol pathway and redox balance in diabetes. *Pharmacological Research.* 2022;182:106326. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106326>
14. Zhang ZY, Miao LF, Qian LL, et al. Molecular mechanisms of glucose fluctuations on diabetic complications. *Frontiers in Endocrinology.* 2019;10:640. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00640>
15. Ramasamy R, Shekhtman A, Schmidt AM. The RAGE/DIAPH1 signaling axis & implications for the pathogenesis of diabetic complications. *International Journal of Molecular Sciences.* 2022;23(9):4579. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23094579>
16. Demirtas L, Guclu A, Erdur FM, et al. Apoptosis, autophagy & endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Indian Journal of Medical Research.* 2016;144(4):515-524. DOI: <https://doi.org/10.4103/0971-5916.200887>
17. Pourvali K, Abbasi M, Mottaghi A. Role of superoxide dismutase 2 gene Ala16Val polymorphism and total antioxidant capacity in diabetes and its complications. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology.* 2016;8(2):48-56.
18. Möllsten A, Marklund SL, Wessman M, et al. A functional polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene and diabetic nephropathy. *Diabetes.* 2007;56(1):265-269. DOI: <https://doi.org/10.2337/db06-0698>
19. Nomiyama T, Tanaka Y, Piao L, et al. The polymorphism of manganese superoxide dismutase is associated with diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients. *Journal of Human Genetics.* 2003;48(3):138-141. DOI: <https://doi.org/10.1007/s100380300021>
20. Liu L, Zheng T, Wang N, et al. The manganese superoxide dismutase Val16Ala polymorphism is associated with decreased risk of diabetic nephropathy in Chinese patients with type 2 diabetes. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 2009;322(1-2):87-91. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11010-008-9943-x>
21. World Health Organization. Global report on diabetes: executive summary (No. WHO/NMH/NVI/16.3). World Health Organization; 2016.
22. Azarova I, Klyosova E, Polonikov A. Association between RAC1 gene variation, redox homeostasis and type 2 diabetes mellitus. *European Journal of Clinical Investigation.* 2022;52(8):13792. DOI: <https://doi.org/10.1111/eci.13792>
23. 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>
24. Bastaki M, Huen K, Manzanillo P, et al. Genotype-activity relationship for Mn-superoxide dismutase, glutathione peroxidase 1 and catalase in humans. *Pharmacogenetics and Genomics.* 2006;16(4):279-286. DOI: <https://doi.org/10.1097/01.fpc.0000199498.08725.9c>
25. Sutton A, Imbert A, Igoudjil A, et al. The manganese superoxide dismutase Ala16Val dimorphism modulates both mitochondrial import and mRNA stability. *Pharmacogenetics and Genomics.* 2005;15(5):311-319. DOI: <https://doi.org/10.1097/01213011-200505000-00006>
26. Valenti L, Conte D, Piperno A, et al. The mitochondrial superoxide dismutase A16V polymorphism in the cardiomyopathy associated with hereditary haemochromatosis. *Journal of Medical Genetics.* 2004;41(12):946-950. DOI: <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.019588>
27. Hiroi S, Harada H, Nishi H, et al. Polymorphisms in the SOD2 and HLA-DRB1 genes are associated with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy in Japanese. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1999;261(2):332-339. DOI: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1036>
28. Landi S, Gemignani F, Neri M, et al. Polymorphisms of glutathione-S-transferase M1 and manganese superoxide dismutase are associated

with the risk of malignant pleural mesothelioma. International Journal of Cancer. 2007;120(12):2739-2743. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.22590>

29. Choi JY, Neuhausen ML, Barnett MJ, et al. Iron intake, oxidative stress-related genes (MnSOD and MPO) and prostate cancer risk in CARET cohort. Carcinogenesis. 2008;29(5):964-970. DOI: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn056>

30. Wiener HW, Perry RT, Chen Z, et al. A polymorphism in SOD2 is associated with development of Alzheimer's disease. Genes, Brain and Behavior. 2007;6(8):770-775. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1601-183x.2007.00308.x>

31. Yao D, Taguchi T, Matsumura T, et al. High glucose increases angiopoietin-2 transcription in microvascular endothelial cells through methylglyoxal modification of mSin3A. J Biol Chem. 2007;282(42):31038-31045. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M704703200>

32. Hammes HP, Feng Y, Pfister F, et al. Diabetic retinopathy: targeting vasoregression. Diabetes. 2011;60(1):9-16. DOI: <https://doi.org/10.2337/db10-0454>

33. Abu-El-Asrar AM, Dralands L, Missoffen L, et al. Expression of apoptosis markers in the retinas of human subjects with diabetes. Investigative Ophthalmology and Visual Science. 2004;45(8):2760-2766. DOI: <https://doi.org/10.1167/iovs.03-1392>

34. Tien T, Zhang J, Muto T, et al. High glucose induces mitochondrial dysfunction in retinal muller cells: Implications for diabetic retinopathy. Investigative Ophthalmology and Visual Science. 2017;58:2915-2921. DOI: <https://doi.org/10.1167/iovs.16-21355>

35. Sasaki M, Ozawa Y, Kurihara T, et al. Neurodegenerative influence of oxidative stress in the retina of a murine model of diabetes. Diabetologia. 2010;53:971-979. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1655-6>

36. Sohn EH, van Dijk HW, Jiao C, et al. Retinal neurodegeneration may precede microvascular changes characteristic of diabetic retinopathy in diabetes mellitus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2016;113(9):E2655-E2664. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1522014113>

Revised 3 September 2023
Accepted 16 September 2023

Информация об авторах

Юлия Эдуардовна Азарова, доктор медицинских наук, профессор кафедры биологической химии, заведующий лабораторией биохимической генетики и метаболомики НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии, ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», г. Курск, Российская Федерация, E-mail: aazzzar@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8098-8052>.

Анастасия Владимировна Гуреева, ординатор ГНЦ РФ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: nastasyi.207@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1719-7316>.

Мария Игоревна Постникова, студент ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», г. Курск, Российская Федерация, E-mail: postnikova0700@icloud.com, ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-8929-1594>.

Виктор Викторович Макаренко, студент ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», г. Курск, Российская Федерация, E-mail: vm200046@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-9741-1051>.

Елена Юрьевна Клёсова, младший научный сотрудник НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии, ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», г. Курск, Российская Федерация, E-mail: ecless@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1543-9230>.

Алексей Валерьевич Полоников, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры биологии, медицинской генетики и экологии, заведующий лабораторией статистической генетики и биоинформатики, директор НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии, ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», г. Курск, Российская Федерация, E-mail: polonikov@rambler.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6280-247X>.

Статья поступила в редакцию 1 июля 2023 г.
Поступила после доработки 3 сентября 2023 г.
Принята к печати 16 сентября 2023 г.

Received 1 July 2023

Information about the authors

Iuliia E. Azarova, Doct. Sci. (Medicine), Professor at the Department of Biological Chemistry, Head of the Laboratory of Biochemical Genetics and Metabolomics, Research Institute for Genetic and Molecular Epidemiology, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, E-mail: azzzzar@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8098-8052>.

Anastasia V. Gureeva, Resident, National Medical Research Center for Endocrinology, Moscow, Russia, E-mail: nastasyi.207@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1719-7316>.

Mariia I. Postnikova, Student, Kursk State Medical University, Kursk, E-mail: postnikova0700@icloud.com, ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-8929-1594>.

Victor V. Makarenko, Student, Kursk State Medical University, Kursk, E-mail: vm200046@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-9741-1051>.

Elena Yu. Klyosova, Junior Researcher, Research Institute for Genetic and Molecular Epidemiology, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, E-mail: ecless@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1543-9230>.

Alexey V. Polonikov, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Professor at the Department of Biology, Medical Genetics and Ecology, Head of the Laboratory of Biochemical Genetics and Metabolomics, Director, Research Institute for Genetic and Molecular Epidemiology, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, E-mail: polonikov@rambler.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6280-247X>.



DOI: 10.18413/2658-6533-2023-9-4-0-4

УДК 616-07:616-079.3

Клинико-генетическая характеристика муковисцидоза в Республике Башкортостан

Г.Р. Аюпова¹ , Р.И. Хусаинова^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет», ул. Ленина, д. 3, г. Уфа, 450008, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, пр-т. Октября, д. 71, г. Уфа, 450054, Российская Федерация
Автор для переписки: Г.Р. Аюпова (guzel8319@gmail.com)

Резюме

Актуальность: По оценкам Всемирной организации здравоохранения ежегодно в мире рождается 40-50 тысяч детей с муковисцидозом (МВ) – моногенным заболеванием с генетической гетерогенностью и клинической вариабельностью, обусловленными региональными и этническими различиями генофонда популяций. Мониторинг особенностей течения заболевания и молекулярного патогенеза у пациентов из различных регионов многонациональной России необходим для оптимизации алгоритмов медико-генетического консультирования и улучшения качества жизни пациентов. **Цель исследования:** Обобщение и систематизация результатов динамических клинических наблюдений, лабораторных и молекулярно-генетических исследований пациентов с муковисцидозом из Республики Башкортостан (РБ) для осуществления мониторинга эффективности работы с пациентами согласно реестру пациентов МВ Республики Башкортостан, совершенствования медико-генетической помощи отягощенным семьям.

Материалы и методы: В группу исследования вошли больные муковисцидозом, члены их семей и пациенты из группы риска по муковисцидозу, проживающие в Республике Башкортостан – 400 человек. Применялись клинико-лабораторные, молекулярно-генетические и статистические методы исследования, биоинформатическая обработка результатов NGS секвенирования. **Результаты:** За период с 2019 г. по 2022 г. число пациентов в РБ возросло с 80 до 94 человек, частота заболевания составила 1,9 и 2,297 на 100 тыс. населения, соответственно. Диагноз подтвержден в ходе ДНК-диагностики 94 пациентам с муковисцидозом в Республике Башкортостан. Определены региональные особенности генетической архитектуры МВ, это 12 патогенных вариантов нуклеотидной последовательности в гене *CFTR*: Phe508del, E92K, CFTRdele2,3, 3849+10kbC>T, L138ins, G509D, 394delTT, N1303K, W1282X, Y84X, 2143delT, 1525-1G>A составляют 94,9%, частота комплексного аллеля – с.1399C>T (p.Leu467Phe, L467F) – 16,6 %. Пациентам назначена таргентная терапия. **Заключение:** Исследование позволило выявить региональные особенности клинико-генетических аспектов МВ для применения дифференциального и персонализированного подхода в оказании медицинской помощи и планировании мероприятий по улучшению качества жизни больных МВ в регионе.

Ключевые слова: муковисцидоз; ген *CFTR*; регистр; Республика Башкортостан

Для цитирования: Аюрова ГР, Хусаинова РИ. Клинико-генетическая характеристика муковисцидоза в Республике Башкортостан. Научные результаты биомедицинских исследований. 2023;9(4):474-485. DOI: 10.18413/2658-6533-2023-9-4-0-4

Clinical and genetic characteristics of cystic fibrosis in the Republic of Bashkortostan

Guzel R. Ayupova¹ , Rita I. Khusainova^{1,2} 

¹ Bashkir State Medical University,

3 Lenin St., Ufa, 450008, Russia

² Ufa Scientific Center, RAS,

71 Oktyabrya Ave., Ufa, 450054, Russia

Corresponding author: Guzel R. Ayupova (guzel8319@gmail.com)

Abstract

Background: According to estimates of the World Health Organization, 40-50 thousand children worldwide are born each year with cystic fibrosis (CF), a monogenic disease with genetic heterogeneity and clinical variability due to regional and ethnic differences in the gene pool of populations. Monitoring of disease course and molecular pathogenesis in patients from different regions of multi-national Russia is necessary to optimize algorithms of medical genetic counseling and improve the quality of life of patients. **The aim of the study:** Generalization and systematization of the results of dynamic clinical observations, laboratory and molecular genetic studies of patients with cystic fibrosis from the Republic of Bashkortostan (RB) to monitor the effectiveness of work with patients according to the registry of CF patients of the Republic of Bashkortostan, improvement of medical and genetic care for burdened families. **Materials and methods:** The study group included cystic fibrosis patients, their family members, and patients from the cystic fibrosis risk group living in the Republic of Bashkortostan – 400 people. Clinical-laboratory, molecular-genetic and statistical research methods, bioinformatic processing of NGS sequencing results were used. **Results:** During the period from 2019 to 2022 the number of patients in RB increased from 80 to 94, the incidence was 1.9 and 2.297 per 100 thousand population, respectively. The diagnosis was confirmed in the course of DNA diagnosis of 94 patients with cystic fibrosis in the Republic of Bashkortostan. Regional peculiarities of CF genetic architecture were determined: these are 12 pathogenic nucleotide sequence variants in *CFTR* gene: Phe508del, E92K, CFTRdele2,3, 3849+10kbC>T, L138ins, G509D, 394delTT, N1303K, W1282X, Y84X, 2143delT, 1525-1G>A are 94.9%, the frequency of the complex allele – c.1399C>T (p.Leu467Phe, L467F) – 16.6%. Patients were prescribed targeted therapy. **Conclusion:** The study allowed us to identify regional peculiarities of clinical and genetic aspects of CF in order to apply a differential and personalized approach in the provision of medical care and planning of measures to improve the quality of life of CF patients in the region.

Keywords: cystic fibrosis; gene *CFTR*; register; Republic of Bashkortostan

For citation: Ayupova GR, Khusainova RI. Clinical and genetic characteristics of cystic fibrosis in the Republic of Bashkortostan. Research Results in Biomedicine. 2023;9(4):474-485. Russian. DOI: 10.18413/2658-6533-2023-9-4-0-4

Введение. Муковисцидоз (МВ), кистозный фиброз (Cystic fibrosis, OMIM 219700, МКБ-10 Е 84) – одно из самых частых

по распространенности наследственное заболевание, встречается во всем мире, но существуют выраженные популяционные различия по его частоте: у азиатов она составляет 1

: 100 000–350 000, у европейцев - 1 : 2500–4500 [1, 2]. Заболевание обусловлено патогенными вариантами нуклеотидной последовательности в гене муковисцидозного трансмембранныго регулятора проводимости (*MBTP*; Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator – *CFTR*), расположенным на 7 хромосоме (7q31.2), наследуется по аутосомно-рецессивному типу [3].

Установлено, что белок *CFTR* человека представляет собой многодоменный интегральный мембранный белок из 1480 остатков, который регулирует поток ионов хлора через клеточную мембрану. Он является членом надсемейства белков-транспортеров АТФ-связывающей кассеты (ABC) и состоит из двух трансмембранных доменов (MSD), двух нуклеотидсвязывающих доменов (NBD) и регуляторной области (R). Уникальный регуляторный домен (regulatory domain, RD) контролирует активность канала. Трансмембранные сегменты соединены между собой четырьмя внутриклеточными петлями (intracellular loops (ICL)), расположенными на поверхности клетки, и шестью внеклеточными петлями (extracellular loops (ECL)), находящимися снаружи клетки, именно в апикальной мемbrane *CFTR* выполняет свою функцию [4]. К настоящему времени выявлено 7 классов мутаций, приводящих к дисфункции хлоридно-анионного канала. Мутации связаны с нарушением синтеза м-РНК для *CFTR*, формирования его вторичной и третичной структур и работы регуляторных доменов [5, 6]. Генетические варианты в гене *CFTR* запускают патологический процесс в организме больного муковисцидозом с развитием тяжелых жизнеугрожающих состояний.

В настоящее время в мире зарегистрировано около 100 тыс. людей, страдающих МВ. Частота заболевания среди европеоидов составляет от 1 на 600 до 1 на 17000 новорожденных [7, 8]. В Российской Федерации и в Республике Башкортостан этот показатель составляет примерно 1 на 9000 новорожденных [9, 10]. Однако существует различия по распространенности МВ в разных регионах РФ, наибольшее количество больных в г. Москве – 447, наименьшее в Магаданской области – 1 человек [11].

Совершенствование методов ранней ДНК диагностики и использование эффективного таргентного лечения привело к увеличению продолжительности и улучшению качества жизни больных. Несмотря на впечатляющие успехи в диагностике и лечении МВ в РБ и РФ, необходим постоянный мониторинг динамики современных тенденций в медицинской науке для своевременного их внедрения в практическое здравоохранение.

Цель исследования. Обобщение и систематизация результатов динамических клинических наблюдений, лабораторных и молекулярно-генетических исследований пациентов с муковисцидозом из Республики Башкортостан (РБ) для осуществления мониторинга эффективности работы с пациентами согласно реестру пациентов МВ Республики Башкортостан, совершенствования медико-генетической помощи отягощенным семьям.

Материалы и методы исследования. Нами проведен проспективный анализ клинико-лабораторных параметров 400 пациентов, которые наблюдались с диагнозом муковисцидоз, пациентов из группы риска с неустановленным диагнозом муковисцидоз, также членов их семей. Диагноз муковисцидоз подтвержден на основании клинической картины, данных положительной потовой пробы и/или генетического исследования [6]. В 2022 г. на диспансерном наблюдении находились 94 пациента (n=94): 22 – взрослый, 72 – ребенка. Данные пациентов вошли в регистр МВ РБ, их параметры были проанализированы в ходе мониторинга с данными Национального регистра МВ РФ за 2020г. Формат параметров соответствовал Европейскому реестру больных МВ [12].

Оценка состояния здоровья пациентов проведена по следующим критериям: возраст установления диагноза, уровень хлоридов в поте при проведении потового теста, результаты микробиологических исследований, функция внешнего дыхания по данным спирометрии, наличие осложнений течения МВ.

Состояние и функцию легких определяли по показателю форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ) и объема форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ1). Исследования проводили в соответствии с критериями ERS/ATS (American Thoracic

Society и European Respiratory Society по спирометрии) в группе детей, способных сделать дыхательный маневр при проведении спирометрии. Микробиологические исследования флоры дыхательных путей проводились в центральных бактериологических лабораториях. Хронический высып диагностировали согласно рекомендациям [13, 14]. Потовые пробы проводились на приборе для сбора и анализа проводимости пота «Nanoduct» - классический метод индукции пота посредством ионофореза пилокарпина, который сопровождается анализом концентрации электролитов с помощью сенсора проводимости. Молекулярно-генетические исследования проведены у 400 пациентов, подтвержден диагноз муковисцидоз у 94 пациентов и выявлено 150 пациентов с гетерозиготным носительством патогенных вариантов в гене *CFTR*. Исследование проведено с использованием мультиплексной лигазно-зависимой амплификацией зондов (SALSA MLPA Probemix P091 CFTR, MRC Holland), таргетного секвенирования следующего поколения (NGS) гена *CFTR* (Набор ParseqLab, Россия) на платформе Illumina (MiSeq, США), с валидацией полученных результатов секвенированием по Сэнгеру.

Оценку функциональной значимости изменений нуклеотидной последовательности генов проводили, используя различные базы данных и предсказательные программы (SIFT, Polyphen2, MutPred, VarSome, EIGEN, FATHMM, PROVEAN, LRT и т.д.). Для анализа результатов NGS секвенирования использовалось программное обеспечение «VariFind». Объем проводимой терапии пациентам из РБ ценен согласно параметрам, предоставленным в Национальном регистре больных МВ РФ.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета прикладных программ STATISTICA (StatSoft). Для описания выборки использовались меры: критерий среднего арифметического (M), стандартное отклонение (SD), медиана (Me) применялась

для результатов, не имеющих нормального распределения. Уровень значимости считался статистически значимыми при $p < 0,05$.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики: исследование одобрено на Ученом совете Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет». Все пациенты и здоровые доноры подписали информированное добровольное согласие на участие в исследовании в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта».

Результаты и их обсуждение. В Республике Башкортостан к 2022 г. состоит на учете с МВ 94 человека. При оценке демографических особенностей МВ в РБ отмечается рост заболеваемости МВ, это связано с доступностью диагностических мероприятий, в том числе применением ДНК диагностики. За период с 2019 г. по 2022 г. количество пациентов в РБ увеличилось с 80 до 94 человек, частота заболевания составила 1,9 и 2,297 на 100 тыс. населения, соответственно (Табл. 1). У 6 пациентов выявлено заболевание в результате неонatalного скрининга, 250 пациентам проведено дообследование, подтверждающая ДНК диагностика, в результате 8 пациентам установлены мутации в гене *CFTR* (ранее наблюдались с неподтвержденным диагнозом). Одному пациенту, который наблюдался с диагнозом муковисцидоз, после обследования (определение хлоридов в поте, ДНК-диагностики, в том числе у членов семьи пробанда), определено гетерозиготное носительство патогенных вариантов в гене *CFTR*, таким образом диагноз снят. Выявлено 150 человек с гетерозиготным носительством патогенных вариантов в гене *CFTR* в отягощенных семьях.

Заболеваемость муковисцидозом в РБ и в РФ

The incidence of cystic fibrosis in the Republic of Bashkortostan and in the Russian Federation

№ п/п	Название	Численность, п	Число больных, п	взрослые		Частота 1/100 тыс.
				n	%	
1.	Республика Башкортостан, 2022	4 091 423	94	21	22,3	2,297
2.	Российская Федерация (Параметры регистра МВ РФ, 2020)	146 630 227	3722	987	26,5	2,538

При анализе клинических данных учитывается своевременность диагностики заболевания, как фактора, влияющего на продолжительность жизни пациентов (Табл. 2). Из таблицы 2 видно, что средний возраст пациентов в Республике Башкортостан в 2022 году составил $13,9 \pm 9,6$ года, что сопоставимо с параметрами по РФ – $13,7 \pm 9,7$ года. Доля пациентов в возрасте ≥ 18 лет

18 лет по данным регистра по РФ (26,5%) в Республике Башкортостан (23,4%). Самому взрослому пациенту в РБ 42 года (самому старшему пациенту в РФ – 63,1 лет). Средний возраст постановки диагноза в РБ и РФ – $3,3 \pm 4,1$ и $3,6 \pm 6,1$ года, соответственно. В РБ в 2022 г. среди пациентов преобладают пациенты женского пола 57,4%, тогда как в РФ в целом преобладают мужчины 52,0%.

Сравнительный анализ демографических и диагностических показателей у пациентов с муковисцидозом в РБ и в РФ в 2022 г.

Comparative analysis of demographic and diagnostic indicators in patients with cystic fibrosis in the Republic of Bashkortostan and in the Russian Federation, 2022

№ п/п	Показатель	РБ	РФ	p
1.	Общее число, абс., М/Ж	94 40/54	3722 1935/1787	>0,05
2.	Живые, п Летальный исход, п	94 1	3722 32	0,05
Возраст, годы				
3.1.	M ± SD Me (IQR)	13,9±9,6 12,4 (13,4)	13,7±9,7 11,4 (12,4)	>0,05
3.2.	Доля пациентов в возрасте ≥ 18 лет, %	23,4	26,5	<0,005
Возраст установления диагноза, год				
4.1.	M±SD Me (IQR)	3,3±4,1 0,8 (3,8)	3,6±6,1 0,4 (2,8)	>0,05
Мекониевый илеус				
5.1.	всего, n(%)*	0,94	8,9	
5.2.	Оперирован, n(%)*	0,94	14,9	
5.3.	Не оперирован, n(%)*	0	1,0	
Неонатальный скрининг				
6.1.	Охват в 2020, n(%)	99,8	80,2	0,959

Примечание: p – критерий – уровень значимости; *p – не рассчитывался в связи с малочисленностью группы.
Note: p – criterion – level of significance; *p – not calculated due to the small size of the group.

Для оценки тяжести течения заболе-

вания МВ в РБ проведен мониторинг данных инфекционного бронхолегочного воспаления у пациентов из РБ (Табл. 3). Определен микробиологический статус, кото-

рый у пациентов из РБ соответствует общероссийскому, хотя частота встречаемости хронического инфицирования *Pseudomonas aeruginosa* выше и составила – 42,4%, в РФ этот показатель – 34,1%.

Таблица 3

Сравнительный анализ спектра возбудителей у больных муковисцидозом в РБ и РФ в 2022 г., %

Table 3

Comparative analysis of the spectrum of pathogens in cystic fibrosis patients in the Republic of Bashkortostan and in the Russian Federation, 2022, %

№ п/п	Возбудитель инфекции	Встречаемость, %	
		РБ	РФ
1.	<i>Staphylococcus aureus</i> , монокультура,	48,8	63,1
2.	MRSA, n (%)	1,0	3,1
3.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , хр. инфицирование, монокультура	42,4	34,1
4.	Интерmittирующий высып	12,5	16,9
5.	<i>Burkholderia cepacia complex</i>	4,1	5,1
6.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3,3	5,3
7.	<i>Achromobacter</i> spp.	7,5	7,6
8.	Неферментирующие бактерии	12,8	11,3
9.	Нетуберкулезные микобактерии	0,3	1,7

К одним из основных параметров состояния здоровья пациентов с МВ относится респираторная функция по данным спирометрии, в таблице 4 представлены средние показатели ($M \pm SD$) функции внешнего дыхания больных старше 5 лет в РБ и РФ. Самый высокий охват данным исследованием в РБ

отмечается среди детей в возрасте с 6 до 18 лет. Средние показатели ($M \pm SD$) функции внешнего дыхания у пациентов сопоставимы с показателями по РФ, данное исследование должно быть доступно всем пациентам с муковисцидозом для контроля эффективности проводимой терапии.

Таблица 4

Функция внешнего дыхания у больных муковисцидозом по данным спирометрии у пациентов в РБ и РФ в 2022

Table 4

External respiration function in cystic fibrosis patients according to spirometry in patients in the Republic of Bashkortostan and in the Russian Federation, 2022

№ п/п	Возраст пациентов	Параметры	РБ	РФ
1.	Дети до 18 лет	абс.	65 из 73	2735 из 3722
		ОФВ1, %	87,1±22,8	86,1±22,6
		ФЖЕЛ, %	88,3±20,8	88,8±20,7
2.	Взрослые	абс.	6 из 21	987 из 3722
		ОФВ1, %	70,3±22,6	61,0±22,6
		ФЖЕЛ, %	87,1±20,7	88,8±20,7

При проведении неонатального скрининга (ранней диагностики) за период с 2006 г. по 2022 г. 48 (88,9%) больным диагностирован МВ, тогда, как всего за этот период диагноз муковисцидоз установлен

54 пациентам. Таким образом, неонатальный скрининг не позволяет выявить всех пациентов на раннем этапе диагностики, поэтому необходимо сохранение насторо-

женности, так как возможна и поздняя манифестации заболевания. Охват неонатальным скринингом в РБ в 2020 г. составил 99,6%, в ходе которого диагноз муковисцидоз установлен: в 2019 г. – 2, 2020 г. – 2,

2021 г. – 1, 2022 г. – 1 пациенту.

Охват генетическим обследованием пациентов с МВ в РБ в 2019-2022 гг. составил 100%, что гораздо выше по сравнению с показателем охвата по РФ – 93% (Табл. 5).

Таблица 5

Характеристика эффективности ДНК-диагностики и частота мажорной мутации в гене *CFTR* в РБ и в РФ в 2022 г.

Table 5

Characterization of the efficiency of DNA diagnosis and the frequency of major mutations in the *CFTR* gene in the Republic of Bashkortostan and in the Russian Federation, 2022

№ п/п	Варианты в гене <i>CFTR</i>	РБ, %	РФ, %
1.	Генетическое исследование (охват)	100	93
2.	Доля выявленных вариантов гена <i>CFTR</i>		
	Две мутации	94,7	83,3
	Одна мутация	2,2	13,3
	Обе мутации не выявлены	3,2	3,5
Мажорная мутация	F508del/ F508del	20,2	30,0
	F508del/ неF508del	57,3	45,2
	неF508del/ неF508del	22,4	24,8
	F508del, аллельная частота	43,9	52,6
Течение заболевания	Мягкий генотип	12,4	23,2
	Тяжелый генотип	87,6	76,8
	Генотип не определен	5,3	16,7

Проведена оценка спектра и частоты мутаций в гене *CFTR* с использованием различных технологий в том числе и таргентного NGS секвенирования. Молекулярный дефект заболевания идентифицирован у 94,7% пациентов с муковисцидозом, выявлены 26 мутаций в гене *CFTR*. В результате проведенной ДНК диагностики диагностировали 36 генотипов у 89 пациентов, у 2 пациентов выявлена 1 мутация, у 3 - мутации не обнаружены, хотя имеются высокие показатели хлоридов в поте, пациенты находятся под динамическим клиническим наблюдением.

Чаще всего в РБ встречаются 5 мутаций (варианты нуклеотидной последовательности, варианты): Phe508del, E92K, CFTRdelle2,3, 3849+10kbC>T, L138ins, которые в сумме дают 80,8% мутаций. 7 мутаций: G509D, 394delTT, N1303K, W1282X, Y84X, 2143delT, 1525-1G>A составляют – 14,1%. Остальные варианты гена *CFTR* не являются регион специфичными, хотя при наличии клинической картины у пациентов целесообразна ДНК-диагностика на муко-

висцидоз. Региональные особенности вариантов всегда учитываются при проведении ДНК-диагностики муковисцидоза в РБ с целью уменьшения сроков и расходов на диагностику заболевания, так как в ходе исследования нами выявлены существенные отличия частоты мутаций по сравнению с общими данными по РФ [15]. Необходимо стремиться к полному генетическому обследованию больных, включая полногеномное секвенирование, MLPA анализ, проведение теста кишечных потенциалов больным, у которых не выявлены патогенные варианты гена *CFTR* стандартными методами.

При сравнительном анализе частот вариантов гена *CFTR* у пациентов из РБ с выборкой из регистра РФ выявлены достоверные различия. В РФ в пятерку мажорных мутаций вошли: F508del, CFTRdelle2,3, E92K, 1677delTA, 3849+10kbC->T. Вариант F508del- главная генетическая причина МВ в РФ и в РБ. Аллельная частота генетического варианта F508del в РБ и РФ – 43,9% и 52,61%, соответственно. Мутация L138ins в РФ составляет 1,53%, в РБ эта мутация

встречается чаще – 5,6%, частота комплексного аллеля F508del/[L467F;F508del] – 16,7 % (в РФ частота – 6,0–8,0%). Это учитывается при проведении ДНК-диагностики муковисцидоза пациентам из РБ в регионе.

Проведено исследование аллельной частоты всех обнаруженных вариантов нуклеотидной последовательности гена *CFTR* и идентификация степени тяжести генотипа (для «тяжелого» присутствие мутации гена *CFTR* I–III класса, «мягкого» – 1 вариант гена *CFTR* IV–VII класса) [16, 17]. «Тяжелые» генотипы преобладают среди пациентов РБ во всех возрастных группах, однако их число снижается с возрастом, как в РФ.

Нами также проведена комплексная оценка проводимого лечения муковисцидоза в Республике Башкортостан (Табл. 6). В целом назначение антибиотикотерапии проводится в соответствии с чувствительностью выделенных микроорганизмов, с учетом ранее проводимого лечения, в том числе

пациентам назначается курсовое применение ингаляционных антибиотиков, согласно национальному консенсусу по диагностике и лечению МВ [18, 19]. Применяется монотерапия азитромицином и комбинации аминогликозидов и цефалоспоринов III–IV поколения [20].

Терапия, включающая дорназу альфа, ферменты, кинезиотерапию, витамины, урсодезоксихолевую кислоту, проводилась всем пациентам в РБ, принципиальных различий между показателями между РФ и РБ не выявлено (Табл. 6). Назначение доз панкреатических ферментов осуществляется с учетом особенностей течения заболевания при «мягком» и «тяжелом» генотипе у пациентов с МВ, проведена коррекция терапии у пациентов с вариантом E92K. В РБ терапия пациентов с муковисцидозом проводится в соответствии с клиническими рекомендациями «Кистозный фиброз (муковисцидоз)» [20].

Таблица 6

Table 6

Характеристика получаемой терапии у пациентов в РБ и РФ, n (%)
Characteristic of the therapy received by patients in the Republic of Bashkortostan and in the Russian Federation, n (%)

№ п/п	Лекарственный препарат	РБ	РФ
1.	Дорназаальфа	100	95,2
2.	Гипертонический раствор натрия хлорида	75,3	72,7
3.	Антибиотики ингаляционные	40,5	45,7
4.	Антибиотики внутривенные	35,7	32,3
5.	Антибиотики пероральные	60,5	57,4
6.	Бронходилататоры	43,3	45,5
7.	Глюкокортикоиды ингаляционные	9,3	10,3
8.	Глюкокортикоиды системные	5,0	3,6
9.	Азитромицин в субингибирующей дозе	30,8	26,5
10.	Урсодезоксихолевая кислота	88,6	88,1
11.	Панкреатические ферменты	95,3	93,3
12.	Жирорастворимые витамины	95,2	91,2
13.	Кинезиотерапия	95,7	81,6
14.	Кислородотерапия	2,3	4,4

Согласно данным Фонда «Круг добра» в 2022 году РБ оказалась в лидерах по РФ по обеспеченности пациентов до 18-летнего возраста таргентной терапией, так как всем пациентам РБ проведено молекулярно-генетическое исследование, что является главным критерием назначения таргентной тера-

пии. 44 ребенка получают современное эффективное лечение. В настоящее время в Республике Башкортостан начали получать таргентную терапию препаратом: МНН «Лумакафтор+ивакафтор» – 11 пациентов гомозигот по Phe508del. Таргентный препарат, незарегистрированный в РФ, предоставляемый

Фондом «Круг добра» МНН «Элексакафторм+Тезакафторм+Ивакафторм/Ивакафторм» получают 33 ребенка.

Мы исследовали генотип F508del/[L467F;F508del], который приводит к устойчивости к таргентной терапии VX-809 лумакафторм и VX-770 ивакафторм [21, 22]. Таким образом, у 13 детей, обнаружены 2 пациента с комплексным аллелем. Всего в РБ 18 пациентов гомозиготных по F508del в гене CFTR, у троих больных выявлен генотип F508del/[L467F;F508del] – частота составила – 16,7 %.

По мере взросления у пациентов нарастает количество осложнений, что утяжеляет состояние здоровья больных, поэтому применение единых клинических рекомендаций позволяет сформировать раннюю тактику диагностики, терапии, мониторинга состояния здоровья пациентов с МВ в РБ и в РФ и реализует персонализированный подход для лечения детей и взрослых с МВ с использованием современной фармакогенетической терапии. Высокая эффективность применения таргентной терапии подтверждена клиническим опытом специалистов разных стран, в которых она широко используется на протяжении 10 лет [23, 24].

Таким образом, оказание медицинской помощи пациентам с МВ необходимо проводить с учетом региональных особенностей течения заболевания, спектра и частот мутаций в гене CFTR [25, 26, 27], что позволит улучшить качество и продолжительность жизни пациентов.

Заключение. Проведена клинико-генетическая характеристика муковисцидоза в Республике Башкортостан и выявлены некоторые региональные особенности. В Республике Башкортостан показатели среднего возраста пациентов, возраст установления диагноза сопоставимы с аналогичными показателями по РФ. При оценке функций внешнего дыхания у пациентов с МВ отмечен высокий уровень ОФВ1, благодаря ранней диагностике, назначению дорназы-альфа, бронходилататоров, кинезиотерапии, антибиотиков. Высокий процент случаев установления диагноза при проведении неонatalного скрининга достигается его высоким охватом

и эффективной организацией. Охват генетическим исследованием в Республике Башкортостан выше по сравнению с эти показателем по РФ, 100 % и 93 % соответственно. Определены региональные особенности спектра и частот мутаций – это 12 вариантов нуклеотидной последовательности в гене CFTR: Phe508del, E92K, CFTRdele2,3, 3849+10kbC>T, L138ins, G509D, 394delTT, N1303K, W1282X, Y84X, 2143delT, 1525-1G>A составляют 94,9%, идентифицирована частота комплексного аллеля – с.1399C>T (p.Leu467Phe, L467F) – 16,6 %. По результатам молекулярно-генетической диагностики МВ в РБ, пациентам назначена таргентная терапия.

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 authors have no conflict of interest to declare.

Список литературы

1. Zvereff VV, Faruki H, Edwards M, et al. Cystic fibrosis carrier screening in a North American population. *Genetics in Medicine.* 2014;16(7):539-546. DOI: <https://doi.org/10.1038/gim.2013.188>
2. Красовский СА, Адян ТА, Амеоина ЕЛ, и др. Муковисцидоз: некоторые вопросы эпидемиологии и генетики. *Практическая пульмонология.* 2019;9:45-50.
3. Hamosh A, Scott AF, Amberger J, et al. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). *Human Mutation.* 2000;15(1):57-61. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(200001\)15:1<57::AID-HUMU12>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(200001)15:1<57::AID-HUMU12>3.0.CO;2-G)
4. Loo TW, Clarke DM. Corrector VX-809 promotes interactions between cytoplasmic loop one and the first nucleotide-binding domain of CFTR. *Biochemical Pharmacology.* 2017;136:24-31. DOI: <https://doi.org/10.1002/bph.1471>

- <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.03.020>
5. Callebaut I, Chong PA, Forman-Kay JD. CFTR structure. *Journal of Cystic Fibrosis.* 2018;17(2):S5-S8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2017.08.008>
6. Каширская НЮ, Капранов НИ, Кондратьева ЕИ, редакторы. Муковисцидоз. Издание 2-е., переработанное и дополненное. М.: ИД «МЕДПРАКТИКА-М»; 2021.
7. Kelly J. Environmental scan of cystic fibrosis research worldwide. *Journal of Cystic Fibrosis.* 2017;16(3):367-370. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2016.11.002>
8. Кондратьева ЕИ, Каширская НЮ, Капранов НИ, редакторы. Национальный консенсус (2-е издание) «Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия» 2018. М.: ООО «Компания БОРГЕС»; 2018.
9. Keogh RH, Szczesniak R, Taylor-Robinson D, et al. Up-to-date and projected estimates of survival for people with cystic fibrosis using baseline characteristics: A longitudinal study using UK patient registry data. *Journal of Cystic Fibrosis.* 2018;17(2):218-227. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2017.11.019>
- 10.Шерман ВД, Кондратьева ЕИ, Воронкова АЮ, и др. Влияние неонатального скрининга на течение муковисцидоза на примере групп пациентов Московского региона. Медицинский совет. 2017;18:124-128. DOI: <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2017-18-124-128>
- 11.Кондратьева ЕИ, Красовский СА, Старицова МА, и др. редакторы. Регистр пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации. 2020 год. М.: ИД «МЕДПРАКТИКА-М»; 2022.
- 12.Cystic Fibrosis Worldwide [Электронный ресурс] [дата обращения 12.06.2019]. URL: <https://www.cfww.org/>
- 13.Lee TWR, Brownlee KG, Conway SP, et al. Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis.* 2003;2(1):29-34. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1569-1993\(02\)00141-8](https://doi.org/10.1016/S1569-1993(02)00141-8)
- 14.Zemanick ET, Sagel SD, Harris JK. The airway microbiome in cystic fibrosis and implication for treatment. *Current Opinion in Pediatrics.* 2011;23(3):319-324. DOI: <https://doi.org/10.1097/mop.0b013e32834604f2>
- 15.Castellani C, Duff AJA, Bell SC, et al. ECFS best practice guidelines: the 2018 revision. *Journal of Cystic Fibrosis.* 2018;17(2):153-178.
- DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2018.02.006>
16.Olivier M, Kavvalou A, Welsner M, et al. Real-life impact of highly effective CFTR modulator therapy in children with cystic fibrosis. *Frontiers in Pharmacology.* 2023;14:1176815. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1176815>
- 17.Красовский СА, Каширская НЮ, Черняк АВ, и др. Генетическая характеристика больных муковисцидозом в Российской Федерации по данным Национального регистра (2014). *Пульмонология.* 2016;26(2):133-151. DOI: <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2016-26-2-133-151>
- 18.Nichols DP, Singh PK, Baines A, et al. Testing the effects of combining azithromycin with inhaled tobramycin for *P. aeruginosa* in cystic fibrosis: a randomised, controlled clinical trial. *Thorax.* 2022;77(6):581-588. DOI: <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2021-217782>
- 19.Всероссийская ассоциация для больных муковисцидозом [Электронный ресурс] [дата обращения 12.12.2021]. URL: <https://mukoviscidoz.org/>
- 20.Кондратьева ЕИ, Амелина ЕЛ, Чернуха МЮ, и др. Обзор клинических рекомендаций «Кистозный фиброз (муковисцидоз)» (2020). *Пульмонология.* 2021;31(2):135-146. DOI: <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2021-31-2-135-146>
- 21.Chevalier B, Hinzpeter A. The influence of CFTR complex alleles on precision therapy of cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis.* 2020;19(Suppl 1):S15-S18. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2019.12.008>
- 22.Baatallah N, Bitam S, Martin N, et al. Cis variants identified in F508del complex alleles modulate CFTR channel rescue by small molecules. *Human Mutation.* 2018;39(4):506-514. DOI: <https://doi.org/10.1002/humu.23389>
- 23.Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, et al. Lumacaftor-ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del CFTR. *New England Journal of Medicine.* 2015;373(3):220-231. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1409547>
- 24.Southern KW, Patel S, Sinha IP, et al. Correctors (specific therapies for class II CFTR mutations) for cystic fibrosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2018;8(8):CD010966. DOI: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010966.pub2>
- 25.Куцев СИ, Ижевская ВЛ, Кондратьева ЕИ. Таргетная терапия при муковисцидозе. *Пульмонология.* 2021;31(2):226-236. DOI:

<https://doi.org/10.18093/0869-0189-2021-31-2-226-236>

26. Амелина ЕЛ, Ефремова АС, Мельяновская ЮЛ, и др. Использование функциональных тестов для оценки остаточной активности канала CFTR и индивидуального подбора эффективных CFTR-модуляторов для лечения пациентов с муковисцидозом с «мягким» и «тяжелым» генетическими вариантами. Пульмонология. 2021;31(2):167-177. DOI: <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2021-31-2-167-177>

27. Ефремова АС, Мельяновская ЮЛ, Булатенко НВ, и др. Описание редких аллелей гена CFTR при муковисцидозе с помощью функциональных тестов и форсколинового теста на ректальных органоидах. Пульмонология. 2021;31(2):178-188. DOI: <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2021-31-2-178-188>

References

1. Zvereff VV, Faruki H, Edwards M, et al. Cystic fibrosis carrier screening in a North American population. *Genetics in Medicine*. 2014;16(7):539-546. DOI: <https://doi.org/10.1038/gim.2013.188>
2. Krasovsky SA, Adyan TA, Amelina EL, et al. Cystic fibrosis: some issues of epidemiology and genetics. *Practical pulmonology*. 2019;9:45-50.
3. Hamosh A, Scott AF, Amberger J, et al. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). *Human Mutation*. 2000;15(1):57-61. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(200001\)15:1<57::AID-HUMU12>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(200001)15:1<57::AID-HUMU12>3.0.CO;2-G)
4. Loo TW, Clarke DM. Corrector VX-809 promotes interactions between cytoplasmic loop one and the first nucleotide-binding domain of CFTR. *Biochemical Pharmacology*. 2017;136:24-31. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.03.020>
5. Callebaut I, Chong PA, Forman-Kay JD. CFTR structure. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2018;17(2):S5-S8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2017.08.008>
6. Kashirskaya NY, Kapranov NI, Kondratieva EI, editors. Cystic fibrosis. 2nd edition, revised and enlarged. Moscow: ID "MEDPRAKTIKA-M"; 2021. Russian.
7. Kelly J. Environmental scan of cystic fibrosis research worldwide. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2017;16(3):367-370. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2016.11.002>
8. Kondratieva EI, Kashirskaya NY, Kapranov NI, editors. National consensus (2nd edition) "Cystic fibrosis: definition, diagnostic criteria, therapy" 2018. M.: LLC "Compania BORGES"; 2018. Russian.
9. Keogh RH, Szczesniak R, Taylor-Robinson D, et al. Up-to-date and projected estimates of survival for people with cystic fibrosis using baseline characteristics: A longitudinal study using UK patient registry data. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2018;17(2):218-227. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2017.11.019>
10. Sherman VD, Kondratieva EI, Voronkova AY, et al. Influence of neonatal screening for cystic fibrosis by the example of patients of the Moscow region. *Meditinskiy sovet*. 2017;18:124-128. Russian. DOI: <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2017-18-124-128>
11. Kondratieva EI, Krasovsky SA, Staranova MA, et al. editors. Register of patients with cystic fibrosis in the Russian Federation. Moscow: ID "MEDPRAKTIKA-M"; 2022. Russian.
12. Cystic Fibrosis Worldwide [Internet] [cited 2019 June 12]. Available from: <https://www.cfcww.org/>
13. Lee TWR, Brownlee KG, Conway SP, et al. Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2003;2(1):29-34. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1569-1993\(02\)00141-8](https://doi.org/10.1016/S1569-1993(02)00141-8)
14. Zemanick ET, Sagel SD, Harris JK. The airway microbiome in cystic fibrosis and implication for treatment. *Current Opinion in Pediatrics*. 2011;23(3):319-324. DOI: <https://doi.org/10.1097/mop.0b013e32834604f2>
15. Castellani C, Duff AJA, Bell SC, et al. ECFS best practice guidelines: the 2018 revision. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2018;17(2):153-178. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2018.02.006>
16. Olivier M, Kavvalou A, Welsner M, et al. Real-life impact of highly effective CFTR modulator therapy in children with cystic fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*. 2023;14:1176815. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1176815>
17. Krasovsky SA, Kashirskaya NY, Chernyak AV, et al. Genetic characterization of cystic fibrosis patients in Russian Federation according to the National Register, 2014. *Pulmonologiya*. 2016;26(2):133-151. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2016-26-2-133-151>
18. Nichols DP, Singh PK, Baines A, et al. Testing the effects of combining azithromycin with

inhaled tobramycin for *P. aeruginosa* in cystic fibrosis: a randomised, controlled clinical trial. Thorax. 2022;77(6):581-588. DOI: <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2021-217782>

19. All-Russian Association for Cystic Fibrosis Patients [Internet] [cited 2021 Dec 12]. Russian. Available from: <https://mukoviscidoz.org/>

20. Kondratyeva EI, Amelina EL, ChernukhaMYu, et al. Review of clinical guidelines «Cystic fibrosis», 2020. Pulmonologiya. 2021;31(2):135-146. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2021-31-2-135-146>

21. Chevalier B, Hinzpeter A. The influence of CFTR complex alleles on precision therapy of cystic fibrosis. Journal of Cystic Fibrosis. 2020;19(Suppl 1):S15-S18. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2019.12.008>

22. Baatallah N, Bitam S, Martin N, et al. Cis variants identified in F508del complex alleles modulate CFTR channel rescue by small molecules. Human Mutation. 2018;39(4):506-514. DOI: <https://doi.org/10.1002/humu.23389>

23. Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, et al. Lumacaftor-ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del CFTR. New England Journal of Medicine. 2015;373(3):220-231. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1409547>

24. Southern KW, Patel S, Sinha IP, et al. Correctors (specific therapies for class II CFTR mutations) for cystic fibrosis. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2018;8(8):CD010966. DOI: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010966.pub2>

25. Kutsev SI, Izhevskaya VL, Kondratyeva EI. Targeted therapy for cystic fibrosis. Pulmonologiya. 2021;31(2):226-236. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2021-31-2-226-236>

26. Amelina EL, Efremova AS, Melyanovskaya YuL, et al. Functional tests for assessment of residual CFTR channel activity and personalized selection of efficacious CFTR-modulators for cystic fibrosis patients with ‘mild’ and ‘severe’ genetic variants. Pulmonologiya. 2021;31(2):167-177. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2021-31-2-167-177>

27. Efremova AS, Melyanovskaya YuL, Bulatenko NV, et al. Description of rare alleles of the CFTR gene in cystic fibrosis using functional tests and forskolin-induced swelling assay in rectal organoids. Pulmonologiya. 2021;31(2):178-188. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2021-31-2-178-188>

Статья поступила в редакцию 25 января 2023 г.

