

ISSN 2658-6533

# НАУЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

---

БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

---

## RESEARCH RESULTS IN BIOMEDICINE

**8(2) 2022**

**16+**

сетевой научный рецензируемый журнал  
online scholarly peer-reviewed journal

Сайт журнала:  
[rrmedicine.ru](http://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 8, №2. 2022

СЕТЕВОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Издаётся с 2014 г.

ISSN 2658-6533



Volume 8, №2. 2022

ONLINE SCHOLARLY PEER-REVIEWED JOURNAL

First published online: 2014

ISSN 2658-6533

### РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

**ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР:** Чурносов М.И., доктор медицинских наук, профессор, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, РФ  
**ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА:** 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

**Ворсанова С.Г.**, доктор биологических наук, профессор, Научно-исследовательский клинический институт педиатрии имени академика Ю.Е. Вельтищева ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова», Москва, РФ

**Галенко-Ярошевский П.А.**, член-корреспондент Российской академии наук, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет», Краснодар, РФ

**Жернакова Н.И.**, доктор медицинских наук, профессор, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, РФ

**Иллиг Т.**, доктор естественных наук, профессор, Ганноверский объединенный биобанк Медицинской школы Ганновера, Ганновер, Германия

**Кубешова Х.М.**, MD, PhD, профессор, Масариков университет, Брно, Чехия

**Малерба Дж.**, PhD, профессор медицинской генетики, Университет Вероны, Верона, Италия

**Милкович Б.**, PhD, профессор, Белградский университет, Белград, Сербия

**Нкенке Э.**, MD, DMD, MA, доктор медицинских наук, профессор, Венский медицинский университет, Вена, Австрия

**Покровский М.В.**, доктор медицинских наук, профессор, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, РФ

**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

### 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

**S.G. Vorsanova**, Doct. Sci. (Biology), Professor, Veltischev Research and Clinical Institute for Pediatrics of Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

**P.A. Galenko-Yaroshevsky**, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

**N.I. Zhernakova**, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia

**T. Illig**, Dr. rer. nat., Professor, Hanover Unified Biobank of Hannover Medical School, Hannover, Germany

**H.M. Kubeshova**, MD, PhD, Professor, Masaryk University, Brno, Czech Republic

**G. Malerba**, PhD, Professor of Medical Genetics, University of Verona, Verona, Italy

**B. Miljkovic**, PhD, Professor, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

**E. Nkenke**, MD, DMD, MA, Dr. rer. medic., Full Professor, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

**M.V. Pokrovsky**, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia

**A.V. Polonikov**, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Kursk State Medical University, Kursk, Russia

**K.I. Proshchaev**, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Research Medical Center "Gerontology", Moscow, Russia

**V.E. Radzinsky**, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

**V.V. Ruzhenkova**, Doct. Sci. (Medicine), Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia

**A.V. Sorokin**, Cand. Sci. (Medicine), National Heart, Lung, and Blood Institute, Bethesda, USA

**V.A. Stepanov**, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Doct. Sci. (Biology), Professor, Research Institute of Medical Genetics of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

**M.B. Freydin**, Doct. Sci. (Biology), King's College London, London, UK

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

**Сорокин А.В.**, кандидат медицинских наук, Национальный институт сердца, легких и крови, Бетесда, США  
**Степанов В.А.**, член-корреспондент Российской академии наук, доктор биологических наук, профессор, НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, Томск, РФ  
**Фрейдин М.Б.**, доктор биологических наук, Королевский колледж Лондона, Лондон, Великобритания  
**Хамошина М.Б.**, доктор медицинских наук, профессор, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, РФ  
**Хуснутдинова Э.К.**, член-корреспондент Российской академии образования, доктор биологических наук, профессор, Институт биохимии и генетики Уфимского Федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, РФ  
**Цыганков Б.Д.**, член-корреспондент Российской академии наук, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова», Москва, РФ  
**Эберт А.Д.**, PhD, доктор медицинских наук, профессор, Клиника женского здоровья, гинекологии и акушерства, Берлин, Германия

#### РЕДАКЦИЯ ЖУРНАЛА:

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

**E.K. Khusnutdinova**, Corresponding Member of the Russian Academy of Education, Doct. Sci. (Biology), Professor, Institute of Biochemistry and Genetics of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia  
**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

<b>Iuliia E. Azarova, Yaroslava E. Korvyakova, Alexander O. Glotov, Vladimir E. Ivakin, Alexey V. Polonikov</b> Association of polymorphism rs10841855 in the glycogen synthase 2 gene with hypercholesterolemia and type 2 diabetes mellitus	<b>Iuliia E. Azarova, Yaroslava E. Korvyakova, Alexander O. Glotov, Vladimir E. Ivakin, Alexey V. Polonikov Association</b> of polymorphism rs10841855 in the glycogen synthase 2 gene with hypercholesterolemia and type 2 diabetes mellitus	<b>138</b>	<b>138</b>
<b>Irina K. Malashenkova, Vadim L. Ushakov, Sergey A. Krynskiy, Daniil P. Ogurtsov, Nikita A. Khailov, Svetlana N. Moskvina, Natalia V. Zakharova, Ekaterina I. Chekulaeva, Nikolay A. Didkovsky, Georgiy P. Kostyuk</b> The association of inflammatory status and immunological parameters with single-nucleotide polymorphisms of cytokine and Toll-like receptor genes in patients with schizophrenia	<b>Irina K. Malashenkova, Vadim L. Ushakov, Sergey A. Krynskiy, Daniil P. Ogurtsov, Nikita A. Khailov, Svetlana N. Moskvina, Natalia V. Zakharova, Ekaterina I. Chekulaeva, Nikolay A. Didkovsky, Georgiy P. Kostyuk</b> The association of inflammatory status and immunological parameters with single-nucleotide polymorphisms of cytokine and Toll-like receptor genes in patients with schizophrenia	<b>148</b>	<b>148</b>
<b>И.Р. Гилязова, Д.Д. Асадуллина, Е.А. Иванова, Р.Р. Рахимов, А.А. Измайлов, М.А. Бермишева, Г.Р. Гилязова, И.А. Шарифгалиев, М.Ф. Урманцев, Е.В. Попова, Р.Я. Сафиханов, В.Н. Павлов, Э.К. Хуснутдинова</b> Герминальные мутации как возможные биомаркеры эффективности терапии ингибиторами контрольных точек иммунитета у пациентов с почечно-клеточной карциномой (мини-обзор)	<b>Ирина R. Gilyazova, Dilara D. Asadullina, Elizaveta A. Ivanova, Radmir R. Rakhimov, Adel A. Izmailov, Marina A. Bermisheva, Gulshat R. Gilyazova, Ildar A. Sharifgaleev, Marat F. Urmantsev, Ekaterina V. Popova, Rishat Ya. Safikhanov, Valentin N. Pavlov, Elza K. Khusnudinova</b> Germline mutations as possible biomarkers of immune checkpoint inhibitor therapy efficacy in patients with renal cell carcinoma (mini review)	<b>164</b>	<b>164</b>
<b>Н.В. Павлова, В.С. Орлова, И.В. Батлукская, О.А. Ефремова, И.В. Пономаренко</b> Роль высокопенетрантных мутаций в генах <i>BRCA1</i> и <i>CHEK2</i> в характере ассоциаций полиморфизма генов матриксных металлопротеиназ с раком молочной железы	<b>Nadezhda V. Pavlova, Valentina S. Orlova, Irina V. Batlutskaya, Olga A. Efremova, Irina V. Ponomarenko</b> The role of highly penetrant mutations in <i>BRCA1</i> and <i>CHEK2</i> genes in the pattern of associations of matrix metalloproteinase gene polymorphisms with breast cancer	<b>180</b>	<b>180</b>

**ФАРМАКОЛОГИЯ,  
КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ**

**PHARMACOLOGY**

Elena V. Kovtun, Eleonora F. Stepanova, Maxim V. Chernikov, Dmitry I. Pozdnyakov, Natalia B. Shabanova, Anastasia D. Gerashchenko, Lyudmila V. Pogrebnyak, Dmitry Tworowsky Pharmacological characteristics of intranasal dosage forms containing Ginkgo biloba extracts	198	Elena V. Kovtun, Eleonora F. Stepanova, Maxim V. Chernikov, Dmitry I. Pozdnyakov, Natalia B. Shabanova, Anastasia D. Gerashchenko, Lyudmila V. Pogrebnyak, Dmitry Tworowsky Pharmacological characteristics of intranasal dosage forms containing Ginkgo biloba extracts	198
В.А. Королев, А.В. Седых, Ю.Э. Азарова, Е.В. Фелькер, Л.А. Ячменева, И.В. Королев, Е.В. Королев Состояние глутатионового звена антиоксидантной защиты организма при фунгицидной интоксикации и коррекции витамином А и расторопшей	207	Vladimir A. Korolev, Anastasia V. Sedykh, Yulia E. Azarova, Elena V. Felker, Lilia A. Yachmeneva, Ivan V. Korolev, Egor V. Korolev Status of the glutathione antioxidant defense in fungicide intoxication and correction with vitamin A and milk thistle	207

**КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА**

**MEDICINE**

Santhi Silambanan, Teena Koshy, Mahesh K. K, Jasmine Ch. A, Emmanuel Bhaskar, Swathy Moorthy Correlation of Biochemical Abnormalities with the Severity of Hospitalized Covid-19 Patients	221	Santhi Silambanan, Teena Koshy, Mahesh K. K, Jasmine Ch. A, Emmanuel Bhaskar, Swathy Moorthy Correlation of Biochemical Abnormalities with the Severity of Hospitalized Covid-19 Patients	221
М.Д. Бароева, Л.С. Попова, Ф.С. Датиева, Л.В. Цаллагова, Е.К. Басаева Сравнительный анализ качества сна здоровых девушки и женщин в период гестации	234	Madina D. Baroeva, Larisa S. Popova, Fatima S. Datieva, Larisa V. Tsallagova, Elena K. Basaeva Comparative analysis of sleep quality in healthy girls and women during gestation	234
В.А. Борозенцева, В.Ю. Борозенцев, К.И. Прощаев, А.Н. Ильницкий, Т.В. Степанова, Э.В. Фесенко, Е.А. Воронина Характеристика питания у людей пожилого возраста с адентией: гериатрические и диетологические аспекты	246	Vita A. Borozentseva, Vladislav Yu. Borozentsev, Kirill I. Prashchayeu, Andrei N. Ilnitski, Tat'yana V. Stepanova, Elvira V. Fesenko, Elena A. Voronina Characteristics of nutrition in elderly people with dentition: geriatric and dietary aspects	246
Т.С. Гурко, Н.М. Агарков, И.В. Лев, Е.Н. Коровин, Х.Ф. Леон Особенности постуральных нарушений и связей с системой комплемента крови при синдроме падений у пожилых	259	Tatyana S. Gurko, Nikolay M. Agarkov, Inna V. Lev, Evgeniy N. Korovin, German F. Leon Peculiarities of postural disorders and connections with the blood complement system in the case of falls syndrome in the elderly	259