Поступила после доработки 26 мая 2023 г.

Принята к печати 20 июня 2023 г.

Received 25 January 2023

Revised 26 May 2023

Accepted 20 June 2023

Информация об авторах

Гузель Рамилевна Аюпова, аспирант по научной специальности 1.5.7 – Генетика ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», г. Уфа, Российская Федерация, E-mail: guzel8319@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6175-9764>.

Рита Игоревна Хусаинова, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры медицинской генетики и фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет»; ведущий научный сотрудник Института биохимии и генетики, ФГБУН Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, г. Уфа, Российская Федерация, E-mail: ritakh@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8643-850X>.

Information about the authors

Guzel R. Ayupova, Post-graduate Student in Scientific Specialty 1.5.7 – Genetics, Bashkir State Medical University, Ufa, Russia, E-mail: guzel8319@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6175-9764>.

Rita I. Khusainova, Doct. Sci. (Biology), Professor, Professor at the Department of Medical Genetics and Fundamental Medicine, Bashkir State Medical University; Leading Researcher at the Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, RAS, Ufa, Russia, E-mail: ritakh@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8643-850X>.



DOI: 10.18413/2658-6533-2023-9-4-0-5

УДК 575.1:612-17

Варианты полиморфизма гена NOS3 и основные характеристики вариабельности сердечного ритма у жителей-северян

И.Н. Безменова , И.В. Аверьянова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Научно-исследовательский центр «Арктика» Дальневосточного отделения Российской академии наук, пр. Карла Маркса, д. 24, г. Магадан, 685000, Российская Федерация
Автор для переписки: И.Н. Безменова (lependina_bel@mail.ru)

Резюме

Актуальность: Вариабельность сердечного ритма как демонстрация функций автономной нервной системы отражает здоровье человека и его благополучие. Мониторинг показателей вариабельности сердечного ритма имеет важное значение для профилактики развития сердечно-сосудистых заболеваний, фокусируясь на дисбалансе, характеризующемся снижением парасимпатической активности и одновременным увеличением симпатической активности. Показатели вариабельности сердечного ритма могут представлять собой маркер вертикальной интеграции, в том числе процессов адаптации, которые формируют активность ствола мозга и вегетативные реакции в организме. Эндотелиальная синтаза окиси азота является основным источником сосудистого оксида азота, вариабельность уровня которого в большей степени обусловлена генетически. Однако влияние оксида азота на вегетативный контроль сердца человека, на данный момент остается недостаточно изученным. **Цель исследования:** Изучение частоты встречаемости полиморфизма -786 T>C (rs 2070744) гена эндотелиальной синтазы окиси азота (*NOS3*) и его взаимосвязи с основными характеристиками вариабельности сердечного ритма у жителей-северян. **Материалы и методы:** В поперечном исследовании участвовали 127 мужчин-северян, преимущественно европейцев, проживающих или рожденных на территории Магаданской области. У обследованных проведено генотипирование гена эндотелиальной синтазы окиси азота, определены показатели вариабельности кардиоритма при помощи комплекса «Варикард». **Результаты:** Распределение генотипов по исследуемому полиморфизму следующее: Т/Т – 40,95%; Т/С – 47,24%; С/С – 11,81% (соответствует равновесию Харди-Вайнберга). У лиц с генотипом Т/Т выявлено преобладание парасимпатического звена вегетативной нервной системы. У носителей мутантного аллеля С гена эндотелиальной окиси азота установлено увеличение симпатической активности в регуляции сердечного ритма, а также значительно более низкие показатели очень низкочастотной составляющей общей мощности спектра. **Заключение:** Полученные результаты позволяют предположить, что низкое значение очень низкочастотной составляющей общей мощности спектра кардиоритма может представлять собой ранний неинвазивный биомаркер снижения уровня эндотелиальной окиси азота как предиктора высокого риска сердечно-сосудистых заболеваний и снижения качества жизни в целом.

Ключевые слова: вариабельность сердечного ритма; сердечно-сосудистые заболевания; генетический полиморфизм

Для цитирования: Безменова ИН, Аверьянова ИВ. Варианты полиморфизма гена *NOS3* и основные характеристики вариабельности сердечного ритма у жителей-северян. Научные результаты биомедицинских исследований. 2023;9(4):486-499. DOI: 10.18413/2658-6533-2023-9-4-0-5

NOS3 gene polymorphism variants and main characteristics of heart rate variability in Northerners

Irina N. Bezmenova , **Inessa V. Averyanova** 

Scientific Research Center «Arktika», Far East Branch of the Russian Academy of Sciences,
24 Karl Marx Ave., Magadan, 685000, Russia

Corresponding author: Irina N. Bezmenova (lependina_bel@mail.ru)

Abstract

Background: Heart rate variability as a demonstration of autonomic nervous system function reflects human health and well-being. By monitoring heart rate variability indices and focusing on the imbalance with a decrease in parasympathetic activity and a simultaneous increase in sympathetic activity, we can prevent the development of cardiovascular diseases. Heart rate variability indices can be a marker of vertical integration, including adaptation processes that form brain stem activity and autonomic reactions in the body. Endothelial nitric oxide synthase is the main source of vascular nitric oxide, with its level variability being mainly determined genetically. However, the effect of nitric oxide on the autonomic control of the human heart still needs further investigation.

The aim of the study: This study aimed to consider the incidence of -786 T>C (rs 2070744) polymorphism of the endothelial nitric oxide (*NOS3*) gene and its relationship with main characteristics of heart rate variability in northerners. **Materials and methods:** The cross-sectional study involved 127 northern men, predominantly Caucasians, living or born on the territory of the Magadan region. The examinees underwent gene typing, and the VARICARD complex was used to determine heart rate variability indices. **Results:** The ratio of the gene types through the studied polymorphism was as follows: T/T – 40,95%; T/C – 47,24%; C/C – 11,81% (corresponds to the Hardy-Weinberg equilibrium). The T/T gene type subjects demonstrated predominance of the parasympathetic link of the autonomic nervous system. Those having the mutant allele C of the endothelial nitric oxide gene exhibited elevated sympathetic activity in heart rhythm regulation, as well as significantly lowered variables of the very low-frequency component of the spectrum total power. **Conclusion:** The obtained results suggest that low variables of the very low-frequency component of the heart rhythm spectrum total power may represent an early non-invasive biomarker of a decrease in the level of endothelial nitric oxide as a predictor for a high risk of cardiovascular diseases and reduced quality of life in general.

Keywords: heart rate variability; cardiovascular diseases; genetic polymorphism

For citation: Bezmenova IN, Averyanova IV. *NOS3* gene polymorphism variants and main characteristics of heart rate variability in Northerners. Research Results in Biomedicine. 2023;9(4):486-499. Russian. DOI: 10.18413/2658-6533-2023-9-4-0-5

Список сокращений

NO – оксид азота;
ЧСС (HR), уд. /мин – частота сердечных сокращений;

MxDMn, мс – разность между максимальным и минимальным значениями кардиоинтервалов, или вариационный размах;
SDNN, мс – стандартное отклонение полного массива кардиоинтервалов;
CV, % – коэффициент вариации полного массива кардиоинтервалов;
RMSSD, мс – квадратный корень из суммы разностей последовательного ряда кардиоинтервалов;
pNN50, мс – число пар кардиоинтервалов с разницей более 50 мс в % у общему числу кардиоинтервалов;
Mo, мс – мода;
AMo, мс – амплитуда моды;
SI, усл.ед. – стресс-индекс (индекс напряжения регуляторных систем);
TP, мс^2 – суммарная мощность спектра временных значений R-R интервалов сердечного ритма (без ультразвуковых составляющих, определяемая как сумма сложения HF, мс^2 , LF мс^2 , VLF мс^2);
HF – мощность спектра высокочастотного компонента вариабельности сердечного ритма в диапазоне 0,4-0,15 Гц (дыхательные волны);
LF мс^2 – мощность спектра низкочастотного компонента вариабельности сердечного ритма в диапазоне 0,15-0,04 Гц (сосудистые волны);
VLF мс^2 – мощность спектра очень низкочастотного компонента вариабельности ритма сердца в диапазоне 0,04 - 0,015 Гц.;
IC, усл. ед. – индекс централизации.

Введение. Вегетативная нервная система влияет на частоту сердечных сокращений и вариабельность сердечного ритма, параметры, которые измеряют изменения от удара к удару во временных интервалах между последовательными ударами сердца. Параметры вариабельности сердечного ритма часто анализируются для оценки баланса симпатической и парасимпатической регуляторных систем работы сердца [1]. Изменение частоты сердечных сокращений генерируется взаимодействием сердца и мозга через симпатическую и парасимпатическую ветви вегетативной нервной системы. Вариабельность кардиоинтервалов отражает реакцию вегетативных нервов сердца на сигналы от баро-, химио-, носоглоточных и других рецепторов, а также центральных вегетативных команд, которые связаны со стрессом, физической активностью, возбуждением, сном и т. д. [2, 3].

Вариабельность сердечного ритма является показателем регуляции вегетативного баланса, артериального давления, газообмена, сердца и сосудистого тонуса, помогая адаптироваться к различным пси-

коэмоциональным и экологическим стрессорам среды. Показано, что вариабельность сердечного ритма как демонстрация функций автономной нервной системы отражает здоровье человека и его благополучие [4]. Основной функцией автономной нервной системы является гомеостаз. Активность вегетативной нервной системы и факторы риска тесно связаны между собой, поскольку дисбаланс вегетативной нервной системы способствует созданию предпатологической среды для факторов риска, таких как гипертония, диабет или фибрillation предсердий, а также изменения эндотелиального гомеостаза в пользу проторботического/привоспалительного состояния, что в конечном итоге приводит к увеличению риска сердечно-сосудистых заболеваний [5, 6]. Таким образом, мониторинг характеристик вариабельности сердечного ритма имеет важное значение для профилактики развития сердечно-сосудистых заболеваний, фокусируясь на дисбалансе, характеризующемся снижением парасимпатической активности и одновременным увеличением симпатической активности [7]. Указывается и на то, что показатели вариабельности сердечного ритма могут

представлять собой маркер вертикальной интеграции, в том числе процессов адаптации, которые формируют активность ствола мозга и вегетативные реакции в организме. Поэтому неудивительно, что вариабельность сердечного ритма считается показателем стресса [8], а также отражает риски заболеваний и ускоренного старения [9].

Эндотелиальная NO-синтаза (*NOS3*) является основным источником сосудистого оксида азота, при этом известно, что большая часть вариабельности уровней оксида азота обусловлена генетически [10]. *NOS3* является наиболее важной изоформой NO-синтазы в эндотелии сосудов, которая активирует продукцию оксида азота эндотелием сосудов, и, следовательно, играет ключевую роль в регуляции работы сердечно-сосудистой системы [11]. Ген эндотелиальной синтазы оксида азота (*NOS3*) клонирован в 1993 году и картирован на 7 хромосоме, а именно в позиции 7q35-36 [12]. Литературные данные свидетельствуют о том, что ген *NOS3* является высокополиморфным – на данный момент описано не менее 11 полиморфизмов [13]. Полиморфизм -786T>C (rs2070744) представляет собой однокарбонатный полиморфизм, который приводит к замене тимина (T) на цитозин (C) в позиции 786 в промоторной области гена *NOS3*. Следствием данной замены является подавление транскрипции и значительное снижение экспрессии фермента, что в конечном счете, ведет и к уменьшению продукции оксида азота [14]. Согласно литературным данным, носители хотя бы одного аллеля *NOS3**C (rs2070744), имеют меньшее количество мРНК и сниженный уровень оксида азота в крови по сравнению с носителями предкового аллеля *NOS3**T (rs2070744) [15]. В литературе имеются данные многих исследований, обнаруживших что функционирование некоторых параметров сердечно-сосудистой системы находится под влиянием в том числе и полиморфизма -786T>C (rs2070744) гена *NOS3* [16, 17].

Исследования направленные на изучение роли оксида азота в регуляции активности вегетативной нервной системы начали проводить около 30 лет назад. Первоначальное предположение о том, что оксид азота может быть важным медиатором в вегетативном контроле сердца, возникло в результате демонстрации отдельных популяций нейронов, которые обладают NO-синтазой в пределах известных сердечных вегетативных путей [18]. Данные, полученные на животных, свидетельствуют о том, что оксид азота, синтезируемый в этих участках, активен в модуляции активности в обеих ветвях вегетативной нервной системы. При этом окись азота, по-видимому, действует как симпатолитическое средство, снижая активность в симпатовозбуждающих ядрах ствола головного мозга и уменьшая центральный симпатический отток, а также ослабляя сердечные реакции на симпатическую стимуляцию [18, 19]. И наоборот, оксид азота увеличивает активность в центральных блуждающих мотонейронах [20] и усиливает сердечный ответ на стимуляцию блуждающего нерва [21]. Однако до настоящего времени нет однозначного ответа, в полной мере объясняющего влияние NO на вегетативный контроль сердца человека.

Цель исследования. В соответствии с вышесказанным, для того чтобы получить более четкое представление о взаимосвязи между полиморфизмами гена *NOS3* и вегетативной регуляцией, мы изучили особенности показателей вариабельности сердечного ритма в группе жителей-северян с разными вариантами генотипов по данному локусу.

Материалы и методы исследования. Для реализации поставленной цели проведено сплошное поперечное исследование жителей-северян Магаданской области в 2022 году. В рамках исследования была обследована выборка из 127 добровольцев-мужчин, преимущественно европейцев. Выборка сформирована из взрослого населения, основные характеристики исследуемой когорты жителей-северян представлены в таблице 1.

Основные характеристики исследуемой выборки жителей-северян
Table 1

Baseline characteristics of study cohort of northerners

Основные показатели	
Средний возраст, г (M ± m)	41,3±1,5
Средняя масса тела, кг (M ± m)	82,96±1,23
Средняя длина тела стоя, см (M ± m)	178,26±0,66
ИМТ, кг/м ² (M ± m)	26,16±0,38
САД, мм.рт.ст. (M ± m)	128,48±1,40
ДАД, мм.рт.ст. (M ± m)	80,31±0,98
ЧСС, уд/мин (M ± m)	69,21±1,05
Отягощенность соматопатологией	1-2 группа здоровья (условно здоровые)
Режим двигательной активности	ОДА (обычная двигательная активность)

Критериями включения в группу исследуемых являлись: условно здоровые, относящиеся к 1-2 группам здоровья, неродственные мужчины, проживающие или рожденные на территории Магаданской области. Критериями исключения из обследований являлось наличие подтвержденных хронических или инфекционных заболеваний, наличие жалоб на состояние здоровья в период исследования, отсутствие информированного согласия на участие в исследовании. Исследование проводили в соответствии с протоколом, одобренным Локальным этическим комитетом ФГБУН НИЦ «Арктика» ДВО РАН (заключение от 26.11.2021 г.) и Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы научных медицинских исследований с участием человека» (с поправками 2013 г.). При обнародовании результатов исследования все данные были деперсонизированы.

Программа комплексного обследования добровольцев включала: заполнение информированного согласия на участие в исследовании, проведение анкетирования с целью оценки состояния здоровья и выявления факторов, являющихся основанием для исключения из выборки, проведение антропометрического обследования, регистрация показателей вариабельности сердечного ритма, забор крови для молекулярно-генетического тестирования.

Выделение геномной ДНК из цельной венозной крови, взятой из локтевой вены добровольцев в пробирки с консервантом

(ЭДТА) проводили стандартным методом фенол-хлороформной экстракции. Для определения концентрации выделенной ДНК в образцах использовали спектрофотометр NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, USA). Последующее генотипирование полиморфизмов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени осуществляли на базе лаборатории Молекулярной генетики человека кафедры медико-биологических дисциплин НИУ «БелГУ» (руководитель – проф., д.м.н. М.И. Чурносов).

Для регистрации вариабельности кардиоритма использовали комплекс «Варикард» (Россия) и программное обеспечение VARICARD-KARDi. В связи с тем, что на показатели вариабельности сердечного ритма значимое влияние оказывают самые разнообразные факторы, такие как, например, состояние здоровья, пол, стресс, температура, циркадные ритмы и пр., то для получения надежных и воспроизводимых результатов анализа вариабельности сердечного ритма исследование было проведено в соответствии с классическими стандартами. Предварительное анкетирования добровольцев было направлено на изучение семейного анамнеза (наличие сердечно-сосудистых, бронхо-легочных, метаболических заболеваний, недавно перенесенных инфекционных заболеваниях, употреблении лекарственных средств и т.д.), режима двигательной активности добровольцев. Исследование параметров вариабельности сердечного ритма проводили в

утренние часы, при комфортной температуре, в спокойной обстановке, в лаборатории с минимальным количеством людей. Респонденты предварительно были ознакомлены с проводимой процедурой.

У испытуемых регистрировались показатели вариабельности сердечного ритма во временной и частотной областях. Помимо этого, определялось отношение низкочастотного и высокочастотного компонентов вариабельности сердечного ритма (LF/HF, усл. ед.).

Статистический анализ результатов исследования проводили стандартными методами математической статистики в программе «Statistica 7.0» [22]. Для проверки нормальности полученных количественных данных использовали тесты Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. Нормально распределенные переменные представлены как средние ($M \pm m$) стандартная ошибка среднего значения, а в случае отклонения от нормального распределения как медиана (Me) и межквартильный диапазон [$Q_1 25\% ; Q_2 75\%$]. Несвязанные выборки были проверены с помощью U-критерия Манна-Уитни. Статистически значимым считалось значение $p = 0,05; 0,01; 0,001$.

Расчет частот генотипов и аллелей, проводили используя калькулятор, представленный на medstatistic.ru. Критерий χ^2 Пирсона использовался для проверки соответствия распределения генотипов равновесию Харди–Вайнберга (при $p > 0,05$ равновесие выполняется).

Результаты и их обсуждение. На основании молекулярно-генетического тестирования локуса -786T>C (rs20770774) *NOS3* популяции мужчин-северян было установлено следующее распределение генотипов: -786 T/T – 40,95%, -786 T/C – 47,24% и -786 C/C – 11,81%. Данное распределение соответствовало закону равновесия Харди–Вайнберга ($\chi^2=0,13$; $p=0,714$). В генофонде популяции жителей-северян в результате генотипирования были выявлены два аллельных варианта гена *NOS3* (rs2070744): предковый вариант *NOS3*T* и мутантный аллель *NOS3*C*. Аллельный вариант *NOS3*C* являлся минорным и встречался с

частотой 35,43%, как и гомозиготный генотип C/C. Частота встречаемости аллельного варианта *NOS3*T* преобладала и составила 64,57%. Уровень аллельного разнообразия по исследуемому локусу – $H_o=0,44$. Полученные данные по распределению частот генов и генотипов в обследуемой популяции жителей-северян сходны с таковыми у европейцев, согласно общемировым базам данных [23, 24].

Для последующего анализа мы разделили исследуемую когорту на 2 группы в соответствии с наличием в генотипе аллельного варианта *NOS3*C*: 1-я группа – гомозиготы T/T (n=52) и 2-я группа – носители аллельного варианта *NOS3*C* – с генотипами T/C+C/C (n=73). Проведение антропометрического тестирования не выявило значимых различий двух групп по соматометрическим характеристикам. Так в первой группе обследуемых средняя длина тела составила $178,4 \pm 1,0$ см, масса тела – $84,2 \pm 1,8$ кг; средняя длина тела и масса тела мужчин-северян второй группы равнялись $178,1 \pm 0,9$ см и $81,9 \pm 1,6$ кг соответственно. Показатели вариабельности сердечного ритма в популяции мужчин-северян с различными генотипами по полиморфизму 786T>C (rs2070744) гена *NOS3* представлены в таблице 2.

Сравнение двух групп не выявило значимых различий относительно показателей ЧСС, RMSSD, Mo и AMo50. Однако у мужчин-северян носителей полиморфного варианта *NOS3*C* (rs2070744) 2 группы (с генотипами T/C+C/C) значимо более низкие величины MxDMn, pNN50, SDNN, относительно гомозигот T/T. Данные показатели коррелируют с активностью парасимпатической нервной системы и могут отражать состояние снижения уровня функционирования синусно-предсердного узла и изменения тонуса блуждающего нерва, что в целом свидетельствует о падении активности контура автономной регуляции сердечного ритма. Согласно литературным данным [25], одним из маркеров, характеризующих напряжение в работе регуляторных систем организма, является показатель стресс-индекса (SI).

Таблица 2

Показатели вариабельности сердечного ритма у мужчин-северян с различными генотипами по полиморфизму -786T>C (rs2070744) гена NOS3, Me [Q1; Q2]

Table 2

Heart rate variability indices in northern men with different genotypes for the -786T>C (rs2070744) polymorphism of the NOS3 gene, Me [Q1; Q2]

Изучаемые показатели/ HRV Parameter	ЧСС, уд./мин /HR, b/min	MxDMn, мс / MxDMn, ms	RMSSD, мс / RMSSD, ms	pNN50, % / pNN50, ms	SDNN, мс / SDNN, ms	Mo, мс / Mo, ms	AMo50, мс / AMo, ms	SI, усл. ед. / SI, arb.	TP, мс ² / TP, ms ²	HF, мс ² / HF, ms ²	LF, мс ² / LF, ms ²	VLF, мс ² / VLF, ms ²	LF/HF, усл. ед. / LF/HF, arb.	IC, усл. ед. / IC, arb.	
Анализируемые группы/ Study Groups	T/T (1)	71,5 [62,1; 77,7]	227,5 [183,0; 291,3]	33,6 [26,7; 43,8]	7,3 [3,3; 16,9]	45,8 [35,0; 57,0]	840,0 [749,3; 954,5]	46,6 [37,8; 60,5]	125,0 [71,3; 223,4]	1526,4 [955,3; 2775,7]	351,9 [188,9; 843,4]	610,0 [410,4; 1247,8]	423,9 [221,0; 807,7]	1,9 [1,0;2,8]	3,1 [1,6;4,9]
	T/C+ C/C (2)	70,2 [64,5; 76,1]	195,5 [154,0; 266,5]	32,6 [25,1; 43,1]	5,1 [1,9; 14,2]	37,9 [27,8; 52,6]	862,0 [791,0; 929,8]	54,2 [43,0; 71,9]	153,4 [87,8; 306,6]	1229,7 [787,2; 2352,7]	339,5 [154,1; 680,3]	594,3 [335,4; 1216,7]	271,1 [152,1;4 51,8]	1,7 [1,0;3,0]	3,1 [1,6;4,7]
	Зна- чи- мость раз- личий (p)/ p- value	p=0.89	p=0.038	p=0.54	p=0.024	p=0.043	p=0.72	p=0.18	p=0.044	p=0.015	p=0.86	p=0.58	p=0.020	p=0.86	p=0.65

Примечание: 1 группа – гомозиготы T/T (n=52), 2 группа – носители аллельного варианта NOS3*C – с генотипами T/C+C/C (n=73)

Note: 1 group – homozygotes T/T (n=52), 2 group – homozygotes C/C and heterozygotes T/C (n=73).

Необходимо отметить, что в целом в исследуемой выборке жителей-северян данный показатель приближается к верхней границе нормы, что может свидетельствовать о высокой степени выраженности адаптационного ответа организма при воздействии различных стрессоров среды, ведущих к перенапряжению в работе регуляторных систем организма. Более того, в группе жителей-северян носителей полиморфного варианта *NOS3*C* (rs2070744) (генотипы T/C+C/C) отмечаются значимо более высокие величины стресс-индекса. Повышение уровня индекса стресса при снижении показателя pNN50 могут свидетельствовать о высоком уровне «экологического стресса» и усилении активности симпатической нервной системы.

Показатель общей мощности спектра, который является индикатором суммарного уровня активности регуляторных систем организма, статистически значимо выше в первой группе обследуемых гомозиготных носителей предкового аллеля *NOS3*T* (генотип T/T). При этом выявленные различия обусловлены значимо более высокими величинами VLF-составляющей ритма с отсутствием значимых межгрупповых отличий относительно HF и LF. Следует отметить, что значимых отличий по показателям LF/HF и IC между двумя группами не обнаружено.

Результаты анализа основных параметров вариабельности сердечного ритма показали различия в обеспечении вегетативной регуляции сердца в зависимости от наличия полиморфизма -786T>C (rs2070744) гена *NOS3*. Так более высокие величины вариационного размаха, индексирующие вариативность значений кардиоинтервалов, обусловленных физиологической дыхательной аритмией наблюдались у обследуемых гомозигот с генотипом T/T (786T>C (rs2070744) гена *NOS3*. Показатель pNN50 коррелирует с активностью парасимпатической нервной системы и в настоящее время используется для оценки ее активности в качестве маркера вариабельности сердечного ритма во временной области [26]. В настоящем исследовании

установлены значимые различия ряда параметров вариабельности сердечного ритма у жителей-северян носителей полиморфного варианта *NOS3*C* (rs2070744) (генотипы T/C+C/C). Во-первых, в данной группе значимо более низкие показатели pNN50 и SDNN, что может свидетельствовать о снижение роли вагусного влияния в вегетативном контроле сердечно-сосудистой системы. Во-вторых, в данной когорте обследуемых выявлены более высокие показатели SI, индексирующие относительное увеличение симпатической активности в регуляции сердечного ритма (различия статистически значимые). При этом обследуемые двух групп не имели отличий относительно показателей ЧСС, RMSSD, Mo и AMo.

В наших исследованиях установлено, что значимо более высокий показатель TP, отражающий суммарную активность регуляторных систем организма, в группе гомозигот T/T, обеспечен значимо более высоким вкладом VLF-составляющей кардиоритма. Обследуемые двух групп не имели отличий относительно высокочастотного (HF) и низкочастотного (LF) диапазона общего спектра с соответствующим отсутствием отличий и относительно величины LF/HF.

Необходимо отметить, что до сих пор однозначного ответа относительно физиологических основ показателя VLF не получено. Так, в некоторых исследованиях указывается на то, что очень низкая частота общего спектра, вероятно, может быть задействована в очень медленно действующих биологических процессах организма, таких, как регуляция температуры [27], ренин-ангиотензиновые воздействия на сердце [27, 28, 29], а также может генерироваться физической активностью [30]. Согласно работам А. Н. Флейшмана (1999): «снижение мощности в VLF-диапазоне может являться чувствительным индикатором наличия энергодефицитного состояния в организме (гипоксия, метаболические нарушения) и, в свою очередь, отражает связь автономных (сегментарных) уровней регуляции с надсегментарными» [31]. При

этом показано, что уменьшение очень низкочастотных колебаний кардиоритма связано с повышенным риском сердечной смерти и нарушения ритма [32]. По данным других исследований низкая мощность в этом диапазоне была связана с высоким уровнем воспаления [33]. Также было высказано предположение, что VLF компонент общего ритма в значительной степени связан с механизмами, зависящими от кальциевых каналов L-типа, генерируемыми миогенными сосудистыми реакциями на спонтанно возникающие нарушения артериального давления [34].

Учитывая тот факт, что в группе носителей варианта *NOS3*C* (rs2070744), были отмечены значимо более низкие показатели VLF-составляющей общей мощности спектра, наши результаты дают нам основание предполагать, что низкое значение VLF может представлять собой ранний неинвазивный биомаркер снижения эндотелиальной функции продукции окиси азота как предиктора высокого риска сердечно-сосудистых заболеваний и снижения качества жизни в целом.

Следует подчеркнуть, что у обследуемых мужчин-северян вне зависимости от генотипа отмечаются повышенные, относительно принятой нормы величины индекса централизации (IC) (нормативный диапазон: 0,3-2,5) [35], что может свидетельствовать о превалирующем влиянии церебральной эрготоропной системы на регуляцию сердечного ритма.

Анализ параметров вариабельности сердечного ритма является хорошо известным неинвазивным методом определения функционирования вегетативной нервной системы. При этом активация симпатического отдела вегетативной нервной системы обеспечивает адаптацию организма к изменяющимся условиям среды, а преобладание парасимпатического звена способствует восстановлению гомеостаза [3]. В нашем исследовании жителей-северян установлено, что в зависимости от наличия в генотипе аллельного варианта *NOS3*C* (rs2070744) наблюдается сдвиг баланса

симпатической и парасимпатической регуляции вариабельности сердечного ритма. Так в группе гомозиготных носителей аллельного варианта *NOS3*T* (rs2070744) наблюдается активация парасимпатического звена вегетативной нервной системы, о чем свидетельствуют значимо более высокие показатели MxDMn, pNN50 на фоне низких показателей стресс-индекса (SI). Полученные результаты в полной мере согласуются с литературными данными, в которых указывается на то, что ингибирование работы эндотелиальной синтазы окиси азота (*NOS3*) устраниет тонизирующий возбуждающий эффект окиси азота на активность блуждающего нерва [36]. Также учитывая тот факт, что, согласно литературным данным [37]: индекс вариабельности сердечного ритма во временной области – SDNN, наряду с показателями вариабельности кардиоритма в частотной области – TR и VLF, отражают по большей части показатели функциональной способности, а не вегетативной активности, мы можем предположить о более высоком уровне функциональных резервов у гомозигот T/T. Необходимо подчеркнуть, что вегетативный профиль, характеризующийся вегетативным дисбалансом с высокой симпатической активностью и относительно низкой парасимпатической активностью, отмечающийся в группе T/C+C/C, является одним из предполагаемых механизмов, лежащих в основе повышенного риска неблагоприятных соматических последствий для здоровья, таких как сердечно-сосудистые заболевания, гипертония, диабет и инсульт, а также смертность от всех причин. Тогда как большая активность блуждающего нерва защищает сердечно-сосудистую систему и связана с общим улучшением здоровья [38] и является признанным предиктором долголетия. Снижение его активности с возрастом рассматривается как естественное уменьшение функциональных резервов [7, 39].

Заключение. В целом, результаты исследования убедительно свидетельствуют о том, что наличие в генотипе даже одного аллеля *NOS3*C* по полиморфизму 786T>C

(rs2070744) оказывает отрицательное влияние на сердечный вегетативный профиль, проявляющийся сдвигом вегетативной нервной регуляции в сторону симпатической активности. При этом полученные в ходе нашего исследования данные дают нам основание предполагать, что низкое значение VLF может представлять собой ранний неинвазивный биомаркер снижения функций эндотелиальной синтазы окиси азота как предиктора высокого риска сердечно-сосудистых заболеваний и снижения качества жизни в целом.

Информация о финансировании

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект №23-15-20001.

Financial support

This work was supported by the Russian Research Foundation, grant №23-15-20001.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors have no conflict of interest to declare.

Список литературы

1. De Oliveira Maranhão Pureza IR, da Silva Junior AE, Silva Praxedes DR, et al. Effects of time-restricted feeding on body weight, body composition and vital signs in low-income women with obesity: A 12-month randomized clinical trial. *Clinical Nutrition*. 2021;40(3):759-766. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.06.036>
2. Tiwari R, Kumar R, Malik S, et al. Analysis of Heart Rate Variability and Implication of Different Factors on Heart Rate Variability. *Current Cardiology Reviews*. 2021;17(5):74-83. DOI: <https://doi.org/10.2174/1573403X16999201231203854>
3. Khan AA, Lip GYH, Shantsila A. Heart rate variability in atrial fibrillation: The balance between sympathetic and parasympathetic nervous system. *European Journal of Clinical Investigation*. 2019;49(11):e13174. DOI: <https://doi.org/10.1111/eci.13174>
4. Hassya IA, Sahroni A, Rahayu AW, et al. The analysis of heart rate variability properties and body mass index in representing health quality information. *Procedia Computer Science*.

2022;197(12):135-142. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.procs.2021.12.127>

5. Bäck M, Yurdagul AJr, Tabas I, et al. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: Mediators and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cardiology*. 2019;16(7):389-406. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0169-2>

6. Carandina A, Lazzeri G, Villa D, et al. Targeting the autonomic nervous system for risk stratification, outcome prediction and neuromodulation in ischemic stroke. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(5):2357. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22052357>

7. Barthelemy JC, Pichot V, Hupin D, et al. Targeting autonomic nervous system as a biomarker of well-ageing in the prevention of stroke. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2022;14:969352. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.969352>

8. Jarczok MN, Jarczok M, Thayer JF, et al. editors. Work Stress and Autonomic Nervous System Activity. *Handbook of Socioeconomic Determinants of Occupational Health*. Handbook Series in Occupational Health Sciences. Springer: Cham; 2020. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-31438-5_27

9. Thayer JF, Mather M, Koenig J. Stress and aging: a neurovisceral integration perspective. *Psychophysiology*. 2021;58(7):1-15. DOI: <https://doi.org/10.1111/psyp.13804>

10. Tejero J, Shiva S, Gladwin MT. Sources of Vascular Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species and Their Regulation. *Physiological Reviews*. 2019;99(1):311-379. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2017>

11. Oliveira-Paula GH, Lacchini R, Tanus-Santos JE. Clinical and pharmacogenetic impact of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms on cardiovascular diseases. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*. 2017;63:39-51. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.08.004>

12. Raza ST, Singh SP, Rizvi S, et al. Association of eNOS (G894T, rs1799983) and KCNJ11 (E23K, rs5219) gene polymorphism with coronary artery disease in North Indian population. *African Health Sciences*. 2021;21(3):1163-1171. DOI: <https://doi.org/10.4314/ahs.v21i3.25>

13. Бебякова НА, Феликсова ОМ, Хромова АВ, и др. Роль полиморфизма -786T>C гена эндотелиальной NO-синтазы в формировании факторов риска развития артериальной гипертензии. *Экология человека*. 2018;25(4):36-42. DOI: <https://doi.org/10.33396/1728-0869-2018-4-36-42>

14. Da Silva RF, Trapé ÁA, Reia TA, et al. Association of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene polymorphisms and physical fitness levels with plasma nitrite concentrations and arterial blood pressure values in older adults. *PLoS ONE.* 2018;13(10):e0206254. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206254>
15. Barbosa AM, Silva KSF, Lagares MH, et al. Atherosclerosis: analysis of the eNOS (T786C) gene polymorphism. *Genetics and Molecular Research.* 2017;16(3):gmr16039708. DOI: <https://doi.org/10.4238/gmr16039708>
16. Tran N, Garcia T, Aniqa M, et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) and the Cardiovascular System: in Physiology and in Disease States. *American Journal of Biomedical Science and Research.* 2022;15(2):153-177.
17. Król M, Kepinska M. Human Nitric Oxide Synthase-Its Functions, Polymorphisms, and Inhibitors in the Context of Inflammation, Diabetes and Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020;22(1):56. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22010056>
18. Zambrano LI, Pontes RB, Garcia ML, et al. Pattern of sympathetic vasomotor activity in a model of hypertension induced by nitric oxide synthase blockade. *Physiological Reports.* 2019;7(14):e14183. DOI: <https://doi.org/10.14814/phy2.14183>
19. Kopp-Scheinplug C, Forsythe ID. Nitric Oxide Signaling in the Auditory Pathway. *Frontiers in Neural Circuits.* 2021;15:759342. DOI: <https://doi.org/10.3389/fncir.2021.759342>
20. Travagli RA, Gillis RA. Nitric oxide-mediated excitatory effect on neurons of dorsal motor nucleus of vagus. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology.* 1994;266(1):G154-G160. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1994.266.1.G154>
21. Markos F, Snow HM, Kidd C, et al. Nitric oxide facilitates vagal control of heart rate via actions in the cardiac parasympathetic ganglia of the anaesthetised dog. *Experimental Physiology.* 2002;87(1):49-52. DOI: <https://doi.org/10.1113/eph8702303>
22. Халафян АА, Боровиков ВП, Калайдина ГВ. Теория вероятностей, математическая статистика и анализ данных: Основы теории и практика на компьютере. STATISTICA. EXCEL. Более 150 примеров решения задач. М.: Ленанд; 2017.
23. ALFRED (Allele Frequency Database) [Электронный ресурс] [дата обращения 01.02.2023] URL: <https://alfred.med.yale.edu/Alfred>
24. Database catalogs of single nucleotide polymorphisms (SNPedia). [Электронный ресурс] [дата обращения 01.02.2023]. URL: <https://www.snpedia.com/index.php/SNPedia>
25. Баевский РМ, Черникова А Г. Оценка адаптационного риска в системе индивидуального дононогического контроля. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* 2014;100(10):1180-1194.
26. Yang Z, Liu H, Meng F, et al. The analysis of circadian rhythm of heart rate variability in patients with drug-resistant epilepsy. *Epilepsy Research.* 2018;146:151-159. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2018.08.002>
27. Wu J, Pierart C, Chaplin TM, et al. Getting to the heart of food craving with resting heart rate variability in adolescents. *Appetite.* 2020;155:104816. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.appet.2020.104816>
28. Laborde S, Mosley E, Thayer JF. Heart Rate Variability and Cardiac Vagal Tone in Psychophysiological Research - Recommendations for Experiment Planning, Data Analysis, and Data Reporting. *Frontiers in Psychology.* 2017;8:213. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2017.00213>
29. Del Valle-Mondragón L, Becerra-Luna B, Cartas-Rosado R, et al. Correlation between Angiotensin Serum Levels and Very-Low-Frequency Spectral Power of Heart Rate Variability during Hemodialysis. *Life.* 2022;12(7):1020. DOI: <https://doi.org/10.3390/life12071020>
30. Grässler B, Thielmann B, Böckelmann I, et al. Effects of Different Training Interventions on Heart Rate Variability and Cardiovascular Health and Risk Factors in Young and Middle-Aged Adults: A Systematic Review. *Frontiers in Psychology.* 2021;12:657274. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.657274>
31. Флейшман АН. Медленные колебания гемодинамики: теория, практическое применение в клинической медицине и профилактике. Новосибирск: ГУП Академический научно-издательский производственно-полиграфический и книгораспространительский центр РАН "Издательство "Наука" Обособленное подразделение "Сибирская издательская фирма "Наука"; 1999.
32. Shaffer F, Ginsberg JP. An Overview of Heart Rate Variability Metrics and Norms. *Frontiers in Public Health.* 2017;5:258. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00258>

33. Young HA, Benton D. Heart-rate variability: a biomarker to study the influence of nutrition on physiological and psychological health? *Behavioural Pharmacology*. 2018;29(2-3):140-151. DOI: <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000383>
34. Gitler A, Vanacker L, De Couck M, et al. Neuromodulation Applied to Diseases: The Case of HRV Biofeedback. *Journal of Clinical Medicine*. 2022;11(19):5927. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm11195927>
35. Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *European Heart Journal*. 1996;17(3):354-381.
36. MacDonald EA, Rose RA, Quinn TA. Neurohumoral Control of Sinoatrial Node Activity and Heart Rate: Insight From Experimental Models and Findings From Humans. *Frontiers in Physiology*. 2020;11:170. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00170>
37. Ernst G. Heart-Rate Variability-More than Heart Beats? *Frontiers in Public Health*. 2017;5:240. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00240>
38. Jarczok MN, Kleber ME, Koenig J, et al. Investigating the associations of self-rated health: heart rate variability is more strongly associated than inflammatory and other frequently used biomarkers in a cross sectional occupational sample. *PLoS ONE*. 2015;10(2):e0117196. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117196>
39. Hernández-Vicente A, Hernando D, Santos-Lozano A, et al. Heart Rate Variability and Exceptional Longevity. *Frontiers in Physiology*. 2020;11:566399. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.566399>
3. Khan AA, Lip GYH, Shantsila A. Heart rate variability in atrial fibrillation: The balance between sympathetic and parasympathetic nervous system. *European Journal of Clinical Investigation*. 2019;49(11):e13174. DOI: <https://doi.org/10.1111/eci.13174>
4. Hassya IA, Sahroni A, Rahayu AW, et al. The analysis of heart rate variability properties and body mass index in representing health quality information. *Procedia Computer Science*. 2022;197(12):135-142. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procs.2021.12.127>
5. Bäck M, Yurdagul AJr, Tabas I, et al. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: Mediators and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cardiology*. 2019;16(7):389-406. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0169-2>
6. Carandina A, Lazzeri G, Villa D, et al. Targeting the autonomic nervous system for risk stratification, outcome prediction and neuromodulation in ischemic stroke. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(5):2357. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22052357>
7. Barthelemy JC, Pichot V, Hupin D, et al. Targeting autonomic nervous system as a biomarker of well-ageing in the prevention of stroke. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2022;14:969352. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.969352>
8. Jarczok MN, Jarczok M, Thayer JF, et al. editors. Work Stress and Autonomic Nervous System Activity. *Handbook of Socioeconomic Determinants of Occupational Health*. Handbook Series in Occupational Health Sciences. Springer: Cham; 2020. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-31438-5_27
9. Thayer JF, Mather M, Koenig J. Stress and aging: a neurovisceral integration perspective. *Psychophysiology*. 2021;58(7):1-15. DOI: <https://doi.org/10.1111/psyp.13804>
10. Tejero J, Shiva S, Gladwin MT. Sources of Vascular Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species and Their Regulation. *Physiological Reviews*. 2019;99(1):311-379. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2017>
11. Oliveira-Paula GH, Lacchini R, Tanus-Santos JE. Clinical and pharmacogenetic impact of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms on cardiovascular diseases. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*. 2017;63:39-51. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.08.004>
12. Raza ST, Singh SP, Rizvi S, et al. Association of eNOS (G894T, rs1799983) and KCNJ11 (E23K, rs5219) gene polymorphism with coronary artery disease in North Indian population.