ГЕНЕТИКА  
GENETICS



DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-1

УДК 575.174.015.3:616.379-008.64

# Association of polymorphism rs10841855 in the glycogen synthase 2 gene with hypercholesterolemia and type 2 diabetes mellitus

Iuliia E. Azarova , Yaroslava E. Korvyakova , Alexander O. Glotov ,  
Vladimir E. Ivakin , Alexey V. Polonikov

Kursk State Medical University,  
3 Karl Marx St., Kursk, 305041, Russia  
Corresponding author: Iuliia E. Azarova (azzzzar@yandex.ru)

## Abstract

**Background:** Glycogen synthase 2 (GYS2) catalyzes a key step in glycogenesis in the liver. *Loss-of-function* mutations in the *GYS2* gene are associated with type 0a glycogenosis with characteristic fasting hypoglycemia and postprandial hyperglycemia. The association of the single nucleotide polymorphism rs10841855 (G>T) with the risk of type 2 diabetes mellitus (T2D) was first established in the European population, but data on the effect of this variant on the predisposition to T2D in the inhabitants of the Slavic ethnic group of Central Russia are not available in the literature. **The aim of the study:** To investigate the association of polymorphism rs10841855 (G>T) *GYS2* with the risk of T2D in residents of Central Russia. **Materials and methods:** The study included 2668 unrelated individuals of Slavic origin, including 1387 patients with T2D and 1281 healthy volunteers. Genotyping of the rs10841855 polymorphism of the *GYS2* gene was performed by the MassArray Analyzer-4 genetic analyzer. SNPStats software was used for statistical analysis of the data. **Results:** Linear regression established an association of the alternative rs10841855-T allele (OR 1.25; 95% CI 1.09-1.43; P=0.001) and the rs10841855-G/T genotype (OR 1.37; 95% CI 1, 13-1.66; P=0.0064) of *GYS2* with an increased risk of T2D. The sex- and BMI-stratified analysis showed that the association of the rs10841855-G/T genotype (OR 1.71; 95% CI 1.32-2.22; P=0.0001) occurred only in females with BMI>25 kg/m<sup>2</sup>. In addition, carriage of the rs10841855-T allele was associated with a higher level of total cholesterol in the blood plasma of T2D patients (P=0.0068). According to the Roadmap Epigenomic Consortium, the rs10841855-T allele is associated with H3K4 histone methylation in the enhancer and promoter regions of the *GYS2* gene in the liver. **Conclusion:** The association of rs10841855 of the *GYS2* gene with an increased risk of T2D in residents of Central Russia was validated for the first time. The association may be explained by the low transcriptional activity of the glycogen synthase 2 gene in the carriers of the alternative allele of this polymorphism.

**Keywords:** type 2 diabetes mellitus; single nucleotide polymorphism; *GYS2*; glycogen synthase; genetic predisposition

**For citation:** Azarova IE, Korvyakova YaE, Glotov AO, et al. Association of polymorphism rs10841855 in the glycogen synthase 2 gene with hypercholesterolemia and type 2 diabetes mellitus. Research Results in Biomedicine. 2022;8(2):138-147. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-1

**Introduction.** According to the International Diabetes Federation, there are more than 537 million diabetic patients worldwide aged 20 to 79 years, with 90 percent having type 2 diabetes mellitus (T2D) [1]. The pathogenetic basis of the disease is dysfunction of pancreatic beta cells that secrete insulin, as well as insulin resistance of the liver, skeletal muscle, and adipose tissue, resulting in chronic hyperglycemia and disruption of all types of metabolism [2]. Type 2 diabetes complications include diabetic retinopathy, nephropathy, neuropathy, and macrovascular complications, which killed 6.7 million people in 2021 [1].

Type 2 diabetes mellitus is a classic multifactorial disease caused by genetic and environmental risk factors such as an excessive fat and refined carbohydrate diet [3, 4], sedentary lifestyle [5, 6], overweight and obesity [7, 8], chronic psycho-emotional stress [7, 8], and others. The genetic basis of the disease is being studied extensively: from 2007 to the present, 197 genome-wide association studies (GWAS) for T2D have been conducted worldwide, yielding a total of over four thousand single nucleotide markers (SNPs) [GWAS Catalog <https://www.ebi.ac.uk/gwas/>]. The majority of the detected loci are in non-coding regions of the genome, pseudogenes, and intergenic regions, which significantly complicates biological interpretation of the existing data layer and impedes clinical application of the results obtained. One of the polymorphic variants identified by R.A. Scott et al. in a genome-wide study in a European population of 159,208 people [9] became the SNP rs10841855 in the intron of the GYS2 gene, which encodes hepatic glycogen synthase 2. The enzyme catalyzes a critical step in hepatic glycogenesis, and its functional deficiency caused by GYS2 gene loss-of-function mutations is known as type 0a glycogenesis, which is characterized by fasting ketotic hypoglycemia and postprandial hyperglycemia due to the liver's inability to store glycogen [10, 11]. It should be noted that the liver plays a critical role in maintaining

normal glucose homeostasis by catalyzing the conversion of glucose into glycogen under hyperglycemia, as well as the processes of glucose regeneration from non-carbohydrate precursors (gluconeogenesis) and glycogenolysis under glucose deficiency in the blood. Violations of the liver's glucostatic function can result in T2D: specifically, a decrease in the function of pancreatic beta-cell glucokinase leads to the development of maturity-onset diabetes of the young, MODY2 [12]. There is no data in the literature on the effect of the rs10841855 variant in the glycogen synthase 2 gene on predisposition to T2D in residents of the Slavic ethnic group of Central Russia, necessitating this validation study.

**The aim of the study.** To analyze the association of the polymorphic variant rs10841855 (G>T) of the GYS2 gene with the risk of T2D in residents of Central Russia.

**Materials and methods.** The KSMU Regional Ethics Committee approved the study protocol. The study included 1387 T2D patients (527 males and 860 females) with a mean age of  $61,2 \pm 6,9$  years who received treatment at the Endocrinology Department of the City Clinical Emergency Hospital, Kursk, from November 2016 to October 2019. Endocrinologists confirmed the diagnosis of T2D using World Health Organization criteria [9, 10]. As previously described [13, 14, 15], 1281 healthy donors from the Regional Blood Transfusion Station (492 males and 789 females) with an average age of  $60,7 \pm 5,6$  years were invited to participate in the control group. On an empty stomach, all study participants completed a questionnaire to identify the main risk factors and gave 10 ml of venous blood. The phenol-chloroform method was used to extract genomic DNA from whole blood. The GYS2 gene was genotyped for rs10841855 (G>T) using iPLEX technology on a MassArray Analyzer 4 genomic mass spectrometer (Agena Bioscience). The concentrations of carbohydrate and lipid metabolism parameters (glucose, glycated hemoglobin, triglycerides,

total cholesterol, low- and high-density lipoproteins) were measured using a semi-automatic biochemical analyzer Clima MC-15 (RAL). The bioinformatics analysis was carried out using the online resources STRING (<https://string-db.org>) for visual assessment of the GYS2 interactome at the level of protein gene products; GTEx Portal (<https://gtexportal.org>) to study tissue-specific expression of the *GYS2* gene in carriers of variant rs10841855 alleles; and Haploreg v4.1 (<https://pubs.broadinstitute.org/mammals/>) to study epigenetic regulation of the *GYS2* gene. The atSNP resource (<http://atsnp.biostat.wisc.edu>) was used to investigate transcription factor affinity in the SNP region. The collected data were statistically analyzed with the SNPStats program (<https://www.snpstats.net/start.htm>). Co-dominant, dominant, recessive, over-dominant, and log-additive genetic models were all tested. As the best model, the one with the lowest numerical value of the Akaike criterion was

chosen. At  $P<0.05$ , the association was deemed significant. The Kolmogorov-Smirnov test was used to determine the normality of the distribution of biochemical parameters. Non-normally distributed indicators were labeled as median (Median), first (Q1), and third (Q3) quartiles: Median [Q1; Q3]. In such cases, the Kruskal-Wallis test was used to determine statistical significance. The observed differences between groups were considered statistically significant at  $P<0.05$ .

**Results and Discussion.** The studied SNP conformed to the Hardy-Weinberg equilibrium ( $P>0.05$ ). According to data from the 1000 Genomes project deposited with Ensembl (<https://www.ensembl.org>), the frequency of the minor allele T of the studied SNP of the *GYS2* gene in the Central Russian population was significantly lower than in the European population. Figure 1 shows a diagram of the rs10841855 genotype frequencies.

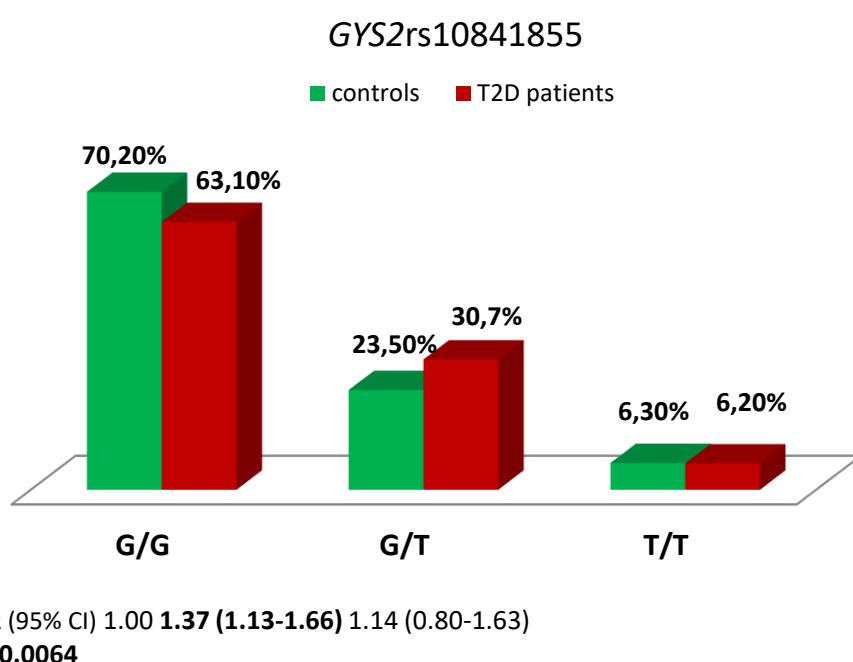


Fig. 1. Genotype and allele frequencies for rs10841855 in the *GYS2* gene in T2D patients and controls

The genotype rs10841855-G/T *GYS2* was associated with an increased risk of developing T2D (OR 1.37; 95% CI 1.13-1.66; P=0.0064). The minor allele rs10841855-T

(OR 1.25; 95 % CI 1.09-1.43; P=0.001) was significantly more common in the DM2 group (21.6%) than in the control group (18.1%).