- African Health Sciences. 2021;21(3):1163-1171. DOI: <https://doi.org/10.4314/ahs.v21i3.25>
13. Bebyakova NA, Feliksova OM, Khromova AV, et al. Polymorphism -786T>C endothelial NO-synthase as a risk factor of arterial hypertension. Human Ecology. 2018;25(4):36-42. Russian. DOI: <https://doi.org/10.33396/1728-0869-2018-4-36-42>
14. Da Silva RF, Trapé ÁA, Reia TA, et al. Association of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene polymorphisms and physical fitness levels with plasma nitrite concentrations and arterial blood pressure values in older adults. PLoS ONE. 2018;13(10):e0206254. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206254>
15. Barbosa AM, Silva KSF, Lagares MH, et al. Atherosclerosis: analysis of the eNOS (T786C) gene polymorphism. Genetics and Molecular Research. 2017;16(3):gmr16039708. DOI: <https://doi.org/10.4238/gmr16039708>
16. Tran N, Garcia T, Aniqa M, et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) and the Cardiovascular System: in Physiology and in Disease States. American Journal of Biomedical Science and Research. 2022;15(2):153-177.
17. Król M, Kepinska M. Human Nitric Oxide Synthase-Its Functions, Polymorphisms, and Inhibitors in the Context of Inflammation, Diabetes and Cardiovascular Diseases. International Journal of Molecular Sciences. 2020;22(1):56. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22010056>
18. Zambrano LI, Pontes RB, Garcia ML, et al. Pattern of sympathetic vasomotor activity in a model of hypertension induced by nitric oxide synthase blockade. Physiological Reports. 2019;7(14):e14183. DOI: <https://doi.org/10.14814/phy2.14183>
19. Kopp-Scheinplug C, Forsythe ID. Nitric Oxide Signaling in the Auditory Pathway. Frontiers in Neural Circuits. 2021;15:759342. DOI: <https://doi.org/10.3389/fncir.2021.759342>
20. Travagli RA, Gillis RA. Nitric oxide-mediated excitatory effect on neurons of dorsal motor nucleus of vagus. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology. 1994;266(1):G154-G160. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1994.266.1.G154>
21. Markos F, Snow HM, Kidd C, et al. Nitric oxide facilitates vagal control of heart rate via actions in the cardiac parasympathetic ganglia of the anaesthetised dog. Experimental Physiology. 2002;87(1):49-52. DOI: <https://doi.org/10.1113/eph8702303>
22. Khalafyan AA, Borovikov VP, Kalaydina GV. Probability theory, mathematical statistics and data analysis: Fundamentals of theory and practice on the computer. STATISTICS. EXCEL. Over 150 problem solving examples. Moscow: Lenand; 2017. Russian.
23. ALFRED (Allele Frequency Database) [Internet] [cited 2023 Feb 01] Available from: URL: <https://alfred.med.yale.edu/Alfred>
24. Database catalogs of single nucleotide polymorphisms (SNPedia). [Internet] [cited 2023 Feb 01]. Available from: URL: <https://www.snpedia.com/index.php/SNPedia>
25. Baevsky RM, Chernikova AG Evaluation of adaptive risk in the system of individual prenosological control. Russian Physiological Journal. 2014;100(10):1180-1194. Russian.
26. Yang Z, Liu H, Meng F, et al. The analysis of circadian rhythm of heart rate variability in patients with drug-resistant epilepsy. Epilepsy Research. 2018;146:151-159. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2018.08.002>
27. Wu J, Pierart C, Chaplin TM, et al. Getting to the heart of food craving with resting heart rate variability in adolescents. Appetite. 2020;155:104816. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.appet.2020.104816>
28. Laborde S, Mosley E, Thayer JF. Heart Rate Variability and Cardiac Vagal Tone in Psychophysiological Research - Recommendations for Experiment Planning, Data Analysis, and Data Reporting. Frontiers in Psychology. 2017;8:213. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2017.00213>
29. Del Valle-Mondragón L, Becerra-Luna B, Cartas-Rosado R, et al. Correlation between Angiotensin Serum Levels and Very-Low-Frequency Spectral Power of Heart Rate Variability during Hemodialysis. Life. 2022;12(7):1020. DOI: <https://doi.org/10.3390/life12071020>
30. Grässler B, Thielmann B, Böckelmann I, et al. Effects of Different Training Interventions on Heart Rate Variability and Cardiovascular Health and Risk Factors in Young and Middle-Aged Adults: A Systematic Review. Frontiers in Psychology. 2021;12:657274. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.657274>
31. Fleishman AN. Slow oscillations of hemodynamics: theory, practical application in clinical medicine and prevention. Novosibirsk: UP Akademicheskiy nauchno-izdatel'skiy proizvodstvenno-poligraficheskiy i knigorasprostranitel'skiy tsentr RAN "Izdatel'stvo "Nauka" Obosobленное подразделение "Sibirskaya izdatel'skaya firma "Nauka"; 1999. Russian.

32. Shaffer F, Ginsberg JP. An Overview of Heart Rate Variability Metrics and Norms. *Frontiers in Public Health.* 2017;5:258. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00258>
33. Young HA, Benton D. Heart-rate variability: a biomarker to study the influence of nutrition on physiological and psychological health? *Behavioural Pharmacology.* 2018;29(2-3):140-151. DOI: <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000383>
34. Gitler A, Vanacker L, De Couck M, et al. Neuromodulation Applied to Diseases: The Case of HRV Biofeedback. *Journal of Clinical Medicine.* 2022;11(19):5927. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm11195927>
35. Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *European Heart Journal.* 1996;17(3):354-381.
36. MacDonald EA, Rose RA, Quinn TA. Neurohumoral Control of Sinoatrial Node Activity and Heart Rate: Insight From Experimental Models and Findings From Humans. *Frontiers in Physiology.* 2020;11:170. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00170>
37. Ernst G. Heart-Rate Variability-More than Heart Beats? *Frontiers in Public Health.* 2017;5:240. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00240>
38. Jarczok MN, Kleber ME, Koenig J, et al. Investigating the associations of self-rated health: heart rate variability is more strongly associated than inflammatory and other frequently used biomarkers in a cross sectional occupational sample. *PLoS ONE.* 2015;10(2):e0117196. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117196>
39. Hernández-Vicente A, Hernando D, Santos-Lozano A, et al. Heart Rate Variability and Exceptional Longevity. *Frontiers in Physiology.* 2020;11:566399. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.566399>

Статья поступила в редакцию 30 января 2023 г.
Поступила после доработки 24 мая 2023 г.
Принята к печати 20 июня 2023 г.

Received 30 January 2023

Revised 24 May 2023

Accepted 20 June 2023

Информация об авторах

Ирина Николаевна Безменова, кандидат биологических наук, доцент, научный сотрудник лаборатории физиологии экстремальных состояний ФГБОУ НИЦ «Арктика» Дальневосточного отделения РАН, г. Магадан, Российская Федерация, E-mail: lependina_bel@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3251-5159>.

Инесса Владиславовна Аверьянова, доктор биологических наук, заведующий лабораторией физиологии экстремальных состояний, главный научный сотрудник ФГБОУ НИЦ «Арктика» Дальневосточного отделения РАН, г. Магадан, Российская Федерация, E-mail: inessa1382@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4511-6782>.

Information about the authors

Irina N. Bezmenova, Cand. Sci. (Biology), Associate Professor, Researcher at the Laboratory of Physiology of Extreme Conditions, Arktika Scientific Research Center, Far East Branch of the Russian Academy of Sciences, Magadan, Russia, E-mail: lependina_bel@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3251-5159>.

Inessa V. Averyanova, Doct. Sci. (Biology), Head of the Laboratory of Physiology of Extreme Conditions, Chief Researcher, Arktika Scientific Research Center, Far East Branch of the Russian Academy of Sciences, Magadan, Russia, E-mail: inessa1382@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4511-6782>.

ФАРМАКОЛОГИЯ, КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ PHARMACOLOGY



DOI: 10.18413/2658-6533-2023-9-4-0-6

УДК 616-092.9

Seasonal periodontal microcirculation by combined stress in rats corrected with complex phytoadaptogen

Zhanna V. Dzampaeva¹ , Fatima S. Datieva¹ , Sergey V. Skupnevskiy¹ ,
Mikhail L. Blagonravov²

¹ Vladikavkaz Scientific Center of the Russian Academy of Sciences,
1 Williams St., Mikhailovskoye, 363110, Russia

² Peoples' Friendship University of Russia,
6 Miklukho-Maklay St., Moscow, 117198, Russia

Corresponding author: Zhanna V. Dzampaeva (dzhanaeva_1991@mail.ru)

Abstract

Background: One of the negative inducers of the internal environment is inflammation; amongst external factors the most significant is polyetiological stress. One of the promising pharmacological methods of health protection is based on natural biologically active compounds, especially complex phytoadaptogen (CPhA). **The aim of the study:** This study evaluated the seasonal rhythms in periodontal microcirculation under combined stress (CS), and the possibility of seasonal prophylaxis with complex phytoadaptogen – *Glycyrrhiza glabra*, *Rhodiola rosea*, *Acantopanax senticosus*. **Materials and methods:** The study was carried out on 60 Wistar male rats (230 ± 20 g) kept in natural light. The complex phytoadaptogen is composed from official 70% tincture of *Glycyrrhiza glabra* and 40% tincture of *Rhodiola rosea*, *Acantopanax senticosus* in the ratio 2:1:1. **Results:** Under seasonal differences in meteorological data in healthy rats systolic flow velocity (S) in winter was higher than in summer ($P=0.005$); under the effect of CS on the gum there was a seasonal difference of S ($P=0.03$) with a maximum in winter ($P=0.007$); decrease in both seasons of the Gosling index (PI) (winter ($P=0.008$), summer ($P=0.005$)), peripheral vascular resistance (RI) (summer ($P=0.005$), winter ($P=0.01$)), Stewart index (SD) (summer ($P=0.005$), winter ($P=0.01$)). Under administration of CPhA (groups 5 and 6) the microcirculation indicators in the gum and peripheries were statistically significantly different from those in experimental periodontitis, and there were fluctuations within the confidence interval of the norm ($p<0.01$), seasonal differences RI ($P=0.005$) and SD ($P=0.03$), there was a significant leveling of the damaging effect of CS. **Conclusion:** Application of a novel herbal extract inhibited alveolar bone resorption by the reduction of osteoclastic activity, maintained the integrity of periodontal structures, and normalized the periodontal microcirculation in summer and winter.

Keywords: combined stress; complex phytoadaptogens; immobilization stress; experimental periodontitis; microcirculation; seasonal rhythms

For citation: Dzampaeva ZhV, Datieva FS, Skupnevskiy SV, et al. Seasonal periodontal microcirculation by combined stress in rats corrected with complex phytoadaptogen. Research Results in Biomedicine. 2023;9(4):500-511. DOI: 10.18413/2658-6533-2023-9-4-0-6

Introduction. Features of seasonal cycles of mammals are formed depending on the ambient photoperiodism, temperature, and are characterized by a number of differences in the production of melatonin and its derivatives, and the restructuring of the neuroendocrine immune system, which, controls seasonal reorganization of body systems through the central circannual pacemaker system and may depend on epigenetic factors [1]. The duration of the daytime cycle is the main regulator of biorhythmic changes in the cardiovascular system and human behavior. Seasonal changes in physiological functions are determined by melatonin regulation of TSH β expression in pars tuberalis and hypothalamic dio2 (dio2 gene expression) [2], and are reflected in neurotransmitters. Seasonal changes in the regulation and functioning of macrohemodynamics have been studied thoroughly [3, 4]; however, there are few studies evaluating the characteristics of seasonal changes in microcirculation in normal conditions and in various typical pathological processes.

Annual cycles are also typical for adaptive responses and the immunity. Analysis of mRNA expression levels in the peripheral blood and adipose tissue monocytes from different ethnic groups showed that about 23% of the genome had significant seasonal differences, with two different antiphase patterns, when the expression of one set of genes is increased in the summer and the expression of the other in approximately equal parts is increased in the winter [5]. Pars tuberalis plays an important modulating role in the formation of the seasonal response to stress and immune functions, which may be important in the pathogenesis of inflammation [6]. Some studies showed a significant decrease in the functional activity of immunocompetent cells in the winter [7] associated with increased energy expenditure which was considered as the result of immune response [8].

Receptors for neurotransmitters on the membrane of lymphoid cells providing percep-

tion of changes in the neurotransmitter microenvironment by immunocytes have been discovered. The idea of an open synapse linked these components into an integral chain that provides the possibility of interaction between the nervous and immune systems through neurotransmitters. It was shown that endogenous bioregulators, including glucocorticoid hormones and immunomodulating cytokines, in particular, interleukin-1 (IL-1), the first of discovered and characterized interleukins, which initiates a cascade of innate and acquired defense reactions, play a decisive role in these mechanisms. Thus, seasonal changes in the NEIM system determine the seasonal variability in the activity of adaptive processes, inflammation, and other typical pathological processes [9].

Biologically active substances of phytoadaptogens (PhA), or modifiers of the biological response, affect central and local regulatory factors, modulate the state of the central nervous and endocrine systems, and the sensitivity of cellular receptors to the action of neurotransmitters and hormones [10-14]. Phytoadaptogens are used as a part of long-term therapeutic and preventive therapy, since they rarely cause side effects. CPhA have individual therapeutic activity and tolerance increasing with time, so their combined compositions are recommended. Among the well-known and widely used phytoadaptogens there are *Glycyrrhiza glabra*, *Rhodiola rosea*, *Acanthopanax senticosus* and many others [14-18].

The choice of the studied drugs is based on the chemical composition, pharmacophores, and targets of *Glycyrrhiza glabra*, *Rhodiola rosea*, *Acanthopanax senticosus*. *Glycyrrhiza glabra* contains up to 24% of triterpene saponin glycyrrhizin, which causes pronounced anti-inflammatory activity with inhibition of exudative and proliferative phases of inflammation. Glycyrrhizin of *Glycyrrhiza glabra* significantly reduces the secretion of necrosis factor- α (TNF- α), IL-1 β and IL-6; inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis.

Acanthopanax senticosus contains antioxidants – pinocembrine, glabranin, which reduce the production of nitric oxide and cortisol in stress. *Rhodiola rosea* contains polyphenols such as flavonoids, proanthocyanidins, tyrosol, cinnamon alcohol, glycosides, organic acids, essential oils, sugars, fats, alcohols and proteins [10, 18]. The pharmacological effects of *Rhodiola rosea*: stimulate the central nervous system, increase the level of beta-endorphin in the brain. Beta-endorphin is the stress-relieving, feel-good, analgesic peptide. The main effects of *Rhodiola rosea* described are adaptogenic, that means “natural herbal products that are nontoxic in normal doses produce a nonspecific response and have a normalizing physiologic influence, stress protective. Moreover, it has been described as an antioxidant [17, 18]. The above effects of *Glycyrrhiza glabra*, *Rhodiola rosea*, *Acanthopanax senticosus* can have a positive effect in the prevention of microcirculation parameters in the periodontium under combined stress (CS) – experimental periodontitis (local factor) and immobilization stress (IS) (centralized exposure).

The aim of the study. To evaluate the seasonal rhythms in periodontal microcirculation under combined stress (CS), and the possibility of seasonal prophylaxis with complex phytoadaptogen – *Glycyrrhiza glabra*, *Rhodiola rosea*, *Acanthopanax senticosus*.

Materials and methods. The experiment was performed on 60 adult *Wistar* male rats (obtained from laboratory animal nursery

“Rappolovo”), weighing 230 ± 20 g. The animals were kept in cages (5 animals in each) in natural light ($43^{\circ}01'00''N$ $44^{\circ}41'00''E$, Vladikavkaz) with free access to food and water. Food was given once a day (from 9.00 to 10.00 o'clock a.m.). The rats were kept in a room with controlled temperature ($21\pm1^{\circ}C$) and humidity (50-55%) and in natural light.

The study used 2 time periods – winter (February) and summer (August), the only difference that affected the condition of animals was the value of the photoperiod (depending on the season). All meteorological data recorded in this study are shown in Figure 1,2. All efforts were made to minimize animal suffering, to reduce the number of animals used.

After the first adaptation period, the animals were randomly assigned to the following groups – 10 animals in each: winter/summer control (1-2 groups), combined winter/summer stress (3-4 groups) and winter/summer combined stress under administration of complex phytoadaptogens (5-6 groups). All the operations were performed between 09.00 and 12.00 PM (GMT).

Combined stress in the summer and winter was modeled by a combination of experimental periodontitis (local factor) and immobilization stress (IS) (centralized exposure).

The study was approved by the Ethics Committee of the Institute of Biomedical Investigations – the Affiliate of Vladikavkaz Scientific Centre of Russian Academy of Sciences (Protocol 6, January 24, 2019).

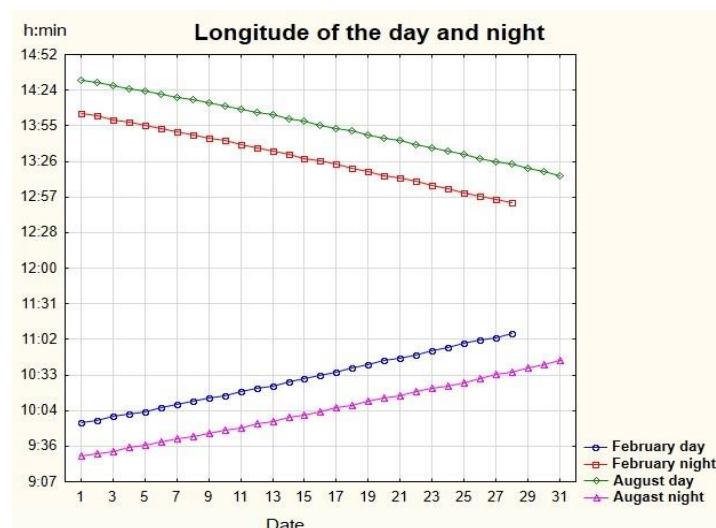


Fig. 1. Longitude of day and night during study period (February, August, 2019).

Experimental model of combined stress (CS) can be comparable in pathogenesis to human stress, and is implemented with the participation of local and general etiological factors. The local factor is a metal ligature that disorders the integrity of the ameloblastic epithelium

("hydrostatic cushion") of the lower incisors of rats, which excludes the restoration of periodontal tissues by its cells and contributes to the maintenance of alterations. A common factor – a high-carbohydrate diet and IS, contribute to the generalization of the inflammatory response [19].

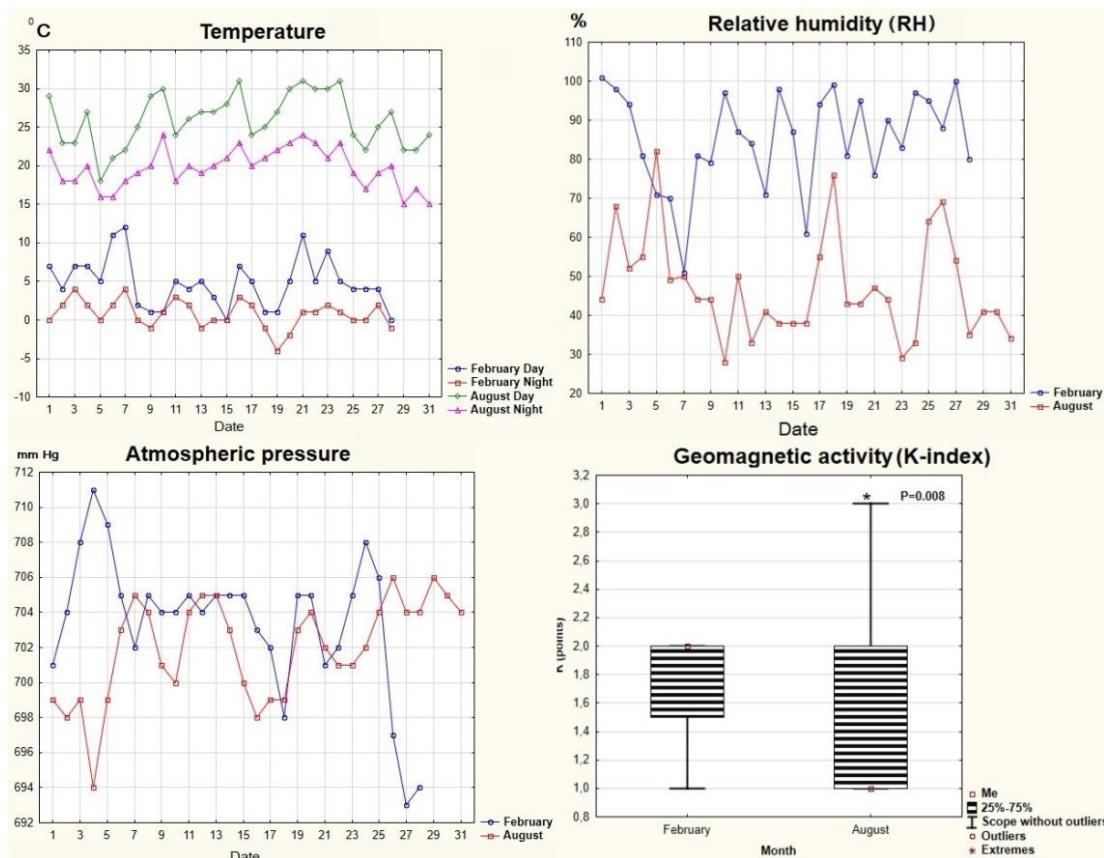


Fig. 2. Meteorological variables including ambient temperature ($^{\circ}\text{C}$), relative humidity (%), atmospheric pressure (mm Hg), and geomagnetic activity (K-index) (points) during the study period (February, August, 2019).

The local factor in CS is experimental periodontitis (EP). EP was modeled by applying a metal ligature at the gingival margin of the lower incisions, using "Zoletil" as an analgesic at a dosage of 0.1 ml/100g. The ligature was fixed to the crest of the alveolar process with a silk thread, disturbing the integrity of the ameloblastic epithelium (hydrostatic cushion) on the vestibular side, where it has the smallest thickness in order to create an entrance for microflora. The animals were fed with wheat porridge with milk (30%), starch (20%) and sugar (15%) (High-carbohydrate diet according to A. I. Evdokimov) [19]. The intensity of inflammation in the periodontium depends on the reactivity of the body and on

the effects of external factors, but together with the ligature, they can contribute to the development of a pronounced inflammatory process [20]. This model causes capillary stasis in the microcirculatory system due to perivascular tissue edema in inflammation.

To assess the severity of the inflammatory process in the rat periodontium and inter-system correlation analysis, we developed an index reflecting the severity of peritonitis (SP). Evaluation scale: 0 – intact periodontal (gums are pale pink, do not bleed); 1 – gums are pale pink, when probing bleeds, periodontal pockets are not detected; 2 – gums are hyperemic, edematous, loose, bleed when probed, periodontal pockets up to 1.5 mm deep, mobility of

the first degree; 3 – gums are hyperemic, edematous, profusely bleed when probed, periodontal pockets depth up to 3 mm, mobility of the II degree.

In our experiment, the common factor – IS was modeled by placing animals from day 2 to day 7 in a tight plastic cage with an area of 0.005 m³ for 6 hours from 9⁰⁰ to 14⁰⁰ [19], totally 6 days.

Small pieces of gum tissue (including the free gingiva, the interdental papilla and the attached gingiva) were fixed in 10% buffered formalin for histopathological studies. The fixed tissues were washed in running tap water, dehydrated in acetone, cleared in benzene, and immersed in paraffin wax (melting temperature 60-62°C). Paraffin sections were cut at the thickness of 4-5 μ and stained with Lily Mayer's hematoxylin and 2% water soluble eosin. The study was carried out using a polarizing microscope with a digital camera ZEISS Axio Lab.A1 (Germany). In gum tissue the following histological parameters were evaluated: 1) intensity of the inflammatory process; 2) structural pattern of the connective tissue.

Doppler ultrasound was used to access microcirculation (MC) disorders (Angiodin-PC device, Russia, 16MHz probe). For this task each rat was fixed on a wooden board in the supine position, upper and lower jaws were anchored in an open position. In the attached gingiva of the transition fold near the lower incisors, an area where large blood vessels do not pass was selected to examine the liquid exchange in the tissues – systolic (S), diastolic (D), medium (M) blood flow velocity, PI – pulsation index (index Gosling), RI – peripheral resistance index (index Purcell), SD – systolic-diastolic index (Stewart index).

CPhA is composed from official 70% tincture of *Glycyrrhiza glabra* and 40% tincture of *Rhodiola rosea*, *Acanthopanax senticosus* in the ratio 2:1:1 [19]. The dose was calculated taking into account the average daily volume of liquid consumed and the coefficient (x10) for small laboratory animals (0.1 ml/100g) per day. CPhA was administered with drinking water in a therapeutic and preventive mode (groups 5 and 6) – 14 days before the experimental simulation and 14 days throughout the simulation.

Since the CPhA contains alcohol extracts of PhA, additional control groups of rats were formed. 1,6 % ethanol solution was administered to these animals (the concentration of ethyl alcohol in the applied dose of CPhA) in the therapeutic and preventive regimen. In both seasons, an additional control group was formed taking the anesthetic Zoletil. No significant changes were detected, so we combined the animals into common groups.

Data analysis was performed using Statistica 10.0 software («StatSoft, Inc», Russia). The normality distribution of continuous variables was tested with the Shapiro-Wilk test. The Kruskal-Wallis test was used to compare independent groups of variables with a non-normal distribution. Median (25-75 %) values were given as descriptive statistics due to the small number of variants in the sample (the Mann-Whitney-Wilcoxon test). The correlation analysis was performed using the Spearman method. The value of p < 0.05 was accepted as statistically significant.

Results

Inflammatory process

The indicators of the periodontitis severity index are given in Table 1.

Table 1

Dynamics of SP index (severity of periodontitis) in all the experimental groups

Parameter	Season	Winter				Summer	
		1 group	3 group	5 group	2 group	4 group	6 group
Hyperemia		-	++	-	-	+	-
Edema		-	++	-	-	+	-
Bleeding		-	++	-	-	+	-
Mobility		-	++	-	-	+	-
Soft plaque		-	++	-	-	+	-
Periodontal pockets		-	+++	+	-	++	-
SP index		0	2.7±0.15	0.5±0.16	0	2.2±0.13*	0.2±0.13

Note: *Seasonal statistically significant difference, p<0.05.

Histological examination of gum tissue

On the 1st day of the experiment (control) in animals of groups 1 (winter) and 2 (summer), the gum was pale pink, did not bleed during probing, and pathological mobility of teeth was not revealed. Under histological examination the gum was represented by its own plate of the mucous membrane, covered with stratified squamous keratinizing epithelium. The lamina propria of the mucous membrane—consisted of relatively thin collagen fibers arranged in an orderly manner with low-activity fibrocytes lying between them.

Group 4 animals (summer animals) were diagnosed with signs of inflammation: oedema

and destruction of collagen fibers, the formation of highly vascularized granulation tissue, with the presence of histiocytes, lymphocytes and plasma cells (Fig. 3a.I) and areas of destruction of the stroma of the gingival mucosa (Fig. 3a.II) at 100%. In group 3 (winter), more pronounced activity of the inflammatory reaction was diagnosed in comparison with animals of group 4 (summer), extensive areas of necrosis of the collagen stroma of the mucosal lamina propria (Fig. 3b.I), an increase in the number of histiocytes, lymphocytes and plasma cells (Fig. 3b.II).

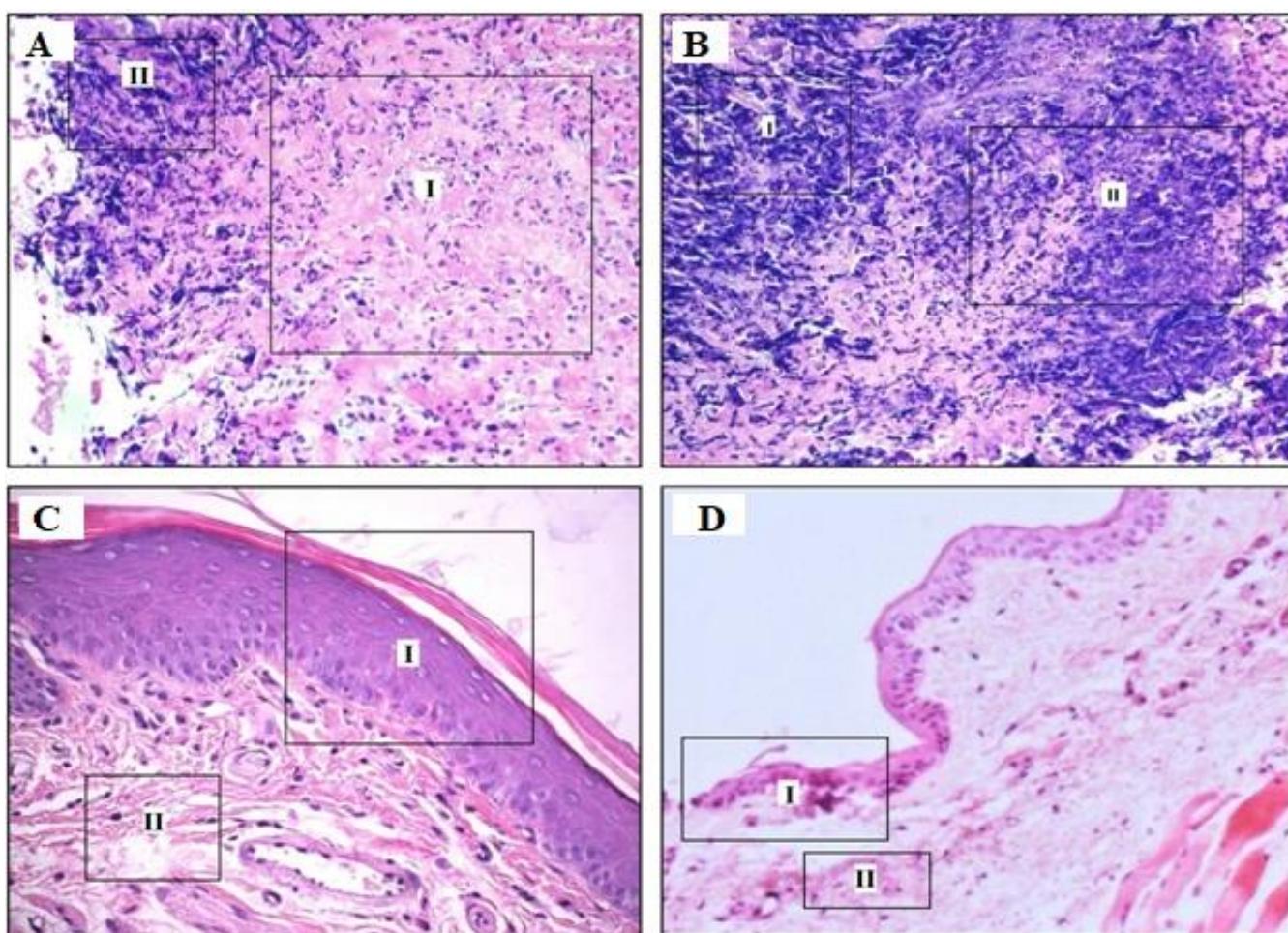


Fig. 3. Inflammatory process in the gum: A – in summer; B – in winter;
C – CPhA application in summer; D – CPhA application in winter (H&E $\times 100$)

In group 5, rounded cavities were found in the gaps between the bundles of collagen fibers, the vessels were moderately dilated, the inflammatory infiltrate was completely resorbed, and the processes of fibrillogenesis

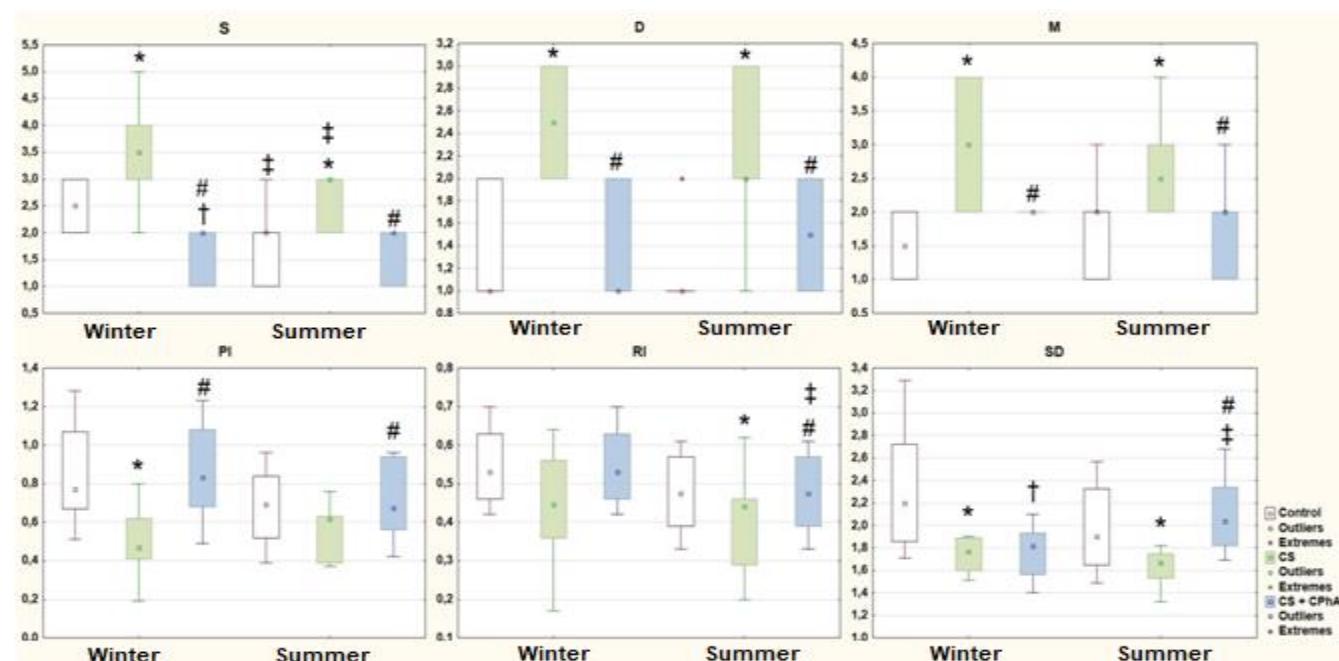
were active. Collagen fibers had a normal structure, but in comparison with intact periodontal preparations they were deformed and thickened (Fig. 3d.II). The stratified squamous

keratinized epithelium was not completely restored (Fig. 3d.I). According to clinical and histological criteria, complete resolution of the inflammatory process was achieved only in 6 group by the end of treatment, the stratified squamous keratinized epithelium (Fig. 3c.I) and collagen fibers had a normal histological structure (Fig. 3c.II).

Microcirculation

In healthy animals, there was a statistically significant maximum of the systolic component of blood flow on the gums in winter, which reflects the dominance of circadian regulation. In conditions of CS on the gum and periphery, there was a statistically significant increase in all blood flow velocities in both seasons (groups 3 and 4), seasonal differences

were significant for the systolic velocity and ($P_{3-4}=0.03$) on the gum with a maximum in the winter season ($P_1=0.007$), and with a minimum in the summer ($P_2=0.01$), systemic hyperperfusion developed, more pronounced in winter (Fig. 4). There was a significant systemic decrease of vascular resistance to the blood flow-Gosling index in both seasons (winter ($P=0.008$) and summer ($P=0.005$)), peripheral vascular resistance (summer ($P=0.005$) and winter ($P=0.01$)), the Stewart index (summer ($P=0.005$) and winter ($P=0.01$)). Under CPhA correction of microcirculation parameters of groups 5 and 6 in the winter season there was an increase in the Gosling pulsatory index (0.005) and the Stewart index ($P=0.03$).



Note: systolic (S) (Vas, mm/sec), diastolic (D) (Vakd, mm/sec), medium blood flow velocity (M) (Vam, mm/sec), pulsatory index Gosling (PI), resistance index (RI), Stewart index (SD) in the region of attached gingiva of transitional fold, CS - combined stress; Statistically significant difference of experimental periodontitis (7 day) * to control; # effectiveness of CPhA correction compared to experimental periodontitis (day 7), † CPhA correction compared to control, ‡ seasonal difference between groups at the same time points; $P<0.05$. Data were presented as median (25-75 %) values.

Fig. 4. Dynamics of microcirculation indicators in the winter and summer seasons in the gum.

Under administration of CPhA (groups 5 and 6) the microcirculation indicators in the gum and peripheries were statistically significantly different from those in experimental periodontitis, and there were fluctuations within the confidence interval of the norm ($p<0.01$), seasonal differences RI ($P_{5-6}=0.005$)

and SD ($P_{5-6}=0.03$) (Fig. 4,5), there was a significant leveling of the damaging effect of CS.

Local inflammation in winter occurred at the maximum of systolic and diastolic components, statistically significant hyperperfusion (increased M) developed with a decrease in permeability and peripheral resistance, which

contributed to alteration and was confirmed by histology, consistent with data on a decrease in immunoreactivity and a more severe damage to the rhythmic organization in the winter season. At the same time, a similar hyperperfusion was observed on the periphery in winter. In summer, peripheral MC disorders occurred as a tendency to an increase in the systolic and diastolic components of blood flow, and a decrease in PI and RI.

In normal conditions (groups 1 and 2),

correlations were noted at the level of vascular parameters (PI, RI, SD). Under EP (groups 3 and 4), the main component of regulation in winter was the metabolic component (D), and in summer – the circadian component, through the systolic component of blood flow. Under EP correction with CPhA in winter the degree of inflammation activity (SP) correlates with local blood flow disorders. In summer, there was a partial restoration of correlations (Table 2).

Table 2

Correlation analysis of microcirculation parameters in the gum and the severity of periodontitis index using Spearman's method in the winter and summer season

	Winter			Summer	
	p	p Value		p	p Value
Control					
PI&RI	0.92	0.0001*	PI&RI	0.96	0.00001*
PI&SD	0.89	0.0005*	PI&SD	0.96	0.00001*
RI&SD	0.96	0.000007*			
Experimental periodontitis					
D&PI	0.66	0.03*	S&M	0.77	0.003*
D&M	0.71	0.01*	S&RI	-0.82	0.003*
D&SD	-0.66	0.04*	S&SD	-0.85	0.001*
M&SD	-0.65	0.03*	M&PI	-0.76	0.009*
PI&SD	0.73	0.01*	M&RI	-0.78	0.007*
			M&SD	-0.87	0.001*
			RI&PI	0.78	0.006*
			RI&SD	0.75	0.01*
			S&SP	0.66	0.03*
			SD&SP	-0.7	0.02*
Experimental periodontitis+ CPhA					
PI&RI	0.93	0.00009*	PI&SD	0.89	0.00004*
PI&SP	-0.81	0.003*			
SD&SP	-0.71	0.02*			

Note: systolic(S) (Vas, mm/sec), diastolic (D) (Vad, mm/sec), medium blood flow velocity (M) (Vam, mm/sec), pulsatory index Gosling (PI), resistance index (RI), Stewart index (SD), SP – severity of periodontitis index, P<0.05.

Discussion. In the study, we obtained statistically significant data on the presence of seasonal dynamics: in healthy animals – in systolic regulation of blood flow (S) with a maximum in the winter season, which correlates with previous studies [21, 22]; in CS, the degree of hyperperfusion is more pronounced in winter, when all structural components of the periodontium are involved in inflammation with maximum manifestations of structural and tissue damage and the appearance of grade II mobility; CPhA normalizes the state of microcirculation and the morphological status of

the periodontium in both seasons, the effect is most pronounced in the summer season.