Table 1

**Analysis of frequencies of the GYS2 genotypes and alleles in T2D patients and controls stratified by gender and body mass index**

GYS2 SNP	Genotype	Controls	T2D patients	OR (95% CI)*	P*	Controls	T2D patients	OR (95% CI)*	P*	
Males										
BMI<25 kg/m <sup>2</sup>										
rs10841855 G>T	G/G	59 (62.8)	72 (69.2)	1.00	0.36	267 (67.1)	273 (64.5)	1.00	0.69	
	G/T	28 (29.8)	23 (22.1)	0.63 (0.33-1.22)		113 (28.4)	124 (29.3)	1.03 (0.76-1.41)		
	T/T	7 (7.5)	9 (8.7)	1.08 (0.38-3.08)	0.60	18 (4.5)	26 (6.2)	1.31 (0.70-2.47)	0.29	
	T	22.3	19.7	0.85 (0.53-1.38)		18.7	20.8	1.14 (0.89-1.46)		
Females										
	BMI<25 kg/m <sup>2</sup>				BMI≥25 kg/m <sup>2</sup>					
	G/G	107 (72.3)	50 (62.5)	1.00	0.31	466 (72.7)	480 (61.5)	1.00	0.0001	
	G/T	28 (18.9)	21 (26.2)	1.68 (0.83-3.39)		132 (20.6)	258 (33.1)	<b>1.71 (1.32-2.22)</b>		
	T/T	13 (8.8)	9 (11.2)	1.12 (0.42-3.00)		43 (6.7)	42 (5.4)	0.86 (0.54-1.37)		
	T	18.2	24.4	1.44 (0.91-2.30)	0.12	17.0	21.9	<b>1.37 (1.13-1.66)</b>	<b>0.001</b>	

Note: \* calculations are performed with adjustments for age (codominant model)

Table 2

**Associations of the GYS2 genotypes with the total cholesterol plasma level of T2D patients**

GYS2 genotype	Total cholesterol concentration, Me (Q1; Q3), mmol/L	P
Entire group of T2D patients		
G/G	5.02 (4.26; 6.1)	0.0068
G/T	5.36 (4.3; 6.27)	
T/T	5.33 (4.3; 6.05)	
Males with T2D		
G/G	4.84 (4.05; 5.73)	0.16
G/T	5.2 (4.19; 6.22)	
T/T	5.1 (4.09; 5.56)	
Females with T2D		
G/G	5.10 (4.37; 6.29)	0.11
G/T	5.40 (4.33; 6.29)	
T/T	5.56 (4.36; 6.4)	

Table 1 shows the results of the sex- and BMI-stratified analysis of the associations of the studied *GYS2* polymorphism with the risk of T2D. The association of the genotype rs10841855-G/T (OR 1.71; 95% CI 1.32-2.22; P=0.0001) was found to be typical only for overweight and obese females. The described risk association was not observed in females with normal body weight or in males, regardless of BMI (P>0.05). Furthermore, when the relationship between *GYS2* genotypes and biochemical parameters of T2D patients' plasma was examined, it was discovered that carrying the rs10841855-T allele was associated with a higher level of total cholesterol in the blood plasma of T2D patients (P=0.0068, Table 2).

The enzyme glycogen synthase 2 (2.4.1.11) was identified on the metabolic map of carbohydrate metabolism using the KEGG Pathways resource (Fig. 2). The enzyme controls the glycogenesis process, which begins in the liver with the phosphorylation of glucose by glucokinase (2.7.1.2). Phosphoglucomutase converts the reaction product, glucose-6-phosphate, to glucose-1-phosphate (5.4.2.5). UDP-glucosyl pyrophosphorylase (2.4.1.29) uses the energy of one UTP molecule to convert glucose-1-phosphate to UDP-glucose. The enzyme glycogen synthase 2 (2.4.1.11) was identified on the metabolic map of carbohydrate metabolism using the KEGG Pathways resource (Fig. 2). The enzyme controls the glycogenesis process, which begins in the liver with the phosphorylation of glucose by glucokinase (2.7.1.2). Phosphoglucomutase converts the reaction product, glucose-6-phosphate, to glucose-1-phosphate (5.4.2.5). UDP-glucosyl pyrophosphorylase (2.4.1.29) uses the energy of one UTP molecule to convert glucose-1-phosphate to UDP-glucose.

Glycogen synthase is involved in the process at 10-20 glucose residues in the primer chain, catalyzing chain elongation by forming alpha<sub>1</sub>→4-glycosidic bonds. A branching

enzyme (amylo-(1→4)-(1→6)-transglycosylase) that forms alpha<sub>1</sub>→6 glycosidic bonds creates branch points in glycogen. Glycogen synthase activity is regulated both allosterically and covalently [17]. Simultaneously, insulin is the primary activator of glycogenesis, promoting the dissociation of hepatic glycogen synthase from the intranuclear complex with the regulatory protein and its release into the cytosol for subsequent glucose phosphorylation [18]. Glucose-6-phosphate, a reaction product, is an important allosteric activator of GYS2 [19]. Protein kinase A (PKA), protein kinase C (PKC), AMP kinase (AMPK), glycogen synthase kinase 3 (GSK3), and other kinases phosphorylate the GYS2 enzyme at seven amino acid residues. Insulin inhibits GSK3, which keeps glycogen synthase 2 active (dephosphorylated) [20]. Furthermore, insulin signaling activates PDE3B via PKB, preventing cAMP-mediated phosphorylation of GYS2 [18].

Functional partners of GYS2 (STRING data) form an interactome network of 10 proteins (Fig. 3), including glycogenin 1 (GYG1), glycogenin 2 (GYG2), glycogen-binding domain-containing protein 1 (STBD1), protein phosphatase 1 regulatory subunit 3C (PPP1R3C), regulatory subunit 3B protein phosphatase 1 (PPP1R3B), serine/threonine protein phosphatase 1 catalytic alpha subunit (PPP1CA), serine/threonine protein phosphatase 1 catalytic beta subunit (PPP1CB), serine/threonine protein phosphatase 1 catalytic gamma subunit (PPP1CC), and laforin (EPM2A). According to the Gene Ontology analysis, all of the listed proteins are involved in glycogen metabolism (FDR=3.55×10<sup>-22</sup>). GYS2, GYG1, GYG2, EPM2A, PPP1R3C, and STBD1 are six network enzymes involved in glycogen biosynthesis (FDR=5.96×10<sup>-10</sup>), PPP1CA, PPP1CB, and PPP1CC are three proteins involved in the circadian regulation of gene expression (FDR=1.70×10<sup>-3</sup>).

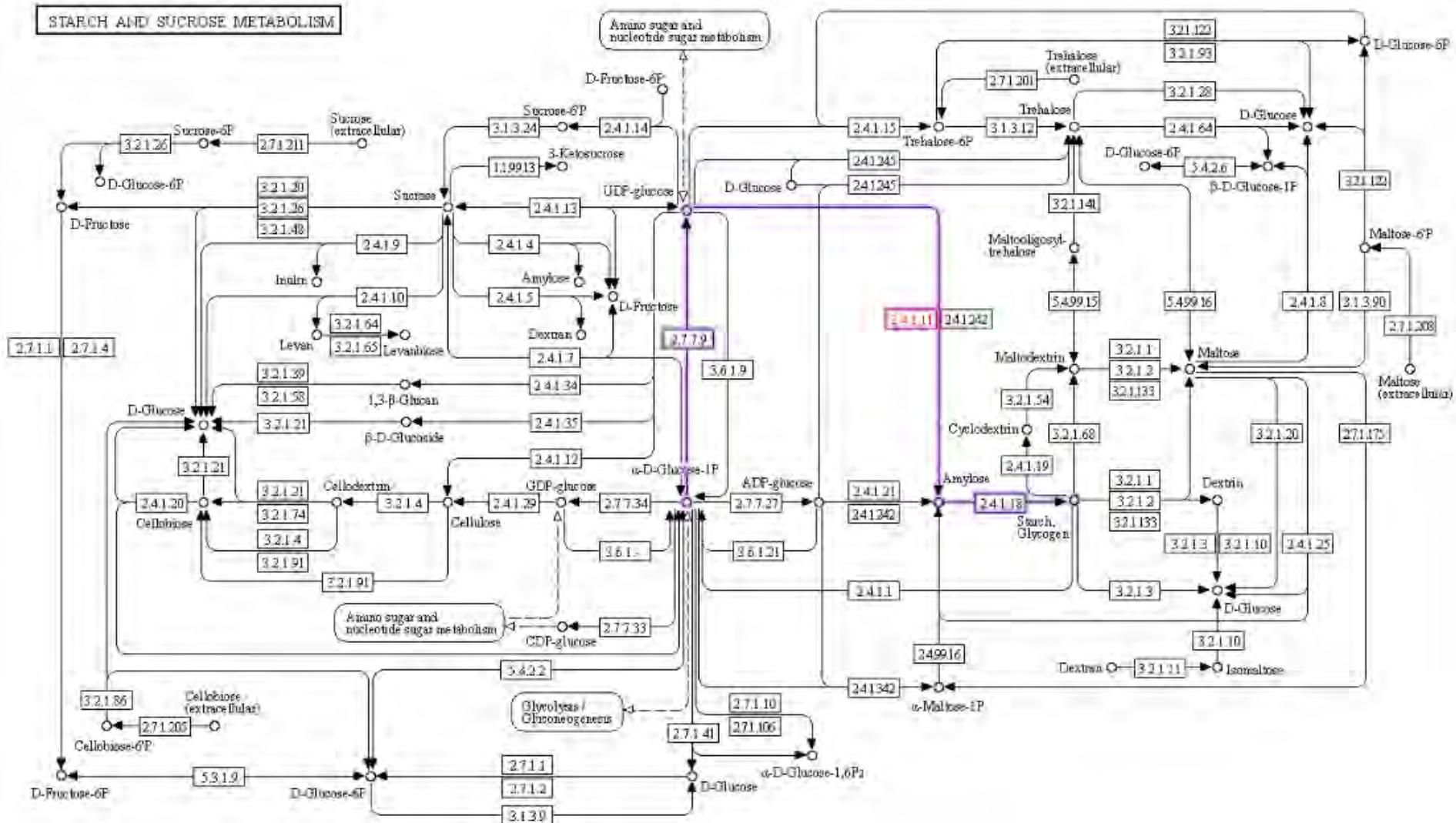


Fig. 2. Glycogen metabolism (KEGG pathways data <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)