Seasonal dynamics of microcirculation in the gingival region in both the winter and summer seasons may be associated with the antioxidant effect of melatonin and its increased secretion in the winter season. Several studies have shown that melatonin, which acts as an antioxidant, has a significant protective potential against oxidative stress-induced inhibition of osteoblast differentiation in human mesenchymal stem cells (MSK). Melatonin also reduces oxidative stress-inhibited osteo-

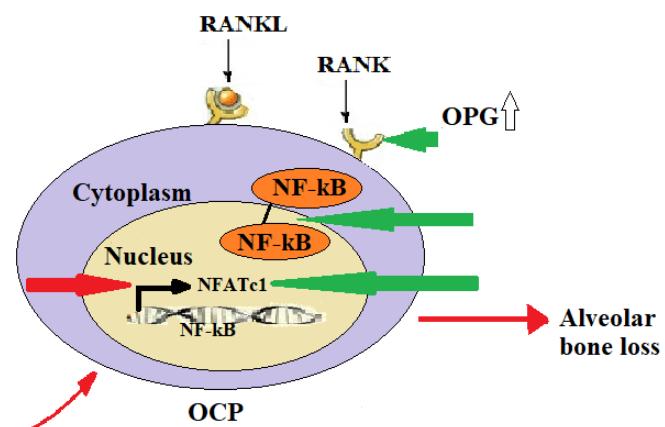
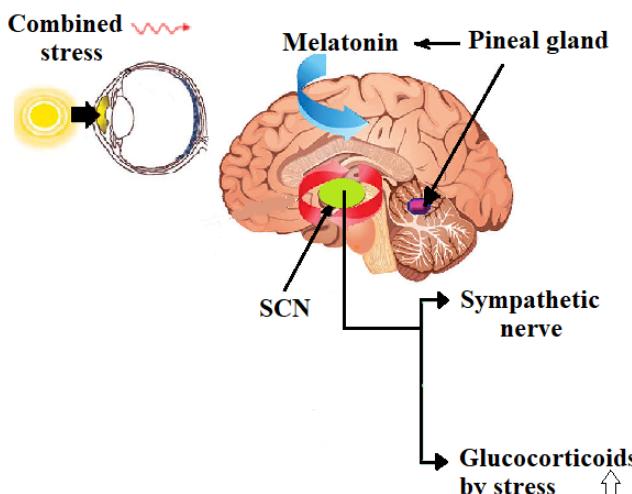
genesis by restoring *in vitro* differentiation potential of human MSCs through the activation of AMPK-FOXO3a-RUNX2 axis (FOXO3a (the key transcription factor regulating oxidative stress-induced cellular response) and RUNX2 (the key transcriptional factor initiating osteogenesis) protein levels during human MSC osteogenesis.

Effect of complex phytoadaptogen on alveolar bone loss by combined stress.

Glucocorticoids are the most important factors in the transmission of circadian time from suprachiasmatic nucleus (SCN) to peripheral osteoclasts (Fig. 5), and it is the peripheral clock of osteoclasts that can regulate the circadian rhythm of bone resorption by regulating the expression of cathepsin K (CTSK) and the nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1 (NFATc1). These mechanisms explain the more pronounced mobility of the lower incisors under the effect of combined stress in the winter season (II degree of mobility of the lower incisors, the SP index was 3 points in group 3).

Stress can affect wound healing (pathophysiological effects of changes in cellular mediators). Intracellular signaling mediators Smad3 and Snail also show circadian expression, while circadian rhythms have been shown in human gingival fibroblasts (HGF-1) and mesenchymal stem cells (MSC), and brain-muscle-like-protein 2 (BMAL2), vascular endothelial growth factor (VEGF), and PERIOD 3 (PER3) show circadian expression in human MSC [23].

CPhA have an effect on combined stress in several ways (Fig. 5): glycyrrhizin of *Glycyrrhiza glabra* significantly reduces the secretion of necrosis factor- α (TNF- α), IL-1 β and IL-6; glycyrrhizin significantly inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis, regulates the expression of nuclear factor of activated T cells 1 (NFATc1); glycyrrhizin reduces the formation of reactive oxygen species in osteoclasts by inducing AMPK (AMP-activated protein kinase) phosphorylation and nuclear transfer of NRF2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) [15].



Note: The red arrows indicate the effects of chronic stress on periodontal inflammation, the green arrows indicate the effects of CPhA on periodontal inflammation. OCP – osteoclast precursor; OPG – osteoprotegerin; RANKL – receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; NF- κ B - receptor activator of nuclear factor kappa-B (RANK); TRAF6 - tumor necrosis factor receptor-associated factors; NFATc1 - nuclear factor of activated T-cells; SCN – suprachiasmatic nucleus, RANKL – nuclear factor activator ligand.

Fig. 5. Effects of complex phytoadaptogens on alveolar bone loss by combined stress.

Adaptogens also contain antioxidants: pinocembrine, glabranin, and licorice (licorice) [14], reducing the production of nitric oxide and cortisol in stress [24]. An adaptogen targets me-

diators of extracellular communication, intracellular networks, and signaling pathways that are involved in stress-induced disorders such as inflammation, atherosclerosis, metabolic disorders, intoxication, and others [25].

Secondary metabolites of adaptogens adapt cells to stress, which is called the phenomenon of hermesis or preconditioning (ashormesis or pre-conditioning) [25, 26]; under the effect of Fapri, the transcription factors NF-KB and FOXO, neurons adapt to stress [27], which plays a role in the adaptation of the NEIM system to the photoperiod.

Seasonal effects of adaptogens on CS are formed through the epiphysis with the participation of melatonin and its receptors. Melatonin has an anti-stress effect, changing the biochemical and neurochemical processes in the hypothalamic structures of the brain [10].

An important feature of the study is the conditions that are as close to natural as possible, in which NEIM—the restructuring of ultra-, circa- and infradian rhythms of the body's functional systems is preserved when the seasons change, and the artificial imposition of rhythm destabilizes the temporary organization and does not reflect adaptation to geomagnetic and climatic conditions of the environment. Thus, the significant difference ($P<0.01$) in day time and night time temperature, humidity, atmospheric pressure, geomagnetic activity (with a maximum in winter, but a maximum amplitude in summer) affects the adaptation of the cardiovascular system (Fig. 1). Studies in natural seasons year-round time (circannual time keeping) allow to work with its main features – its predictive ability to anticipate and prepare for upcoming seasonal changes in the environment [21] and also to express stable annual cycles which at certain phases overlap the effects of the nearest signals, including photoperiod, and artificial modulation of the photoperiod disables these mechanisms. In healthy individuals, tissue functions under the influence of a mechanism that generates endogenous rhythms are reprogrammed between the subjective perception of winter and summer, and a disturbance of the natural seasonal rhythm leads to disorders of adaptive responses [5].

CS leads to the permissive effect of blocking melatonin receptors with glucocorticoids, while CPhA reduces the concentration of stress hormones and turns off blocking of melatonin receptors in peripheral vessels, re-

storing the physiological properties of melatonin [28]. But it does not explain why the degree of damage is higher under conditions of higher melatonin concentration (winter), and the effects of CPhA are less pronounced. This is the subject of our further research.

The study of seasonal features of microcirculation disorders is necessary for understanding the pathogenesis of post-stress disorders in the dynamics of the annual cycle, developing principles of prevention and correction, taking into account the annual restructuring of the NEIM system.

Conclusions. In healthy animals, there are seasonal differences between parameters of microcirculation. Combined stress caused by a combination of immobilization and local inflammation causes significant changes in hemodynamics, structural tissue damage in both seasons of the year, but the degree of the damage is higher in winter compared with summer. Application of a novel herbal extract inhibited alveolar bone resorption by the reduction of osteoclastic activity, maintained the integrity of periodontal structures, normalize the periodontal microcirculation in summer and winter. These results suggest that complex phytoadaptogen have ameliorative effects on the progress of periodontal breakdown and might be utilized for the treatment or the prevention of periodontal diseases.

Financial support

The research was funded within the framework of the comprehensive topic of the state assignment for the research work of the IBMI VNC RAS (2019-2021).

Conflict of interests

The authors have no conflict of interest to declare.

References

1. Lincoln G. A brief history of circannual time. Journal of Neuroendocrinology. 2019;31(3):e12694. DOI: <https://doi.org/10.1111/jne.12694>
2. Sáenz de Miera C, Sage-Ciocca D, Simonneaux V, et al. Melatonin-independent Photoperiodic Entrainment of the Circannual TSH Rhythm in the Pars Tuberalis of the European

Hamster. Journal of Biological Rhythms. 2018;33(3):302-317. DOI: <https://doi.org/10.1177/0748730418766601>

3. Komarov FI, Rapoport SI, Chibisov SM. The role of the Chronobiology and Chronomedicine Problem Board of Russian Academy of Medical Sciences in the development of internal medicine (on the occasion of its 25th anniversary). Clinical Medicine (Russian Journal). 2007;85:14-16. Russian.

4. Rapoport SI. Chronomedicine, circadian rhythms. Who may be interested? Clinical Medicine (Russian Journal). 2012;90:73-75. Russian.

5. Dopico XC, Evangelou M, Ferreira RC, et al. Widespread seasonal gene expression reveals annual differences in human immunity and physiology. Nature Communications. 2015;6:7000. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms8000>

6. Korf HW. Signaling pathways to and from the hypophysial pars tuberalis, an important center for the control of seasonal rhythms. General and Comparative Endocrinology. 2018;258:236-243. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.05.011>

7. Mate I, Madrid JA, De la Fuente M. Chronobiology of the neuroimmunoendocrine system and aging. Current Pharmaceutical Design. 2014;20(29):4642-4655. DOI: <https://doi.org/10.2174/1381612820666140130201131>

8. Onishi KG, Maneval AC, Cable EC, et al. Circadian and Circannual Timescales Interact to Generate Seasonal Changes in Immune Function. Brain, Behavior, and Immunity. 2020;83:33-43. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.07.024>

9. Chereshnev VA, Chereshneva MV. Immunological mechanisms of local inflammation. Medical Immunology (Russia). 2011;13(6):557-568. Russian. DOI: <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2011-6-557-568>

10. Arushanian ÉB, Beier ÉV. Participation of pineal gland in antistressor activity of adaptogenic drugs. Eksperimental'naia i Klinicheskaiia Farmakologiiia. 2015;78(1):9-12. Russian.

11. Bocharova OA, Bocharov EV, Karanova RV, et al. Integrins LFA-1 and Mac-1 and cytokines IL-6 and IL-10 in high-cancer mice under the influence of phytoadaptogen. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2014;157(2):258-260. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10517-014-2539-4>

12. Bocharov EV, Sharonov GV, Bocharova OV, et al. Conformational transitions and interactions underlying the function of membrane

embedded receptor protein kinases. Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes. 2017;1859(9A):1417-1429. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.01.025>

13. Yu X, Bao Y, Meng X, et al. Multi-pathway integrated adjustment mechanism of licorice flavonoids presenting anti-inflammatory activity. Oncology Letters. 2019;18(5):4956-4963. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.01.025>

14. Frattaruolo L, Carullo G, Brindisi M, et al. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Flavanones from Glycyrrhiza glabra L. (licorice) Leaf Phytocomplexes: Identification of Licoflavanone as a Modulator of NF- κ B/MAPK Pathway. Antioxidants. 2019;8(6):186. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox8060186>

15. Li JS, Fan LY, Yuan MD, et al. Salidroside Inhibits Lipopolysaccharide-ethanol-induced Activation of Proinflammatory Macrophages via Notch Signaling Pathway. Current Medical Science. 2019;39:526-533. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11596-019-2069-4>

16. Kuriyama A, Maeda H. Topical application of licorice for prevention of postoperative sore throat in adults: A systematic review and meta-analysis. Journal of Clinical Anesthesia. 2019;54:25-32. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclinane.2018.10.025>

17. Zhou JX, Braun MS, Wetterauer P, et al. Antioxidant, Cytotoxic, and Antimicrobial Activities of Glycyrrhiza glabra L., Paeonia lactiflora Pall., and Eriobotrya japonica (Thunb.) Lindl. Extracts. Medicines. 2019;6(2):43. DOI: <https://doi.org/10.3390/medicines6020043>

18. Tobeiba M, Moghadasi MH, Amin N, et al. RANKL/RANK/OPG Pathway: A Mechanism Involved in Exercise-Induced Bone Remodeling. BioMed Research International. 2020;2020:6910312. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/6910312>

19. Dzampaeva ZhV, Datieva FS, Dzaraeva ZR, et al. Assessment of the efficiency of the application of complex phytoadaptogens in the treatment of inflammatory diseases of periodontal. Medical News of North Caucasus. 2020;15:262-265. DOI: <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15062>

20. Bhattacharai G, Poudel SB, Kook SH, et al. Resveratrol prevents alveolar bone loss in an experimental rat model of periodontitis. Acta Biomaterialia. 2016;29:398-408. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.10.031>

21. Shea SA, Hilton MF, Hu K, et al. Existence of an endogenous circadian blood pressure

rhythm in humans that peaks in the evening. *Circulation Research.* 2011;108(8):980-984. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.233668>

22. Zhu B, Dacso CC, O'Malley BW. Unveiling "Musica Universalis" of the Cell: A Brief History of Biological 12-Hour Rhythms. *Journal of the Endocrine Society.* 2018;2(7):727-752. DOI: <https://doi.org/10.1210/jse.2018-00113>

23. Sato F, Sato H, Jin D, et al. Smad3 and Snail show circadian expression in human gingival fibroblasts, human mesenchymal stem cell, and in mouse liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2012;419(2):441-446. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.02.076>

24. Panossian A, Hambardzumyan M, Hovhanissyan A, et al. The adaptogens Rhodiola and Schizandra modify the response to immobilization stress in rabbits by suppressing the increase of phosphorylated stress-activated protein kinase, nitric oxide and cortisol. *Drug Target Insights.* 2007;2:39-54. DOI: <https://doi.org/10.1177/117739280700200011>

25. Panossian AG, Efferth T, Shikov AN, et al. Evolution of the adaptogenic concept from traditional use to medical systems: Pharmacology of stress- and aging-related diseases. *Medicinal Research Reviews.* 2020;411(1):630-703. DOI: <https://doi.org/10.1002/med.21743>

26. Panossian A, Seo EJ, Efferth T. Synergy assessments of plant extracts used in the treatment of stress and agingrelated disorders. *Synergy.* 2018;7:39-48. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.synres.2018.10.001>

27. Mattson MP, Meffert MK. Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death and Differentiation.* 2006;13(5):852-860. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401837>

28. Kurhaluk N, Szarmach A, Zaitseva OV, et al. Effects of melatonin on low-dose lipopolysaccharide-induced oxidative stress in mouse liver, muscle, and kidney. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* 2018;96(11):1153-1160. DOI: <https://doi.org/10.1139/cjpp-2018-0011>

Received 21 May 2022

Revised 12 June 2023

Accepted 4 July 2023

Information about the authors

Zhanna V. Dzampaeva, Junior Researcher at the Department of Chronopathology and Phytopharmacology, Institute for Biomedical Research, Vladikavkaz Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Vladikavkaz, Russia, E-mail: dzhanaeva_1991@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0778-5117>.

Fatima S. Datieva, Doct. Sci. (Medicine), Director, Institute for Biomedical Research, Vladikavkaz Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Vladikavkaz, Russia, E-mail: faaroo@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1636-9174>.

Sergey V. Skupnevskiy, Doct. Sci. (Biology), Leading Researcher at the Department of Subcellular Structures, Institute for Biomedical Research, Vladikavkaz Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Vladikavkaz, Russia, E-mail: dreammas@yandex.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6233-5944>.

Mikhail L. Blagonravov, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Head of the V.A. Frolov Department of General Pathology and Pathological Physiology, Institute of Medicine, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia, E-mail: blagonravov-ml@rudn.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7838-0486>.



DOI: 10.18413/2658-6533-2023-9-4-0-7

Curcumin Ameliorates High-Fat Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Regulating Endoplasmic Reticulum Stress in The Liver

Mahardian Rahmadi¹ , Ahmad D. Nurhan¹ , Maulidany R.D. Ananda¹ , Annisa D.S. Ramadhani¹ , Zuhaela Iqbal¹ , Santhra S. Balan^{2,3}

¹ Airlangga University,
MERR (C) Campus Mulyorejo, Surabaya, 60115, Indonesia

² Management and Science University,
DU019(B) University Drive, Off Persiaran Olahraga, Section 13,
Shah Alam Selangor, 40100, Malaysia

³ University of Putra Malaysia,
Selangor Darul Ehsan, Serdang, 43400, Malaysia

Corresponding author: Mahardian Rahmadi (mahardianr@ff.unair.ac.id)

Abstract

Background: Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a chronic pathological condition of the liver due to excess triglyceride accumulation in hepatocytes. The antioxidant properties of curcumin improve lipid dysregulation and reduce reactive oxygen species (ROS). **The aim of the study:** This study explores the effects of curcumin administration on beclin-1 and microtubule-associated protein light chain-3 (LC3) expression as autophagy markers and XBP1 spliced as a marker indicating endoplasmic reticulum stress in ameliorating HFD-induced NAFLD in mice. **Materials and methods:** Twenty-four ddY male mice were divided into four groups: the normal chow group, high-fat diet (HFD) group, HFD with curcumin 50 mg/kg for 28 days group, and HFD with curcumin 100 mg/kg for 28 days group. Bodyweight and food intake were measured daily, and curcumin was administered intraperitoneally. The animals were sacrificed 24 hours after the last treatment. The liver was collected for macroscopic and histopathological assessment and molecular analysis using the reverse transcription-polymerase chain reaction (PCR) method. **Results:** Curcumin 50 and 100 mg/kg improved macroscopic and histopathological features of the liver. The results of the molecular analysis showed that curcumin 50 and 100 mg/kg did not increase the beclin-1 or LC3 mRNA expression in the liver ($p>0.05$). Meanwhile, curcumin 100 mg/kg significantly increases the XBP1 spliced expression in the liver ($p<0.05$), which indicates that curcumin modulates endoplasmic stress induced-NAFLD in a dose-dependent manner. **Conclusion:** Curcumin overcomes endoplasmic reticulum stress in the high-fat diet-induced NAFLD in mice.

Keywords: nonalcoholic fatty liver disease; curcumin; endoplasmic reticulum stress; high-fat diet; beclin-1; light chain-3; XBP1

Acknowledgements: The authors thanks the Department of Pharmacy Practice, Faculty of Pharmacy, Airlangga University and Biomedical Pharmacy Research Group, Faculty of Pharmacy, Airlangga University for all support during research.

For citation: Rahmadi M, Nurhan AD, Ananda MRD, et al. Curcumin Ameliorates High-Fat Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Regulating Endoplasmic Reticulum Stress in The Liver. Research Results in Biomedicine. 2023;9(4):512-523. DOI: 10.18413/2658-6533-2023-9-4-0-7

Introduction. Nonalcoholic fatty liver disease is a spectrum of progressive liver disease which is characterized by simple steatosis, which means there are more than 5% triacylglycerol infiltration in hepatocytes, inflammation of hepatocytes, and hepatocellular ballooning due to perturbation of homeostatic mechanisms that regulate the synthesis and use of liver fat [1, 2]. NAFLD occurs in the absence of alcohol consumption or with minimal alcohol consumption [2]. NAFLD is divided into two isoforms, simple NAFL, a benign and reversible form of NAFLD, and NASH, an aggressive and irreversible form [3].

NAFLD occurs in many countries and has become a global burden, with a worldwide incidence percentage of approximately 25.24% with wide geographical variations, with the highest prevalence of NAFLD in Middle Eastern countries and South America at around 30% [4]. Meanwhile, for countries in Asia, especially in Sri Lanka, Malaysia, Singapore, and Indonesia, the prevalence of NAFLD tends to be varied, which is around 5-30% caused by wide variations of genetic differences, economic conditions, intake, and individual lifestyle [5].

The pathogenesis of NAFLD remains unclear, but there is a well-known theory, namely the two-hits theory from James and Day in 1998 [6, 7]. They defined the first hit of lipid accumulation in hepatocytes due to changes in intrahepatic lipid metabolism, then followed by a second hit in the form of a mechanism that represents the various factors that trigger the progression of NAFLD, such as inflammation of hepatocytes, inflammation, and fibrosis [6, 7]. The complexity of this process led to the assumption that the theory was too old-fashioned, so in 2010, Tilg and Moschen came up with their “multi parallel hits hypothesis” theory, which explains the pathogenesis of NAFLD more complexly; nevertheless, it seems less resonant when compared to the two hits theory by James and Day [7, 8].

Autophagy is a catabolic process that targets cell constituents such as damaged organelles into lysosomes for degradation. It regulates cell metabolism and integrates it into eliminating microorganisms to enhance inflammation and activation of the adaptive immune system [9, 10]. Autophagosome formation involves three main steps: 1) initiation of the uncoordinated 51-like kinase (ULK); 2) beclin-1/PI3K nucleation; and 3) membrane elongation with the help of LC3 [11]. Autophagy is activated in various ways, such as restriction of the rapamycin complex called mTOR and activation of protein kinase or AMPK [1]. Several proteins involved in human autophagic pathways, microtubule-associated protein light chain-3 (LC3) and beclin-1, play important roles that have been reported to be related to the physiology and pathogenesis of human liver disease [12]. Inhibition of autophagy with negative regulators interacting with beclin-1 results in accelerated lipid accumulation and triggers the pathogenesis of NAFLD [1]. LC3 is a protein that plays a role in modulating the formation of autophagosomes, in which LC3-I is formed and then conjugated to LC3-II as a marker of successful development of complete autophagosomes [13]. The downregulation of LC3 transcription is often associated with the severity of liver disease [13].

Endoplasmic reticulum stress is a mechanism that plays an essential role in the pathogenesis of NAFLD, dysregulation of the endoplasmic reticulum triggers a physiological response from cells, namely the Unfolded Protein Response, which is a compensatory mechanism for cells to restore protein folding, reduce the accumulation of misfolded proteins and maintain the integrity of the cell [14, 15]. There are three transmembrane proteins involved in this mechanism, which are inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α), Protein Kinase R-Like ER Kinase (PERK), and activating transcription factor-6 α (ATF6 α) [14, 15]. X-

Box Binding Protein 1, as a protein downstream of IRE1, is an imperative regulator of lipogenesis and apoptosis in cells that experience endoplasmic reticulum stress [16]. Measurement of XBP1 spliced mRNA expression is a strategic way to analyze the effect of gene expression changes in stressed condition cells related to the progression of NAFLD.

Curcumin is a polyphenolic compound found in *Curcuma longa* and *Curcuma xanthorrhiza*, Roxb, which provides various pharmacological activities, especially antioxidant [17, 18, 19]. Curcumin induces antioxidant enzymes, modulating the activity of GSH enzymes, catalase, and superoxide dismutase in neutralizing free radicals [17]. Curcumin significantly reduces oxidative stress in the liver, inhibits apoptosis, enhances cell protection, and repairs mitochondrial damage through the induction of autophagy [20]. Curcumin induces autophagy-related apoptosis in mesothelioma and chronic myelogenous leukemia K562 cells by modulating the PI3K/AKT/mTOR and NF- κ B signaling pathway [21].

The aim of the study. This study explores the effects of curcumin administration on the expression of autophagy markers (beclin-1 and LC3), endoplasmic reticulum stress through XBP1 spliced mRNA expression and to discover the mechanism and correlation of these various pathways concerning the progress of NAFLD.

Materials and methods

Experimental animals

Eight-week-old ddY male mice with a healthy physical condition were used in this study. Mice were fed in individual cages measuring $20 \times 20 \times 15$ cm and covered with 6 mm gauze with a temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and with a 12 hours light/dark cycle. Their cages were cleaned and replaced with new husks every day. All experiments were performed at the Animal Research Laboratory of the Faculty of Pharmacy, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia. The protocol of this study was approved by the Ethical Committee (Animal Care and Use Committee) of the Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga (No.2.KE.054.05.2021).

Diet, drug, and experimental design

The high-fat diet (HFD) used in this study consists of 60% beef tallow (902 kcal/100 g), which has been melted at 65°C using a hotplate and mixed up to 100% with a normal chow diet (306.20 kcal/100 g) that has been mashed. Curcumin (Tokyo Chemical Industry Inch., Tokyo, Japan) was dissolved to 10% polysorbate 80 (vehicle) in a *recenter paratus* before treatment.

In this experimental study, twenty-four mice were used. All of the test animals were reared in the same way. After one week of habituation, the mice were randomly divided into four groups ($n = 6$) and given the same amount of food with free access to food and water. The groups included: (1) the control group which was fed with a normal chow diet and treated with 10% of polysorbate 80 for 28 days; (2) the HFD group was fed with an HFD for 28 days; (3) the low dose curcumin-treated group which was fed with HFD and curcumin 50 mg/kg i.p for 28 days; and (4) the high dose curcumin-treated group which was fed with HFD and curcumin 100mg/kg i.p for 28 days. The high-fat diet used in this work is consistent with the previous study that successfully developed the high-fat diet-induced NAFLD in mice [22]. The justification of choice doses and the administration route of curcumin are based on previous study that found curcumin 50 and 100 mg/kg exhibit antioxidant activity in the liver diseases [23, 24, 25]. At the end of the study, all mice in each group were euthanized after 28 days of treatment and 24 hours of the last treatment. The liver was extracted and put in the freezer at -80°C for further analysis.

Liver macroscopic evaluation and histopathological examination

The macroscopic evaluation of the liver was carried out visually. Then, for histopathological examination, the liver tissues were fixed and stored in a sample container at 4°C in 4% paraformaldehyde, routinely processed and embedded in paraffin, prepared into 5 μm thick sections and stained for 8 min hematoxylin-eosin (H&E), washed for 60 min in flowing tap water, counter staining at room temperature with eosin for 60 seconds. The steatosis is characterized by lipid droplets, ballooning, and

inflammation on the histopathology of the liver tissue under a light microscope (magnification, $\times 400$; Nikon Company, Tokyo, Japan).

RNA extraction and reverse transcription-polymerase chain reaction (PCR)

Measurement of beclin-1, LC3, and XBP-1 spliced (XBP1s) mRNA relative expression was obtained from the liver tissue measurement using the reverse-transcription polymerase chain reaction (PCR) method. The animals were sacrificed, and the largest lobe of the liver was taken. The purification of total RNA in the liver sample was performed with the RNA Purification Kit® (Jena Bioscience, Germany). The reverse transcription was performed using the GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, USA). The following primers were used: beclin-1 (forward: 5'-GAACCG CAAGATAAGTGGC-3'; and reverse: 5'-CAGAGCATGGAGCAGCAA-3'), LC3 (forward: 5'-CAG-GATCCATGCCGTCCCAGAACGACC-3'; and reverse: 5'-GTCCCTTTGCCTTGG-TAG-3'), XBP1s (forward: 5'-TCTGCTGAG-TCTGCAGCAG-3'; and reverse: 5'-TCTGGGAAGGACATTGAA-3'), and β -actin (forward: 5'-TGTTACCAACTGGGAC-GACA-3'; reverse: 3'-AAGGAGGCTG-GAAAA GAGC-5').

The thermal cycler process of PCR was performed using the initial denaturation for 5 minutes at 94 °C, 35 cycles of denaturing for 40 seconds at 94 °C, annealing for 1 minute at 55 °C, extension for 2 minutes at 72 °C, and final extension for 4 minutes at 72 °C. The separation process of aliquots from PCR was performed on 2% agarose LE (Promega, USA) using electrophoresis. Ethidium bromide (Sigma-Aldrich) was used to stain gel and photographed using UV transillumination. The

ImageJ software was used to examine the band intensity.

Data analysis

The statistical analysis for the body weight and food intake data was performed using the two-way analysis of variance (ANOVA) method, followed by the Tukey's post hoc test. Then, the analysis for the mRNA relative expressions of beclin-1, LC3, and XBP-1 spliced was performed using the one-way ANOVA method followed by the Tukey's post hoc test (Tukey test for multiple comparisons). The data analysis was performed using GraphPad Prism 9.0.2 for Windows (Graphpad Software, San Diego).

Results

Bodyweight profile

The bodyweight profiles of the normal chow group (control), the HFD-only group, and the HFD group with curcumin treatment at a dose of 50 mg/kg i.p and 100 mg/kg i.p for 28 days were compared, as shown in Fig. 1. The normal chow group tended to increase in body weight every day by 19.3% until the 28th day, inversely with the HFD group, which tended to decrease by 22.2% until the 28th day. The weight fall also occurred in the curcumin 50 and 100 mg/kg groups, which were 31.2% and 18.4% weight loss, respectively.

Food intake and calorie intake profiles

The findings showed no specific difference in the amount of food consumed by each group every day. However, in terms of calorie intake, there is a difference in the amount of calorie intake between the normal chow (control) group and the group fed with high-fat diets. The amount of calorie intake in the three groups that were fed a high-fat diet was higher compared to the normal chow group as shown in Fig. 2.

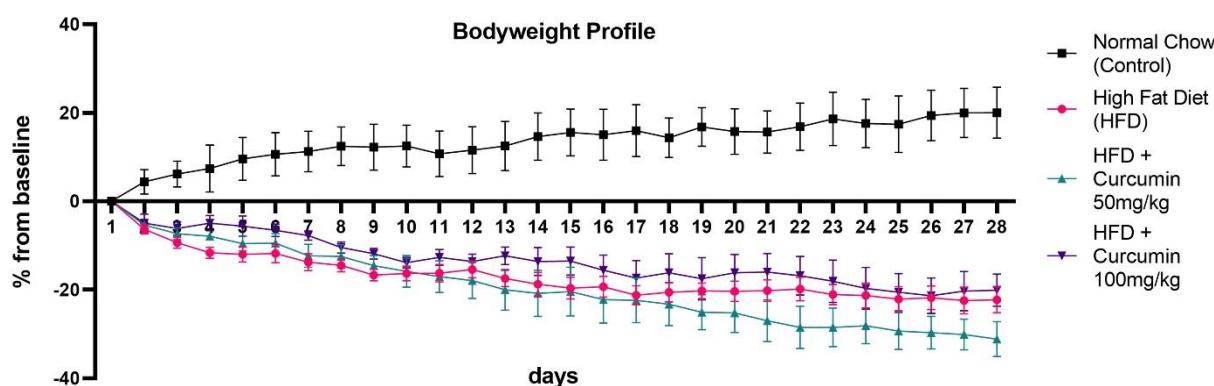


Fig. 1. Bodyweight profile calculated for 28 days from baseline (day 1). Each bar represents the mean \pm SEM of the six experimental animals for each group.

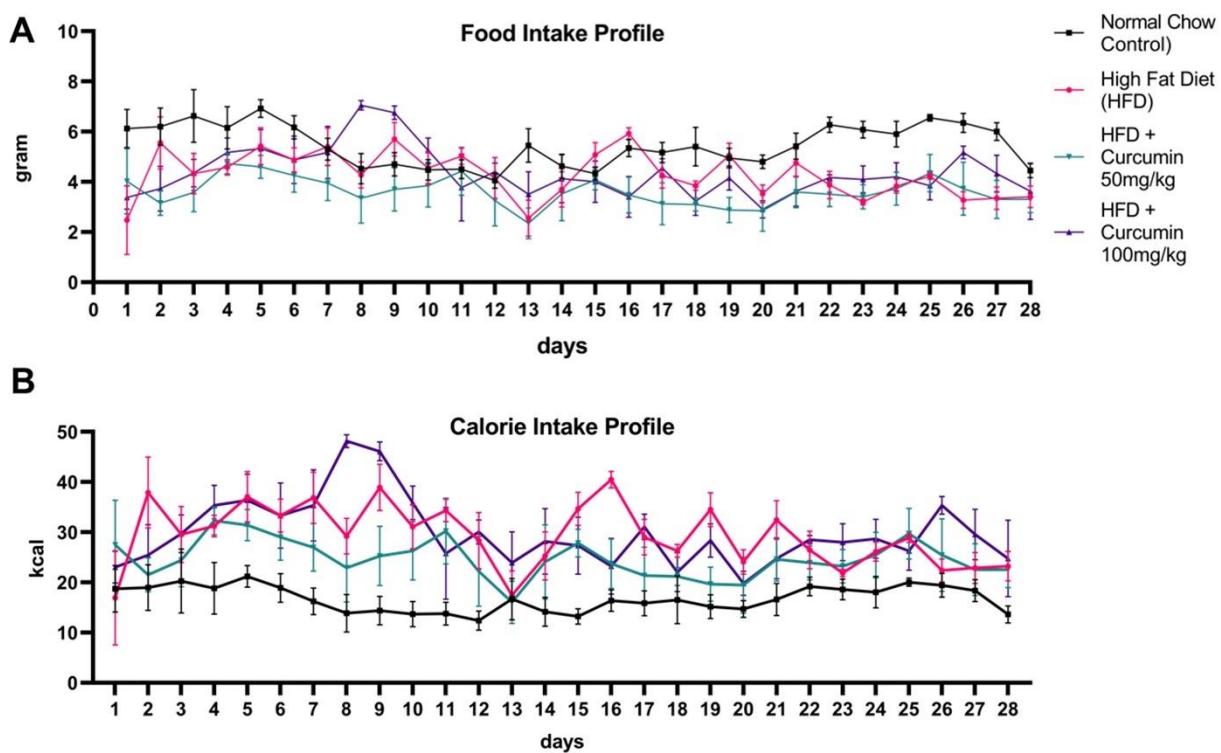


Fig. 2. Food intake and calorie intake profiles were calculated for 28 days, (A) food intake profile and (B) calorie intake profile. Each bar represents the mean \pm SEM of the six experimental animals for each group.

Macroscopic features of the liver

The macroscopic features of the normal liver are generally observed with many blood vessels, so the color tends to be dark red with a smooth surface, as shown in Fig. 3A (normal chow group). While in the HFD group, the liver looks pale with a granular surface due to lipid deposits, as shown in Fig. 3B. The administration of curcumin 50 or 100 mg/kg i.p for 28 days improves the macroscopic features of the liver (Fig. 3C and 3D),

characterized by changes in liver color that are getting closer to normal as it becomes dark red and the surface becomes smoother compared to the HFD-only group.

Histopathological features of the liver

The histopathological features of the liver in the normal chow (control) group shows normal hepatocyte cell structure with clearly visible sinusoids and no signs of NAFLD (Fig. 4A). While in the HFD group, the histopathological features

of the liver show abnormal hepatocyte cell structures with narrowed sinusoids. In addition, there are signs of NAFLD, such as lipid droplets, ballooning cells, and inflammation at a certain point (Fig. 4B). The administration of curcumin 50 and

100 mg/kg i.p for 28 days improves the histopathological features of the liver (Fig. 4C and 4D), characterized by decreases in the number of lipid droplets, ballooning cells, and inflammatory points.

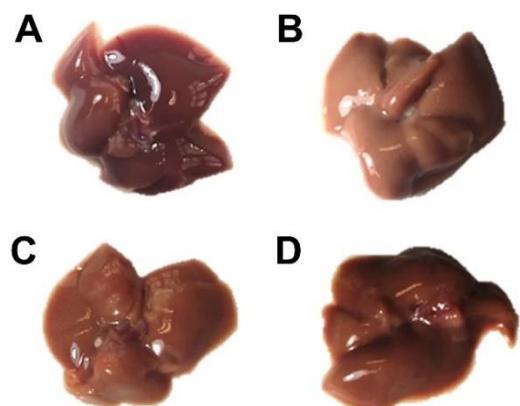


Fig. 3. Macroscopic features of the liver, (A) normal chow (control) group, (B) HFD group, (C) HFD + curcumin 50 mg/kg for 28 days, and (D) HFD + curcumin 100 mg/kg for 28 days.

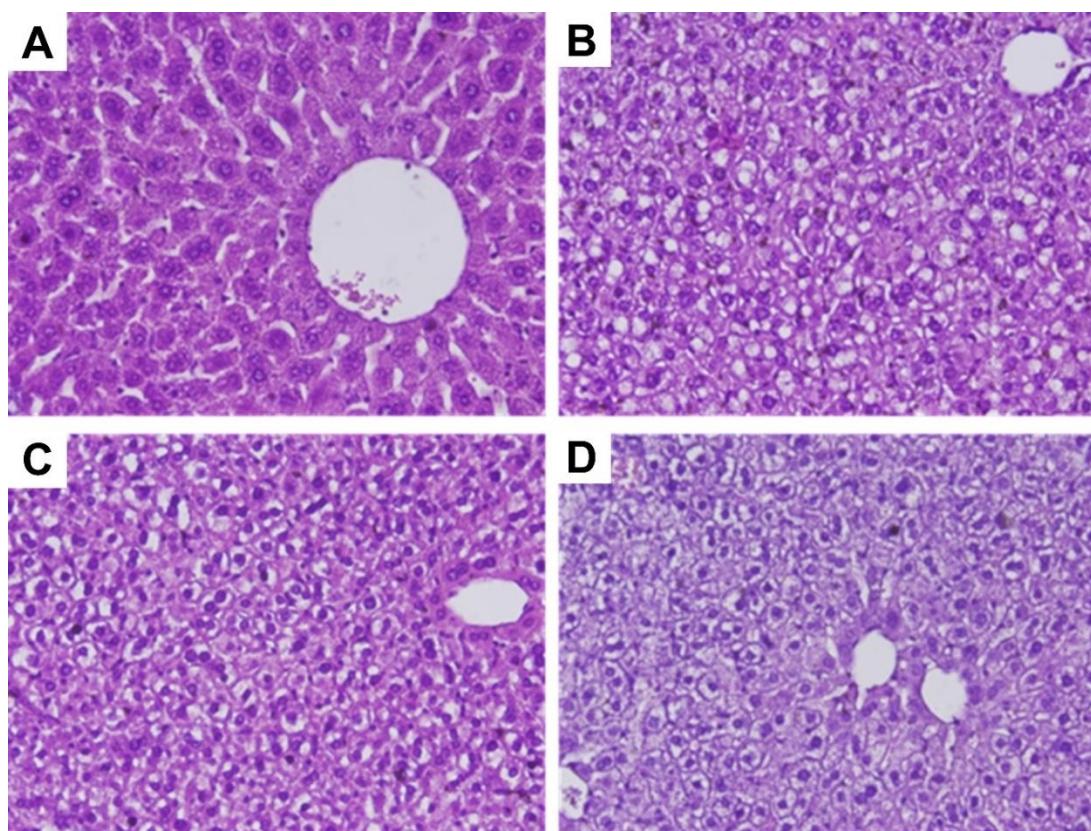


Fig. 4. Histopathological features of the liver, (A) normal chow (control) group, (B) HFD group, (C) HFD + curcumin 50 mg/kg for 28 days, and (D) HFD + curcumin 100 mg/kg for 28 days.

LC3, beclin-1, and XBP1 spliced mRNA relative expression

Measurement of the microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) and beclin-1

mRNA relative expression showed no significant difference between all experimental groups (Fig. 5A and 5B). Furthermore, for XBP1 spliced (XBP1s) evaluation, the findings showed a significant decrease in the XBP1s mRNA relative expression in the HFD

group compared to the normal chow (control) group. The supplementation of curcumin 100 mg/kg but not 50 mg/kg increases the XBP1s mRNA relative expression compared to the HFD group (Fig. 5C).

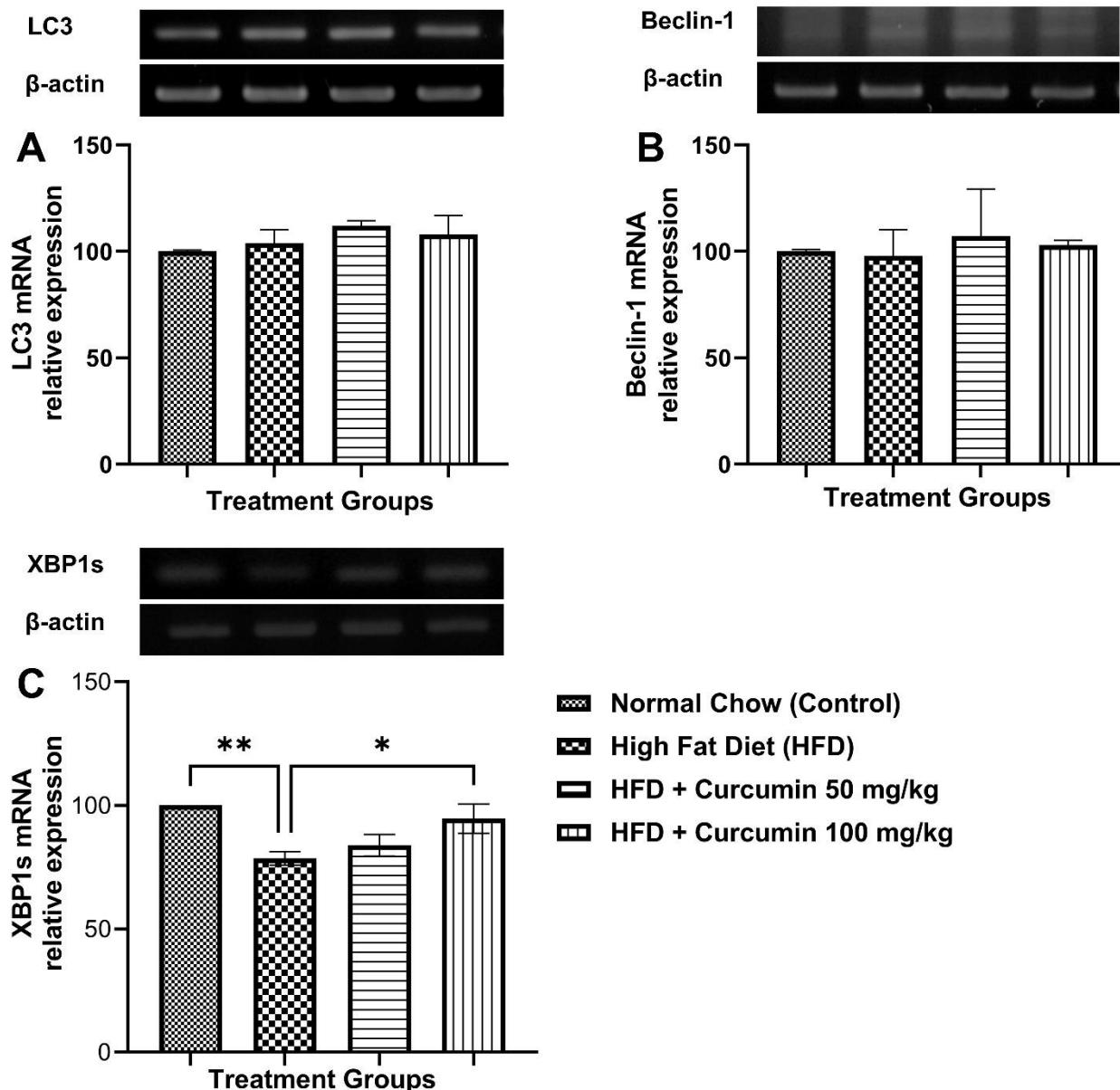


Fig. 5. mRNA relative expression of (A) LC3, (B) beclin-1, and (C) XBP1s in the mice liver analyzed using reverse transcription PCR. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Each bar represents the mean \pm SEM of the six experimental animals for each group.

Discussion. The high-fat diet (HFD) intake in the animal promoted liver damage, similar to the phenotype in humans with NAFLD [26]. Therefore, HFD induction is often used for *in vivo* NAFLD model development [26,

27, 28]. In this study, an analysis of the effect of curcumin in the repair of NAFLD was carried out from cellular properties assessment by histopathological and molecular evaluation

through the evaluation of the biomarkers of autophagy and endoplasmic reticulum stress.

The administration of the HFD triggered gradual weight loss in the HFD group, HFD + curcumin 50 mg/kg group, and HFD + curcumin 100 mg/kg group. This result is in accordance with the previous study that found a weight loss in mice received HFD beef tallow 60%, HFD beef tallow 45%, and vegetable ghee due to compensation for polyunsaturated fatty acid (PUFA) deficiency regarding high saturated fatty acid (SFA) content in HFD so that the rate of lipolysis in adipose tissue is greater than its esterification [27].