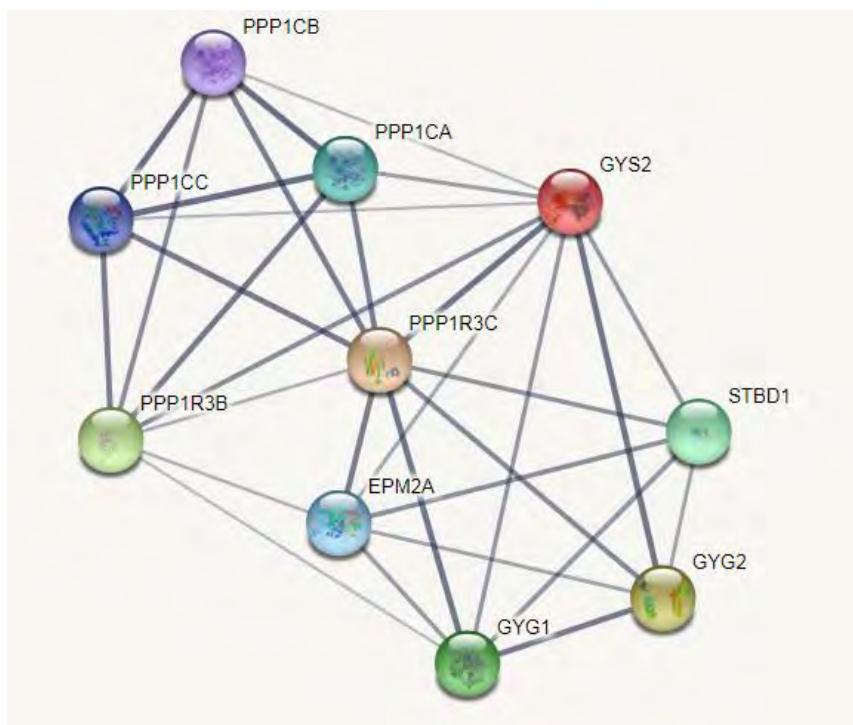


Fig. 3. GYS2 protein network

The current study successfully validated the association between the polymorphic locus rs10841855 in the regulatory region of the GYS2 gene and an increased risk of T2D in residents of Central Russia. The link between this locus and the disease was discovered in a genome-wide study on a European sample of 159208 people [9], where the rs10841855-G allele was linked to an increased risk of developing the disease. The alternative allele rs10841855-T was found to be risky in our study. The rs10841855-T allele has also been linked to a predisposition to T2D in the Japanese population [21]. The literature describes associations of GYS2 gene loss-of-function mutations with the development of glycogenesis type 0 [10] and type 0a [11], in which glycogen synthesis in the liver is disrupted, resulting in ketosis, fasting hypoglycemia with a decrease in lactate and alanine levels, and long-term persistent postprandial hyperglycemia. Increased glycogenesis in the liver of Ankit mice with the T2D phenotype, on the other hand, resulted in decreased hyperglycemia and normalization of liver energy homeostasis [22]. J. Chen et al. discovered a link between GYS2 gene polymorphism and blood plasma

insulin levels [23], and a study in the Korean population established an association between GYS2 and obesity, polycystic ovary syndrome, and gestational diabetes mellitus [24].

The current study demonstrated for the first time a link between carrying the rs10841855-T allele and a higher total cholesterol content in the blood plasma of T2D patients, which is explained by the outflow of glucose-6-phosphate accumulating in the liver into lipogenesis, which includes the synthesis of triacylglycerols and cholesterol synthesis.

The rs10841855-T allele is not associated with changes in gene expression in the liver, according to GTEx Portal experimental data. According to the Roadmap Epigenomic Consortium, the rs10841855-T allele is associated with four epigenetic marks in the liver: H3K4me1, H3K27ac in the enhancer region, and H3K4me3, H3K9ac in the GYS2 gene promoter, indicating that the studied variant has significant epigenetic regulatory potential. Interestingly, A. Sharifi-Zarchi discovered that weakly methylated DNA regions are high in H3K4me3, whereas highly methylated genome regions correspond to the H3K4me1 mark [25].

An analysis of transcription factor (TF) binding ability using the bioinformatics tool atSNP revealed that the minor allele rs10841855-T significantly reduces the affinity of three TFs: FOXO1 ( $P=3,76\times10^{-3}$ ), FOXJ1 ( $P=4,60\times10^{-3}$ ), and SOX10 ( $P=7,29\times10^{-3}$ ) preventing them from binding to DNA in the region of that variant allele. It should be noted that FOXO1 in the liver acts as a gluconeogenesis activator [26] and is the primary target of insulin signaling [27].

**Conclusion.** Thus, the study discovered an association of the GYS2 gene rs10841855 with hypercholesterolemia and an increased risk of T2D in overweight and obese females, which may be due to epigenetic mechanisms of regulation of glycogen synthase 2 gene activity, as well as changes in the network of transcription factors that modulate glucose metabolism in carriers of the alternative allele rs10841855-T. More research, including pharmacogenetic approaches [28], will be needed to determine whether this polymorphism affects the efficacy of type 2 diabetes mellitus treatment.

### Financial support

The study was supported by the Russian Science Foundation (N20-15-00227).

### Conflict of interests

The authors have no conflict of interest to declare.

### References

1. Sun H, Saeedi P, Karuranga S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 2022;183:109119. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109119>
2. DeFronzo RA. Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. In: Bonora E, DeFronzo R, editors. *Diabetes. Epidemiology, Genetics, Pathogenesis, Diagnosis, Prevention, and Treatment. Endocrinology.* Springer, Cham; 2018:1-74. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-27317-4\\_8-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-27317-4_8-1)
3. Skovsø S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *Journal of Diabetes Investigation.* 2014;5(4):349-358. DOI: <https://doi.org/10.1111/jdi.12235>
4. Malik VS, Hu FB. Sweeteners and risk of obesity and type 2 diabetes: the role of sugar-sweetened beverages. *Current Diabetes Reports.* 2012;12(2):195-203. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11892-012-0259-6>
5. Li DD, Yang Y, Gao ZY, et al. Sedentary lifestyle and body composition in type 2 diabetes. *Diabetology and Metabolic Syndrome.* 2022;14(1):1-11. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13098-021-00778-6>
6. Bertoglia MP, Gormaz JG, Libuy M, et al. The population impact of obesity, sedentary lifestyle, and tobacco and alcohol consumption on the prevalence of type 2 diabetes: Analysis of a health population survey in Chile, 2010. *PLoS ONE.* 2017;12(5):e0178092. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178092>
7. Hackett RA, Steptoe A. Type 2 diabetes mellitus and psychological stress—a modifiable risk factor. *Nature Reviews Endocrinology.* 2017;13(9):547-560. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.64>
8. World Health Organization. Global report on diabetes: executive summary (No. WHO/NMH/NVI/16.3). World Health Organization; 2016.
9. Scott RA, Scott LJ, Mägi R, et al. An Expanded Genome-Wide Association Study of Type 2 Diabetes in Europeans. *Diabetes.* 2017;66(11):2888-2902. DOI: <https://doi.org/10.2337/db16-1253>
10. Orho M, Bosshard NU, Buist NRM, et al. Mutations in the liver glycogen synthase gene in children with hypoglycemia due to glycogen storage disease type 0. *Journal of Clinical Investigation.* 1998;102:507-515. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI2890>
11. Iijima H, Ago Y, Fujiki R, et al. Novel GYS2 mutations in a Japanese patient with glycogen storage disease type 0a. *Molecular Genetics and Metabolism Reports.* 2021;26:100702. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2020.100702>
12. Dedov II, Zubkova NA, Arbatskaya NYu, et al. MODY2: Clinical and molecular genetic characteristics of 13 cases of the disease. The first description of MODY in Russia. *Problems of Endocrinology.* 2009;55(3):3-7. Russian. DOI: <https://doi.org/10.14341/probl20095533-7>
13. Azarova I, Bushueva O, Konoplyva A, et al. Glutathione S-transferase genes and the risk of

- type 2 diabetes mellitus: Role of sexual dimorphism, gene–gene and gene–smoking interactions in disease susceptibility. *Journal of Diabetes.* 2018;10(5):398-407. DOI: <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12623>
14. Azarova IE, Klyosova EYu, Samgina TA, et al. Role of cyba gene polymorphisms in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Medical Genetics.* 2019;18(8):37-48. Russian. DOI: <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2019.08.37-48>
15. Azarova IE, Klyosova EYu, Sakali SYu, et al. Contribution of rs11927381 polymorphism of the IGF2BP2 gene to the pathogenesis of type 2 diabetes. *Research Results in Biomedicine.* 2020;6(1):9-19. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2020-6-1-0-2>
16. Adeva-Andany MM, González-Lucán M, Donapetry-García C, et al. Glycogen metabolism in humans. *BBA Clinical.* 2016;5:85-100. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbaci.2016.02.001>
17. Zhang H, Ma J, Tang K, et al. Beyond energy storage: roles of glycogen metabolism in health and disease. *FEBS Journal.* 2021;288(12):3772-3783. DOI: <https://doi.org/10.1111/febs.15648>
18. Petersen MC, Vatner DF, Shulman GI. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology.* 2017;13(10):572-587. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.80>
19. Pederson BA. Mammalian Glycogen Metabolism Enzymology, Regulation, and Animal Models of Dysregulated Glycogen Metabolism. *Enzymology of Complex Alpha-Glucans.* CRC Press; 2021:84-137.
20. Lewis GF, Carpentier AC, Pereira S, et al. Direct and indirect control of hepatic glucose production by insulin. *Cell Metabolism.* 2021;33(4):709-720. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.03.007>
21. Kanai M, Akiyama M, Takahashi A, et al. Genetic analysis of quantitative traits in the Japanese population links cell types to complex human diseases. *Nature Genetics.* 2018;50(3):390-400. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0047-6>
22. López-Soldado I, Guinovart JJ, Duran J. Increasing hepatic glycogen moderates the diabetic phenotype in insulin-deficient Akita mice. *Journal of Biological Chemistry.* 2021;296:100498. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100498>
23. Chen J, Spracklen CN, Marenne G, et al. The trans-ancestral genomic architecture of glycemic traits. *Nature Genetics.* 2021;53(6):840-860. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00852-9>
24. Hwang JY, Lee EJ, Jin Go M, et al. Genome-wide association study identifies GYS2 as a novel genetic factor for polycystic ovary syndrome through obesity-related condition. *Journal of Human Genetics.* 2012;57(10):660-664. DOI: <https://doi.org/10.1038/jhg.2012.92>
25. Sharifi-Zarchi A, Gerovska D, Adachi K, et al. DNA methylation regulates discrimination of enhancers from promoters through a H3K4me1-H3K4me3 seesaw mechanism. *BMC Genomics.* 2017;18(1):1-21. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4353-7>
26. Oh KJ, Han HS, Kim MJ, et al. CREB and FoxO1: two transcription factors for the regulation of hepatic gluconeogenesis. *BMB Reports.* 2013;46(12):567. DOI: <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2013.46.12.248>
27. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1–PGC-1 $\alpha$  interaction. *Nature.* 2003;423(6939):550-555. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature01667>
28. Chernikova NA, Kamynina LL, Ametov AS, et al. The pharmacogenetics of hypoglycemia and the glycemic variability at the patients with type 2 diabetes mellitus. *Therapeutic archive.* 2020;24;92(10):54-62. Russian. DOI: <https://doi.org/10.26442/00403660.2020.10.000530>

Received 20 January 2022

Revised 12 March 2022

Accepted 16 March 2022

### Information about the authors

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

**Yaroslava E. Korvyakova**, Student, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, E-mail: yasya\_kursk@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4756-9707>.