The result of the HFD-induced NAFLD model in this study is similar to the ketogenic diet in terms of its effect on body weight. This finding may be due to the HFD and ketogenic diets containing HFD composition, even though the HFD-induced NAFLD model in this study did not apply carbohydrate restriction. High-fat and low-carbohydrate intakes significantly reduce insulin secretion and cause changes in metabolism through two processes, namely gluconeogenesis and ketogenesis, resulting in the conversion of protein and fat as energy sources [29]. Hence, the ketogenic diet improves glycemic control but possesses a risk of hyperlipidemia, hyperinsulinemia, elevated liver enzymes, and the development of diseases associated with NASH [30, 31].

Macroscopically, the color of normal liver is generally dark red, and the surface texture is smooth. Meanwhile, the color of the liver with NAFLD is pale with a granular surface due to the accumulation of excess lipid droplets and had a larger size, as is characteristic of the HFD group in this study. This study's findings align with previous studies, which revealed changes in the visual appearance of the liver: it became paler with increasing time of exposure to HFD [32]. The administration of curcumin on HFD-induced NAFLD showed macroscopic liver improvement, characterized by changes in color and texture closer to normal liver than the HFD group without curcumin. Previous research that explores the supplementation of hot water extract from turmeric rhizome to HFD mice

with 8 weeks of treatment reduces the serum concentration of triglycerides and total cholesterol [33].

The histopathological features of the liver in NAFLD condition are characterized by lipid droplets (steatosis), hepatocellular ballooning, and lobular and portal inflammation until fibrosis [34]. In the normal chow (control) group, normal hepatocyte structure was founded with clear sinusoids. In contrast, in the HFD group, there were many lipid droplets, ballooning, and several points of inflammation. These results indicated that NAFLD successfully occurred in the HFD group. In the HFD group treated with curcumin 50 mg/kg, there were some lipid droplets and ballooning in the cells. Meanwhile, in the HFD group treated with curcumin 100 mg/kg i.p., only ballooning was found in cells. This finding shows that the administration of curcumin repairs the liver tissue damage caused by fat accumulation in the liver.

Furthermore, the reverse transcription-PCR measurements showed no significant differences regarding the LC3 and beclin-1 mRNA in the HFD with low-dose and high-dose curcumin groups. This study's results illustrated that curcumin had no effect on autophagy markers. This finding may be due to a shorter duration of the HFD, so the NAFLD model that was successfully developed is still relatively mild. There is also the possibility that each marker of the autophagosome phase works independently since many pathways induce and inhibit autophagy mechanisms. NAFLD/NASH caused by HFD is highly variable, most likely influenced by diet composition and duration as well as animal species, strain, sex, and age [31].

Regarding the mechanism of endoplasmic reticulum stress, the HFD increases the activity of the three main transmembrane proteins IRE1, PERK, and ATF6, and causes a physiological response called unfolded protein response, which is under normal conditions, the activity of transmembrane proteins is at a bare minimum [14]. Many factors trigger endoplasmic reticulum stress, including nutritional deficiencies, accumulation of free fatty

acids, hyperlipidemia, and hyperglycemia, including the induction with HFD that triggers an increase in misfolded protein in the endoplasmic reticulum lumen [14]. Along with an increase in misfolded protein, there is a decrease in the affinity of GRP78 or BiP with transmembrane proteins so that GRP78 binds to misfolded proteins in the ER lumen [14, 35]. There was an increase in misfolded protein in the lumen of the endoplasmic reticulum in cells under stress conditions, so GRP78 or BiP, which have functions to bind proteins in the endoplasmic reticulum lumen, was unable to balance the amount of misfolded protein and causes transautophosphorylation of IRE1 [14, 35]. In the IRE1 branch, transautophosphorylation of IRE1 occurred as a corollary of HSP47 release from the protein domain. The proximal sensor of endoribonuclease IRE1 α induces unconventional splicing of XBP1 mRNA to develop a mature mRNA encoding an active transcription factor XBP1s afterward [14, 35].

XBP1 is a downstream gene from IRE1 in the RNA kinase branch, which has two isoforms, namely XBP1 unspliced (XBP1u) and XBP1 spliced (XBP1s) [36]. Under physiological conditions or conditions without endoplasmic reticulum stress, XBP1u expression predominates [36, 37]. Activation due to endoplasmic reticulum stress caused splicing of XBP1u by excluding 26 nucleotides resulting in a frameshift from the XBP1 coding sequence and then translated into XBP1s protein, which then translocates into the nucleus and providing changes in cells that affect lipogenesis, apoptosis, and so on [36, 38].

The reverse transcription-PCR evaluation showed a significant decrease of XBP1s mRNA relative expression in the HFD group compared to the normal chow group. Although there was an increase in splicing XBP1, this phenomenon happened in the early phase. After XBP1s increase even to supraphysiological levels, a gradual decrease appeared in the expression of spliced XBP1, which induced the activation of the PERK-ATF4 pathway and caused a terminal UPR response that resulted in an impact on cell apoptosis [39, 40]. This phenomenon underlies the decrease in the ratio

of XBP1 spliced in stress condition cells in this study. The finding in this study is in accordance with the previous study that found the upregulation of IRE1 in mouse embryonic fibroblasts 2 (MEF2) cells up to 4 folds and also XBP1 splicing in WT cells up to 80% by induction of thapsigargin and tunicamycin as endoplasmic reticulum inducers, then decreased gradually [41].

In the curcumin group, there was a significant increase of XBP1s mRNA relative expression that was proportional to the increase of curcumin dose to the HFD group; it was because curcumin showed activity in modulating endoplasmic reticulum stress. Curcumin plays a role in the downregulation of GRP78, eIF2, and CHOP, a proapoptotic cell. Hence, curcumin suppresses cell apoptosis [21].

Conclusion. Curcumin improves the macroscopic and histopathological features of the liver of the HFD-induced NAFLD model by increasing the XBP1s mRNA relative expression. However, further research is still needed to explore the overall mechanisms regarding the ameliorating effects of curcumin on NAFLD.

Financial support

This research was funded by the Ministry of Education, Culture, Research and Technology of the Republic of Indonesia.

Conflict of interests

The authors have no conflict of interest to declare.

References

1. Zhang L, Yao Z, Ji G. Herbal Extracts and Natural Products in Alleviating Non-alcoholic Fatty Liver Disease via Activating Autophagy. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9:1459. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01459>
2. Anstee QM, McPherson S, Day CP. How big a problem is non-alcoholic fatty liver disease? *BMJ*. 2011;343(7816):d3897. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.d3897>
3. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73-84. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.28431>

4. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology.* 2018;15(1):11-20. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.109>
5. Mitra S, De A, Chowdhury A. Epidemiology of non-alcoholic and alcoholic fatty liver diseases, *Translational Gastroenterology and Hepatology.* 2020;5:16. DOI: <https://doi.org/10.21037/TGH.2019.09.08>
6. Yu J, Marsh S, Hu J, et al. The pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease: interplay between diet, gut microbiota, and genetic background. *Gastroenterology Research and Practice.* 2016;2016:2862173. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/2862173>
7. Marzio HD, Dina L, Fenkel, JM. Concepts and treatment approaches in nonalcoholic fatty liver disease. *Advance in Hepatology.* 2014;2014:357965. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/357965>
8. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology.* 2010;52(5):1836-1846. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.24001>
9. Maiuri MC, De Stefano D. Autophagy Networks in Inflammation. Springer International Publishing; 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-30079-5>
10. Lavallard VJ, Gual P. Autophagy and non-alcoholic fatty liver disease. *BioMed Research International.* 2014;2014:120179. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/120179>
11. Mao Y, Yu F, Wang J, et al. Autophagy: a new target for nonalcoholic fatty liver disease therapy. *Hepatic Medicine: Evidence and Research.* 2016;8:27-37. DOI: <https://doi.org/10.2147/HMER.S98120>
12. Meng YC, Lou XL, Yang LY, et al. Role of the autophagy-related marker LC3 expression in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology.* 2020;146(5):1103-1113. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00432-020-03174-1>
13. Bortolami M, Comparato A, Benna C, et al. Gene and protein expression of mTOR and LC3 in hepatocellular carcinoma, colorectal liver metastasis and “normal” liver tissues. *PLoS ONE.* 2020;15(12):e0244356. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244356>
14. Lebeaupin C, Vallée D, Hazari Y, et al. Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology.* 2018;69(4):927-947. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.06.008>
15. Pagliassotti MJ. Endoplasmic reticulum stress in nonalcoholic fatty liver disease. *Annual Review of Nutrition.* 2012;32:17-33. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071811-150644>
16. Yoon SB, Park YH, Choi SA, et al. Real-time PCR quantification of spliced X-box binding protein 1 (XBP1) using a universal primer method. *PLoS ONE.* 2019;14(7):e0219978. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219978>
17. Mansour-Ghanaei F, Pourmasoumi M, Hadi A, et al. Efficacy of curcumin/turmeric on liver enzymes in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review of randomized controlled trials. *Integrative Medicine Research.* 2019;8(1):57-61. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.imr.2018.07.004>
18. Nurhan AD, Gani MA, Budiatin AS, et al. Molecular docking studies of *Nigella sativa* L and *Curcuma xanthorrhiza* Roxb secondary metabolites against histamine N-methyltransferase with their ADMET prediction. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology.* 2021;32(4):795-802. DOI: <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2020-0425>
19. Gani MA, Nurhan AD, Maulana S, et al. Structure-based virtual screening of bioactive compounds from Indonesian medical plants against severe acute respiratory syndrome coronavirus-2. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research.* 2021;12(2):120-126. DOI: https://doi.org/10.4103/japtr.JAPTR_88_21
20. Sala de Oyanguren FJ, Rainey NE, Moustapha A, et al. Highlighting curcumin-induced crosstalk between autophagy and apoptosis as supported by its specific subcellular localization. *Cells.* 2020;9(2):361. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells9020361>
21. Deng S, Shanmugam MK, Kumar AP, et al. Targeting autophagy using natural compounds for cancer prevention and therapy. *Cancer.* 2019;125(8):1228-1246. DOI: <https://doi.org/10.1002/cncr.31978>
22. Al-Maamari JNS, Rahmati M, Panggono SM, et al. The effects of quercetin on the expression of SREBP-1c mRNA in high-fat diet-induced NAFLD in mice. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology.* 2021;32(4):637-644. DOI: <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2020-0423>
23. Dkhar P, Sharma R. Attenuation of age-related increase of protein carbonylation in the

- liver of mice by melatonin and curcumin. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2013;380:153-160. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1668-9>
- 24.Zhao NJ, Liao MJ, Wu JJ, et al. Curcumin suppresses Notch-1 signaling: Improvements in fatty liver and insulin resistance in rats. *Molecular Medicine Reports*. 2018;17(1):819-826. DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7980>
- 25.Park EJ, Jeon CH, Ko G, et al. Protective effect of curcumin in rat liver injury induced by carbon tetrachloride. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2000;52(4):437-440. DOI: <https://doi.org/10.1211/0022357001774048>
- 26.Recena Aydos L, Aparecida do Amaral L, Serafim de Souza R, et al. Nonalcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in C57bl/6 models. *Nutrients*. 2019;11(12):3067. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu11123067>
- 27.Rahmadi M, Nurhan AD, Pratiwi ED, et al. The effect of various high-fat diet on liver histology in the development of NAFLD models in mice. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*. 2021;32(4):547-553. DOI: <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2020-0426>
- 28.Kanuri G, Bergheim I. In vitro and in vivo models of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *International Journal of Molecular Sciences*. 2013;14(6):11963-11980. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms140611963>
- 29.Alharbi A, Al-Sowayan NS. The effect of ketogenic-diet on health. *Food and Nutrition Sciences*. 2020;11(4):301-313. DOI: <https://doi.org/10.4236/fns.2020.114022>
- 30.Anekwe CV, Chandrasekaran P, Stanford, FC. Ketogenic diet-induced elevated cholesterol, elevated liver enzymes and potential non-alcoholic fatty liver disease. *Cureus*. 2020;12(1):e6605. DOI: <https://doi.org/10.7759/cureus.6605>
- 31.Takahashi Y, Fukusato T. Animal models of liver diseases. In: *Animal Models for the Study of Human Disease (Second Edition)*. Academic Press; 2017:313-339. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809468-6.00013-9>
- 32.Podrini C, Cambridge EL, Lelliott CJ, et al. High-fat feeding rapidly induces obesity and lipid derangements in C57BL/6N mice. *Mammalian Genome*. 2013;24(5-6):240-251. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00335-013-9456-0>
- 33.Mun J, Kim S, Yoon HG, et al. Water extract of Curcuma longa L. ameliorates non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients*. 2019;11(10):2536. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu11102536>
- 34.Naito H, Yoshikawa-Bando Y, Yuan Y, et al. High-fat and high-cholesterol diet decreases phosphorylated inositol-requiring kinase-1 and inhibits autophagy process in rat liver. *Scientific Reports*. 2019;9(1):12514. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48973-w>
- 35.Lee AH, Scapa EF, Cohen DE, et al. Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science*. 2008;320(5882):1492-1496. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1158042>
- 36.Wu R, Zhang QH, Lu YJ, et al. Involvement of the IRE1 α -XBP1 pathway and XBP1s-dependent transcriptional reprogramming in metabolic diseases. *DNA and Cell Biology*. 2015;34(1):6-18. DOI: <https://doi.org/10.1089/dna.2014.2552>
- 37.Li J, Chen Z, Gao LY, et al. A transgenic zebrafish model for monitoring xbp1 splicing and endoplasmic reticulum stress in vivo. *Mechanisms of Development*. 2015;137:33-44. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mod.2015.04.001>
- 38.Duarte M, Vende P, Charpilienne A, et al. Rotavirus infection alters splicing of the stress-related transcription factor XBP1. *Journal of Virology*. 2019;93(5):e01739-18. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01739-18>
- 39.Yoshida H, Oku M, Suzuki M, et al. pXBP1 (U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1 (S) in mammalian ER stress response. *Journal of Cell Biology*. 2006;172(4):565-575. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.200508145>
- 40.Mimura N, Fulciniti M, Gorgun G, et al. Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1 α is a promising therapeutic option in multiple myeloma. *Blood*. 2012;119(24):5772-5781. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-366633>
- 41.Tsuru A, Imai Y, Saito M, et al. Novel mechanism of enhancing IRE1 α -XBP1 signalling via the PERK-ATF4 pathway. *Scientific Reports*. 2016;6(1):24217. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep24217>

Received 12 December 2022

Revised 2 February 2023

Accepted 20 February 2023

Information about the authors

Mahardian Rahmadi, SSi, MSc, PhD, Associate Professor at the Department of Pharmacy Practice, Researcher at the Biomedical Pharmacy Research

Group, Faculty of Pharmacy, Airlangga University, Surabaya, Indonesia, E-mail: mahardianr@ff.unair.ac.id, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7256-2446>.

Ahmad D. Nurhan, SFarm, MFarm, Associate Professor at the Department of Pharmacy Practice, Researcher at the Biomedical Pharmacy Research Group, Faculty of Pharmacy, Airlangga University, Surabaya, Indonesia, E-mail: ahmad.dzulfikri.nurhan-2019@ff.unair.ac.id, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9584-0667>.

Maulidany R.D. Ananda, SFarm, Research Assistant at the Department of Pharmacy Practice, Faculty of Pharmacy, Airlangga University, Surabaya, Indonesia, E-mail: maulidany.rifkha.dwi.ananda-2017@ff.unair.ac.id, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8376-5572>.

Annisa D.S. Ramadhani, Research Assistant at the Department of Pharmacy Practice, Faculty of Pharmacy, Airlangga University, Surabaya, Indonesia, E-mail: annisa.dayu.syifa.ramadhani-2017@ff.unair.ac.id, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5961-2859>.

Zuhaela Iqbal, SFarm, Research Assistant at the Department of Pharmacy Practice, Faculty of Pharmacy, Airlangga University, Surabaya, Indonesia, E-mail: zuhaela.iqbal-2021@ff.unair.ac.id, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7955-9303>.

Santhra S. Balan, MBiomed, PhD, Head of the Department of Allied Health Sciences, Faculty of Health and Life Science, Management and Science University, Shah Alam Selangor; PhD Student, University of Putra Malaysia, Serdang, Malaysia, E-mail: santhra@msu.edu.my, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9756-3074>.

КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА MEDICINE



DOI: 10.18413/2658-6533-2023-9-4-0-8

Assessment of malnutrition risk in post-stroke patients: a systematic literature review

Stefano Mancin^{1,2,3} , Marco E. Sguanci⁴ , Francesco Reggiani^{2,3} ,
Francesca Vecchio² , Michela Piredda^{4,5} , Maria G. De Marinis^{4,5}

¹ Tor Vergata University of Rome,

1 Viale Montpellier, Rome, 00128, Italy

² Humanitas Research Hospital,

56 Via Manzoni, Rozzano (Milan), 20089, Italy

³ Humanitas University,

4 Via Rita Levi Montalcini, Milan, 20072, Italy

⁴ Campus Bio-Medico University of Rome,

21 Via Alvaro del Portillo, Rome, 00128, Italy

⁵ Campus Bio-Medico University Hospital Foundation,

200 Via Alvaro del Portillo, Rome, 00128, Italy

Corresponding author: Michela Piredda (m.piredda@unicampus.it)

Abstract

Background: Stroke is one of the main causes of death, especially when associated with malnutrition. Assessment of nutritional status in all stages of the disease is therefore mandatory to improve clinical outcomes. **The aim of the study:** To identify the most suitable nutritional screening tools in the acute and chronic phase of the disease. **Materials and methods:** A systematic literature search was conducted in the PubMed, Embase, Cinahl, Scopus and Web of Science databases, and through manual search of relevant journals and grey literature. The process of screening, selection and inclusion of the articles, as well as the assessment of risk of bias and methodological quality, were conducted independently by two reviewers. Out of 1,722 records identified, 20 studies were included in this systematic review. **Results:** In the acute phase of stroke, the Malnutrition Universal Screening Tool has shown a greater capacity to identify malnutrition. It also correlates better with poor clinical outcomes, such as length of hospital stay, mortality, length of stay and functional disability, when compared to other tools. In the rehabilitation/home setting the Mini Nutritional Assessment demonstrated high sensitivity and predictiveness and strong correlation with clinical outcomes such as quality of life, functional outcomes and Activities of Daily Living. **Conclusion:** The nutritional status of post-stroke patients is often compromised, and malnutrition is a frequent complication. Identifying specific nutritional screening tools applicable during different stages of the disease helps to better identify the risk of malnutrition, improving clinical outcomes.

Keywords: stroke; nutritional assessment; nutritional screening tool; malnutrition; systematic review

For citation: Mancin S, Sguanci M, Reggiani F, et al. Assessment of malnutrition risk in post-stroke patients: a systematic literature review. Research Results in Biomedicine. 2023;9(4):524-543. DOI: 10.18413/2658-6533-2023-9-4-0-8

Introduction. Strokes are one of the most common acute neurological diseases and a leading worldwide cause of mortality and physical disability in adults [1]. In Italy, about 90,000 strokes occur every year, about 80% of which are new episodes [2]. Currently in the European Union (EU), there are about 6 million stroke survivors [3]. According to the World Health Organization, the number of stroke events in these countries will increase from 1.1 million in 2000 to more than 1.5 million per year in 2025 due to demographic changes [4]. The risk of stroke rises with age, hypertension, cigarette smoking, heart disease, diabetes, transient ischemic attacks, lack of exercise, alcohol abuse, poor diet and obesity [5].

Stroke is the cause of 10-12% of all deaths per year. It represents the first cause of disability and the second cause of dementia and neurological deficits with loss of self-sufficiency and development of complications. Among these neurological deficits, dysphagia represents a frequent complication [6], with a prevalence between 31.7% and 59.6% of subjects affected by ischemic-hemorrhagic stroke [7], exposing them to morbidities such as dehydration and aspiration pneumonia, and leading to prolonged hospitalization and increased mortality rates [6, 7, 8]. Right from the start, dysphagia also has a notable impact on the patient's nutritional status [9, 10], hampering adequate daily nutritional intake [11] and causing the onset of a state of malnutrition [12, 13], hindering survival [1, 14] and functional recovery [10].

Increased awareness among healthcare professionals and proper management of nutritional issues during and after hospitalization following a stroke can contribute to better outcomes [15, 16]. Early identification and treatment of patients at risk for malnutrition is important [10]. Hence an adequate nutritional screening tool needs to be used with this population, both in the acute and chronic phases of the disease [3]. Numerous screening tests are

available [17], but to date only the Malnutrition Universal Screening Tool (MUST) is recognized as a validated tool for patients with acute stroke [3, 18].

The main guidelines drawn up by international scientific societies recommend that every patient suffering from an acute cerebrovascular event should be screened for malnutrition within 48 hours of admission to hospital [3, 18-22]. However, guidelines don't specify which tool should be used in stroke patients.

In particular, according to the guidelines of the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN) and of the National Institute for Health and Care Excellence (NICE), the MUST scale is suitable and valid for patients in the acute phase of the disease [3, 18]. The Norwegian National Guidelines [18] for the screening of malnutrition and acute stroke dysphagia consider the Nutrition Risk Score 2002 (NRS 2002) as a suitable tool for use in Norwegian hospitals. The Slovenian Guidelines [19] for nutritional support of stroke, as well as the Canadian recommendations [20] for good practice in hospitalization, inpatient and home rehabilitation in stroke, indicate the importance of nutritional risk assessment without specifying which tool should be preferred among MUST, NRS 2002, Mini Nutrition Assessment (MNA) or Short Nutritional Assessment Questionnaire (SNAQ) [20]. Finally, the Guidelines of the German Society for Clinical Nutrition (DGEM) [21] identify the NRS 2002 as the most suitable screening tool for acute stroke patients, but indicate that other screening and evaluation tools such as MUST, MNA, Mini Nutrition Assessment Short-Form (MNA-SF), may be applicable to other contexts such as rehabilitation and home care.

Some reviews of the literature have been published to date. The reviews by Ray et al. [22] and Sabbouh et al. [23] emphasized the importance of assessing nutritional status in stroke patients, but considering them only in the acute phase of the disease. Both reviews

identified the MUST as a possible tool to apply. The review by Wang et al. [24], which considered the correlation between assessment of nutritional status measured by different screening tools and various risk factors and conditions associated with this pathology, hypothesized that both NRS 2002 and MUST could be used to screen for the risk of malnutrition in stroke patients, while MNA was appropriate for people over the age of 65 with associated stroke. In addition, as suggested by the aforementioned reviews [22, 23, 24], the assessment of dysphagia should always be associated with the assessment of nutritional status [4, 25].

To date, it is unclear which specific reference tool for the assessment of nutritional risk is applicable to stroke patients.

Systematic Review objectives. The purpose of this systematic review is to identify through the analysis of current data which malnutrition risk assessment tools may be used in stroke patients, and in which phase of the disease (acute or chronic) and treatment setting (hospital stay, rehabilitation or home) they are applicable. Secondary outcomes will evaluate the identification of malnutrition prevalence and its correlation with relevant clinical outcomes such as: mortality, length of stay, discharge outcomes, functional capacity and quality of life.

Methods. As a preliminary step, relevant guidelines published by recognized scientific societies were identified [1, 10-14]. A systematic and comprehensive literature search was then conducted first in the Cochrane Library and subsequently in the Pubmed, Embase, Cinahl, Trip, Scopus and Web of Science databases. A manual search was also conducted in relevant journals, and by screening the references of relevant articles, and in sources of grey literature such as Google Scholar search engine.

The screening, selection and inclusion process of the articles was conducted using the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (Supplementary file 1) [26, 27]. The risk of bias and the methodological quality of the articles included were independently assessed by two reviewers (MS,

SM) through the critical appraisal tools for Analytical Cross-Sectional Studies and Cohort Studies [28] of the Joanna Briggs Institute (Data availability statement).

The search was carried out using the keywords "stroke", "nutritional assessment", and "nutritional screening tool", suitably combined with Boolean operators in search strings adapted to the specificities of the different databases, for literature published between 01-01-2012 and 07-04-2022; full search strategies are available online in data availability statement at the link provided within data availability statement.

The inclusion criteria considered patients with both acute and chronic stroke, aged ≥ 18 years, using at least one validated nutritional screening and assessing both the ability of the screening tool to identify malnutrition and its correlation with relevant clinical outcomes such as: mortality, length of stay, outcomes at discharge, functional capacity and quality of life.

Studies that evaluated only the body mass index (BMI) for assessing the risk of malnutrition were excluded; books, chapters of books, case reports, editorial letters, animal studies were also excluded.

The titles and abstracts of studies identified as potentially relevant based on the inclusion and exclusion criteria were independently assessed by two researchers (MS, SM). Potentially admissible studies were finally selected by analyzing the full-text articles.

The data relating to complete search algorithm and the assessment of the risk of bias and the methodological quality of the articles included are available at the following link: <https://figshare.com/s/420ada20a9e78f510d7f>; PRISMA Flow Chart are available at the following link: <https://figshare.com/s/956950aa9d36cbbb2016>.

Results. A total of 1,722 articles were identified: 1,596 through electronic database searches (35 Cochrane Library, 165 PubMed, 594 Embase, 353 Cinahl, 227 Scopus, 222

Web of Science) and 126 from manual searches and grey literature.

After 793 articles were deleted as duplicates, all titles were screened and 202 articles were retained and evaluated for eligibility through reading the abstract. Of these, 126 were judged not relevant and 76 full-texts were evaluated, 56 of which were further deleted as irrelevant.

After deleting duplicates and evaluating for eligibility through reading the abstract and full-texts, the screening process ultimately included 20 studies in this review (Data availability statement).

General characteristics of studies included

All the studies included in the analysis were observational. Specifically, eleven were cross-sectional studies [22, 30, 31, 32, 34, 36, 37, 38, 40, 45, 47] (55%), five prospective cohort studies [33, 35, 42, 44, 46] (25%), two retrospective cohort studies [39, 43] (10%) and two retrospective cross-sectional studies [29, 41] (10%). Only three studies were multicenter [31, 45, 46]. No interventional studies were found.

The diagnoses reported were mainly ischemic stroke and hemorrhagic stroke. The total number of stroke patients who were assessed for malnutrition was 7,029 (range 35–1906 patients per study). The correlation between the risk or the presence of malnutrition and different outcomes [prognosis and mortality [29, 30, 31, 33, 42, 47] (30%), cognitive impairment [35, 43] (10%), prevalence of malnutrition and risk predictors [22, 32, 38, 39, 45, 47] (30%), post-discharge destination [40] (5%), quality of life and subjective assessment [34, 36] (15%) and functional outcomes [41, 44, 46] (10%)] were evaluated. The main features and findings of the included studies are described in Table 1.

Screening tools used for nutritional evaluation

Screening/evaluation tools and anthropometric/biochemical measurements were used for nutritional examination. The risk assessment/prevalence of malnutrition was investigated by anthropometric/ biochemical measurements and different screening tools:

MNA in seven studies [32, 34, 36, 37, 38, 44, 47], Geriatric Nutritional Risk Index (GNRI) in five studies [29, 33, 35, 41, 46], Controlling Nutritional Status (CONUT) in three studies [29, 31, 46], NRS 2002 in three studies [22, 32, 46], MUST in three studies [30, 42, 46], MNA-SF in three studies [36, 39, 43], The European Society of Clinical Nutrition and Metabolism-Diagnostic Criteria for Malnutrition (ESPEN DCM) in two studies [40, 46], Malnutrition Risk Screening Tool-Hospital (MRST-H) in one study [45], Global Leadership Initiative on Malnutrition (GLIM criteria) in one study [40], Guy's & St. Thomas Malnutrition Screening Tool (GST) in one study [30] and Short Nutritional Assessment Questionnaire (SNAQ⁶⁵⁺) in one study [47]. More details on the screening tools used for the nutritional examination are shown in Table 1.

Description of the screening tools evaluated

Controlling Nutritional Status (CONUT) [29, 31, 46] is a nutritional scoring tool that is calculated using serum albumin, total cholesterol level, and total lymphocyte count.

Geriatric Nutritional Risk Index (GNRI) [29, 33, 35, 41, 46] is a nutritional scoring calculated based on the serum albumin level and the ratio of present body weight to ideal body weight. The GNRI was proposed for assessing the nutritional status of elderly patients with various illnesses.

Global Leadership Initiative on Malnutrition (GLIM criteria) [40] includes three phenotypic criteria (weight loss, low body mass index, and decreased muscle mass) and two etiological criteria (decreased food intake or absorption and increased disease burden or inflammation). If a patient meets at least one phenotypic criterion and one etiological criterion, malnutrition is diagnosed.

Guy's & St. Thomas Malnutrition Screening Tool (GST) [30] is a rapid screening tool that evaluates BMI, recent weight loss and dietary intake. The tool categorises patients in low, medium and high risk of malnutrition.

Malnutrition Risk Screening Tool-Hospital (MRST-H) [45] is a validated tool for nutritional screening that evaluates financial dependence, food dependence, unintentional

weight loss, and measures of mid-upper arm circumference and calf circumference of the non-paralytic limb. The score classifies patients at high risk of malnutrition (≥ 2) or low risk of malnutrition (< 2).

Malnutrition Universal Screening Tool (MUST) is a five-step screening tool to identify adults who are malnourished, at risk of malnutrition (undernutrition), or obese. It also includes management guidelines, which can be used to develop a care plan. It is suited for hospitals, community and other care settings and can be used by all care workers. The total score identifies whether the patient has a low (0 point), medium (1 point) or high (≥ 2 points) risk of malnutrition.

Mini Nutritional Assessment (MNA) [32, 34, 36, 37, 38, 44, 47] is a validated nutrition screening and assessment tool that can identify geriatric patients (aged 65 and above) who are malnourished or at risk of malnutrition. The 18-item MNA includes anthropometric measurement, global assessment, dietary questionnaire, and subjective assessment. The MNA identify patients well-nourished (score 24–30), at risk for malnutrition (score 17–23.5) and malnourished (< 17).

Mini Nutritional Assessment short-form (MNA-sf) [36, 39, 43] consists of 6 questions highly correlated with the original 18-item long form, which should be used if further investigations into the client's condition are warranted after administration of the MNA-sf. Each item of the MNA-sf is scored along a scale 0–3 with total scores ranging 0–14. The assessment takes less than 10 minutes to complete with lower scores suggestive of poorer nutritional intake.

Nutritional Risk Screening 2002 (NRS 2002) [22, 32, 46] is a validated tool for nutritional screening of patients aged from 18 to 90 years who have or are at risk of malnutrition. The tool includes standard screening parameters, such as body mass index (BMI), patient's age, weight loss, dietary intake, and severity of underlying disease. The NRS-2002 score ranges from 0 to 7, and a total score ≥ 3 indicates a patient "at nutritional risk".

Short Nutritional Assessment Questionnaire (SNAQ⁶⁵⁺) [47] uses a set of quick and

easy-to-apply criteria (recent weight loss, ability to climb stairs, appetite, mid-upper arm circumference). This tool is used not only in hospitals, but also in home care.

The European Society of Clinical Nutrition and Metabolism-Diagnostic Criteria for Malnutrition (ESPEN DCM) [40, 46] has two alternatives for diagnosing malnutrition after initial nutritional screening with a validated screening tool. One is to diagnose malnutrition if the BMI is $< 18.5 \text{ kg/m}^2$, and the other is a combination of unintentional weight loss ($> 10\%$ of habitual weight indefinitely or $> 5\%$ over 3 months), reduced BMI ($< 20 \text{ kg/m}^2$ for patients aged < 70 years, or $< 22 \text{ kg/m}^2$ for patients aged > 70 years), or low FFM index ($< 17 \text{ kg/m}^2$ in men and $< 15 \text{ kg/m}^2$ in women).

Clinical context of application of nutritional screening tools

The nutritional risk assessment scales or scores used in the included studies were classified according to the context of application and divided into acute, post-acute (outpatient) and rehabilitation/home, respectively described in 17 (56.7%), 8 (26.7%) and 5 (16.6%) studies.

In the hospital context, in which patients are mainly affected by stroke in the acute phase, the most frequently used screening tool was the GNRI, used in three studies [29, 33, 41] accounting for 33.1% of the total sample of patients analyzed, followed by the MUST (two studies [30, 42], 17.9%), the CONUT (two studies [30, 31], 11.2%), NRS 2002 (two studies [18, 31], 10.7%) and MNA (three studies [36, 42, 48], 4.8%).

In the post-acute phase, the most frequently used screening tools were the CONUT, used in a single study [46] accounting for 8.4% of the total sample of patients analyzed, followed by the GNRI (two studies [35, 46], 6.4%), the NRS 2002 used in a single study [46] (3.7%), the MUST used in a single study [46] (3.1%), the SNAQ⁶⁵⁺ and the MNA used in a single study [47].

Finally, in the context of rehabilitation/home, the nutritional screening tools identified were the MNA-SF used in two studies [37, 39] accounting for 8% of the total sample analyzed, the MRST-H used in one study [45]

(5.66%), and the MNA, used in three studies [36, 37, 44] (2.6%) (Table 1).

Screening tools, clinical outcomes and clinical context

In the acute phase of stroke, the following three tools were mostly applied in the hospital context: GNRI, MUST and CONUT. GNRI proved to be valid to detect malnutrition [35, 41] in this population (range 17.2% - 76%), as well as MUST [42, 46] (range 21.5% - 77.6%) and CONUT [29, 31] (range 55% - 56.6%). To support these data, two studies [29, 46] compared the three tools showing a superiority of CONUT over GNRI in a first study [29] (prevalence of malnutrition CONUT score=55% p=0.003; prevalence of malnutrition GNRI score= 37% p=0.218), while in the second one [46] MUST demonstrated significantly superior data compared to the other two tools (prevalence of malnutrition MUST=77,6% p<0.001; prevalence of malnutrition CONUT score=67,2% p=0.007; prevalence of malnutrition GNRI score= 34% p=0.218). Furthermore, in the latter [46] and in other studies [29, 31, 33, 41, 42], the correlation between malnutrition and poor clinical outcomes was measured with the mRS score (Modified Rankin Scale), and also in this correlation CONUT score was better than GNRI score. However, when the analysis included also the MUST [46] scale, the correlation was clearly in favor of the latter [(Pearson r=0.776, p<0.001); (OR 10,096, 95% CI 5,777-17,647, p<0.001); (Predictive Value MUST ≥2 0.771, p<0.001); (Sensitivity and Specificity MUST ≥2 77.6%, 73.29%)]. To support this, MUST scale showed an association between risk of malnutrition and length of hospital stay (RR 1.30 (CI95% 1.07-1.58) p≤ 0.01) [42] and statistically significant relationship with mortality (p<0.0001) and Length of stay (LOS) (p=0.033) [30].

Finally, only one study [35] analyzed the correlation between malnutrition (assessed through GNRI) and hospital discharge, evaluating the association between malnutrition and cognitive impairment measured with PCSI (improvement in post-stroke cognitive impairment) and MMSE (Mini-Mental State Examination). Low GNRI is associated with an increased risk of PSCI (OR, 2.04; 95% CI, 1.00–4.14; p=0.049), and a correlation between low GNRI and MMSE is present (z-scores β=0.04, p=0.03) (Table 1).

In the rehabilitation/home setting, most studies [34, 37, 40, 44-47] used the MNA screening tools (full or short version). The prevalence of malnutrition was between 22,3% and 96,7%. It was not possible to compare these data with those of other screening tools, except in one study [47], in which MNA was compared with the SNAQ⁶⁵⁺ tool, demonstrating a greater ability of MNA to identify patients at risk. To support this, the study by Kim et al.³⁴ found that MNA, applied in patients suffering from chronic stroke, showed sensitivity 100%, specificity 33.3%, positive predictive power 81.2%, and negative predictive power 100%. Furthermore, when MNA was compared with the MNA-SF version, it proved to be superior, in particular when correlated with quality of life (QoL) measured with the WHOQOL-BREF [36] instrument (WHO Quality of Life-BREF) (rho=0.30, p=0.005). These data were confirmed by a second study [37] ($r^2=0.104$; p=0.008), which also evaluated the reliability of the instrument through test-retest (ICC 0.91, [CI95% 0.85-8.94], minimal detectable change was 2.1 and 8.2%).

MNA also demonstrated a strong association towards functional outcomes [44] such as MBI score (Modified Barthel Index Score) (r=0.527, p<0.001) and MAS score (Motor Assessment Scale) (r=0.476, p=0.007), ADL (Activities of Daily Living) [36] (rho=0.24, p=0.029) and functional outcomes at discharge [40] (Table 1).

Beginning of Table 1

Characteristics of the studies and correlation between nutritional screening tools, clinical setting and clinical outcomes

Study	Study design	Sample	Setting	Malnutrition screening tools	Intervention and clinical outcomes	Results	Clinical Outcomes	Screening tool identified (when compared)
Akimoto et al. (2021) [29]	Cross-sectional retrospective study	218 Hospitalized patients aged ≥ 65 years	Acute care	CONUT GNRI	Comparison between GNRI and CONUT scores to identify prevalence of malnutrition and poor outcomes during Hospitalization (mRS scale ≥ 3)	The CONUT score demonstrated greater ability than the GNRI score to identify the prevalence of malnutrition and poor outcomes (mRS scale ≥ 3)	CONUT SCORE - Prevalence of malnutrition risk: 55% ($p = 0.003$); - Association with poor outcomes (mRS ≥ 3) and malnourished patients was 69% ($p = 0.003$) GNRI SCORE - Prevalence of malnutrition risk 37% ($p = 0.218$) - Association with poor outcomes (mRS ≥ 3) and malnourished patients was 42% ($p = 0.218$)	CONUT
Zhang et al. (2021) [46]	Multi-centre cohort study	593	Post-discharge	NRS 2002 CONUT MUST GNRI* ESPEN DCM *(patients aged ≥ 65 years)	Comparison between NRS 2002, CONUT, MUST, GNRI, ESPEN DCM to identify the correlation between malnutrition and poor outcomes after hospitalization (mRS scale) at 3 months. The sensitivity and specificity of the various tools was also assessed.	MUST and NRS 2002 tools demonstrated greater ability to identify poor outcomes after hospitalization (mRS scale) at 3 months and demonstrated greater sensitivity / specificity values	NRS 2002 - Association between malnutrition and poor outcomes (mRS ≥ 3) was 23,8% ($p<0.001$), OR 4.404, [95%CI 2.279-8.511]; ($p<0.001$); Predictive Value NRS ≥ 3 0.671 ($p<0.001$); Sensitivity and Specificity NRS ≥ 3 (68.8%, 61.32%) CONUT - Association with poor outcomes (mRS ≥ 3) and malnourished patients: CONUT score 2-4: 52% ($p=0.07$); OR 1.863 [95%CI 1.082-3.207] $p =0.025$; CONUT score 5-12: 15,2% ($p=0.07$), OR 2.537, [95%CI 1.107-5.814] $p=0.028$; Predictive Value 0.584 ($p=0.004$); Sensitivity and Specificity CONUT score ≥ 3 and mRS: (45.6%, 68.59%)	MUST

Continuation of Table 1

Characteristics of the studies and correlation between nutritional screening tools, clinical setting and clinical outcomes

Study	Study design	Sample	Setting	Malnutrition screening tools	Intervention and clinical outcomes	Results	Clinical Outcomes	Screening tool identified (when compared)
							<p>MUST</p> <p>- Association between malnutrition and poor outcomes ($mRS \geq 3$) was 77,6% ($p<0.001$); OR 10.096 [95%CI 5.777-17.647] $p<0.001$; Predictive Value MUST ≥ 2 0.771 ($p=<0.001$); Sensibility and Specificity MUST ≥ 2 (77.6%, 73.29%)</p> <p>GNRI</p> <p>- Association between malnutrition and poor outcomes ($mRS \geq 3$) was 34% ($p = 0.218$), OR 2.553[95%CI 1.415-4.606] $p=0.002$; Predictive Value GNRI ≤ 92 0.583 ($p=0.017$); Sensibility and Specificity GNRI ≤ 92 (44.57%, 70.52%)</p> <p>-</p> <p>ESPEN DCM</p> <p>- Association between poor outcomes ($mRS \geq 3$) and malnourished patients was 23,2% ($p<0.001$) OR 3.045 [95%CI 1.640-5.654] $p <0.001$; Predictive Value 0.569 ($p<0.001$); Sensibility and Specificity (23.2%, 90.6%)</p>	

Continuation of Table 1

Characteristics of the studies and correlation between nutritional screening tools, clinical setting and clinical outcomes

Study	Study design	Sample	Setting	Malnutrition screening tools	Intervention and clinical outcomes	Results	Clinical Outcomes	Screening tool identified (when compared)
Tsutsumi-uchi et al. (2021) [43]	Retro-spective cohort study	90	Acute care	MNA-SF	Investigated prevalence and the relationship between malnutrition risk on admission (MNA-SF) and improvement in post-stroke cognitive Impairment (PSCI) with MMSE score	Most patients with PSCI were mal-nourished; malnutrition on admission for rehabilitation was associated with poor MMSE score and poor outcomes identified with mRS score	Prevalence of malnutrition risk was 75,6% (p < 0.001) Correlation* between malnutrition and PCSI: r=0.607 Correlation* between malnutrition and MMSE: r=0.497 Prevalence between malnutrition and poor outcomes (mRS ≥ 3) was 86,7% (p< 0.001), correlation* r= -0.444 (*Spearman's correlation coefficient)	//////////
Nozoe et al. (2021) [40]	Cross Sectional study	115	Acute care	Criteria GLIM and ESPEN	Investigated prevalence of malnutrition with GLIM criteria and ESPEN criteria and functional outcome at discharge (FIM-M score)	GLIM criteria have been shown to detect the prevalence of malnutrition more than the ESPEN criteria and demonstrate a greater association with poor functional outcomes at discharge	GLIM CRITERIA - Prevalence of malnutrition was 28.7% (p<0.001) - Association between malnutrition and FIM-M score at discharge was b= -0.238, (p<0.01) ESPEN CRITERIA - Prevalence of malnutrition was 16.5% (p<0.001) - Association between malnutrition and FIM-M score at discharge was b= -0.118, (p=0.04).	GLIM criteria

Continuation of Table 1

Characteristics of the studies and correlation between nutritional screening tools, clinical setting and clinical outcomes

Study	Study design	Sample	Setting	Malnutrition screening tools	Intervention and clinical outcomes	Results	Clinical Outcomes	Screening tool identified (when compared)
Lee and Chiu (2021) [36]	Cross Sectional study	82	Rehabilitation/ home	MNA MNA-SF	Investigated the relationship between malnutrition and complete ADL function (including Barthel index and Frenchay's activity index and the WHOQOL-BREF	The nutritional status measured with MNA-SF and MNA was significantly correlated with the comprehensive ADL function, but only MNA full version was associated with WHOQOL-BREF	MNA - Mean score 25.3 (well-nourished) - Association between MNA and the comprehensive ADL function: rho=0.24, (p=0.029) - Association between MNA and the WHOQOL-BREF: rho=0.30, (p=0.005) MNA-SF - Association between nutritional status and comprehensive ADL function was rho=0.27, (p=0.013) (no association between MNA-SF and WHOQOL-BREF)	MNA
Lee et al. (2021) [35]	Cohort study	344	Acute and post-discharge care	GNRI	Investigated prevalence of malnutrition risk with GNRI score and PSCI score at 3 months after stroke with MMSE score (Korean version)	A low GNRI was independently associated with the development of PSCI at 3 months and also significantly associated with the z-scores from MMSE	Prevalence of malnutrition risk 17,2% (p=0.003) Association between low GNRI and increased risk of the development of PSCI was OR, 2.04 [95% CI, 1.00–4.14] p=0.049 Correlation between low GNRI and MMSE (z-scores) was β=0.04 (p=0.03)	//////////

Continuation of Table 1

Characteristics of the studies and correlation between nutritional screening tools, clinical setting and clinical outcomes

Study	Study design	Sample	Setting	Malnutrition screening tools	Intervention and clinical outcomes	Results	Clinical Outcomes	Screening tool identified (when compared)
Wong et al. (2020) [45]	Multi-centre cross-sectional study	398	Rehabilitation/ home	Malnutrition Risk Screening Tool-Hospital (MRST-H)	Investigated the prevalence and predictors of malnutrition risk among post-stroke patients	40% of patients were classified as high-risk for Malnutrition. Tube feeding, loss of appetite, wheelchair-bound and BMI were found to be significant predictors of malnutrition risk	Prevalence of malnutrition risk was 40% Comparison of clinical profiles and nutrition-related issues with high-risk malnutrition tube feeding (OR: 13.16, 95%CI: 3.22–53.77), loss of appetite (OR: 8.15, 95% CI: 4.71–14.12), wheelchair-bound (OR: 2.23, 95% CI: 1.22–4.09) and BMI (AOR: 0.87, 95% CI: 0.82–0.93) p<0,001	//////////
Nishioka et al. (2020) [40]	Retrospective cohort study	334 (489 total)	Rehabilitation	MNA-SF	Investigated the prevalence of malnutrition and functional (FIM score)	High prevalence of malnutrition risk. Malnourished patients had a significantly lower FIM total score	Prevalence of malnutrition risk was 96,7% (p < 0.001) Association between malnutrition and FIM score was: lower FIM total associated with malnutrition p<0.001 and malnutrition significantly predicted the FIM at discharge (standardized partial regression coefficient, –0.15; partial regression coefficient, –8.9; 95% confidence interval = –20.3 to 2.5; p=0.13)	//////////
Kang et al. (2020) [33]	Cohort study	1906	Acute care	GNRI	Investigated the prevalence of malnutrition risk and correlation between malnutrition and poor outcomes after hospitalization (mRS scale) at 3 months.	The increased risk of premorbid under-nutrition was associated with an increased risk of unfavourable outcome.	Prevalence of malnutrition risk: 27,7% (p=<.0001); Association between malnutrition and poor outcomes (mRS ≥ 3): OR 1.492 [95%CI 1.386–1.607] p=<.0001	//////////

Continuation of Table 1

Characteristics of the studies and correlation between nutritional screening tools, clinical setting and clinical outcomes

Study	Study design	Sample	Setting	Malnutrition screening tools	Intervention and clinical outcomes	Results	Clinical Outcomes	Screening tool identified (when compared)
Cai et al. (2020) [31]	Multi-centre cross-sectional study	572	Acute care	NRS-2002 CONUT	Investigated the prevalence of malnutrition risk and correlation between malnutrition and poor outcomes after hospitalization (mRS scale) at 3 months.	CONUT demonstrated better efficacy in detecting malnutrition than NRS-2002. CONUT and NRS-2002 demonstrate a good ability to predict poor outcomes at discharge	NRS 2002 - Prevalence of malnutrition risk 45,8% (p<0.001) - Association between malnutrition and poor outcomes (mRS≥3): OR 3.337 [IC 95% 2.184–5.098] p<0.001 CONUT - Prevalence of malnutrition risk: 56,6% (p < 0.001) - Association between malnutrition and poor outcomes (mRS ≥ 3): Low risk OR [IC95% 1.608 1.038–2.490] p=0.033; Moderate to severe risk OR 2.398 [IC95% 1.264–4.55] p=0.007	CONUT
Weun et al. (2019) [44]	Cohort study	45	Rehabilitation	MNA	Investigated the prevalence of malnutrition risk and correlation between malnutrition and functional outcomes (MBI and MAS scores)	High prevalence of malnutrition and correlation to MNA and MBI/MAS scores	Malnourished patients were 24.4% and prevalence of malnutrition risk was 66.7% Correlation between malnutrition and MBI and MAS: MBI r=0.527 (p=0.000); MAS r=0.476 (p=0.007)* (*Pearson's correlation)	//////////
Sremankova et al. (2019) [42]	Cohort Study	1101	Acute care	MUST	Investigated the prevalence of malnutrition risk and correlation between	High prevalence of malnutrition risk. Malnutrition was associated with LOS	Prevalence of malnutrition risk: 21.5% (p=<0.001); Association between malnutrition and poor outcomes (mRS≥3) at admission and	//////////

Continuation of Table 1

Characteristics of the studies and correlation between nutritional screening tools, clinical setting and clinical outcomes

Study	Study design	Sample	Setting	Malnutrition screening tools	Intervention and clinical outcomes	Results	Clinical Outcomes	Screening tool identified (when compared)
					malnutrition and LOS and clinical outcomes		at discharge was increased in patients at risk of malnutrition (data not available) Association between risk of malnutrition and length of hospital stay: RR 1.30 [IC95% 1.07-1.58] p≤0.01.	
Sato et al. (2019) [41]	Retrospective Cross sectional study	205	Acute care	GNRI	Investigated the of malnutrition risk at admission and at discharge correlating with poor outcomes after hospitalization (mRS scale) at discharge	High prevalence of malnutrition during the admission and at discharge. Malnutrition risk was correlated to mRS at the time of discharge.	Prevalence of malnutrition risk: 42% at admission and 76% at discharge (p=<0.001); Correlation between malnutrition and poor outcomes at discharge (mRS≥3): β=-0.16, (p=<0.001);	//////////
Lin et al. (2019) [37]	Cross sectional study	59	Rehabilitation/ home	MNA	Investigated the test-retest reliability of the MNA and association of MNA with quality of life (WHOQOL-BREF score)	MNA is a valid tool for screening the nutritional status of patients with chronic stroke and was positively associated with the WHOQOL-BREF	MNA mean score 25.3 (well-nourished) Test-retest reliability MNA: The ICC for the MNA was 0.91 with [95%CI 0.85–8.94]. The MDC and MDC% for the MNA were 2.1 and 8.2%, respectively. Association between MNA and WHOQOL-BREF r ² =0.104; (p=0.008)	//////////
Cin et al (2019) [47]	Cross sectional study	130*	Post-acute care	MNA SNAQ ⁶⁵⁺	Investigated the prevalence of malnutrition risk with MNA and SNAQ ⁶⁵⁺ and testing	MNA found a higher prevalence of malnutrition risk	MNA - Prevalence of malnutrition risk was 22.3% (p=0.365)	MNA

Continuation of Table 1

Characteristics of the studies and correlation between nutritional screening tools, clinical setting and clinical outcomes

Study	Study design	Sample	Setting	Malnutrition screening tools	Intervention and clinical outcomes	Results	Clinical Outcomes	Screening tool identified (when compared)
		*(patients aged ≥ 65 years)			the sensibility and specificity of SNAQ ⁶⁵⁺	compared to SNAQ ⁶⁵⁺ scale SNAQ ⁶⁵⁺ can be used to screen for malnutrition in elderly patients with Stroke	SNAQ ⁶⁵⁺ - Prevalence of malnutrition risk was 18.4% (p=0.070) - Correlation between SNAQ ⁶⁵⁺ and MNA scores (p=0.000). 96% sensitivity, and 68.9% specificity	
Hsieh, et al. (2017) [32]	Cross sectional study	231	Acute care	MNA	Investigated the prevalence of malnutrition and the risk of malnutrition correlating with poor outcomes during the acute phase of hospitalization (mRS scale)	High prevalence of malnourished patients or at risk of malnutrition. Malnutrition was correlated to mRS ≥ 3	Malnourished patients were 12.1% and prevalence of malnutrition risk was 54.1% Prevalence of malnourished patients with mRS ≥ 3 : 52.8% (p<0.001) in malnutrition risk group and 100% (p<0.001) in malnourished group.	//////////
Kampman et al. (2015) [22]	Cross sectional study	185	Acute care	NRS 2002	Evaluated a prevalence of malnutrition	High prevalence of malnourished patients	Prevalence of malnutrition risk (NRS score ≥ 3) days 0-7, 24.6%	//////////
Mosselman, et al. (2013) [38]	Cross sectional study	73	Acute care	MNA	Evaluated a prevalence of malnutrition during hospital stay and after 10 days	The prevalence of malnutrition and risk of malnutrition in patients with acute stroke increases strongly during the first 10 days of admission.	Malnourished patients were 5% and prevalence of malnutrition risk was 14% Malnourished patients (10 days later) were 26% and prevalence of malnutrition risk was 39%	//////////

End of Table 1

Characteristics of the studies and correlation between nutritional screening tools, clinical setting and clinical outcomes

Study	Study design	Sample	Setting	Malnutrition screening tools	Intervention and clinical outcomes	Results	Clinical Outcomes	Screening tool identified (when compared)
Kim et al. (2013) [34]	Cross-sectional study	35	Rehabilitation/ home	MNA	Evaluated a prevalence of malnutrition during hospital stay	High prevalence of malnutrition and risk of malnutrition	Malnourished patients were 54.3% and prevalence of malnutrition risk was 37.1% Sensitivity 100%, specificity 33.3%, positive predictive power 81.2%, and negative predictive power 100%.	//////////
Aubrey et al. (2013) [30]	Cross-Sectional study	158	Acute care	MUST GST	Evaluated MUST and GST to identify clinical outcomes in stroke patients	MUST and GST are valuable tools for identifying LOS and mortality. GST also identified outcomes at discharge	MUST - Significant relationship with mortality ($p=0.000$) and LOS ($p=0.033$) GST - Significant relationship with mortality ($p=0.000$), LOS ($p=0.021$) and discharge ($p=0.015$) (Complete data not available).	MUST

Legend: CONUT= Controlling Nutritional Status; ESPEN DCM =European Society for Clinical Nutrition and Metabolism criteria;GNRI = Geriatric Nutritional Risk Index; GLIM= Global Leadership Initiative on Malnutrition criteria; GST= Guy's & St. Thomas; MUST= Malnutrition Universal Screening Tool; MNA= Mini-Nutritional Assessment; MNA-SF= Mini-Nutritional Assessment short-form; MNA-SFv2= Mini-Nutritional Assessment short-form version 2; NRS 2002= Nutritional Risk Screening; SNAQ65+= Short Nutritional Assessment Questionnaire; PCSI: improvement in post-stroke cognitive Impairment; mRS= Modified Rankin Scale; FIM= Functional Independence Measure; FIM-M=independence measure motor domain score; MBI=Modified Barthel Index Score; MAS= Motor Assessment Scale; MMSE score: Mini-Mental State Examination; WHOQOL-BREF= WHO Quality of Life-BREF; MMSE; QoL: quality of life ;LOS: length of stay; ADL=Activities of Daily Living.MDC= minimal detectable change.

Discussion. This systematic review aimed to identify which malnutrition risk assessment tools are applicable to post-stroke patients and in which stage of the disease (acute or chronic) and setting of care (hospital, rehabilitation or home) are applicable.

In the hospital setting (acute/post-acute phase), the most widely used screening tools were the Geriatric Nutritional Risk Index (GNRI), the Malnutrition Universal Screening Tool (MUST), and the Controlling Nutritional Status (CONUT). All these tools proved to be applicable to the population under investigation and able to adequately identify the nutritional risk. Considering the clinical outcomes of interest, the MUST scale demonstrated a greater capacity than the other two scores in detecting malnutrition and relevant correlated clinical outcomes such as mortality, length of stay, outcomes at discharge, functional capacity and quality of life. As known in the literature, malnutrition is directly correlated with poor clinical outcomes [3] and our research also investigated whether the different nutritional risk assessment scales correlated with poor clinical outcomes during hospitalization. Also in this evaluation, the MUST scale proved to be superior when compared with the different tools investigated [30, 46], demonstrating a positive correlation with clinical outcomes such as: length of hospital stay (RR 1.30 (CI95% 1.07-1.58) p≤ 0.01), mortality (p=0.000) and LOS (p=0.033) [30]. Moreover, when correlated with functional disability measured with the mRS scale, MUST showed a significant association equal to 77.6% p<0.001, demonstrating sensibility and specificity respectively 77.6% and 73.29% [42]. In support of this tool there is certainly also the rapidity and easiness of administration that make this nutritional risk assessment scale applicable in hospital clinical setting [3].

Differently, in the rehabilitation/home setting our research has identified only one instrument of interest, the Mini Nutritional Assessment (MNA and MNA-SF version). The use of this tool in this population is dictated by the fact that it was created for application in an elderly population and gracefully in a rehabilitation/home context [34, 36, 43]. The study by

Kim et al. [34] showed that MNA, applied in a sample of chronic stroke patients, showed a sensitivity of 100%, a specificity of 33.3%, a positive predictive value of 81.2% and a negative predictive value of 100%; although they demonstrated adequate diagnostic accuracy, these data were obtained from a relatively small sample size (n=35). Furthermore, MNA has been shown to be superior to MNA-SF in detecting the risk of malnutrition and in particular when correlated with clinical outcomes of fundamental importance in a chronic care setting such as quality of life (QoL) assessment measured with the WHOQOL-BREF [36, 37] instrument and in others functional outcomes such as MBI score, MAS[44] score and ADL[36]; This evidence is supported by a study [37], that evaluated the very reliability of the instrument through a test-retest study on a sample of patients with chronic stroke, defining an ICC value of this instrument equal to 0.91.

Conclusions. Since stroke is one of the main causes of death, especially when associated with malnutrition, an assessment of nutritional status in all stages of the disease is important. However, not all tools, especially if they were not developed for this specific population, may be suitable for the early identification of malnutrition.

This systematic review of the literature is the first to evaluate the application of nutritional assessment scales in the post-stroke patient, specifically investigating which tool was most suitable for the different phases of the disease. In our opinion, this factor is of fundamental importance because the various screening tools have been created and validated on specific populations. Our results have not only confirmed what is indicated by the ESPEN, indicating the MUST as the tool to be applied to the patient with stroke in the acute phase of the disease, because this scale has shown not only greater capacity in identifying malnutrition when compared with all the tools investigated, but also a correlation with poor clinical outcomes, such as mortality, LOS and functional disability.

In the chronic phase of stroke, MNA full version has shown not only to be the most widely applied scale in almost all studies in this setting, but from our research we have obtained sufficient data to indicate that this tool can be the reference tool in the chronic stroke patient. Our considerations are supported by several studies, mainly observational and cohort studies that have evaluated adequate patient samples and demonstrating that MNA when compared with other tools has shown greater ability to identify nutritional risk, a characteristic supported by a high sensitivity and predictiveness of this tool which also showed adequate results when applied in a test-retest study. Furthermore, MNA demonstrated a strong correlation with clinical outcomes of relevance for the chronic population investigated, as QoL, functional outcomes and ADL.

This research aims to be a valid resource to researchers and clinicians for the assessment of malnutrition risk in the different phases of post-stroke.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Conflict of interests

The author has no conflict of interest to declare.

References

1. Donkor ES. Stroke in the 21st Century: A Snapshot of the Burden, Epidemiology, and Quality of Life. *Stroke Research and Treatment*. 2018;2018:3238165. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/3238165>
2. Mattioli F. The clinical management and rehabilitation of post stroke aphasia in Italy: evidences from the literature and clinical experience. *Neurological Sciences*. 2019;40(7):1329-1334. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10072-019-03844-0>
3. Burgos R, Bretón I, Cereda E, et al. ESPEN guideline clinical nutrition in neurology. *Clinical Nutrition*. 2018;37(1):354-396. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.09.003>
4. Wafa HA, Wolfe CDA, Emmett E, et al. Burden of Stroke in Europe: Thirty-Year Projections of Incidence, Prevalence, Deaths, and Disability-Adjusted Life Years. *Stroke*. 2020;51(8):2418-2427. DOI: <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.120.029606>
5. Boehme AK, Esenwa C, Elkind MSV. Stroke Risk Factors, Genetics, and Prevention. *Circulation Research*. 2017;120(3):472-495. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308398>
6. GBD DALYs and HALE Collaborators 2017. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 359 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*. 2018;392(10159):1859-1922. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32335-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32335-3)
7. Khedr EM, Abbass MA, Soliman RK, et al. Post-stroke dysphagia: frequency, risk factors, and topographic representation: hospital-based study. *Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery*. 2021;57:23. DOI: <https://doi.org/10.1186/s41983-021-00281-9>
8. Crary MA, Humphrey JL, Carnaby-Mann G, et al. Dysphagia, nutrition, and hydration in ischemic stroke patients at admission and discharge from acute care. *Dysphagia*. 2013;28:69-76. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00455-012-9414-0>
9. Yoo SH, Kim JS, Kwon SU, et al. Undernutrition as a predictor of poor clinical outcomes in acute ischemic stroke patients. *Archives of Neurology*. 2008;65(1):39-43. DOI: <https://doi.org/10.1001/archneurol.2007.12>
10. Brynningsen PK, Damsgaard EMS, Husted SE. Improved nutritional status in elderly patients 6 months after stroke. *Journal of Nutrition, Health and Aging*. 2007;11(1):75-79.
11. Hama S, Kitaoka T, Shigenobu M, et al. Malnutrition and nonthyroidal illness syndrome after stroke. *Metabolism*. 2005;54(6):699-704. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2004.11.016>
12. Dávalos A, Ricart W, González-Huix F, et al. Effect of malnutrition, after acute stroke on clinical outcome. *Stroke*. 1996;27:1028-1032. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.STR.27.6.1028>
13. Davis JP, Wong AA, Schluter PJ, et al. Impact of premorbid undernutrition on outcome in stroke patients. *Stroke*. 2004;35:1930-1934. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000135227.10451.c9>
14. Arsava EM, Aydoğdu İ, Güngör L, et al. Nutritional approach and treatment in patients with stroke, an expert opinion for turkey. *Turkish Journal of Neurology*. 2018;24(3):226-242. DOI: <https://doi.org/10.4274/tnd.92603>

15. Clarke DJ, Forster A. Improving post-stroke recovery: the role of the multidisciplinary health care team. *Journal of Multidisciplinary Healthcare*. 2015;22(8):433-442. DOI: <https://doi.org/10.2147/JMDH.S68764>
16. Kernan WN, Viera AJ, Billinger SA. Primary Care of Adult Patients After Stroke: A Scientific Statement From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2021;52(9):558-571. DOI: <https://doi.org/10.1161/STR.0000000000000382>
17. Gomes F, Hookway C, Weekes CE. Royal college of physicians intercollegiate stroke working party evidence-based guidelines for the nutritional support of patients who have had a stroke. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*. 2014;27(2):107-121. DOI: <https://doi.org/10.1111/jhn.12185>
18. Kampman, MT, Eltoft, A, Johnsen SH, et al. Full Implementation of Screening for Nutritional Risk and Dysphagia in an Acute Stroke Unit: A Clinical Audit. *The Neurohospitalist*. 2015;5(4):205-211. DOI: <https://doi.org/10.1177/1941874415588749>
19. Klempíř J, Šarbochová I, Růžičková, et al. Guidelines for nutritional support in stroke. *Česká a Slovenská neurologie a neurochirurgie*. 2020;83/116(6):667-673. DOI: <https://doi.org/10.48095/ccsnsn2020667>
20. Teasell R, Salbach NM, Foley N, et al. Canadian Stroke Best Practice Recommendations: Rehabilitation, Recovery, and Community Participation following Stroke. Part One: Rehabilitation and Recovery Following Stroke; 6th Edition Update 2019. *International Journal of Stroke*. 2020;15(7):763-788. DOI: <https://doi.org/10.1177/1747493019897843>
21. Wirth R, Smoliner C, Jäger M, et al. Guideline clinical nutrition in patients with stroke. *Experimental and Translational Stroke Medicine*. 2013;5:14. DOI: <https://doi.org/10.1186/2040-7378-5-14>
22. Ray S, Rana P, Rajput M, et al. Rajput and M. Nutritional management of stroke: from current evidence to conjecture. *Nutrition Bulletin*. 2007;32(2):145-153. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2007.00631.x>
23. Sabbouh T, Torbey MT. Malnutrition in Stroke Patients: Risk Factors, Assessment, and Management. *Neurocritical Care*. 2018;29(3):374-384. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12028-017-0436-1>
24. Wang J, Lou B, Xie Y, et al. Evaluation methods on the nutritional status of stroke patients. European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 2014;18:3902-3907.
25. Mancin S, Bertone A, Mazzoleni B, et al. Malnutrition risk as a negative prognostic factor in COVID-19 patients. *Clinical Nutrition ESPEN*. 2021;45:369-373. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2021.07.016>
26. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*. 2021;372:n71. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.n71>
27. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, et al. Reprint – Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *Physical Therapy*. 2009;89(9):873-880.
28. Moola S, Munn Z, Tufanaru C, et al. Systematic reviews of etiology and risk. In book: Joanna Briggs Institute Reviewer's Manual. The Joanna Briggs Institute; 2017. DOI: <https://doi.org/10.46658/JBIRM-17-06>
29. Akimoto T, Hara M, Morita A, et al. Relationship between Nutritional Scales and Prognosis in Elderly Patients after Acute Ischemic Stroke: Comparison of Controlling Nutritional Status Score and Geriatric Nutritional Risk Index. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2021;77(2):116-123. DOI: <https://doi.org/10.1159/000515212>
30. Aubrey VC, Gomes F, Weekes CE. Nutrition screening tools can predict poor outcomes at one month in patients who have had a stroke. *Cerebrovascular Diseases*. 2013;35:171.
31. Cai ZM, Wu YZ, Chen HM, et al. Being at risk of malnutrition predicts poor outcomes at 3 months in acute ischemic stroke patients. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2020;74(5):796-805. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41430-020-0605-8>
32. Hsieh DY, Hung JW, Chang KC, et al. Malnutrition in Acute Stroke Patients Stratified by Stroke Severity- A Hospital Based Study. *Acta Neurologica Taiwanica*. 2017;26(3):120-127.
33. Kang MK, Kim TJ, Kim Y, et al. Geriatric nutritional risk index predicts poor outcomes in patients with acute ischemic stroke - Automated undernutrition screen tool. *PLoS ONE*. 2020;15(2):e0228738. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228738>
34. Kim EJ, Yoon YH, Kim WH, et al. The clinical significance of the mini-nutritional assessment and the scored patient-generated subjective global assessment in elderly patients with stroke. *Annals of Rehabilitation Medicine*. 2013;37(1):66-71. DOI: <https://doi.org/10.5535/arm.2013.37.1.66>

35. Lee M, Lim JS, Kim Y, et al. Association between geriatric nutritional risk index and post-stroke cognitive outcomes. *Nutrients*. 2021;13(6):1776. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu13061776>
36. Lee YC, Chiu EC. Nutritional status as a predictor of comprehensive activities of daily living function and quality of life in patients with stroke. *NeuroRehabilitation*. 2021;48(3):337-343. DOI: <https://doi.org/10.3233/NRE-201540>
37. Lin SC, Lin KH, Lee YC. Test-retest reliability of the Mini Nutritional Assessment and its relationship with quality of life in patients with stroke. *PLoS ONE*. 2019;14(6):e0218749. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218749>
38. Mosselman MJ, Kruitwagen CL, Schuurmans MJ, et al. Malnutrition and risk of malnutrition in patients with stroke: prevalence during hospital stay. *Journal of Neuroscience Nursing*. 2013;45(4):194-204. DOI: <https://doi.org/10.1097/JNN.0b013e31829863cb>
39. Nishioka S, Omagari K, Nishioka E, et al. Concurrent and predictive validity of the Mini Nutritional Assessment Short-Form and the Geriatric Nutritional Risk Index in older stroke rehabilitation patients. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*. 2020;33(1):12-22. DOI: <https://doi.org/10.1111/jhn.12699>
40. Nozoe M, Yamamoto M, Masuya R, et al. Prevalence of Malnutrition Diagnosed with GLIM Criteria and Association with Activities of Daily Living in Patients with Acute Stroke. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2021;30(9):105989. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2021.105989>
41. Sato M, Ido Y, Yoshimura Y, et al. Relationship of Malnutrition During Hospitalization With Functional Recovery and Postdischarge Destination in Elderly Stroke Patients. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2019;28(7):1866-1872. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2019.04.012>
42. Sremanakova J, Burden S, Kama Y, et al. An Observational Cohort Study Investigating Risk of Malnutrition Using the Malnutrition Universal Screening Tool in Patients with Stroke. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2019;28(12):104405. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2019.104405>
43. Tsutsumiuchi K, Wakabayashi H, Maeda K, et al. Impact of malnutrition on post-stroke cognitive impairment in convalescent rehabilitation ward inpatients. *European Geriatric Medicine*. 2021;12(1):167-174. DOI: <https://doi.org/10.1007/s41999-020-00393-0>
44. Weun CC, Hasnan N, Latif LA, et al. Nutritional status of post-acute stroke patients during rehabilitation phase in hospital. *Sains Malaysiana*. 2019;48(1):129-135. DOI: <http://dx.doi.org/10.17576/jsm-2019-4801-15>
45. Wong HJ, Harith S, Lua PL, et al. Prevalence and predictors of malnutrition risk among post-stroke patients in outpatient setting: A cross-sectional study. *Malaysian Journal of Medical Sciences*. 2020;27(4):72-84. DOI: <https://doi.org/10.21315/mjms2020.27.4.7>
46. Zhang M, Ye SL, Huang XR, et al. Comparing the prognostic significance of nutritional screening tools and ESPEN-DCM on 3-month and 12-month outcomes in stroke patients. *Clinical Nutrition*. 2021;40(5):3346-3353. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.11.001>
47. Cin A, Boyraz S, Ozturk V, et al. Malnutrition in old patients with stroke. *Turkish Journal of Cerebrovascular Diseases*. 2019;25(3):155-163. DOI: <https://doi.org/10.5505/tbdhd.2019.12599>

Received 10 February 2023

Revised 25 March 2023

Accepted 10 April 2023

Information about the authors

Stefano Mancin, RN, MSc, PhD Student, Department of Biomedicine and Prevention, Tor Vergata University of Rome, Rome; Nutritionist at the Cancer Center, Clinical Nutrition Unit, Humanitas Research Hospital, Rozzano (Milan); Adjunct Professor of Nursing at the Department of Biomedical Sciences, Humanitas University, Milan, Italy, E-mail: stefano.mancin@humanitas.it, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4988-4391>.

Marco E. Sguanci, RN, PhD, Research Fellow at the Department of Medicine and Surgery, Research Unit of Nursing Science, Campus Bio-Medico University of Rome, Rome, Italy, E-mail: sguancim@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8845-5127>.

Francesco Reggiani, MD at the Nephrology and Dialysis Unit, Humanitas Research Hospital, Rozzano (Milan); Associate Professor, Research Fellow at the Department of Biomedical Sciences,

Humanitas University, Milan, Italy, E-mail: francesco.reggiani@hunimed.eu, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9254-618X>.

Francesca Vecchio, RN, Registered Nurse at the Cancer Center, Oncology Unit, Humanitas Research Hospital, Rozzano (Milan), Italy, E-mail: francesca.vecchio@humanitas.it, ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-2540-1332>.

Michela Piredda, RN, MSc, PhD Nursing, Associate Professor of Nursing at the Department of Medicine and Surgery, Research Unit of Nursing

Science, Campus Bio-Medico University of Rome; Associate Professor of Nursing at the Campus Bio-Medico University Hospital Foundation, Rome, Italy, E-mail: m.piredda@unicampus.it, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5998-476X>.

Maria G. De Marinis, RN, MEd, Full Professor of Nursing at the Department of Medicine and Surgery, Research Unit of Nursing Science, Campus Bio-Medico University of Rome; Head of Research Unit Nursing Palliative Care, Campus Bio-Medico University Hospital Foundation, Rome, Italy, E-mail: m.demarinis@policlinicocampus.it, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7039-6280>.



DOI: 10.18413/2658-6533-2023-9-4-0-9

УДК 618-019

Comorbidity and syntropy of benign proliferative diseases of the female reproductive system: non-genetic, genetic, and epigenetic factors (review)

Marina S. Ponomarenko , Evgeny A. Reshetnikov , Maria M. Churnosova , Yuliya N. Reshetnikova , Vladimir I. Churnosov , Irina V. Ponomarenko

Belgorod State National Research University,
85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia

Corresponding author: Marina S. Ponomarenko (ponomarenkomc@yandex.ru)

Abstract

Background: Benign proliferative diseases of the female reproductive system (endometriosis, endometrial hyperplasia, and uterine leiomyoma) are comorbid and often occur together. **The aim of the study:** To establish common risk factors for the development of benign proliferative diseases of the female reproductive system (endometriosis, endometrial hyperplasia, and uterine leiomyoma). **Materials and methods:** The review includes up-to-date data from articles found in PubMed and EliLibrary on this topic. **Results:** The article reviews the recent literature about factors determining comorbidity and syntropy of the diseases. Their comorbidity may be based on common environmental risk factors (early menarche, body mass index, induced abortions, etc.) and mechanisms of the pathogenesis, which include hormone-dependent cellular proliferation associated with the action of sex hormones and hormone-independent cellular proliferation processes stimulated by growth factors and cytokines, apoptosis, and pathological neoangiogenesis, etc. These common mechanisms are backed by syntropic genes (e.g., *FSHB*, *COMT*). Syntropy and pleiotropy appear to be closely related: syntropic genes manifest pleiotropic effects too. Also, epigenetic factors, such as miRNAs are important determinants of the diseased phenotypes. **Conclusion:** Identification of the shared factors contributing to the benign proliferative diseases of the female reproductive system helps to determine targets for therapeutic intervention and efficient control of the comorbidity.

Keywords: uterine leiomyoma; endometriosis; endometrial hyperplasia; comorbidity; syntropy

For citation: Ponomarenko MS, Reshetnikov EA, Churnosova MM, et al. Comorbidity and syntropy of benign proliferative diseases of the female reproductive system: non-genetic, genetic, and epigenetic factors (review). Research Results in Biomedicine. 2023;9(4):544-556. DOI: 10.18413/2658-6533-2023-9-4-0-9

Introduction. Benign proliferative diseases of the female reproductive system – endometriosis, endometrial hyperplasia, and uterine leiomyoma, prevail in the structure of the overall gynecological morbidity [1, 2, 3]. Uterine leiomyoma (UL), commonly known as

fibroids, is a benign tumor of the smooth muscle in the uterus [1, 4]. About 30 percent of reproductive-age women are diagnosed with UL, which is considered as a major factor of gynecologic morbidity, one of the primary causes of hospitalizations for gynecological disorders, and the most frequent reason for hysterectomy

in the USA [1]. Endometriosis (EM) is a condition when endometrial tissue proliferates in ectopic locations, such as the pelvic peritoneum, ovaries, and rectovaginal septum [3, 5]. Endometriosis is diagnosed in 6-10% of women of reproductive age and in 20-50% of infertile women [5, 6]. Endometrial hyperplasia (EH) is defined as excessive growth and thickening of the endometrium. This process increases the glands/stroma ratio [7, 8]. In the structure of gynecological morbidity in women of reproductive age, EH possesses a significant segment. In developed countries, there are an estimated 200,000 new cases of EH per annum [2].

Benign proliferative diseases of the female reproductive system are comorbid and quite commonly occur together [9-12]. Nezhat et al. [9] reported the co-occurrence of uterine leiomyoma and endometriosis in 87.1% of women who underwent laparoscopic myomectomy/hysterectomy for symptomatic uterine leiomyoma. Simple endometrial hyperplasia occurs in 22.7% of patients with uterine leiomyoma [10]. Among patients with endometrial hyperplasia, uterine fibroid occurs in 51.54% and endometriosis in 35.19% [11], with uterine fibroid occurring in 52.40% and endometrial hyperplasia in 46.33% of patients with endometriosis [12].

The aim of the study. To establish common risk factors for the development of benign proliferative diseases of the female reproductive system (endometriosis, endometrial hyperplasia, and uterine leiomyoma).

Materials and methods: The review includes up-to-date data from articles found in PubMed and Elibrary on this topic.

Results and Discussion. One of the causes for comorbidity of the above benign proliferative diseases may be common environmental and/or endogenous risk factors. Risk factors for UL are endogenous hormones, early menarche or late menopause, obesity, induced abortions, family history, genetic factors, polycystic ovary syndrome, age, ethnicity, oral contraceptives, lifestyle, diet, and others (Fig. 1, 2, 3) [1, 4, 13, 14, 15].

The continuous overstimulation of the endometrium by estrogen was recognized among the primary factors of the EH pathophysiology [8]. The other EH risk factors are

quite diverse and include early menarche or late menopause, overweight, diabetes mellitus, infertility, hypertension, family history, genetic factors, induced abortions, chronic anovulation, polycystic ovary syndrome, tamoxifen therapy, estrogen hormone replacement therapy, postmenopausal status, and others [2, 7, 8, 11].

Endometriosis was associated with body weight, age at menarche, duration of menstrual discharge and menstrual cycle, reproductive factors, family history, genetic factors, induced abortions, diet, and others [3, 5, 6, 12, 16, 17, 18].

In general, it appears that factors affecting the level of endogenous estrogen (early menarche, body mass index, and others), family history, genetic factors, induced abortions, etc., are shared factors for the risk of benign proliferative disorders of the female reproductive system (uterine leiomyoma, endometriosis, and endometrial hyperplasia) and can determine their comorbidity.

At the same time, benign proliferative diseases of the female reproductive system, along with common risk factors, have common pathogenetic mechanisms of development: hormone-dependent cellular proliferation associated with the action of sex hormones (absolute, relative and local hyperestrogenism); hormone-independent cellular proliferation processes, stimulated by growth factors and cytokines, and causing uncontrolled cellular proliferation, apoptosis, and pathological neangiogenesis; processes involving pro- and anti-inflammatory cytokines caused by genital infections, invasive intrauterine interventions; immune disorders associated with immunological resistance, etc. [1-4, 7, 8].

Age at menarche has been suggested as a risk factor for UL, EH, and EM [1, 2, 7, 18]. Women with early onset of menarche have, on average, a longer period of menstruations in their life and thus a greater overall exposure to estrogens, which may induce the growth of UL and promote EH [1, 7]. Cell division rate in the myometrium is highest during the luteal phase of the menstrual cycle, therefore, a longer history of cycling may increase the risk of UL [1]. Continuing exposure to estrogens in the absence of progesterone seems to promote the development of EH [2].

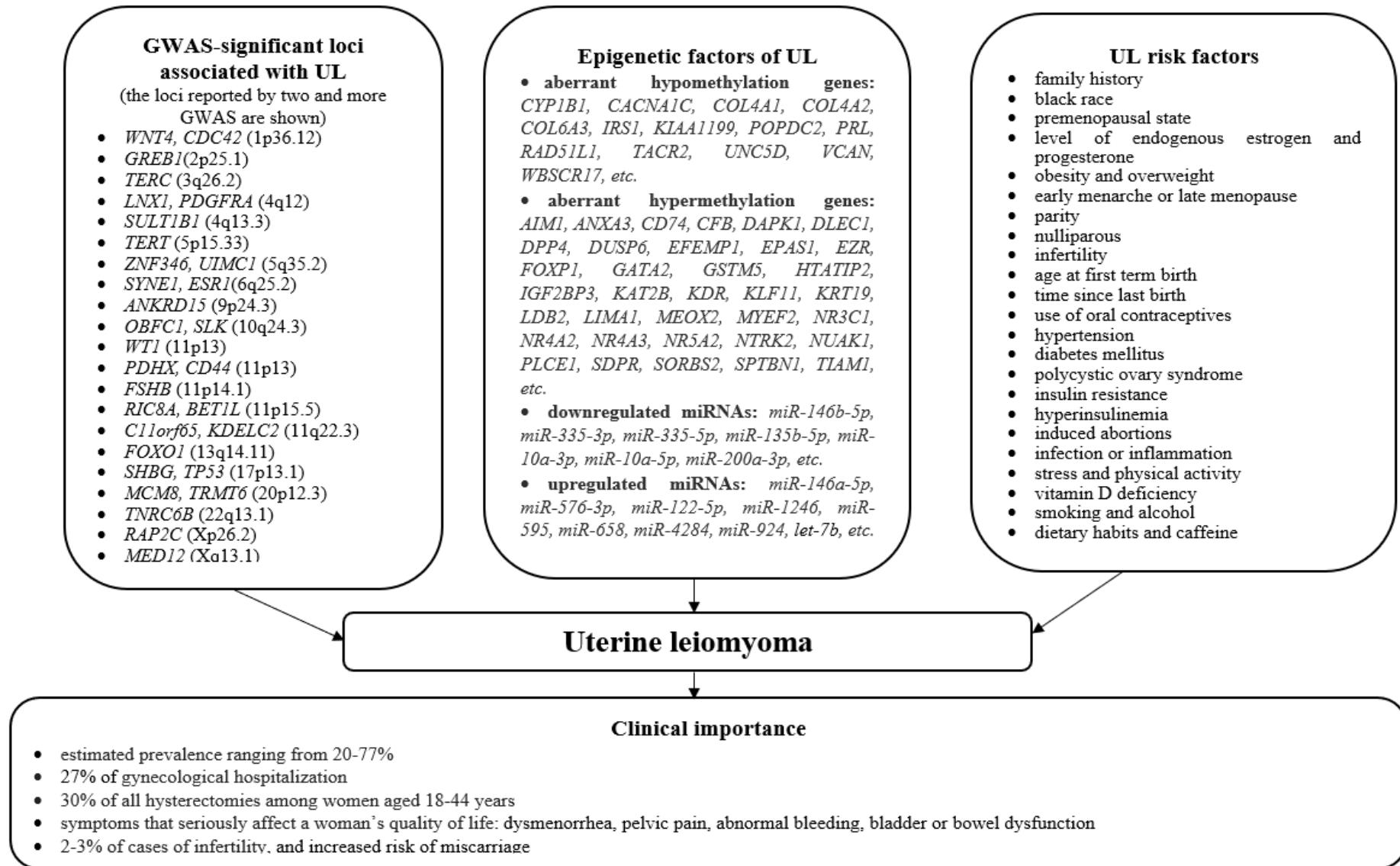


Fig. 1. Risk factors (environmental, genetic and epigenetic) and clinical importance of UL

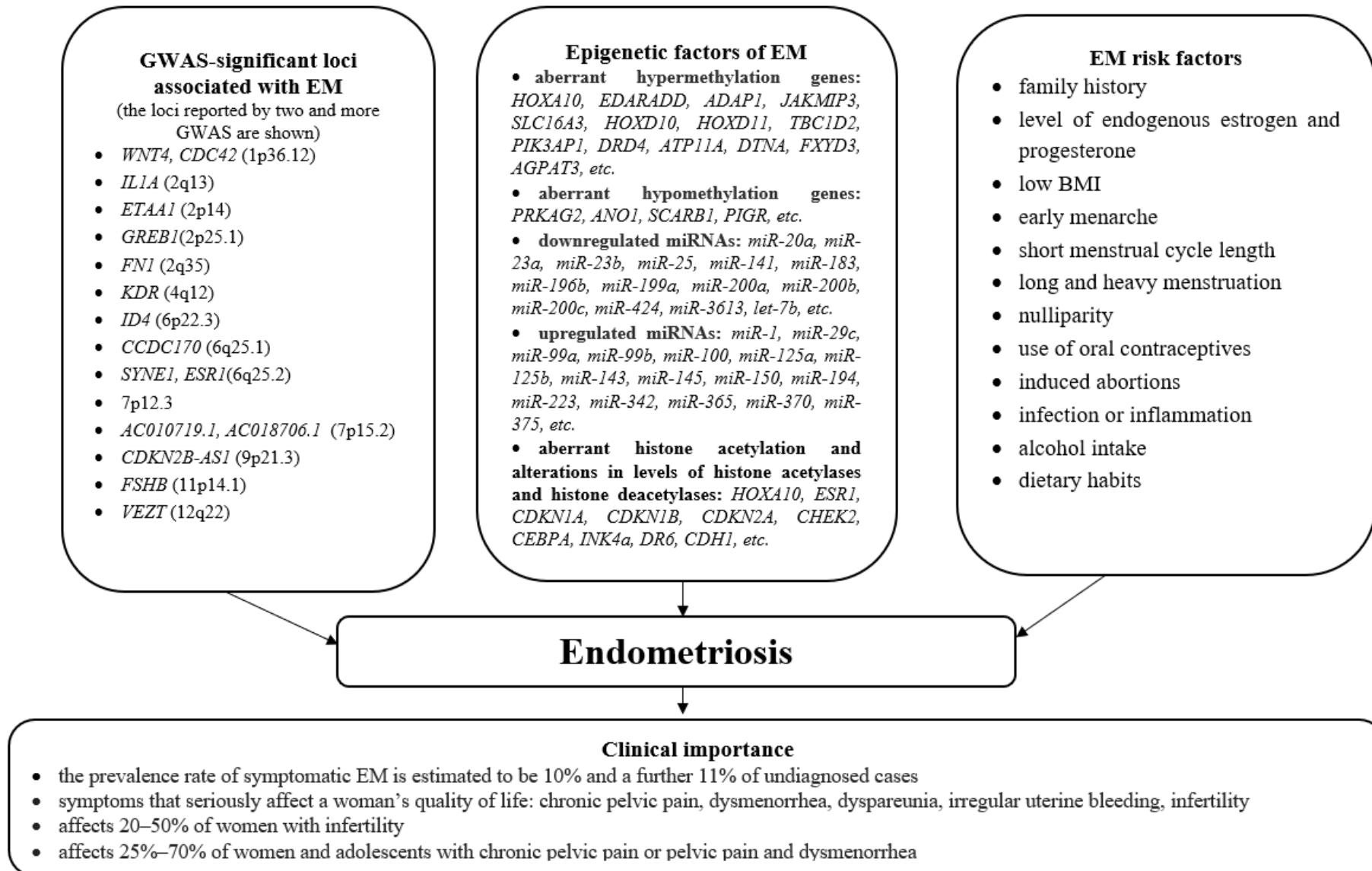


Fig. 2. Risk factors (environmental, genetic and epigenetic) and clinical importance of EM

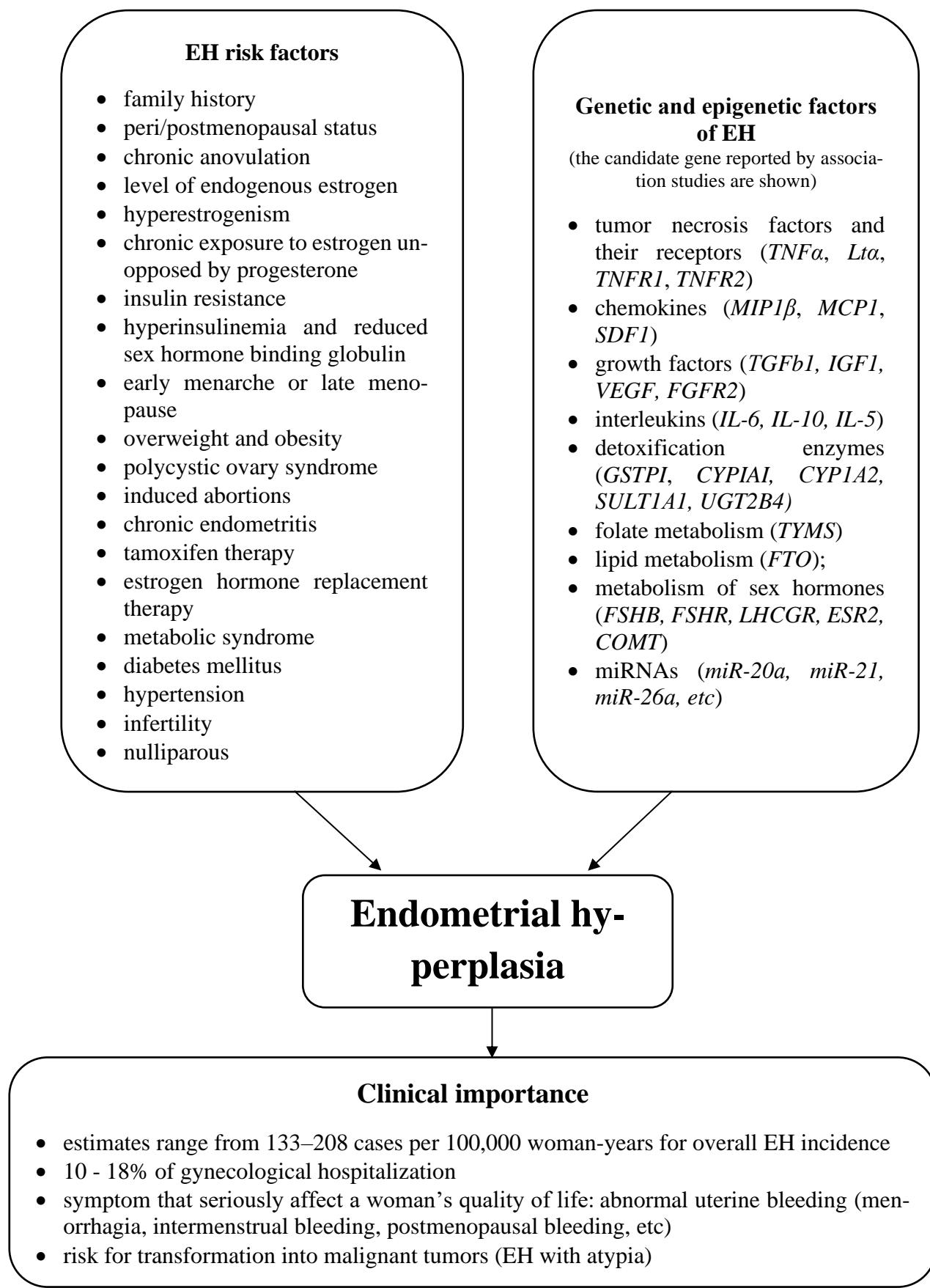


Fig. 3. Risk factors (environmental, genetic and epigenetic) and clinical importance of EH

Likewise, an increased lifelong exposure to menstruation due to early menarche may also increase the risk of EM [18]. The relationship between age at menarche and the proliferative benign diseases is further supported by that candidate genes for age at menarche were associated with EH and EM [11, 12, 19].