**Alexander O. Glotov**, Student, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, E-mail: aoglotoff@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4661-752X>.

**Vladimir E. Ivakin**, Cand. Sci. (Medicine), Associate Professor at the Department of Internal Diseases N1, Kursk State Medical University, Kursk,

Russia, E-mail: ivakinve@kursksmu.net, ORCID:  
<https://orcid.org/0000-0003-1057-6292>.

**Alexey V. Polonikov**, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Director of the Research Institute for Genetic and Molecular Epidemiology, Head of the Laboratory of Statistical Genetics and Bioinformatics, Research Institute for Genetic and

Molecular Epidemiology, Professor at the Department of Biology, Medical Genetics and Ecology, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, E-mail: polonikov@rambler.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6280-247X>.



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

УДК 616.895.87:575.224.22

# The association of inflammatory status and immunological parameters with single-nucleotide polymorphisms of cytokine and Toll-like receptor genes in patients with schizophrenia

Irina K. Malashenkova<sup>1,2</sup> , Vadim L. Ushakov<sup>3,4,5</sup> , Sergey A. Krynskiy<sup>1</sup> , Daniil P. Ogurtsov<sup>1</sup> , Nikita A. Khailov<sup>1</sup> , Svetlana N. Moskvina<sup>1</sup> , Natalia V. Zakharova<sup>4</sup> , Ekaterina I. Chekulaeva<sup>1</sup> , Nikolay A. Didkovsky<sup>2</sup> , Georgiy P. Kostyuk<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Kurchatov Institute,

1 Akademik Kurchatov Sq., Moscow, 123182, Russia

<sup>2</sup> Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine,  
Federal Medical Biological Agency,

1a Malaya Pirogovskaya St., Moscow, 119435, Russia

<sup>3</sup> Moscow Engineering Physics Institute,

31 Kashirskoye Highway, Moscow, 115409, Russia

<sup>4</sup> Alekseev Psychiatric Clinical Hospital No. 1,

2 Zagorodnoye Highway, Moscow, 117152, Russia

<sup>5</sup> Lomonosov Moscow State University,

1 Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia

Corresponding author: Irina K. Malashenkova (malashenkova.irina@bk.ru)

## Abstract

**Background:** Schizophrenia is a multifactorial and clinically polymorphic disease with a significant hereditary component. The study of the influence of functionally significant polymorphisms of the genes regulating immune response and inflammation on the immune parameters in patients with schizophrenia is relevant for the development of new methods for predicting the course of the disease and finding new therapy targets. **The aim of the study:** To study the association of polymorphisms in cytokine and Toll-like receptor genes with the serum levels of immune mediators in patients with schizophrenia. **Materials and methods:** 95 patients diagnosed with schizophrenia and 99 healthy volunteers were recruited into the study. Polymorphisms of genes regulating the immune response (*IL1B* rs1143627, *IL4* rs2243250, *IL2* rs2069762, *IL10* (rs1800896, rs1800872, rs1800871), *IFNL* rs8099917, *IFNL* rs12979860, *TLR9* rs5743836, *TLR9* rs352140, *TLR3* rs3775291), the serum level of major cytokines and markers of systemic inflammation were determined. **Results:** The patients were found to have elevated levels of key pro-inflammatory cytokines IL-8 and IL-17A and other markers of systemic inflammation, as well as an increase in the content of antigen-antibody complexes in the bloodstream. Increased frequency of *IL10* gene polymorphisms (rs1800896, rs1800872, rs1800871) was revealed in the patients with schizophrenia. A relationship between IL-6 and IL-8

levels and the carriage of *IL1B* T-511C (rs16944), *IL10* 1082A (rs1800896), *IL10* 592 C>A (rs1800872) and *TLR3* Leu412Phe (G/A) (rs3775291) single nucleotide polymorphisms was found.

**Conclusion:** The revealed associations may indicate a role of SNPs in cytokine and Toll-like receptor genes in modulating the network genetic interactions underlying certain immunological endophenotypes in the patients. Based on the results of this work and literature data, it is important to further study the relationship of immunogenetic markers in schizophrenia with the immune profiles of the disease and its clinical manifestations, including in larger samples of patients.

**Keywords:** cytokines; inflammation; single nucleotide polymorphisms; schizophrenia; Toll-like receptors

**For citation:** Malashenkova IK, Ushakov VL, Krynskiy SA, et al. The association of inflammatory status and immunological parameters with single-nucleotide polymorphisms of cytokine and Toll-like receptor genes in patients with schizophrenia. Research Results in Biomedicine. 2022;8(2): 148-163. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-2

**Introduction.** Neuroimmune interactions mediate homeostasis and normal functioning of both the central nervous system (CNS) and the immune system with the participation of neurotransmitters, hormones and cytokines produced in the cells of these systems. Changes in the signal pathways that provide cooperation between the immune system and the nervous system are involved in the pathogenesis of a number of non-infectious diseases, including mental disorders [1].

Schizophrenia is a multifactorial disease with a significant hereditary component (more than 60% of the disease risk according to twin studies). There is evidence showing the critical role of immune disorders and neuroinflammation in the pathogenesis of various forms of schizophrenia [2]. In recent years, a number of works confirm the role of systemic inflammation in the development of this disease [3]. Numerous clinical, postmortem, biomedical, genetic and experimental studies, including cell and animal models, have shown that schizophrenia is accompanied by neuroinflammation and systemic immune disorders [4, 5, 6]. According to the results of large genome-wide association studies (GWAS), single-nucleotide polymorphisms in genes regulating the functions of the immune system have significant associations with schizophrenia risk [7, 8]. Patients with psychotic episode have increased levels of inflammation markers in the cerebrospinal fluid and systemic circulation, and an increased expression of proteins involved in the

immune response and inflammation in the prefrontal cortex [4-7]. According to indirect evidence, schizophrenia associated with neuroinflammation can account for up to 40% of cases, but more convincing studies are needed [2].

Maes et al., who studied the protein-protein interaction network in patients with first-episode schizophrenia, have shown that schizophrenia is characterized by prominent changes in the nuclear factor- $\kappa$ B signaling related to inflammation, in Toll-like receptor 4 (TLR4) signaling mediating the immune response to bacterial infections and in JAK/STAT (Janus kinases/signal transducer and activator of transcription) pathways mediating the effects of cytokines [8]. According to the authors, these data suggest that schizophrenia is a systemic neuro-immune disorder that is triggered by infectious stimuli and induces neuro-immune toxicity cascades overexpressed in people that have hereditary predisposition such as reduced anti-inflammatory protection and altered Toll-like receptor signaling. It is now generally accepted that the genetic component of the risk of schizophrenia is determined by the contribution of polymorphisms of many genes, with each polymorphism having only a small effect on hereditary predisposition. Moreover, all known genetic markers of schizophrenia in total provide only less than 50% of the family predisposition which is actually observed in the population according to the data of twin and genealogical

studies, indicating the important role of the environment in the realization of hereditary risk [9].

Polymorphisms of the genes regulating the immune response are among the most important genetic risk factors of schizophrenia [10-17]. Some of the strongest associations with the risk of the disease are observed for the major histocompatibility complex (MHC) locus, and, in particular, for the complement component C4 gene located within this locus [11]. In addition, results of GWAS studies indicate a significant relationship with the risk of schizophrenia for at least 39 genes that regulate the immune response and are located outside the MHC locus. More than 30 of these genes are expressed in both the brain and immune cells [18]. It was revealed that a number of immunogenetic markers (at least 12 out of 39 markers outside the MHC locus) are common for schizophrenia and other mental and neurological diseases, including bipolar disorder, anxiety disorder and amyotrophic lateral sclerosis [19]. Common genetic markers in schizophrenia and immune-mediated diseases including Crohn's disease, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, type 1 diabetes mellitus, and ulcerative colitis have also been found [20]. Interestingly, according to a GWAS study, most of the polymorphisms that occur with the highest frequency in schizophrenia affect the signal pathways specific to the functioning of B cells [21].

Schizophrenia is characterized by heterogeneity of symptoms, responses to treatment and outcomes, reflecting the existence of different subtypes of the disease, but clinical observations alone generally do not allow the identification of etiological and pathogenetic differences between these subtypes [22]. It has been demonstrated in a number of studies that immune disturbances are associated with severity and type of symptoms in the patients with schizophrenia. For example, the serum level of an important marker of systemic inflammation, IL-6, has been shown to correlate

with the severity of cognitive symptoms in outpatients with schizophrenia ( $r = -0.395$ ) [23]. According to another study, the level of IL-6 decreased to normal values in hospitalized patients with schizophrenia after a course of antipsychotic therapy, and the decrease in IL-6 level correlated with a decrease in the positive and negative symptoms according to the PANSS scale [24]. In addition, there is evidence that an increase in the serum concentration of this cytokine is associated with morphometric changes in left lingual and left fusiform gyrus in patients with schizophrenia [25].

To search for new prognostic markers and targets for therapy, it is necessary to identify the causes of the development of immunological changes in schizophrenia, and the research should include investigation of the genetic basis of various types of immune disorders in the patients. However, the associations of genetic factors with immune parameters in the patients with schizophrenia have not been studied sufficiently [26, 27].

**The aim of the study** was to study the possible associations of cytokine and Toll-like receptor gene polymorphisms with the immune parameters in patients with schizophrenia for the subsequent development of new prognostic methods and identification of new therapy targets.

**Materials and Methods.** 95 patients with paranoid schizophrenia were enrolled into the study. 56 of the patients were men and 29 of the patients were women, the average age of the patients was  $26.77 \pm 1.26$  years. At the time of hospitalization, the patients had signs of Kandinsky-Clerambo syndrome: delusions of influence, pseudohallucinations and mental automatism. The diagnosis was confirmed by the compliance with the diagnostic criteria of schizophrenia (F20) of the International Classification of Diseases of the tenth revision (ICD-10). The demographic and clinical characteristics of the patients and of the volunteers of the control group are presented in Table 1.