Age at menopause has also been suggested to affect the risk of UL and EH [1, 2, 7]. Late menopause has a similar effect to early menarche: it extends a lifelong exposure to estrogens, which may promote the growth of UL and promote EH [1, 7].

One more risk factor for UL and EH is obesity/overweight/high body mass index [1, 2, 7, 8, 14, 15]. A direct correlation between BMI and UL was reported: the risk increased by 20% per each 10 kg of weight gain [14]. Obese women ($BMI > 30 \text{ kg/m}^2$) showed a nearly 4-fold increase in the incidence of atypical EH, as compared to non-obese ones. Furthermore, women with BMI of 40 kg/m^2 had a 13-fold higher risk of atypical EH and a 23-fold increased risk of non-atypical EH as compared to the women with normal BMI [8]. This relationship can be explained by that androgens produced by the adrenal glands and ovaries are converted into estrogens in the fat tissue. Excessive fat promotes the development of insulin resistance and reduced synthesis of globulin, which binds sex hormones [8]. As a result, obese women have a higher level of free circulating estrogens that can promote the development of UL and EH. Besides, hyperinsulinemia, one of the main elements of the metabolic syndrome, is associated with higher serum levels of the insulin-like growth factor-1 and epidermal growth factor [20], which, in turn, induce secretion of estrogen in ovaries or promote cell proliferation in the endometrium and myometrium [1, 2].

BMI is a risk factor for EM too, but the effect is opposite to the mentioned above: low BMI increases the risk of EM [5, 17]. The recent meta-analysis reported that the EM risk decreased ($OR=0.67$) per each 5 kg/m^2 BMI gain [17]. One of the possible explanations of these results is that obese women usually have a higher estrogen level that may lead to anovulatory and irregular menses and, respectively, lower chances of the retrograde menstruation [16].

The history of induced abortions significantly increases the risk of UL, EH, and EM [11, 12, 13, 16]. Induced abortions in the first trimester of pregnancy may cause multiple health complications, including polycystic ovary syndrome, hyperprolactinemia, anovulatory menstruation, post-abortion endometritis, and the others [21]. Induced recurring abortions result in injuries of the uterus. Uterine injuries may induce the expression of the growth factor that speed-ups cellular proliferation, suppresses apoptosis, and increases production of the extracellular matrix [1]. The risk for UL, EH, and EM directly correlates with the number of abortions in the anamnesis [11, 12, 13]. A higher number of induced abortions was associated with an increased UL risk (one induced abortion - $OR = 1.32$, two induced abortions - $OR = 1.45$, and ≥ 3 induced abortions - $OR = 1.62$) [13], EH (it increases from $OR=2.00$ in the case of two abortions up to $OR=6.54$ with four and more abortions) [11] and EM (it increases from $OR = 2.05$ in the case of 2 abortions up to $OR = 5.87$ with 4 and more abortions) [12]. Induced abortions may also be associated with other hormone-related diseases (e.g., breast cancer) [22].

Another important risk factor for UL, EH, and EM is a family history of the disease [1-4]. A risk to develop UL is 2.5-fold greater for first-degree relatives of affected women than the population average [23] and the concordance among monozygotic twins is almost twice that of dizygotic twins [15]. Heritability estimates of UL from twin studies vary from 26 to 69% in European populations [15]. Genetic factors are important for the development of EM [3, 6]. Results of twin studies estimate their contribution at 51% [6]. As to the relative contribution of genetic factors to the development of EH, no family or twin studies have been conducted so far and candidate gene association studies were limited [7, 11].

Recent genome-wide studies (GWAS) provided more estimates for genetic factors of the diseases. The current National Genome Research Institute's catalog of GWAS (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>) includes more than 10 studies of EM [e.g., 24-31]. These studies reported more than 20 significant loci associated with EM. Among those, 19 SNPs were estimated to determine 5.19% of the EM variability [30].

Several GWAS of UL were conducted in different ethnic populations, including Japanese, Caucasians of the USA and Australia, and African-American women [e.g., 31-36]. In 2018, two teams presented results of the first GWAS of UL in European populations [33, 34]. Both studies reported somewhat similar results: 21 and 22 GWAS-significant loci for UL, respectively. The contribution of these 21 GWAS-significant SNPs to the UL variability was estimated at 13% [33]. A follow-up GWAS meta-analysis of 35,474 cases and 267,505 controls of European ancestry confirmed 21 previously reported loci and identified eight novel loci for UL [35]. Besides, four loci identified in the meta-analysis were also associated with EM risk: 1p36.12

(*WNT4/CDC42*), 2p25.1 (*GREB1*), 6q25.2 (*ESRI*), 11p14.1 (*FSHB*). A summary of the candidate genes for UL and EM determined by GWAS is given in Table 1.

An epidemiological meta-analysis of 402,868 women suggested at least a two-fold higher risk for UL in patients with a history of EM [35]. It was hypothesized that both UL and EM were underlain by hormone-related factors [33] and thus might have a shared genetic basis [35]. This assumption was supported by the recent findings of syntropic genes for these diseases [33, 35]. In particular, the GWAS of UL in European populations [33] replicated three (*GREB1*, *CDC42/WNT4*, *SYNE1/ESRI*) of the 19 previously reported candidate loci for EM [30].

Table 1

GWAS-significant loci associated with UL and EM

Locus	Genes	References
UL and EM		
1p36.12	<i>WNT4</i> , <i>CDC42</i>	[25,28,30,31,33,34,35]
2p25.1	<i>GREB1</i>	[26,30,31,33,34,35]
6q25.2	<i>SYNE1</i> , <i>ESRI</i>	[30,33,34,35,36]
11p14.1	<i>FSHB</i>	[30,33,35]
EM		
2q13	<i>ILIA</i>	[24,30]
2p14	<i>ETAA1</i>	[26,30]
6p22.3	<i>ID4</i>	[25,26,28,30]
7p15.2	<i>AC010719.1</i> , <i>AC018706.1</i>	[26,27,28,30]
9p21.3	<i>CDKN2B-AS1</i>	[26,29,30]
12q22	<i>VEZT</i>	[25,30]
UL		
3q26.2	<i>TERC</i>	[34,35]
4q12	<i>LNX1</i> , <i>PDGFRA</i>	[33,35]
4q13.3	<i>SULT1B1</i>	[31,33,35]
5p15.33	<i>TERT</i>	[31,33,34,35]
5q35.2	<i>ZNF346</i> , <i>UIMC1</i>	[33,35]
9p24.3	<i>ANKRD15</i>	[33,35,36]
10q24.3	<i>OBFC1</i> , <i>SLK</i>	[31,32,33,34,35,36]
11p15.5	<i>RIC8A</i> , <i>BET1L</i>	[32,33,35]
11p13	<i>WT1</i>	[33,34,35,36]
11p13	<i>PDHX</i> , <i>CD44</i>	[33,34,35]
11q22.3	<i>C11orf65</i> , <i>KDEL</i>	[33,35]
13q14.11	<i>FOXO1</i>	[33,34,35]
17p13.1	<i>SHBG</i> , <i>TP53</i>	[33,34,35,36]
20p12.3	<i>MCM8</i> , <i>TRMT6</i>	[33,35]
22q13.1	<i>TNRC6B</i>	[31,32,33,35,36]
Xp26.2	<i>RAP2C</i>	[31,35]
Xq13.1	<i>MED12</i>	[34,35]

Note: the loci reported by two and more GWAS are shown

A comparison of the biological processes for the EM and UL development (gene expression, gene networks, and epigenetic regulation) revealed their similarities thus suggesting mo-

lecular syntropy of both disorders. The PANTHER overrepresentation test of the biological pathways for the syntropic genes provided further support for this assumption (Table 2).

Table 2
Hierarchical PANTHER Overrepresentation Test results of the syntropic genes for UL and EM (<http://geneontology.org>)

GO biological process complete	Genes	Fold Enrichment	+/-	raw P value	FDR
Mammary gland branching involved in pregnancy	<i>WNT4, ESR1</i>	> 100	+	1.93E-06	1.53E-02
Multicellular organismal reproductive process	<i>WNT4, ESR1, SYNE1, FSHB</i>	16.55	+	3.74E-05	3.13E-02
Multicellular organism reproduction	<i>WNT4, ESR1, SYNE1, FSHB</i>	16.20	+	4.07E-05	2.94E-02
Female pregnancy	<i>WNT4, ESR1, FSHB</i>	55.45	+	1.48E-05	2.14E-02
Multi-organism reproductive process	<i>WNT4, ESR1, SYNE1, FSHB</i>	13.63	+	8.00E-05	4.71E-02
Multi-mitochondrial organism process	<i>WNT4, ESR1, FSHB</i>	47.61	+	2.32E-05	2.31E-02
Branching involved in mammary gland duct morphogenesis	<i>WNT4, ESR1</i>	> 100	+	2.06E-05	2.34E-02
Mammary gland duct morphogenesis	<i>WNT4, ESR1</i>	> 100	+	3.85E-05	3.06E-02
Mammary gland morphogenesis	<i>WNT4, ESR1</i>	> 100	+	7.10E-05	4.51E-02
Gland morphogenesis	<i>WNT4, ESR1, FSHB</i>	> 100	+	2.52E-06	1.00E-02
Developmental process involved in reproduction	<i>WNT4, ESR1, SYNE1, FSHB</i>	14.17	+	6.87E-05	4.55E-02
Positive regulation of steroid biosynthetic process	<i>WNT4, ESR1</i>	> 100	+	1.59E-05	2.11E-02
Positive regulation of steroid metabolic process	<i>WNT4, ESR1</i>	> 100	+	3.63E-05	3.20E-02
Positive regulation of lipid metabolic process	<i>WNT4, ESR1, FSHB</i>	65.57	+	9.04E-06	1.80E-02
Ovulation cycle process	<i>WNT4, ESR1</i>	> 100	+	7.10E-05	4.34E-02
Female gonad development	<i>WNT4, ESR1, FSHB</i>	> 100	+	1.81E-06	2.88E-02
Development of primary female sexual characteristics	<i>WNT4, ESR1, FSHB</i>	> 100	+	2.12E-06	1.12E-02
Female sex differentiation	<i>WNT4, ESR1, FSHB</i>	93.92	+	3.14E-06	9.99E-03
Sex differentiation	<i>WNT4, ESR1, FSHB</i>	38.19	+	4.45E-05	3.08E-02
Development of primary sexual characteristics	<i>WNT4, ESR1, FSHB</i>	46.54	+	2.48E-05	2.32E-02
Gonad development	<i>WNT4, ESR1, FSHB</i>	47.82	+	2.29E-05	2.43E-02
Regulation of morphogenesis of an epithelium	<i>WNT4, ESR1, FSHB</i>	57.28	+	1.35E-05	2.14E-02
Hormone metabolic process	<i>WNT4, ESR1, FSHB</i>	53.19	+	1.68E-05	2.05E-02
Regulation of animal organ morphogenesis	<i>WNT4, ESR1, FSHB</i>	40.10	+	3.85E-05	2.92E-02

No GWAS on EH has been conducted so far. Candidate gene studies reported associations of tumor necrosis factors and their receptors (*TNF α* , *Lta*, *TNFR1*, *TNFR2*), chemokines (*MIP1 β* , *MCP1*, *SDF1*), growth factors (*TGF $b1$* , *IGF1*, *VEGF*, *FGFR2*), interleukins (*IL-6*, *IL-10*, *IL-5*), folate metabolizing and detoxifying enzymes (*TYMS*, *ApoE*, *GSTPI*, *CYP1A1*, *CYP1A2*, *SULT1A1*, *GP-IIIa*), candidate genes for age at menarche, and others [7, 11]. Some of these genes were also associated with EM and UL [3, 37, 38].

The available body of evidence suggests that *FSHB* can be one of the syntropic genes for UL, EH, and EM. The meta-analysis of 11 GWAS reported the region on chromosome 11 (11p14.1, rs74485684) harboring the *FSHB* gene as that associated with EM [30]. This variant was replicated by GWAS of UL in European populations [33]. Several loci associated with EM, including rs11031006 located in 11p14.1 harboring the *FSHB* gene, were reported as candidates for UL in the recent GWAS [35]. Polymorphisms of the *FSHB* gene (rs555621, rs11031010, rs1782507) were also documented for their association with EH [11, 12]. Importantly, rs11031010 *FSHB* associated with EH is located just 1.9 kb from rs74485684 (associated with EM) and linked to rs11031006 ($r^2 = 0.64$) (associated with EM [30] and UL [35] respectively).

There is evidence that some tightly linked polymorphisms of the *FSHB* gene may contribute to various reproductive characters, including the serum level of the follicle-stimulating and luteinizing hormones [39], ages at menarche [40] and menopause [41], BMI of adults [19]. Several SNPs in the 5'-region of *FSHB* were suggested to play a key role in various reproductive processes [42]. Importantly, three alleles of the *FSHB* gene (G of rs555621, A of rs11031010, and A of rs1782507) were associated with later menarche [40] and were suggested as a protective factor for EH [11]. That means the age at menarche and the EH risk may have a shared genetic basis.

The *FSHB* gene encodes a beta-subunit of the follicle-stimulating hormone. This hormone has multiple functions in the female reproductive system, including stimulation of the

follicular granulosa cells proliferation, the rescue of follicles from apoptosis, synthesis of the luteinizing hormone receptors on these cells before ovulation, control of the synthesis of aromatases that convert androgens into estrogens (estradiol), etc. (<http://www.ensembl.org/>).

It seems quite reasonable to hypothesize that, in addition to *FSHB* and other candidate genes for the age at menarche, a syntropic effect for UL, EH, and EM may be manifested by genes contributing to those anthropometric traits, which were shown to increase risks for these diseases (e.g., height, BMI, and the others). For example, an increased BMI was reported to elevate a risk for EH [2, 7, 8] and UL [1, 14, 15], while a lower BMI might increase a risk for EM [5, 17]. Several genetic variants within or near genes *CAB39L*, *GRB14*, *KIFAP3*, and *WNT4* were associated with both EM and the ratio of waist and hip circumference [43]. Several genes (e.g., *FANCL*, *FTO*, *GPRC5B*, *LIN28B*, *MAP2K5*, *TNNI3K*, and the others) were suggested to contribute to some of the above-mentioned phenotypes, such as the age at menarche, height, BMI, and the others [44, etc]. Some of these genes (e.g., *LIN28B*) were also associated with EH and EM [11, 12, 19].

Another syntropic candidate gene contributing to both anthropometric traits (age at menarche, BMI, and height) and the above-mentioned diseases (UL, EM, and EH) can be *COMT*. *COMT* (catechol-O-methyltransferase) is an enzyme involved in the estrogen metabolism. The rs4633 polymorphism of this gene was associated with AAM, height, and BMI [19]. This polymorphism and related rs4680 were associated with the expression level of *COMT* in peripheral blood [19]. The activity of the *COMT* enzyme is elevated in the human leiomyoma tissue as compared with the normal myometrium; since this enzyme plays a key role in estrogen metabolism, the observed association suggests a possible causal role of *COMT* in the UL formation [4]. In addition, the rs4680 polymorphism encodes a Val158Met substitution in *COMT*: the Met variant has a 40% lower activity as compared to Val [45]. Further support of the possible

contribution of rs4680 to UL comes from the meta-analysis by Feng et al. [46], which reported its association with UL. This locus was also associated with EM [47], while rs4633 *COMT* – with EH [11].

The above results suggest that pleiotropic loci apparently account for a major contribution to the analyzed phenotypes (age at menarche, anthropometric characteristics, UL, EH, EM). In turn, this ample evidence suggests a shared genetic basis for these phenotypes. The estimates of genetic correlations (r_g) between various phenotypes and EM based on the GWAS results provide a support for this assumption [30]. Indeed, the significant genetic correlations ($p < 0.05$) were determined between EM and the age at menarche, height, and obesity. Furthermore, significant genetic correlations were obtained between the age at menarche and two anthropometric characteristics, BMI ($r_g = -0.35$, $p = 1.4 \times 10^{-91}$) and height ($r_g = 0.13$, $p = 2.5 \times 10^{-10}$) [48]. The analysis of the data of 250,037 women from the UK Biobank yielded a strong association between the age at menarche and obesity ($p < 1 \times 10^{-21}$), UL ($p < 1 \times 10^{-21}$), and EM ($p < 7.48 \times 10^{-5}$) [49]. A significant genetic correlation was determined between UL and EM ($p = 0.003$) by Rafnar et al. [33]. The existence of syntropic genes and probable shared genetic basis can be important factors of UL, EH, and EM comorbidity.

Another reason for the comorbidity of benign proliferative diseases of the female reproductive system (UL, EH, and EM) may be the involvement of common regulatory non-coding RNAs and, in particular, micro-RNAs (miRNAs) in their development [50]. MiRNAs modulate various biological processes occurring in the endo- and myometrium, such as cell proliferation, apoptosis, cell differentiation, and inflammatory response. These RNAs are involved in the regulation of the effect of steroid hormones on the endo- and myometrium. In the normal endometrium, the highest expression levels were reported for miR-21, miR-125b, miR-145, miR-23b, miR-26a, miR-29a, and miR-99a [50]. Thirty-two miRNAs were found to be differentially expressed in glandular epithelial and endometrial stromal cells. Steroid hormones had the strongest effect on

the expression of miR-20a, miR-21 и miR-26a. In the endometrium, the elevated expression was observed for miR-29c and miR-145, and lower expression – for miR-196b, miR-199a, miR-23a/b. The differential expression of miRNAs resulted in the altered expression of the respective targeted proteins playing an important role in the pathogenesis of EM. For example, the elevated expression of miR-29c and miR-145 lowered the expression of COL7A1, UPK1B, TFAP2C и FASCIN1, JAM-A, PAI-1, while the lower expression of miR-196b и miR-199a increased transcription of BCL2, C-MYC, HOXA10, IKK/NFKB, and IL-8 [50].

The comparative analysis of the expression level of micro-RNA in the normal myometrium and cells of myomatous nodes demonstrated that, in the normal myometrium, the expression of miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, and miR-429 was elevated that determined the lower production of targeted proteins ZEB1, ZEB2, STAT5b, while the expression of miR-199a-3p/214 was lowered that resulted in the higher expression of the COX2 protein. The myomatous tissue was characterized by the higher expression of let-7 and the lower expression of miR-200a, miR-200b, and some other miRNAs that significantly altered the expression of targeted proteins HMGA2, ZEB1, ZEB2, CYP1B1, VEGFA, CDH1, and others [50].

It appears that the benign proliferative diseases of the female reproductive system share the same epigenetic mechanisms involving miRNAs (let-7, miR-200, miR-199, miR-145, and others) and their targeted proteins (HMGA2, COX2, and others). These miRNAs exert their biological effects through the control of the transcription of some genes (including the syntropic ones) and respective targeted proteins. On the other hand, the differences in the epigenetic landscape may explain the existence of different clinical forms of the disorders as well as their unique clinical manifestation.

Conclusion. In summary, the commonly observed comorbidity of the benign proliferative diseases of the female reproductive system (uterine leiomyoma, endometriosis, endometrial hyperplasia) is based on the shared risk factors and mechanisms of the pathogenesis;

the latter include, among the others, epigenetic factors and syntropic genes. Identification of the shared factors for these diseases helps to determine therapeutic targets and develop an efficient treatment strategy against comorbidity of the disorders.

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. 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.00000000000000164>
2. Sanderson PA, Critchley HOD, Williams ARW, et al. New concepts for an old problem: the diagnosis of endometrial hyperplasia. *Human Reproduction Update.* 2017;23(2):232-254. DOI: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw042>
3. Laganà AS, Garzon S, Götte M, et al. The pathogenesis of endometriosis: molecular and cell biology insights. *International Journal of Molecular Sciences.* 2019;20(22):5615. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20225615>
4. Commandeu AE, Styler AK, Teixeira JM. Epidemiological and genetic clues for molecular mechanisms involved in uterine leiomyoma development and growth. *Human Reproduction Update.* 2015;21(5):593-615. DOI: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv030>
5. Backonja U, Louis GMB, Lauver DR. Overall adiposity, adipose tissue distribution, and endometriosis: a systematic review. *Nursing Research.* 2016;65(2):151-166. DOI: <https://doi.org/10.1097/NNR.0000000000000146>
6. Treloar SA, O'Connor DT, O'Connor VM, et al. Genetic influences on endometriosis in an Australian twin sample. *Fertility and Sterility.* 1999;71(4):701-710. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(98\)00540-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(98)00540-8)
7. Chandra V, Kim JJ, Benbrook DM, et al. Therapeutic options for management of endometrial hyperplasia. *Journal of Gynecologic Oncology.* 2016;27(1):e8. DOI: <https://doi.org/10.3802/jgo.2016.27.e8>
8. Epplein M, Reed SD, Voigt LF, et al. Risk of complex and atypical endometrial hyperplasia in relation to anthropometric measures and reproductive history. *American Journal of Epidemiology.* 2008;168(6):563-576. DOI: <https://doi.org/10.1093/aje/kwn168>
9. Nezhat C, Li A, Abed S, et al. Strong association between endometriosis and symptomatic leiomyomas. *Journal of the Society of Laparoendoscopic Surgeons.* 2016;20(3):e2016.00053. DOI: <https://doi.org/10.4293/JSL.S.2016.00053>
10. Geethamala K, Murthy VS, Vani BR, et al. Uterine Leiomyomas: An ENIGMA. *Journal of Mid-Life Health.* 2016;7(1):22-27. DOI: <https://doi.org/10.4103/0976-7800.179170>
11. Ponomarenko I, Reshetnikov E, Polonikov A, et al. Candidate genes for age at menarche are associated with endometrial hyperplasia. *Gene.* 2020;757:144933. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144933>
12. Ponomarenko I, Reshetnikov E, Polonikov A, et al. Candidate genes for age at menarche are associated with endometriosis. *Reproductive BioMedicine Online.* 2020;41(5):943-956. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.04.016>
13. Song L, Shen L, Mandiwa C, et al. Induced and spontaneous abortion and risk of uterine fibroids. *Journal of Women's Health.* 2017;26(1):76-82. DOI: <https://doi.org/10.1089/jwh.2016.5913>
14. Ross RK, Pike MC, Vessey MP, et al. Risk factors for uterine fibroids: reduced risk associated with oral contraceptives. *British Medical Journal (Clinical research ed.).* 1986;293:359-362. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.293.6543.359>
15. Luoto R, Kaprio J, Rutanen EM, et al. Heritability and risk factors of uterine fibroids—the Finnish Twin Cohort study. *Maturitas.* 2000;37(1):15-26. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0378-5122\(00\)00160-2](https://doi.org/10.1016/s0378-5122(00)00160-2)
16. Moini A, Malekzadeh F, Amiraghmaghi E, et al. Risk factors associated with endometriosis among infertile Iranian women. *Archives of Medical Science.* 2013;9(3):506-514. DOI: <https://doi.org/10.5114/aoms.2013.35420>
17. Liu Y, Zhang W. Association between body mass index and endometriosis risk: a meta-analysis. *Oncotarget.* 2017;8(29):46928-46936. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14916>
18. Nnoaham KE, Webster P, Kumbang J, et al. Is early age at menarche a risk factor for endometriosis? A systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Fertility and Sterility.*

- 2012;98(3):702-712.e6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.05.035>
19. Ponomarenko I, Reshetnikov E, Altuchova O, et al. Association of genetic polymorphisms with age at menarche in Russian women. *Gene.* 2019;686:228-236. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.11.042>
20. Alsudairi HN, Alrasheed AT, Dvornyk V. Estrogens and uterine fibroids: an integrated view. *Research Results in Biomedicine.* 2021;7(2):156-163. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2021-7-2-0-6>
21. Douglas NI, Pavlova TU, Burtseva TE, et al. Women's reproductive health in the Sakha Republic (Yakutia). *International Journal of Circumpolar Health.* 2014;73(1):25872. DOI: <https://doi.org/10.3402/ijch.v73.25872>
22. Schneider AP, 2nd Zainer CM, Kubat CK, et al. The breast cancer epidemic: 10 facts. *The Linacre quarterly.* 2014;81(3):244-277. DOI: <https://doi.org/10.1179/2050854914Y.00000000027>
23. Vikhlyaeva EM, Khodzhaeva ZS, Fantschenko ND. Familial predisposition to uterine leiomyomas. *International Journal of Gynecology and Obstetrics.* 1995;51(2):127-131. DOI: [https://doi.org/10.1016/0020-7292\(95\)02533-I](https://doi.org/10.1016/0020-7292(95)02533-I)
24. Adachi S, Tajima A, Quan J, et al. Meta-analysis of genome-wide association scans for genetic susceptibility to endometriosis in Japanese population. *Journal of Human Genetics.* 2010;55:816-821. DOI: <https://doi.org/10.1038/jhg.2010.118>
25. Albertsen HM, Chettier R, Farrington P, et al. Genome-wide association study link novel loci to endometriosis. *PLoS ONE.* 2013;8(3):e58257. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058257>
26. Nyholt DR, Low SK, Anderson CA, et al. Genome-wide association meta-analysis identifies new endometriosis risk loci. *Nature Genetics.* 2012;44:1355-1359. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng.2445>
27. Painter JN, Anderson CA, Nyholt DR, et al. Genome-wide association study identifies a locus at 7p15.2 associated with endometriosis. *Nature Genetics.* 2011;43:51-54. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng.731>
28. Uimari O, Rahmioglu N, Nyholt DR, et al. Genome-wide genetic analyses highlight mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling in the pathogenesis of endometriosis. *Human Reproduction.* 2017;32(4):780-793. DOI: <https://doi.org/10.1093/humrep/dex024>
29. Uno S, Zembutsu H, Hirasawa A, et al. A genome-wide association study identifies genetic variants in the CDKN2BAS locus associated with endometriosis in Japanese. *Nature Genetics.* 2010;42:707-710. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng.612>
30. Sapkota Y, Steinhorsdottir V, Morris AP, et al. Meta-analysis identifies five novel loci associated with endometriosis highlighting key genes involved in hormone metabolism. *Nature Communications.* 2017;8:15539. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms15539>
31. Masuda T, Low SK, Akiyama M, et al. GWAS of five gynecologic diseases and cross-trait analysis in Japanese. *European Journal of Human Genetics.* 2020;28:95-107. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41431-019-0495-1>
32. Cha PC, Takahashi A, Hosono N, et al. A genome-wide association study identifies three loci associated with susceptibility to uterine fibroids. *Nature Genetics.* 2011;43:447-450. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng.805>
33. Rafnar T, Gunnarsson B, Stefansson OA, et al. Variants associating with uterine leiomyoma highlight genetic background shared by various cancers and hormone-related traits. *Nature Communications.* 2018;9:3636. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05428-6>
34. Välimäki N, Kuisma H, Pasanen A, et al. Genetic predisposition to uterine leiomyoma is determined by loci for genitourinary development and genome stability. *eLife.* 2018;7:e37110. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.37110>
35. Gallagher CS, Mäkinen N, Harris HR, et al. Genome-wide association and epidemiological analyses reveal common genetic origins between uterine leiomyomata and endometriosis. *Nature Communications.* 2019;10:4857. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12536-4>
36. Edwards TL, Giri A, Hellwege JN, et al. A Trans-Ethnic Genome-Wide Association Study of Uterine Fibroids. *Frontiers in Genetics.* 2019;10:511. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00511>
37. Radzinsky VE, Altuchova OB. Molecular-genetic determinants of infertility in genital endometriosis. *Research Results in Biomedicine.* 2018;4(3):28-37. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18413/2313-8955-2018-4-3-0-3>
38. Golovchenko IO. Genetic determinants of sex hormone levels in endometriosis patients. *Research Results in Biomedicine.* 2023;9(1):5-21. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2023-9-1-0-1>

39. Ruth KS, Campbell PJ, Chew S, et al. Genome-wide association study with 1000 genomes imputation identifies signals for nine sex hormone-related phenotypes. *European Journal of Human Genetics.* 2016;24:284-290. DOI: <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.102>
40. He C, Kraft P, Chasman DI, Buring JE, et al. A large-scale candidate gene association study of age at menarche and age at natural menopause. *Human Genetics.* 2010;128:515-527. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00439-010-0878-4>
41. Stolk L, Perry JRB, Chasman DI, et al. Meta-analyses identify 13 loci associated with age at menopause and highlight DNA repair and immune pathways. *Nature Genetics.* 2012;44:260-268. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng.1051>
42. Gajbhiye R, Fung JN, Montgomery GW. Complex genetics of female fertility. *npj Genomic Medicine.* 2018;3:29. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41525-018-0068-1>
43. Rahmioglu N, Macgregor S, Drong AW, et al. Genome-wide enrichment analysis between endometriosis and obesity-related traits reveals novel susceptibility loci. *Human Molecular Genetics.* 2015;24(4):1185-1199. DOI: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu516>
44. Fernández-Rhodes L, Demerath EW, Cousminer DL, et al. Association of adiposity genetic variants with menarche timing in 92,105 women of European descent. *American Journal of Epidemiology.* 2013;178(3):451-460. DOI: <https://doi.org/10.1093/aje/kws473>
45. Chen J, Lipska BK, Halim N, et al. Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. *American Journal of Human Genetics.* 2004;75:807-821. DOI: <https://doi.org/10.1086/425589>
46. Feng Y, Zha X, Zhou C, et al. The associations between the Val158Met in the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene and the risk of uterine leiomyoma (ULM). *Gene.* 2013;529(2):296-299. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.07.019>
47. Zhai J, Jiang L, Wen A, et al. Analysis of the relationship between COMT polymorphisms and endometriosis susceptibility. *Medicine.* 2019;98(1):e13933. DOI: <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000013933>
48. Day FR, Bulik-Sullivan B, Hinds DA, et al. Shared genetic aetiology of puberty timing be-

tween sexes and with health-related outcomes. *Nature Communications.* 2015;6:8842. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms9842>

49. Day FR, Elks CE, Murray A, et al. Puberty timing associated with diabetes, cardiovascular disease and also diverse health outcomes in men and women: the UK Biobank study. *Scientific Reports.* 2015;5:11208. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep11208>

50. Nothnick WB. Non-coding RNAs in Uterine Development, Function and Disease. *Advances in experimental medicine and biology.* 2016;886:171-189. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-017-7417-8_9

Received 3 May 2023

Revised 2 July 2023

Accepted 19 September 2023

Information about the authors

Marina S. Ponomarenko, Post-graduate Student in Scientific Specialty 1.5.7 – Genetics, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, E-mail: ponomarenkomp@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-0312-0829>.

Evgeny A. Reshetnikov, Doct. Sci. (Biology), Associate Professor, Professor at the Department of Biomedical Disciplines, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, E-mail: reshetnikov@bsu.edu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5429-6666>.

Maria M. Churnosova, Student, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, E-mail: 1647082@bsu.edu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6444-8806>.

Yuliya N. Reshetnikova, Post-graduate Student in Scientific Specialty 1.5.7 – Genetics, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, E-mail: resh_yul@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-6123-4086>.

Vladimir I. Churnosov, Post-graduate Student in Scientific Specialty 1.5.7 – Genetics, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, E-mail: vchurnosov@yandex.kz, ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-8519-4594>.

Irina V. Ponomarenko, Doct. Sci. (Medicine), Associate Professor, Professor at the Department of Biomedical Disciplines, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, E-mail: pononarenko_i@bsu.edu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5652-0166>.



DOI: 10.18413/2658-6533-2023-9-4-0-10

УДК 614.8:352.14(871.24+315.64)

Особенности психологического дефицитарного профиля пожилых пациентов с возрастассоциированной коморбидной кардиопатологией

А.В. Чернов¹ , Н.А. Щетинина¹ , В.А. Негребецкий²

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко», ул. Студенческая, д. 10, г. Воронеж, 394036, Российская Федерация

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова», ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997, Российская Федерация

Автор для переписки: Н.А. Щетинина (shchetinina.2016@inbox.ru)

Резюме

Актуальность: С увеличением возраста повышается вероятность развития когнитивных нарушений, тревожно-депрессивного синдрома среди пациентов с коморбидной артериальной гипертензией (АГ) и ишемической болезнью сердца (ИБС), которые редко анализируются среди вышеуказанного контингента, а психологические дефицитарные состояния, в основном, рассматриваются раздельно для пациентов с АГ и для пациентов с ИБС. **Цель исследования:** Изучение особенностей психологического дефицитарного профиля пожилых пациентов с возрастассоциированной коморбидной кардиопатологией. **Материалы и методы:** В период стационарного лечения пациентов 60-74 лет проведено изучение когнитивных нарушений, тревожности и депрессии у 212 пациентов с изолированной АГ, 208 пациентов с изолированной ИБС и 223 пациентов с коморбидной АГ и ИБС (АГ+ИБС). Оценка когнитивной дисфункции выполнена по шкале Mini-Mental-State-Examination, депрессии и тревожности – по шкале Hospital anxiety and depression scale (HADS). **Результаты:** Среди пациентов с изолированной АГ средний балл по MMSE составил $24,7 \pm 0,3$, изолированной ИБС – $21,3 \pm 0,2$ и коморбидной АГ и ИБС – $14,2 \pm 0,2$ со статистически значимым различием во всех группах ($p < 0,001$), что свидетельствует об умеренной тяжести когнитивных нарушений, лёгкой деменции и деменции средней степени тяжести соответственно. Сказанное доказывает более выраженное негативное влияние коморбидной АГ и ИБС на ухудшение ментальной функции обследованных пациентов. Величина среднего балла уровня тревожности достигла соответственно $8,4 \pm 0,2$; $9,1 \pm 0,2$ и $11,2 \pm 0,3$ баллов с достоверным различием между группами. Уровень тревожности среди пациентов 60-74 лет с изолированной АГ и ИБС соответствовал субклинической тревоге, но при коморбидной АГ и ИБС – выраженной тревоге. По шкале HADS-D средний балл уровня депрессии среди выделенных клинических групп составил $8,7 \pm 0,3$; $9,6 \pm 0,2$ и $11,5 \pm 0,4$ баллов соответственно с достоверным различием во всех случаях. Параметры депрессии у пациентов 60-74 лет с изолированной АГ и изолированной ИБС показали наличие субклинической тревожности и депрессии.

ской депрессии, в отличие от представителей с коморбидной АГ и ИБС, где она соответствовала клинически выраженной депрессии. **Заключение:** Коморбидная АГ и ИБС оказывают наиболее негативное влияние на психологический дефицитарный профиль пожилых пациентов, нежели наличие изолированной АГ или ИБС.

Ключевые слова: пожилые; психологический дефицитарный профиль; когнитивные нарушения; депрессия; артериальная гипертензия; ишемическая болезнь сердца

Для цитирования: Чернов АВ, Щетинина НА, Негребецкий ВА. Особенности психологического дефицитарного профиля пожилых пациентов с возрастассоциированной коморбидной кардиопатологией. Научные результаты биомедицинских исследований. 2023;9(4):557-569. DOI: 10.18413/2658-6533-2023-9-4-0-10

Features of the psychological deficit profile of elderly patients with age-associated comorbid cardiopathology

Aleksey V. Chernov¹ , Nadezhda A. Shchetinina¹ , Viktor A. Negrebetskiy² 

¹ Burdenko Voronezh State Medical University,
10 Studencheskaya St., Voronezh, 394036, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University,
1 Ostrovityanov St., Moscow, 117997, Russia

Corresponding author: Nadezhda A. Shchetinina (shchetinina.2016@inbox.ru)

Abstract

Background: With increasing age, there is an increased likelihood of cognitive impairment, anxiety-depressive syndrome among patients with comorbid arterial hypertension (AH) and coronary heart disease (CHD), which are rarely analysed among the above population, and psychological deficit states are mostly considered separately for patients with AH and for patients with CHD. **The aim of the study:** To study the features of the psychological deficit profile of elderly patients with age-associated comorbid cardiopathology. **Materials and methods:** During inpatient treatment of 60-74-year-old patients, cognitive impairment, anxiety and depression were studied in 212 patients with isolated hypertension, 208 patients with isolated coronary artery disease and 223 patients with comorbid hypertension and coronary heart disease (AH+CHD). Cognitive dysfunction was assessed on the Mini-Mental-State-Examination scale, depression and anxiety – on the Hospital anxiety and depression scale (HADS). **Results:** In patients with isolated AH, the average MMSE score was 24.7 ± 0.3 , isolated CHD – 21.3 ± 0.2 and comorbid AH and CHD – 14.2 ± 0.2 with a statistically significant difference in all groups ($p < 0.001$), indicating moderate severity of cognitive impairment, mild dementia and moderate dementia, respectively. The above proves a more pronounced negative effect of comorbid hypertension and coronary heart disease on the deterioration of mental function of the examined patients. The value of the average score of the anxiety level reached 8.4 ± 0.2 , respectively; 9.1 ± 0.2 and 11.2 ± 0.3 points with a significant difference between the groups. The level of anxiety in 60-74-year-old patients with isolated hypertension and CHD corresponded to subclinical anxiety, but with comorbid hypertension and CHD – pronounced anxiety. According to the HADS-D scale, the average depression level score in the selected clinical groups was 8.7 ± 0.3 ; 9.6 ± 0.2 and 11.5 ± 0.4 points, respectively, with a significant difference in all cases. Depression parameters in 60-74-year-old patients

with isolated hypertension and isolated coronary artery disease showed the presence of subclinical depression in contrast to representatives with comorbid hypertension and coronary artery disease, where it corresponded to clinically pronounced depression. **Conclusion:** Comorbid AH and CHD have the most negative impact on the psychological deficit profile of elderly patients than the presence of isolated AH or CHD.

Keywords: elderly; psychological deficit profile; cognitive impairment; depression; arterial hypertension; coronary heart disease

For citation: Chernov AV, Shchetinina NA, Negrebetsky VA. Features of the psychological deficit profile of elderly patients with age-associated comorbid cardiopathology. Research Results in Biomedicine. 2023;9(4):557-569. Russian. DOI: 10.18413/2658-6533-2023-9-4-0-10

Введение. Большая часть пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) страдает депрессией [1, 2]. Депрессия связана с различными негативными последствиями для здоровья кардиологических пациентов и считается независимым фактором риска сердечно-сосудистых осложнений и риска смертности [3, 4]. Пациенты с факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний, такими как артериальная гипертензия (АГ), сахарный диабет 2-го типа, дислипидемия, когнитивные нарушения, высокий уровень тревожности, подвергаются повышенному риску неблагоприятных нефатальных и фатальных исходов, инфицированию COVID-19 [5]. Всё чаще сообщается о сердечно-сосудистых осложнениях – инфаркт миокарда, острый коронарный синдром, острое повреждение миокарда, сердечная недостаточность, нарушения сердечного ритма, миокардит, перикардит, тромбоэмболия [5].

Тревожно-депрессивные расстройства распространены среди пациентов с АГ, достигая 60%, и их частота прогрессивно коррелирует со степенью тяжести АГ [6]. Исследования показывают также ассоциацию депрессии среди пациентов с хронической сердечной недостаточностью, обусловленной АГ и ИБС [7]. В исследовании КОМЕТА, включающем 1687 пациентов с изолированной АГ и 1015 пациентов с АГ и ИБС из 30 различных городов Российской Федерации, обратившихся за медицинской помощью в амбулаторно-поликлинические учреждения, тревожная симптоматика (≥ 8 баллов по шкале HADS-A) обнаружена у 47,4% пациентов старше 55 лет с изолированной АГ и у 47,3% пациентов с сочетанной АГ и ИБС, а клинически выраженная тревожная симптоматика (≥ 11 баллов по

шкале HADS-A) у 24,7% и 27,4% соответственно [8, 9]. Однако в данных [8, 9], как и в других исследованиях [6] рассматривались пациенты различного возраста и, в частности, в [8] – в возрасте 55-60 лет, старше 60 лет, в работе [7] – от 26 до 72 лет; в публикации [9] – менее 60 лет, 60-69 лет, 70-79 лет и старше 80 лет, что указывает на гетерогенность возрастного состава обследованных и несоответствие общепринятой градации людей пожилого возраста 60-74 лет. Кроме того, в исследованиях [8, 9] из-за малого числа пациентов с изолированной ИБС не изучались тревожно-депрессивный статус, а также когнитивные нарушения. Последние, наряду с тревожно-депрессивными расстройствами, одновременно не рассматривались и не анализировались в других исследованиях.