**Table 1**  
**The social-demographic and clinical characteristics of the patients enrolled into the study (n=95) and of the volunteers of the control group (n=99)**

Value/Groups	Schizophrenia (n=95)	Control (n=99)	P
Age on the date of the assessment	26.8 ± 1.3	28.3 ± 2.6	p >0.05
<b>Gender distribution</b>			
Male	56 (58.95%)	46 (46.46%)	p >0.05
Female	39 (41.05%)	53 (53.54%)	
<b>Clinical characteristics</b>			
Mean duration of the disease	4.8 ± 1.1	-	-
Mean age of onset of prodromal symptoms	18.0 ± 1.2	-	-
Mean age of manifestation	23.1 ± 1.3	-	-
PANSS (Positive and Negative Syndrome Scale)	95.2±4.5	36.0±1.9	p = 1x10 <sup>-10</sup> /p <sub>a</sub> =7.0*10 <sup>-10</sup>
NSA-4 (4-Item Negative Symptom Assessment)	19.3±1.3	5.0±0.0	p = 3x10 <sup>-8</sup> /p <sub>a</sub> =1*10 <sup>-7</sup>
BFCRS (Bush-Francis Catatonia Rating Scale)	6.6±1.5	0.0±0.0	p = 0.01 /p <sub>a</sub> =0.023

Blood sampling was done in the first days of hospitalization, after achieving reduction of the positive symptoms by antipsychotic therapy. The control group for the genetic study included 99 healthy volunteers, comparable to patients with schizophrenia in terms of gender and age, mean age 28.34 ± 2.56 years (53 women and 46 men). Exclusion criteria included somatic diseases in the phase of decompensation, signs of alcohol abuse and/or other substance use disorders, mental diseases other than schizophrenia, exacerbation of infectious, inflammatory and autoimmune diseases in the 2 months preceding the examination, pregnancy.

The study was approved by the local ethics committee of the National Research Center "Kurchatov Institute" (No. 5, 04/05/2017). All participants were familiarized with the details of the study and signed a voluntary informed consent sheet.

DNA extraction was performed using a set of reagents for RNA / DNA extraction from clinical material "AmpliPrime RIBO-prep" (AmpliSens, Moscow) according to the manufacturer's recommendations. This method is

based on lysis of cells and denaturation of cellular proteins using a lysis solution containing a chaotropic agent (guanidine thiocyanate), followed by precipitation of nucleic acids with isopropanol and their further extraction into the solution.

Determination of single nucleotide polymorphisms in *IFNL*, *IL1B*, *IL2*, *IL4*, *TLR3*, and *TLR9* genes was carried out using reagent kits for polymerase chain reaction (PCR) analysis produced by "DNA-technology" and "Litekh" according to the manufacturer's recommendations.

To identify polymorphisms of *IL1B* (rs1143627 T-31C) and *IL4* (rs2243250 C589T) genes, we used the method of polymerase chain reaction with a fluorescent detection scheme in "real time". With a sample of isolated DNA, two amplification reactions were carried out in parallel with two pairs of allele-specific primers. The mixture contained an intercalating dye SYBR Green, the fluorescence intensity of which multiplies upon incorporation into the resulting double-stranded product.

To identify polymorphisms of the interferon λ (*IFNL*) gene (rs8099917 T> G,

rs12979860 C> T), the polymerase chain reaction method with a fluorescent detection scheme in “real time” was used. Signaling probes containing fluorescent labels Fam and Hex were introduced into the mixture for amplification for each variant of the genetic polymorphisms to be detected. After the PCR, thermal melting of the duplexes was carried out, the change of fluorescence level was recorded and presented in the form of a graph. If the signaling probe was partially complementary to the target DNA, the melting temperature of such a duplex was lower than in the case of complete complementarity of the probe. The analysis of the results was carried out on the basis of the melting temperature of the signal probes.

*IL2* rs2069762 T-330G, *IL10* rs1800896 G-1082A, *IL10* rs1800872 C-592A, *IL10* rs1800871 C-819T, *TLR9* rs5743836 T-1237C, *TLR9* rs352140 G2848A, and *TLR3* rs3775291 Leu412Phe single nucleotide polymorphisms were determined by PCR with electrophoretic detection of amplification products. Two amplification reactions were carried out in parallel with two pairs of allele-specific primers. Separation of PCR amplification products was carried out in 3% agarose gel. To visualize the PCR products in the gel, ethidium bromide solution was used as a dye.

Immunological studies were carried out in all patients of the main group and in 35 volunteers in the control group (mean age 27.1 ± 1.6 years; 13 men; 17 women). The systemic level of inflammation markers and the content of the main cytokines were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using sets of reagents to detect human interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), human interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), human interleukin-6, human interleukin-8, human interleukin-10, human interleukin-17, human tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (“Cytokin”, Russia, St. Petersburg), a set of reagents for detection of cortisol in blood serum (“HEMA”, Russia), a set of reagents for the detection of C-reactive protein (CRP) in blood serum (“HEMA”, Russia), a set of reagents for the detection of circulating immune complexes (CIC) in blood serum (“CHEMA”, Russia).

The software Excel (Microsoft, 2010) and STATISTICA 10 (Stat Soft, 2010) were used for statistical processing. The Shapiro-Wilk test was used to assess the normality of distribution. The results of immunological tests (continuous variables) were presented as medians with an interquartile range; when 2 groups were compared, the significance of differences was assessed using the Mann-Whitney test; when multiple groups were compared, the Kruskall-Wallis test was used with post-hoc pair-wise comparisons conducted using the Mann-Whitney test. The results of the clinical assessment (continuous variables) were presented as means ± 95% confidence interval and the Student’s t-test was used to assess the significance of differences. For discrete variables, Fisher’s exact test was used to assess the significance of differences if one of the expected values in contingency table was below 10, otherwise chi-squared test was used. The differences between the indicators were considered to be statistically significant at  $p < 0.05$ . Benjamini-Hochberg procedure was used to correct for false discovery rate (FDR = 0.05). To assess the correlations, the Pearson correlation coefficient was used.

## Results and Discussion

*The levels of cytokines of innate and adaptive immunity and of systemic inflammation markers in patients with schizophrenia and in the control group.*

The serum levels of inflammation markers, including C-reactive protein and circulating immune complexes, and of cortisol was significantly higher in the patients with schizophrenia than in healthy volunteers (Table 2). The level of the proinflammatory cytokine/chemokine IL-8/CCL8 was significantly higher in the patients than in the control group ( $p < 0.05$ ). The assessment of the level of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  has shown there were no significant differences between patients with schizophrenia and healthy volunteers (Table 3). Although the difference in the levels of IL-6, an important inflammatory cytokine, between the patients and the control group was statistically significant, showing an increase in the content of IL-6 in the patients, the statistical power did not reach 0.8, so larger samples are needed to confirm this finding.

Table 2

**The levels of systemic inflammation markers in the patients with schizophrenia and in the control group**

Indicator	Schizophrenia	Control	Significance of differences
C-reactive protein [mg/l]	3.3 [1.2; 17.3]	0.6 [0.4; 1.8]	* $p=1.4 \times 10^{-4}$ $/p_a=4.2 \times 10^{-4}$ , power 0.97
Cortisol [nmol/l]	532.6 [449.7; 591.2]	449.7±64 [204.6; 508.8]	* $p=8.9 \times 10^{-4}$ $/p_a=8.9 \times 10^{-4}$ , power 0.99
Circulating immune complexes [conventional units]	103.0 [73.0; 160.0]	75.0 [52.0; 93.0]	* $p=2.3 \times 10^{-4}$ $/p_a=3.4 \times 10^{-4}$ , power 0.95

Note: \* statistically significant differences between the groups according to Mann-Whitney U-test ( $p < 0.05$ );  $p_a$  – p value adjusted for multiple comparisons by Benjamini-Hochberg procedure

Table 3

**The levels of cytokines of innate and adaptive immunity in the patients with schizophrenia and in the control group**

Indicator	Schizophrenia	Control	Significance of differences
IL-1 $\beta$ [pg/ml]	1.45 [0.55; 2.91]	1.23 [0.76; 1.70]	$p>0.05$
TNF $\alpha$ [pg/ml]	1.79 [1.30; 3.08]	1.57 [1.34; 2.75]	$p>0.05$
IL-6 [pg/ml]	8.77 [3.61; 15.53]	3.73 [1.96; 8.20]	$p=5.8 \times 10^{-3}$ $/p_a=0.023$ , power 0.76
IL-8 [pg/ml]	37.54 [13.83; 94.15]	13.16 [8.33; 32.11]	* $p=0.01$ $/p_a=0.026$ , power 0.93
IL-10 [pg/ml]	5.91 [2.96; 7.52]	3.93 [1.79; 6.97]	$p>0.05$
IFN $\gamma$ [pg/ml]	49.73 [34.27; 129.66]	33.44 [19.38; 70.62]	* $p=0.015$ $/p_a=0.03$ , power 0.64
IL-4 [pg/ml]	2.75 [1.39; 5.12]	3.89 [1.33; 7.19]	$p>0.05$
IL-17A [pg/ml]	>1 pg/ml in 35 patients; <1 pg/ml in 38 patients	>1 pg/ml in 1 volunteer; <1 pg/ml in 15 volunteers **	** $p=0.002$ $/p_a=0.016$ , power 1.00

Note: \* statistically significant differences between the groups according to Mann-Whitney U-test ( $p < 0.05$ ); \*\* significantly significant differences between the groups according to Fisher's exact test ( $p < 0.05$ );  $p_a$  – p value adjusted for multiple comparisons by Benjamini-Hochberg procedure.

These findings indicate that in schizophrenia there was an activation of the systemic inflammatory response and of the pituitary-hypothalamus-adrenal axis. An increase in the CIC content may indicate the activation of the formation of antigen-antibody complexes in the bloodstream, as well as disruption of their clearance.

Given the presence of systemic inflammation, including increased levels of IL-8, we also assessed the level of a key immunoregula-

tory cytokine, IL-10, in patients with schizophrenia. Its central function is to suppress inflammation and excessive immune activation. In the patient group, the content of this cytokine was increased (more than 5 pg/ml) in 20 out of 30 patients, and in the control group it increased only in three people; however, the differences turned out to be insignificant, which could be associated with the high variability of the IL-10 level in schizophrenic patients. In one third of the patients with normal IL-10 concentration, the content

of IL-6 or IL-8 or IL-1 $\beta$  was increased, which indicates suppression of immunoregulatory mechanisms in these patients.

The serum levels of a key Th2 cytokine, IL-4, did not differ significantly between the groups (Table 3). The level of IFN $\gamma$ , an important Th1 cytokine, was increased (more than 45 pg/ml) in 53 of 87 patients with schizophrenia and only in 6 of 19 healthy volunteers, and its level was significantly higher in schizophrenia ( $p < 0.05$ ), but the statistical power of the comparison did not reach 0.8, so larger samples are needed to confirm this finding. An increase in the level of IL-17A above 1 pg/ml was observed significantly more often in schizophrenia: in 35 out of 73 patients with schizophrenia and only in 1 out of 16 people of the control group ( $p < 0.05$  according to Fisher's exact test). IL-17A is the most important cytokine of the Th17 response, involved in the stimulation and maintenance of inflammation and autoimmune responses. It is implicated in

the pathogenesis of neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease, Parkinson's disease, multiple sclerosis, amyotrophic lateral sclerosis, and glaucoma [28]. Of 35 patients with an increase in IL-17 levels (more than 1 pg/ml), only 7 had normal IFN $\gamma$  level (below 45 pg/ml). Thus, a significant proportion of schizophrenic patients had signs of excessive activation of the Th17 and Th1 responses.

*Polymorphisms of cytokine and Toll-like receptor genes in patients with schizophrenia and in the control group.*

The frequency of the studied polymorphisms was checked for compliance with the Hardy-Weinberg equilibrium. It was found that the Hardy-Weinberg law is fulfilled for all the studied polymorphisms.

Statistically significant differences in the frequency of SNPs of the *IL10* gene between the patients and the control group were found (Table 4).

Table 4

**The frequency of SNPs of cytokine and Toll-like receptor genes in patients with schizophrenia depending on the age of manifestation and in the control group**

SNP	Group	N	Homozygous for the first allele		Heterozygous		Homozygous for the second allele	
			N	%	N	%	N	%
<i>IL4</i> C-589T rs2243250	Manifestation of schizophrenia at the age of 26 or older	31	23	74,2	8	25,8	0	0,0
	Manifestation of schizophrenia at the age of 25 or younger	56	31	55,4	16	28,6	9*	16,0
	Control	89	61	68,5	25	28,1	3	3,4
<i>IL2</i> T-330G rs2069762	Manifestation of schizophrenia at the age of 26 or older	29	17	58,6	10	34,5	2	6,9
	Manifestation of schizophrenia at the age of 25 or younger	48	21	43,8	21	43,8	6	12,4
	Control	91	38	41,8	46	50,5	7	7,7
<i>TLR3</i> Leu412Phe rs3775291	Manifestation of schizophrenia at the age of 26 or older	29	18	62,1	10	34,5	1	3,4
	Manifestation of schizophrenia at the age of 25 or younger	50	22	44,0	23	46	5	10
	Control	85	50	58,8	33	38,8	2	2,4

Note: \*  $p=0.011$  ( $p > 0.05$  after adjusting for multiple comparisons by Benjamini-Hochberg procedure)

Table 5

**The frequency of SNPs of cytokine and Toll-like receptor genes in patients with schizophrenia and in the control group**

SNP	Group	N	Homozygous for the first allele		Heterozygous		Homozygous for the second allele	
			N	%	N	%	N	%
<i>IFNL</i> : rs8099917 T>G	Schizophrenia	89	60	67.4	25	28.1	4	4.5
	Control	93	65	69.9	27	29.0	1	1.1
<i>IFNL</i> : rs12979860 C>T	Schizophrenia	89	47	52.8	33	37.1	9	10.1
	Control	92	48	52.2	38	41.3	6	6.5
<i>IL1B</i> T-31C rs1143627	Schizophrenia	89	39	43.8	38	42.7	12	13.5
	Control	89	47	52.8	36	40.4	6	6.7
<i>IL4</i> C-589T rs2243250	Schizophrenia	89	55	61.8	24	27.0	10	11.2
	Control	89	61	68.5	25	28.1	3	3.4
<i>IL2</i> T-330G rs2069762	Schizophrenia	79	39	49.4	32	40.5	8	10.1
	Control	91	38	41.8	46	50.5	7	7.7
<i>IL10</i> G-1082A rs1800896	Schizophrenia	89	29	33*	46	52*	14	16*
	Control	99	74	74	26	26	0	0
<i>IL10</i> C-592A rs1800872	Schizophrenia	89	50	56*	38	43*	1	1
	Control	99	81	81	18	18	1	1
<i>L10</i> C-819T rs1800871	Schizophrenia	89	48	54*	34	38	7	8
	Control	99	76	76	24	24	0	0
<i>TLR3</i> Leu412Phe rs3775291	Schizophrenia	81	41	50.6	34	42.0	6	7.4
	Control	85	50	58.8	33	38.8	2	2.4
<i>TLR9</i> G2848A rs352140	Schizophrenia	84	16	19.0	44	52.4	24	28.6
	Control	81	22	27.2	45	55.6	14	17.3
<i>TLR9</i> T1237C rs5743836	Schizophrenia	85	68	80.0	16	18.8	1	1.2
	Control	83	71	85.5	10	12.0	2	2.4
<i>IL1B</i> T-511C rs16944	Schizophrenia	73	9	12.3	31	42.5	33	45.2
	Control	83	6	7.2	38	45.8	39	47.0

Note: \* statistically significant differences with the control group; \* p <0.001 (p <0.05 after adjusting for multiple comparisons by Benjamini-Hochberg procedure)

The frequency of homozygous state for the first allele of all studied polymorphisms of the *IL10* gene was significantly (p <0.001) lower in the patients than in the control group

(OR = 0.16, 95% CI [0.09; 0.31], power 0.99 for *IL10* G-1082A rs1800896; OR = 0.28, 95% CI [0.15; 0.55], power 0.95 for *IL10* C-592A rs1800872; OR = 0.35, 95% CI [0.19; 0.66],

power 0.85 for *IL10* C-819T rs1800871). Moreover, the frequency of heterozygous state for the G-1082A (rs1800896) and C-592A (rs1800872) polymorphisms was significantly ( $p < 0.001$ ) higher in the patients: OR = 3.95, 95% CI [2.13; 7.30], power 0.94 for *IL10* G-1082A rs1800896; OR = 3.69, 95% CI [1.90; 7.16], power 0.95 for *IL10* C-592A rs1800872. The frequency of homozygous state for the second allele for *IL10* G-1082A rs1800896 was also significantly ( $p < 0.001$ ) higher in the patient group: OR = 38.22, 95% CI [2.24; 650.92], power 0.99. No significant differences between the patients with schizophrenia and the control group were found in the frequency of the other studied SNPs of cytokine and Toll-like receptor genes (Table 5). However, there was a tendency for higher frequency of the homozygous state for the minor allele of most of the studied SNPs in the patients with schizophrenia.

The analysis of associations between the frequency of SNPs, socio-demographic data and clinical characteristics of the patients has revealed that homozygous state for the T allele of C-589T (rs2243250) SNP of the *IL4* gene was more common in the patients in whom the disease manifested at the age of 25 years or less (on average,  $19.02 \pm 1.02$  years) compared with the control group: OR = 5.49, 95% CI [1.42; 21.36];  $p = 0.011$ . However, the statistical power (0.67) did not reach 0.8, so larger samples are needed to confirm this finding. In the patients in whom schizophrenia manifested at the age of more than 25 years (on average,  $30.38 \pm 1.24$  years), there were no differences in the frequency of the studied SNPs with the control group (Table 4).

#### *Associations of single-nucleotide polymorphisms of cytokine and Toll-like receptor genes with serum levels of immune mediators in patients with schizophrenia.*

The following new associations between single-nucleotide polymorphisms of cytokine and Toll-like receptor genes and serum levels of immune mediators were revealed in patients with schizophrenia.

It was found that carriage of the C allele for the *IL1B* T-511C polymorphism (rs16944)

was associated with an increase in the level of IL-6 in patients with schizophrenia ( $p=0.034$  for differences with the control group, power 0.94). In the patients who were homozygous for the T allele of this SNP the level of IL-6 did not differ from the control group (Figure 1).

According to the literature, the *IL1B* T-511C polymorphism influences the transcription of the *IL1B* gene, but the results in the literature regarding the functional effects of different alleles are not consistent. According to [29], the T allele results in increased transcriptional activity of the *ILB* gene in the THP-1 human monocyte cell line. Yet, there is data that in the carriers of GG genotype the peripheral blood mononuclear cells release more IL-1 $\beta$  after stimulation with lipopolysaccharide [30]. Importantly, the GG genotype for the *IL1B* T-511C polymorphism has been associated with an increased risk of schizophrenia, odds ratio 1.24 (95% CI 1.09, 1.41) [31]. It has also been shown that the rs16944 GG genotype is associated with decreased gray matter volume and functional activity of the brain in schizophrenia and bipolar disorder [33, 33]. In addition, this genotype was associated with a reduced likelihood of achieving remission in 256 individuals with depression (odds ratio = 1.74) [34].

The mechanisms of the influence of the *IL1B* T-511C polymorphism on the risk of schizophrenia and on the changes of the brain in the patients remain unclear, but it has been hypothesized that the effect of this SNP is realized through modulation of IL-1 $\beta$  secretion levels [35]. In the pathogenesis of schizophrenia, chronic activation of innate immunity and disrupted balance in activation of Th1 and Th2 links of adaptive immunity with excessive activation of Th2 link plays a large part, contributing to an increase in the levels of kynurenic acid that causes glutamatergic dysfunction in the patients [36]. IL-1 $\beta$  is one of the key inflammatory cytokines, involved in the initiation and sustainment of chronic inflammation. Activating the NF $\kappa$ B signaling, it induces expression of a number of inflammatory mediators in target cells, including the inflammatory cytokine IL-6 [37]. IL-6 promotes Th2 differentiation and inhibits Th1 differentiation through two independent molecular mechanisms.

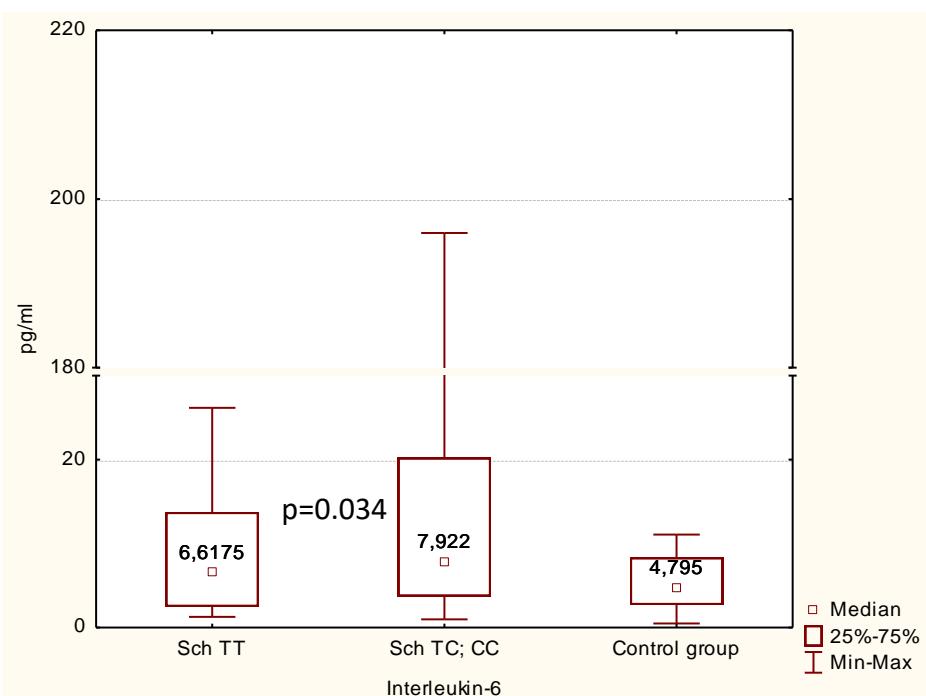


Fig. 1. Serum level of interleukin-6 in patients with schizophrenia depending on the presence of the C allele for the *IL1b* T-511C polymorphism.