Цель исследования. Изучение особенностей психологического дефицитарного профиля пожилых пациентов с возрастассоциированной коморбидной кардиопатологией.

Материалы и методы исследования. В период госпитализации пациентов пожилого возраста в специализированное кардиологическое отделение проведена комплексная гериатрическая оценка [10] с изучением когнитивного статуса, изменения уровня тревожности и депрессии среди 212 пациентов с изолированной АГ, 208 пациентов с изолированной ИБС и 223 пациентов с коморбидной АГ и ИБС (АГ+ИБС). Пациенты выделенных групп не имели статистически значимых различий по возрасту: $69,2 \pm 2,1$ лет, $68,7 \pm 1,9$ лет и $68,9 \pm 1,7$ лет соответственно ($p > 0,05$). Сопутствующие заболевания у обследованных пациентов находились в стадии компенсации.

В исследование не включались пациенты других возрастных категорий, с пре-астенией и синдромом старческой астении. Определение когнитивных нарушений про-ведено по многократно валидированной шкале Mini-Mental-State-Examination (MMSE) [11]. Уровень тревоги и депрессии определялся по госпитальной шкале тре-воги и депрессии – Hospital anxiety and depression scale (HADS) [12]. При анализе ре-зультатов данной шкалы придерживались следующих критериев: 0-7 баллов – отсут-ствие тревоги и депрессии, 8-10 баллов – субклиническая тревога и депрессия, 11 баллов и более – клинически выраженная тревога и депрессия.

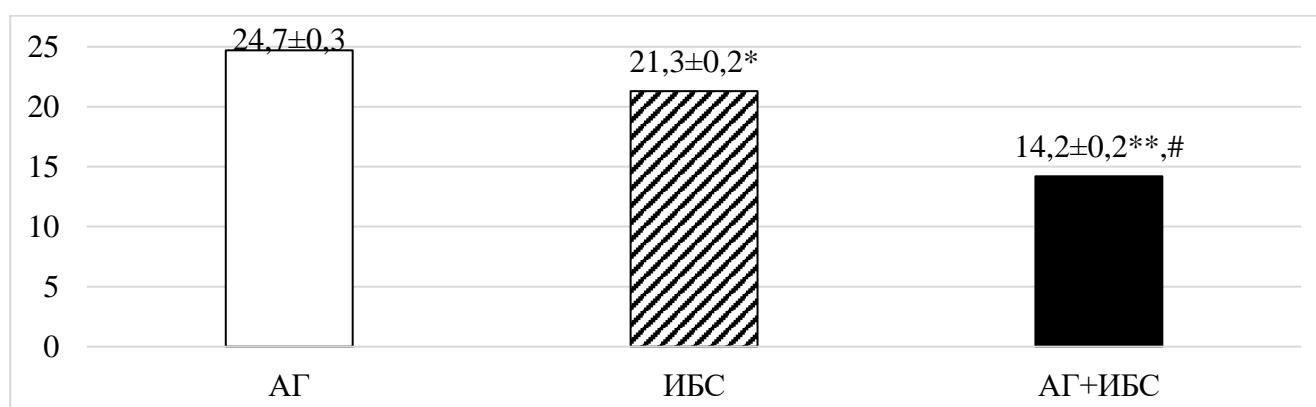
Диагностика АГ осуществлялась в со-ответствии с «Клинические рекомендации. Артериальная гипертония у взрослых» [13]. Диагностика ИБС выполнялась с учётом кри-териев клинических рекомендаций «Стабильная ишемическая болезнь сердца» [14].

Пациенты включались в исследование после получения письменного согласия на обследование и использование получен-ных результатов в научных целях. Исследо-вание проводилось с соблюдением мо-

рально-этических норм и принципов надле-жащей клинической практики («Good Clin-ical Practice»).

При статистической обработке ис-пользовался стандартный статистический пакет «Statistica 10.0». Рассчитывались среднеарифметические величины и ошибки среднеарифметических величин. Оценка статистической значимости проведена по непараметрическому критерию X^2 , а разли-чие принималось статистически значимым при $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. Ана-лиз шкалы MMSE показал, что у пациентов 60-74 лет, страдающих изолированной АГ, средний балл статистически значимо выше ($p<0,001$), чем у пациентов двух других вы-деленных клинических групп аналогичного возраста ценза – с изолированной ИБС и коморбидной АГ+ИБС (Рис. 1). Величина среднеарифметического балла пациентов с изолированной АГ соответствует умерен-ным когнитивным нарушениям, тогда как у пациентов с изолированной ИБС – лёгкой деменции, а у пациентов с наличием одновременно коморбидной АГ и ИБС – демен-ции средней степени тяжести.



Примечание: * $p<0,001$ между пациентами с изолированной АГ и изолированной ИБС, ** $p<0,001$ между пациен-тами с изолированной АГ и коморбидной АГ+ИБС, # $p<0,001$ между пациентами с изолированной ИБС и комор-бидной АГ+ИБС

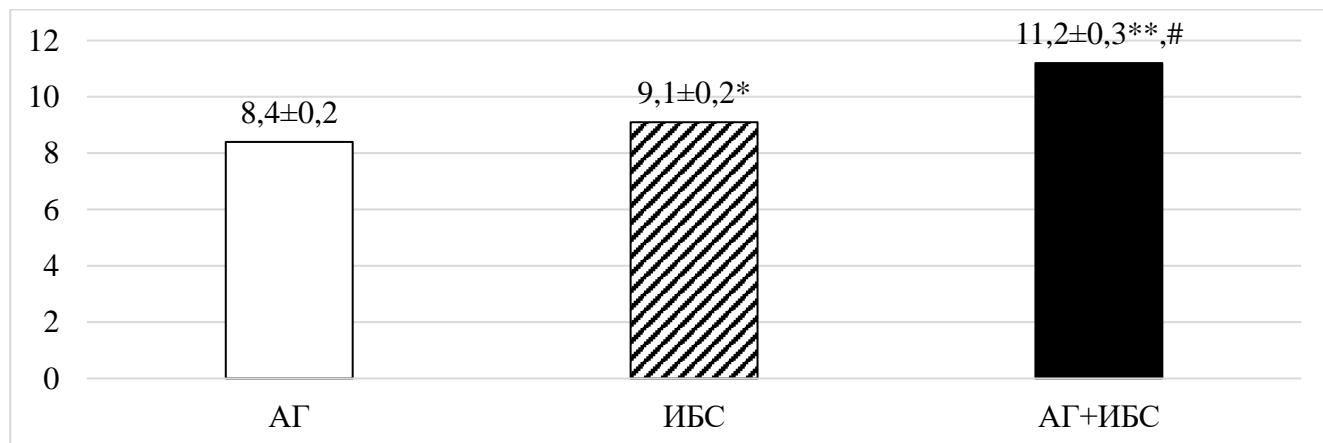
Рис. 1. Когнитивные нарушения среди пациентов 60-74 лет с изолированной АГ, ИБС и коморбидной АГ+ИБС по шкале MMSE ($M\pm m$, баллы)

Note: * $p<0.001$ between patients with isolated AH and isolated CHD, ** $p<0.001$ between patients with isolated AH and comorbid AH+CHD, # $p<0.001$ between patients with isolated CHD and comorbid AH+CHD

Fig. 1. Cognitive impairment in 60-74-year-old patients with isolated AH, CHD and comorbid AH+CHD on the MMSE scale ($M\pm m$, points)

Следовательно, степень когнитивной дисфункции существенно изменяется у пациентов пожилого возраста с изолированной АГ по сравнению с пациентами 60-74 лет с изолированной ИБС и ещё более существенно относительно пациентов того же возрастного ценза с наличием одновременно коморбидной АГ и ИБС. Наиболее негативно на ментальную функцию пожилых влияет, как видно из полученных результатов, коморбидная АГ и ИБС.

Средние величины тревожности по шкале HADS-А среди пожилых пациентов сопоставляемых клинических групп с изолированной и коморбидной сердечно-сосудистой патологией статистически значимо различались (Рис. 2). Статистически значимое различие в уровне тревожности установлено не только между пациентами с изолированной и коморбидной сердечно-сосудистой патологией, но и пациентами пожилого возраста с изолированными сердечно-сосудистыми заболеваниями.



Примечание: * $p<0,01$ между пациентами с изолированной АГ и изолированной ИБС, ** $p<0,01$ между пациентами с изолированной АГ и коморбидной АГ+ИБС, # $p<0,01$ между пациентами с изолированной ИБС и коморбидной АГ+ИБС

Рис. 2. Уровень тревожности у пожилых пациентов с изолированной АГ, изолированной ИБС и коморбидной АГ+ИБС ($M\pm m$, баллы)

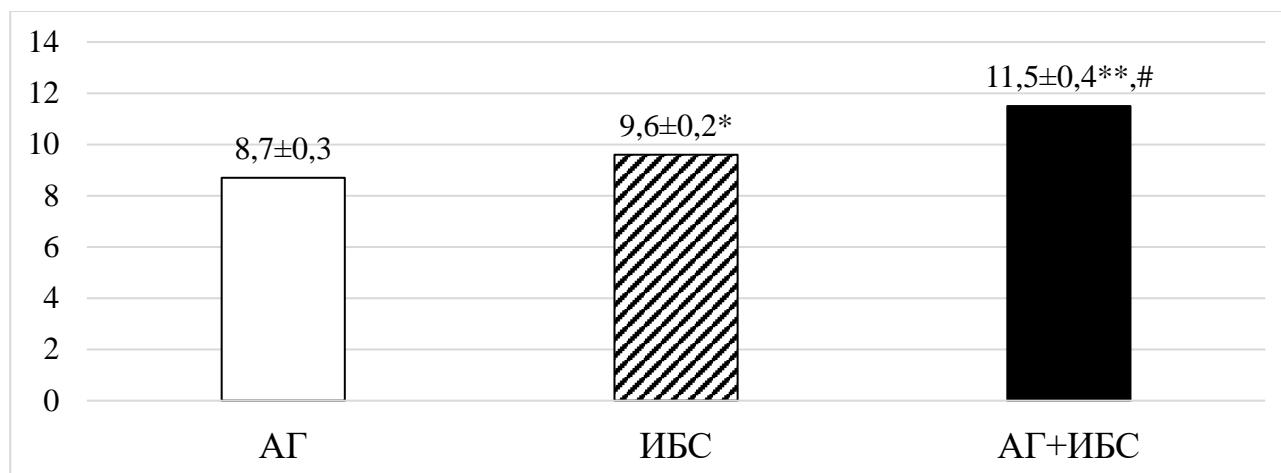
Note: * $p<0.01$ between patients with isolated AH and isolated CHD, ** $p<0.01$ between patients with isolated AH and comorbid AH+CHD, # $p<0.01$ between patients with isolated CHD and comorbid AH+CHD

Fig. 2. The level of anxiety in elderly patients with isolated AH, isolated CHD and comorbid AH+CHD ($M\pm m$, points)

Так, показатель тревожности по шкале HADS-А статистически значимо оказался выше у пациентов с ИБС относительно пациентов того же возрастного ценза с АГ ($p<0,01$). Несмотря на существенность различий уровня тревожности в вышеназванных когортах пациентов, он соответствовал в обеих группах субклинической тревоге. Однако среди пациентов с коморбидной АГ и ИБС уровень тревожности оказался максимальным со статистически значимым различием к ранее рассмотренным группам с изолированной кардиопатологией и соответствовал клинически

выраженной тревоге, что свидетельствует о наиболее неблагоприятном воздействии именно коморбидной, чем изолированной АГ и ИБС на состояние тревожности пациентов 60-74 лет.

Депрессивный профиль пациентов с обсуждаемой кардиопатологией характеризуется статистически значимыми различиями во всех случаях (Рис. 3). Уровень депрессии имел значимое различие по шкале HADS-D среди пациентов с изолированной АГ и изолированной ИБС ($p<0,01$), но в обеих группах соответствовал субклинической депрессии.



Примечание: * $p<0,01$ между пациентами с изолированной АГ и изолированной ИБС, ** $p<0,01$ между пациентами с изолированной АГ и коморбидной АГ+ИБС, # $p<0,01$ между пациентами с изолированной ИБС и коморбидной АГ+ИБС

Рис. 3. Уровень депрессии у пожилых пациентов с изолированной АГ, изолированной ИБС и коморбидной АГ+ИБС ($M\pm m$, баллы)

Note: * $p<0.01$ between patients with isolated AH and isolated CHD, ** $p<0.01$ between patients with isolated AH and comorbid AH+CHD, # $p<0.01$ between patients with isolated CHD and comorbid AH+CHD

Fig. 3. The level of depression in elderly patients with isolated AH, isolated CHD and comorbid AH+CHD ($M\pm m$, points)

Более высокий уровень депрессии имелся среди пациентов с коморбидной АГ и ИБС, статистически значимо превышая аналогичные параметры как пациентов с изолированной АГ, так и изолированной ИБС. Уровень депрессии у пациентов с коморбидной АГ и ИБС, в отличие от пациентов с изолированной АГ и ИБС, соответствовал клинически выраженной депрессии, что указывает на более значительное влияние коморбидной АГ и ИБС на состояние депрессии пожилых пациентов и согласуется с ранее полученными результатами [9], но уровень депрессии в указанной публикации был значительно ниже установленного нами.

В гетерогенной по возрасту группе пациентов от 55 лет и свыше 80 лет с АГ+ИБС и изолированной АГ не установлено статистически значимых различий по показателю тревожности шкалы HADS-A и доле лиц с тревожной симптоматикой любой степени выраженности [8], хотя величины депрессии у пациентов с АГ и коморбидной АГ+ИБС достоверно различались ($p<0,001$) и среди последних чаще обнаруживалась клинически выраженная депрессивная симптоматика (20,9% против 13,9%

при изолированной АГ, $p<0,001$). Симптомы депрессии различной степени наблюдались у пациентов 65-79 лет с ИБС в 35,1% случаев и в 48,0% случаев у пациентов того же возраста с АГ [15], а депрессия соответственно – в 50,0% и 38,0% случаев. Показано также, что с умеренной/тяжёлой депрессивной симптоматикой связан, прежде всего, высокий уровень стресса [9]. Между депрессией и тревогой у пациентов в возрасте 66,5±11,2 лет с АГ+ИБС методом многомерной регрессии обнаружена ассоциация [16]. Распространённость депрессии среди пациентов с АГ, проживающих в Эфиопии, выявлена в 37,8% и ассоциирована преимущественно с женским полом [17], что существенно ниже, чем среди аналогичной группы, проживающей в Гане, – 6,3% [18]. Среди же пациентов с ИБС в возрасте старше 40 лет распространённость депрессии составила 11,4% [19].

Депрессия, как свидетельствуют современные исследования [9, 17], выступает ведущим фактором повышенного риска заболеваемости и смертности от сердечно-сосудистых заболеваний, таких как ИБС. В исследовании, проведенном на репрезентативной на национальном уровне когорте

населения США, обнаружено, что уровень депрессии независимо связан с более высоким риском развития ИБС, инсульта, а также смертности от всех причин и сердечно-сосудистой смертности. У 20% пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями наблюдалась депрессия от умеренной до тяжелой степени, а еще у 20% пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями наблюдалась депрессия от легкой до умеренной степени, что примерно в два-три раза превышает показатель в общей популяции. Кроме того, метаанализ со средней продолжительностью наблюдения 8,4 года показал, что кумулятивная частота сердечно-сосудистых заболеваний у пациентов с тяжелыми психическими заболеваниями (ТПЗ) составила 3,6% (95% ДИ = 2,7–5,3%), что значительно выше, чем у людей без ТПЗ (ОР = 1,78; 95% ДИ = 1,60–1,80) по сравнению с контрольной группой.

Механизмы, лежащие в основе данных коморбидностей, – депрессии и ИБС, являются сложными и текущие исследования показали, что депрессия и ИБС могут быть связаны биологическими и поведенческими механизмами, в том числе через метаболический синдром, который преобладает при депрессии, сахарном диабете 2 типа, увеличении толщины висцерального жира, изменении уровня кортизола из-за нарушения регуляции гипotalамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и нездрового образа жизни (курение, неправильное питание, отсутствие физических упражнений и т.д.) [7]. Более того, в исследованиях последних лет также сообщалось, что сердечно-сосудистые характеристики, такие как артериальное давление и жесткость артерий, зависят от депрессии и связаны с ней. Следует отметить, что депрессия приводит к снижению систолического артериального давления (САД) на 1 мм рт. ст. в возрасте 45 лет и снижению САД на 2,5 мм рт. ст. в возрасте 65 лет у лиц мужского пола [20]. Тем не менее, также стоит отметить, что средние значения САД у лиц мужского пола были около 140 мм рт. ст., как в группе здорового контроля, так и у пациентов с ИБС. В этом контексте влияние

такой небольшой разницы САД на коронарные артерии было незначительным у представителей мужского пола. Таким образом, исследования показали, что ИБС и депрессия могут быть обусловлены общей генетической предрасположенностью, и каждое заболевание увеличивает риск другого.

Предыдущие исследования показали, что депрессия была идентифицирована как фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний [8, 9], тогда как связь между конкретной тяжестью депрессии и ИБС, риском инсульта, а также смертностью до сих пор неизвестна. Обнаружено, что с каждым дополнительным увеличением уровня депрессии последствия такого увеличения риска развития ИБС, инсульта и смертности были огромными.

Таким образом, понимая взаимосвязь и степень воздействия, можно правильно выявлять, предотвращать и лечить ИБС, а также создавать политику и стратегии, которые помогут снизить её распространённость и улучшить качество жизни путем решения проблем депрессии. Это подчеркивает важность регулярного скрининга депрессии у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, в том числе ИБС.

Интересно, что пациенты с более высоким уровнем депрессии имели более высокий риск смертности от всех причин и смертность пациентов с депрессией и сопутствующими сердечно-сосудистыми заболеваниями, у которых депрессия хорошо лечилась, была резистентна к лечению и недостаточно лечилась, составляла 2,4%, 5% и 6,9% соответственно [21]. Эти результаты свидетельствуют о том, что активное лечение депрессии снижает риск смерти от ИБС.

При анализе связи между уровнем депрессии и сердечно-сосудистой смертностью обнаружено, что риск сердечно-сосудистой смерти был самым низким в группе с тяжелой депрессией. Это явление можно объяснить результатами анализа причин смерти, согласно которому, ведущей причиной в этой группе были все остальные причины (5,03%), за которыми следовали несчастные случаи (непреднамеренные

травмы) (1,79%), злокачественные новообразования (1,25%) и болезни сердца (1,05%) [15]. Поэтому, пациентам с депрессией могут потребоваться ранние и/или дополнительные меры первичной профилактики ИБС, чтобы уменьшить чрезмерное бремя сердечно-сосудистых заболеваний.

Субклиническая тревога и депрессия зарегистрированы среди пожилых пациентов с изолированной АГ соответственно в 27,2% и 32,7% случаев [20], что, по мнению авторов, указывает на актуальность проведения регулярного скрининга. Баллы депрессии по шкале Бэка оказались достоверно выше у пациентов с резистентной АГ (3,0-11,5) по сравнению с контролем (1-6 баллов) ($p<0,05$) [21], что соответствует нашим результатам для пациентов с изолированной АГ. Аналогичная закономерность установлена и для уровня тревожности как у пациентов с АГ, так и ИБС [22].

У пожилых пациентов с изолированной АГ гипертония является основным фактором риска снижения когнитивных функций и деменции. Однако утверждение о том, что снижение артериального давления снижает риск когнитивных нарушений, остается спорным. Некоторые исследования сообщают, что контроль артериального давления может эффективно снизить риск снижения когнитивных функций. Тем не менее, использование целевого значения систолического артериального давления <120 мм рт. ст. у пациентов с АГ существенно не снижает риск деменции по сравнению с уровнем 140 мм рт. ст. Аналогичным образом, исследование Secondary Prevention of Small Subcortical Strokes показало, что кратковременное лечение, снижающее артериальное давление, не улучшает когнитивные функции пациентов с АГ в возрасте старше 60 лет. Показана U-образная связь между артериальным давлением и когнитивными способностями: как высокое, так и низкое артериальное давление отрицательно влияют на когнитивные функции [20]. Соответственно, взаимосвязь между АГ и развитием когнитивной дисфункции сложна. Оценка когнитивных спо-

собностей по шкале MMSE у 1171 пациентов старше 60 лет в северной части Китая выявила неоднозначные результаты [22]. Распространённость когнитивных нарушений среди обследованных составила 32,4% в целом, 25,6% среди лиц мужского пола и 38,1% - среди лиц женского пола. Однако распространённость когнитивных нарушений в группе АГ в целом и в группе с АГ 3-й стадии увеличилась на 41,5 и 73,4% соответственно по сравнению с таковой в группе без АГ. По сравнению с группой с нормальным артериальным давлением показатели ориентации, внимания и счета, а также языка в группе с АГ снизились более чем на 0,2 балла. С каждым увеличением стадии АГ баллы по MMSE снижались более чем на 0,5 балла.

Выполненное нами исследование установило снижение когнитивных способностей на фоне изолированной АГ, что согласуется с результатами предыдущих исследований, показавших, что АГ может вызвать снижение когнитивных функций, а АГ, начавшаяся в среднем возрасте, оказывает наиболее сильное влияние на когнитивные функции у пожилых людей [18]. В соответствии с результатами предыдущих исследований, по сравнению с лицами с нормальным артериальным давлением, распространенность когнитивных нарушений у лиц с АГ значительно выше на 41,5%.

Как отмечалось ранее, связь между АГ и когнитивными нарушениями не является прямолинейной. Это подтверждается тем, что у пациентов без АГ (с нормальным уровнем артериального давления) по сравнению с пациентами с АГ 1-й стадии и АГ 2-й стадии не установлено существенных различий в величинах баллов по MMSE ($p=0,84$ и $p=0,05$ соответственно) [23]. Напротив, существовала значительная положительная корреляция между АГ 3-й стадии и распространённостью когнитивных нарушений (отношение шансов 1,73; 95% доверительный интервал: 1,13-2,66; $p=0,012$). АГ без учёта стадии повышает вероятность развития когнитивной дисфункции в 1,42 раза (отношение шансов 1,42; 95% доверительный интервал: 1,01-1,99;

$p=0,047$). Кроме того, выявлена значительная связь между стадиями АГ и артериального давления с показателями MMSE ($p<0,05$). В группе пациентов с АГ относительно пациентов без АГ достоверно ниже баллы за ориентацию, внимание и счёт, а также речь на 0,24, 0,23 и 0,27 баллов соответственно ($p<0,05$).

Однако взаимосвязь между артериальным давлением и когнитивными способностями не может быть прямолинейной, и существует нелинейная зависимость. Среди амбулаторных взрослых с АГ контроль целевого систолического артериального давления ниже 120 мм рт. ст. не привел к значительному снижению риска деменции по сравнению с 140 мм рт. ст. [20]. У взрослых с АГ снижение функции почек, измеряемое по расчетной скорости клубочковой фильтрации, связано с повышенным риском деменции; тем не менее, интенсивное лечение АГ не снизило риск. Это может быть связано с взаимосвязью между артериальным давлением и церебральной перфузией, при которой после интенсивного снижения артериального давления гипотония и церебральная гипоперфузия могут отрицательно влиять на когнитивные функции мозга.

Низкая церебральная оксигенация, по мнению Gayda M. [24], лежит в основе развития когнитивной дисфункции у пациентов с ИБС, модулирующей, наряду с возрастом, снижение ментальности. На основании сосудистой гипотезы высказано предположение, что особенно у пациентов с ИБС, наблюдаются более низкие уровни оксигенации крови и цереброваскулярного резерва. Проведенное исследование показало, что по шкале MMSE у пожилых пациентов с ИБС средний балл значительно ниже ($28,1\pm1,1$), чем у здоровых без ИБС ($29,2\pm0,8$ баллов) ($p<0,01$). Также выявлены статистически значимые различия в показателях кратковременной памяти – $8,3\pm1,7$ баллов против $11,9\pm1,7$ баллов соответственно ($p<0,001$). Ухудшение когнитивных способностей обусловлено снижением церебрального кровотока, составившего у

пожилых с ИБС $36,0\pm8$ мл/мин относительно пожилых без ИБС $42,0\pm6$ мл/мин ($p<0,01$) и молодых без ИБС – $59,0\pm8$ мл/мин ($p<0,01$) [24].

Таким образом, пациенты с ИБС, несмотря на хорошее состояние, показали значительно худшие результаты в когнитивных тестах, касающихся кратковременной и рабочей памяти, скорости обработки информации, торможения и гибкости, а также долговременной вербальной памяти, по сравнению с лицами того же возраста и у молодых здоровых людей из контрольной группы. Церебральная оксигенация/перфузия во время физических упражнений была значительно ниже среди пациентов с ИБС и контрольной группы того же возраста по сравнению с молодыми пациентами.

Большой и постоянно растущий объем данных подчеркивает положительную взаимосвязь, существующую между ИБС и когнитивными функциями как у здоровых взрослых среднего возраста, так и у пожилых людей. Кроме того, более высокая физическая форма в молодом возрасте предсказывает улучшение когнитивных функций в дальнейшей жизни. Эти данные также согласуются с другими данными, показывающими пользу физических упражнений для когнитивных функций у здоровых людей. Коррелятами этой ассоциации являются структурные различия (большая часть белого вещества, мозговой кровоток и т. д.). Среди пожилых марафонцев (средний возраст 66 лет, функциональные способности 140% от прогнозируемых) продемонстрировано улучшение когнитивных функций в одной области управляющих функций (невербальная беглость, оцениваемая с помощью пятибалльного теста) по сравнению с контрольной группой того же возраста, в то время как все остальные исполнительные функции были схожими между группами. В небольшом исследовании среди спортсменов-мастеров ($n=12$, средний возраст 72 года) беглость букв и категорий была значительно лучше по сравнению как с малоподвижными пожилыми людьми, так и с молодыми людьми из кон-

трольной группы, в то время как другие когнитивные области были одинаковыми во всех трех группах [24].

Когнитивная дисфункция по шкале MMSE у пациентов 50-60 лет с ИБС диагностирована в 61,4% случаев, а среди пациентов с АГ и сахарным диабетом 2-го типа – в 79,4% случаев [25]. При этом удельный вес средних и тяжёлых нарушений соответственно составлял 6,8% и 44,1%. Средний балл по сравнению с нашим исследованием у пациентов с ИБС 50-60 лет оказался существенно выше – $25,3 \pm 0,21$ балла [25]. Пациенты 45-65 лет с изолированной АГ имели средний балл 18,9, а 93,3% обследованных ниже 26,0 по Монреальской шкале когнитивной оценки [26]. При этом 51,6% пациентов страдали умеренными когнитивными нарушениями. Среди пациентов с ИБС по вышеуказанной шкале средний балл составил $25,4 \pm 3,73$ и частота умеренных когнитивных нарушений увеличивалась с возрастом [27].

Заключение. Коморбидная АГ и ИБС наиболее негативно влияет на все составляющие психологического дефицитарного профиля пожилых пациентов, обуславливая формирование деменции средней тяжести, клинически выраженной тревоги и депрессии. Изолированная АГ и изолированная ИБС способствуют развитию менее выраженных дефицитов психологического дEMENTA.

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. Cao H, Zhao H, Shen L. Depression increased risk of coronary heart disease: A meta-

analysis of prospective cohort studies. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2022;9:913888. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.913888>

2. Нагибина ЮВ, Кубарева МИ, Князева ДС. Медико-социальные особенности больных ишемической болезнью сердца с различным уровнем депрессии. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2019;18(6):142-151. DOI: <https://doi.org/10.15829/1728-8800-2019-1930>

3. Khandaker GM, Zuber V, Rees JMB, et al. Shared mechanisms between coronary heart disease and depression: findings from a large UK general population-based cohort. *Molecular Psychiatry*. 2020;25(7):1477-1486. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0395-3>

4. Jiang X, Asmaro R, O'Sullivan DM, et al. Depression may be a risk factor for coronary heart disease in midlife women <65 years: A 9-year prospective cohort study. *International Journal of Cardiology*. 2018;271:8-12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.05.085>

5. Ma LY, Chen WW, Gao RL, et al. China cardiovascular diseases report 2018: an updated summary. *Journal of Geriatric Cardiology*. 2020;17(1):1-8. DOI: <https://doi.org/10.11909/j.issn.1671-5411.2020.01.001>

6. Межмидинова СК, Захаров ВВ, Вахнина НВ. Тревожно-депрессивные и мотивационные расстройства при артериальной гипертензии. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2021;13(2):40-46. DOI: <https://doi.org/10.14412/2074-2711-2021-2-40-46>

7. Van Agtmaal MJM, Houben AJHM, Pouwer F, et al. Association of microvascular dysfunction with late-life depression: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Psychiatry*. 2017;74(7):729-739. DOI: <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2017.0984>

8. Погосова НВ, Соколова ОЮ, Юферова ЮМ, и др. Психосоциальные факторы риска у пациентов с наиболее распространенными сердечно-сосудистыми заболеваниями - артериальной гипертонией и ишемической болезнью сердца (по данным российского многоцентрового исследования КОМЕТА). Кардиология. 2019;59(8):54-63. DOI: <https://doi.org/10.18087/cardio.2019.8.n469>

9. Pogosova N, Boytsov S, Bacquer DD, et al. Factors Associated with Anxiety and Depressive Symptoms in 2775 Patients with Arterial Hypertension and Coronary Heart Disease: Results from the COMETA Multicenter Study. *Global Heart*. 2021;16(1):73. DOI: <https://doi.org/10.5334/gh.1017>

10. Ткачева ОН, Котовская ЮВ, Руничина НК, и др. Комплексная гериатрическая оценка у пациентов пожилого и старческого возраста с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Экспертное мнение Российской Ассоциации Геронтологов и Гериатров. Кардиология. 2021;61(5):71-78. DOI: <https://doi.org/10.18087/cardio.2021.5.n1349>
11. Горелик СГ, Ильницкий АН, Прощаев КИ, и др. Опросники и шкалы в геронтологии и гериатрии. Геронтология. 2021;9(1):1-91.
12. Белова АН, Щепотова ОН. Шкалы, тесты и опросники в медицинской реабилитации: руководство для врачей и научных работников. М.: Антидор; 2002.
13. Кобалава ЖД, Конради АО, Недогода СВ. Клинические рекомендации «Артериальная гипертония у взрослых». М.: Российское кардиологическое общество; 2020.
14. Барбараши ОЛ, Карпов ЮА, Акчурин РС, и др. Клинические рекомендации «Стабильная ишемическая болезнь сердца». М.: Российское кардиологическое общество; 2020.
15. Яскевич РА. Уровни тревоги у бывших жителей заполярья пожилого возраста, страдающих артериальной гипертензией и ишемической болезнью сердца. Клиническая геронтология. 2021;27(9-10):65-66. DOI: <https://doi.org/10.26347/1607-2499202109-10023-066>
16. Lowe B, Levenson J, Depping M, et al. Somatic symptom disorder: a scoping review on the empirical evidence of a new diagnosis. Psychological Medicine. 2022;52(4):632-648. DOI: <https://doi.org/10.1017/s0033291721004177>
17. Asmare Y, Ali A, Belachew A. Magnitude and associated factors of depression among people with hypertension in Addis Ababa, Ethiopia: a hospital based cross-sectional study. BMC Psychiatry. 2022;22(1):327. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12888-022-03972-6>
18. Boima V, Tetteh J, Yorke E, et al. Older adults with hypertension have increased risk of depression compared to their younger counterparts: Evidence from the World Health Organization study of Global Ageing and Adult Health Wave 2 in Ghana. Journal of Affective Disorders. 2020;277:329-336. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2020.08.033>
19. Jahan H, Bernando C, Gonzalez-Chica D, et al. General practice management of depression among patients with coronary heart disease in Australia. BMC Primary Care. 2022;23(1):329. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12875-022-01938-x>
20. Abdisa L, Letta S, Nigussie K. Depression and anxiety among people with hypertension on follow-up in Eastern Ethiopia: A multi-center cross-sectional study. Frontiers in Psychiatry. 2022;13:853551. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpsy.2022.853551>
21. Nemcsik-Bencze Z, Korosi B, Gyongyosi H, et al. Depression and anxiety in different hypertension phenotypes: a cross-sectional study. Annals of General Psychiatry. 2022;21(1):23. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12991-022-00400-7>
22. Blumenthal JA, Smith PJ, Jiang W, et al. Effect of Exercise, Escitalopram, or Placebo on Anxiety in Patients With Coronary Heart Disease: The Understanding the Benefits of Exercise and Escitalopram in Anxious Patients With Coronary Heart Disease (UNWIND) Randomized Clinical Trial. JAMA Psychiatry. 2021;78(11):1270-1278. DOI: <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2021.2236>
23. Bao J, Liu Z, Zhang Z, et al. Relationship Between Hypertension and Cognitive Function in an Elderly Population: A Population-Based Study in Rural Northern China. Frontiers in Neurology. 2022;13:885598. DOI: <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.885598>
24. Gayda M, Gremiaux V, Bherer L, et al. Cognitive function in patients with stable coronary heart disease: Related cerebrovascular and cardiovascular responses. PLoS ONE. 2017;12(9):e0183791. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183791>
25. Васильева ЕИ, Опалинская ИВ, Васильева НП, и др. Сравнительный анализ когнитивных нарушений у пациентов с ишемической болезнью сердца и сахарным диабетом 2 типа с сопутствующей артериальной гипертензией. В: Бусалаева ЕИ, Барсукова ЕВ, Винокур ТЮ, редакторы. Выбор оптимальной стратегии у пациентов с сосудистыми заболеваниями. Региональный сосудистый центр 2019: итоги десятилетия. Материалы Международной научно-практической конференции; 29 мая 2019 г. Чебоксары: Издательство Чувашского университета; 2019:175-179.
26. Zuniga-Salazar GA, Hincapie-Arias SM, Salazar-Bolanos EE, et al. Impact of arterial hypertension on the cognitive function of patients between 45 and 65 years. Luis Vernaza Hospital, Guayaquil, Ecuador. Archivos de cardiolología de México. 2020;90(3):284-292. Spanish. DOI: <https://doi.org/10.24875/acm.20000350>
27. Stewart RA, Held C, Krug-Gourley S, et al. Cardiovascular and Lifestyle Risk Factors and

Cognitive Function in Patients With Stable Coronary Heart Disease. Journal of the American Heart Association. 2019;8(7):e010641. DOI: <https://doi.org/10.1161/jaha.118.010641>

References

1. Cao H, Zhao H, Shen L. Depression increased risk of coronary heart disease: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2022;9:913888. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.913888>
2. Nagibina YuV, Kubareva MI, Knyazeva DS. Medical and social features of patients with coronary artery disease and depression. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2019;18(6):142-151. Russian. DOI: <https://doi.org/10.15829/1728-8800-2019-1930>
3. Khandaker GM, Zuber V, Rees JMB, et al. Shared mechanisms between coronary heart disease and depression: findings from a large UK general population-based cohort. *Molecular Psychiatry*. 2020;25(7):1477-1486. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0395-3>
4. Jiang X, Asmaro R, O'Sullivan DM, et al. Depression may be a risk factor for coronary heart disease in midlife women <65 years: A 9-year prospective cohort study. *International Journal of Cardiology*. 2018;271:8-12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.05.085>
5. Ma LY, Chen WW, Gao RL, et al. China cardiovascular diseases report 2018: an updated summary. *Journal of Geriatric Cardiology*. 2020;17(1):1-8. DOI: <https://doi.org/10.11909/j.issn.1671-5411.2020.01.001>
6. Mezhmedinova SK, Zakharov VV, Vakhnina NV. Depression, anxiety and motivation in arterial hypertension. *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*. 2021;13(2):40-46. Russian. DOI: <https://doi.org/10.14412/2074-2711-2021-2-40-46>
7. Van Agtmaal MJM, Houben AJHM, Pouwer F, et al. Association of microvascular dysfunction with late-life depression: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Psychiatry*. 2017;74(7):729-739. DOI: <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2017.0984>
8. Pogosova NV, Sokolova OYu, Yufereva YuM, et al. Psychosocial Risk Factors in Patients With Most Common Cardiovascular Diseases Such as Hypertension and Coronary Artery Disease (Based on Results From the Russian Multicenter COMET Study). *Kardiologiya*. 2019;59(8):54-63. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18087/cardio.2019.8.n469>
9. Pogosova N, Boytsov S, Bacquer DD, et al. Factors Associated with Anxiety and Depressive Symptoms in 2775 Patients with Arterial Hypertension and Coronary Heart Disease: Results from the COMETA Multicenter Study. *Global Heart*. 2021;16(1):73. DOI: <https://doi.org/10.5334/gh.1017>
10. Tkacheva ON, Kotovskaya YuV, Runihina NK, et al. Comprehensive geriatric assessment in elderly and senile patients with cardiovascular diseases. Expert opinion of the Russian Association of Gerontologists and Geriatricians. *Kardiologiya*. 2021;61(5):71-78. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18087/cardio.2021.5.n1349>
11. Gorelik SG, Ilnitsky AN, Proschaeff KI, et al. Questionnaires and scales in gerontology and geriatrics. *Gerontology*. 2021;9(1):1-91. Russian.
12. Belova AN, Shchepetova ON. Scales, tests and questionnaires in medical rehabilitation: a guide for doctors and researchers. Moscow: Antidor; 2002. Russian.
13. Kobalava ZhD, Konradi AO, Nedogoda SV. Clinical recommendations "Arterial hypertension in adults". Moscow: Rossiyskoye kardiologicheskoye obshchestvo; 2020. Russian.
14. Barbarash OL, Karpov YuA, Akchurin RS., et al. Clinical recommendations "Stable ischemic heart disease". Moscow: Rossiyskoye kardiologicheskoye obshchestvo, 2020. Russian.
15. Yaskevich RA. Anxiety levels in elderly former residents of the Arctic region suffering from arterial hypertension and coronary heart disease. *Clinical Gerontology*. 2021;27(9-10):65-66. Russian. DOI: <https://doi.org/10.26347/1607-2499202109-10023-066>
16. Lowe B, Levenson J, Depping M, et al. Somatic symptom disorder: a scoping review on the empirical evidence of a new diagnosis. *Psychological Medicine*. 2022;52(4):632-648. DOI: <https://doi.org/10.1017/s0033291721004177>
17. Asmare Y, Ali A, Belachew A. Magnitude and associated factors of depression among people with hypertension in Addis Ababa, Ethiopia: a hospital based cross-sectional study. *BMC Psychiatry*. 2022;22(1):327. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12888-022-03972-6>
18. Boima V, Tetteh J, Yorke E, et al. Older adults with hypertension have increased risk of depression compared to their younger counterparts: Evidence from the World Health Organization study of Global Ageing and Adult Health Wave 2 in Ghana. *Journal of Affective Disorders*. 2020;277:329-336. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2020.08.033>

19.Jahan H, Bernando C, Gonzalez-Chica D, et al. General practice management of depression among patients with coronary heart disease in Australia. *BMC Primary Care.* 2022;23(1):329. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12875-022-01938-x>

20.Abdisa L, Letta S, Nigussie K. Depression and anxiety among people with hypertension on follow-up in Eastern Ethiopia: A multi-center cross-sectional study. *Frontiers in Psychiatry.* 2022;13:853551. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2022.853551>

21.Nemcsik-Bencze Z, Korosi B, Gyongyosi H, et al. Depression and anxiety in different hypertension phenotypes: a cross-sectional study. *Annals of General Psychiatry.* 2022;21(1):23. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12991-022-00400-7>

22.Blumenthal JA, Smith PJ, Jiang W, et al. Effect of Exercise, Escitalopram, or Placebo on Anxiety in Patients With Coronary Heart Disease: The Understanding the Benefits of Exercise and Escitalopram in Anxious Patients With Coronary Heart Disease (UNWIND) Randomized Clinical Trial. *JAMA Psychiatry.* 2021;78(11):1270-1278. DOI: <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2021.2236>

23.Bao J, Liu Z, Zhang Z, et al. Relationship Between Hypertension and Cognitive Function in an Elderly Population: A Population-Based Study in Rural Northern China. *Frontiers in Neurology.* 2022;13:885598. DOI: <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.885598>

24.Gayda M, Gremeaux V, Bherer L, et al. Cognitive function in patients with stable coronary heart disease: Related cerebrovascular and cardiovascular responses. *PLoS ONE.* 2017;12(9):e0183791. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183791>

25.Vasilyeva EI, Opalinskaya IV, Vasilyeva NP, et al. Comparative analysis of cognitive impairment in patients with coronary heart disease and type 2 diabetes mellitus with concomitant arterial hypertension. In: Busalaeva EI, Barsukova EV, Vinokur TY, editors. Choosing the optimal strategy in patients with vascular diseases. Regional Vascular Center 2019: results of the decade. Proceedings of the Interdisciplinary Scientific and Practical Conference; May 29, 2019. Cheboksary: Izdatel'stvo Chuvashskogo universiteta; 2019:175-179. Russian.

26.Zuniga-Salazar GA, Hincapie-Arias SM, Salazar-Bolanos EE, et al. Impact of arterial hypertension on the cognitive function of patients between 45 and 65 years. Luis Vernaza Hospital, Guayaquil, Ecuador. *Archivos de cardiología de México.* 2020;90(3):284-292. Spanish. DOI: <https://doi.org/10.24875/acm.20000350>

27.Stewart RA, Held C, Krug-Gourley S, et al. Cardiovascular and Lifestyle Risk Factors and Cognitive Function in Patients With Stable Coronary Heart Disease. *Journal of the American Heart Association.* 2019;8(7):e010641. DOI: <https://doi.org/10.1161/jaha.118.010641>

Статья поступила в редакцию 14 июля 2023 г.
Поступила после доработки 5 сентября 2023 г.
Принята к печати 27 сентября 2023 г.

Received 14 July 2023
Revised 5 September 2023
Accepted 27 September 2023

Информация об авторах

Алексей Викторович Чернов, доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой физической и реабилитационной медицины, гериатрии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко», г. Воронеж, Российская Федерация, E-mail: kaf-frm@vrngmu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8762-6326>.

Надежда Александровна Щетинина, ассистент кафедры управления в здравоохранении ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко», г. Воронеж, Российская Федерация, E-mail: n.a.schetinina@vrngmu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8881-2019>.

Виктор Анатольевич Негребецкий, клинический ординатор ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: va-ivanov@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5318-1544>.

Information about the authors

Aleksey V. Chernov, Doct. Sci. (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Physical and Rehabilitation Medicine, Geriatrics, Burdenko Voronezh State Medical University, Voronezh, Russia, E-mail: kaf-frm@vrngmu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8762-6326>.

Nadezhda A. Shchetinina, Assistant at the Department of Management in Healthcare, Burdenko Voronezh State Medical University, Voronezh, Russia, E-mail: n.a.schetinina@vrngmu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8881-2019>.

Viktor A. Negrebetskiy, Clinical Resident, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia, E-mail: va-ivanov@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5318-1544.5>