IL-6 activates nuclear factor of activated T cells (NFAT), stimulating production of IL-4 by CD4(+) T cells and their differentiation into Th2 cells. Moreover, it upregulates suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 to inhibit IFN $\gamma$  signaling and the differentiation of Th1 cells [38].

The role of IL-6 as a potential marker of the progression of cognitive impairment and brain MRI changes in schizophrenia is currently being intensively studied. As mentioned above, serum IL-6 levels are negatively associated with cognitive performance in schizophrenia [26]. In addition, according to our previous results, there is evidence that an increase in the levels of this cytokine is associated with morphometric changes in the left lingual and left fusiform gyrus in the patients [25]. Taking this into account, the association of the *IL1B* T-511C polymorphism with an increase in IL-6 levels may contribute to the pathogenetic mechanisms of schizophrenia at least in some of the patients. Further research is needed to understand the possible effect of the *IL1B* T-511C polymorphism on the clinical characteristics of the disease and on its prognosis.

Carriage of the homozygous G allele of the *IL10* SNP 1082A (rs1800896) was associated with no significant increase in the levels of proinflammatory cytokine/chemokine IL-8 (29.08 [12.22; 101.54], while carriers of the A allele had significantly increased IL-8 levels compared with the control group (39.07 [14.33; 89.67] and 13.16 [8.33; 32.11],  $p = 0.027$ , power 0.99).

Carriage of the A allele of the *IL10* SNP 592 C>A (rs1800872) was also associated with no significant increase in the levels of IL-8 (29.08 [9.24; 55.23], while homozygotes for the C allele had significantly increased IL-8 levels compared with the control group (51.62 [23.36; 106.24] and 13.16 [8.33; 32.11],  $p = 0.02$ , power 0.99).

According to the literature, homozygous carriage of the G allele for the *IL-10* polymorphism G-1082A is associated with a high level of IL-10 production [39, 40]. The highest IL-10 production is detected in the carriers of the G allele which also have the A allele in *IL10* 592 C>A SNP [40]. IL-10 is an immunoregulatory cytokine that inhibits the production of inflammatory mediators including IL-8, which may to a certain extent explain the lack of in-

creased IL-8 levels in the patients with schizophrenia who are carriers of *IL10* 1082A and *IL10* 592 C>A SNPs.

Carriage of the Phe allele for the *TLR3* Leu412Phe (G / A) (rs3775291) polymorphism was also associated with no significant increase in the levels of IL-8 compared to the control group, while carriers of the Leu allele

had significantly increased levels of IL-8, p<0,05, power 0.89 (Figure 2). As can be seen from Figure 2, carriers of the Leu allele also had significantly higher levels of TNF $\alpha$  than in the control group, but the statistical power of this comparison was lower than 0.8, therefore larger studies are required to confirm the result.

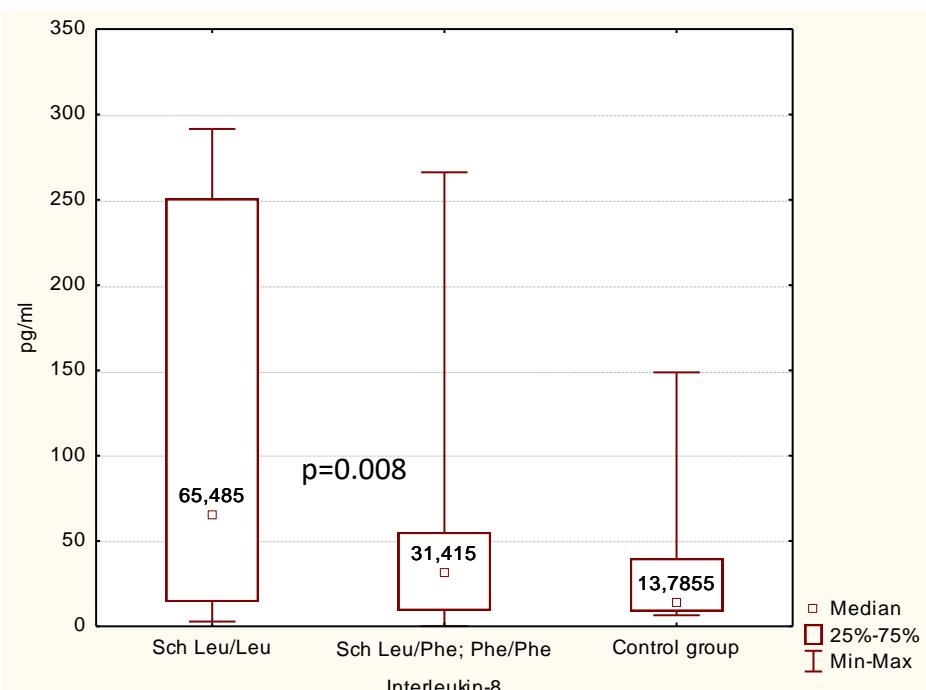


Fig. 2. Serum level of interleukin-8 in patients with schizophrenia depending on the presence of the Phe allele for the *TLR3* Leu412Phe polymorphism.

According to the literature, increased serum levels of IL-8 in schizophrenia predict the development of resistance to therapy [41]. Further studies are needed to elucidate the clinical characteristics and the course of the disease in the patients with schizophrenia who carry the SNPs associated with lower IL-8 levels.

There is evidence that the *TLR3* Leu412Phe (G/A) genetic polymorphism (rs3775291) reduces the ability of the TLR3 protein to bind double-stranded RNA (dsRNA). This polymorphism is associated with a decrease in the synthesis of IFN $\gamma$  by mononuclear cells of the umbilical cord blood after stimulation of the cells with a synthetic TLR3 ligand, pI:C [42]. Therefore, the polymorphism may contribute to a less pronounced activation of the innate immune response and a lower activation of the Th1-link of adaptive

immunity. In addition, it has been demonstrated to have some protective effect against the risk of HIV infection and HSV-2 infection [43, 44]. In accordance with these effects of the SNP, our work shows a lower level of proinflammatory cytokines in the patients with schizophrenia who are carriers of the *TLR3* Leu412Phe polymorphism. They also demonstrate an increase in the CIC level which may reflect a higher activation of the Th2 component of adaptive immunity.

In the present study a number of associations were revealed between the polymorphisms in the genes regulating the immune response and the parameters of the systemic immunity in patients with schizophrenia. The new data obtained are important for describing different immunological variants of schizophrenia and for identifying genetic factors that

affect the type and severity of immunological disorders in patients.

Activation of the systemic inflammatory response found in this study in patients with schizophrenia is in accordance with the literature data and with the previous results obtained by the authors [25].

Increased frequency of SNPs in the *IL10* gene in patients with schizophrenia has been revealed in this study. This finding indicates a need of further studies to clarify the possible role of *IL10* SNPs in the disruptions of neuro-immune interactions that contribute to the pathogenesis of schizophrenia and might affect the clinical manifestations of the disease.

Associations of SNPs in the genes regulating the immune response with the immune parameters in schizophrenia were also found. Notably, such associations were identified for SNPs that were overrepresented in the patients, including *IL10* 1082A (rs1800896) and *IL10* 592 C>A (rs1800872). These results may indicate a role of these SNPs in modulating the network genetic interactions underlying certain immunological endophenotypes in the patients. The associations of SNPs in genes regulating the immune response with increased production of key inflammatory cytokines such as IL-6 and IL-8 warrants further research, considering that level of IL-8 has been shown in our previous work to correlate with clinically important characteristics of the disease including the severity of negative symptoms, and level of IL-6 was shown to be associated with structural changes of the brain detected by MRI [25, 45].

Based on the results of this study, researching the associations of polymorphisms of genes regulating the immune response with immune parameters and clinical characteristics of patients with schizophrenia is a promising approach to elucidating the pathogenetic mechanisms of the disease. Further research, particularly in larger samples of patients, adopting big data and network methodologies, may contribute to the translation of fundamental immunogenetic data into clinical practice as well as to finding new markers for prediction of the course of schizophrenia.

**Conclusion.** In this study, the parameters of immunity and a number of SNPs of cytokine and TLR genes in patients with schizophrenia have been assessed. The associations of the studied SNPs with the type and severity of immune disorders and the presence of systemic inflammation in patients with schizophrenia have been analyzed. New data have been obtained on the relationship of genetic factors, immune disorders and systemic inflammation in schizophrenia.

The principal findings of the study are:

1. In the patients with schizophrenia, activation of the systemic inflammatory response with an increase in the levels of key pro-inflammatory mediators including C-reactive protein, cortisol, circulating immune complexes, IL-8 and IL-17A was revealed, which is in accordance with the previous results obtained by the authors and with the literature.

2. Increased frequency of *IL10* gene polymorphisms (rs1800896, rs1800872, rs1800871) was revealed in the patients with schizophrenia compared to the control group.

3. New associations between the levels of immunological and inflammatory markers and SNPs of cytokine and TLR genes in patients with schizophrenia were found. Increased IL-6 levels were associated in the patients with the presence of the C allele for *IL1B* T-511C (rs16944), and increased IL-8 levels were associated in the patients with the presence of the G allele for *IL10* SNP 1082A (rs1800896), the A allele for *IL10* 592 C>A (rs1800872) and the Phe allele for *TLR3* Leu412Phe (G/A) (rs3775291).

### Financial support

*This work was supported by NRC "Kurchatov Institute" (R&D "Biomedical Technologies", subtopic "Immunogenetic strategies for the diagnosis and treatment of schizophrenia", order No. 1059 of July 2, 2020, order No. 2757 of October 28, 2021) and partially supported by RSF (grant 20-15-00299).*

### Conflict of interests

*The authors have no conflict of interest to declare.*

## References

1. Kerage D, Sloan EK, Mattarollo SR, et al. Interaction of neurotransmitters and neurochemicals with lymphocytes. *Journal of Neuroimmunology.* 2019;332:99-111. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.04.006>
2. Bechter K. Updating the mild encephalitis hypothesis of schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry.* 2013;42:71-91. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.06.019>
3. Müller N, Krause D, Weidinger E, et al. Immunological treatment options for schizophrenia. *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie.* 2014;82(4)210-219. Deutsch. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0033-1355776>
4. Goldsmith DR, Rapaport MH, Miller BJ. A meta-analysis of blood cytokine network alterations in psychiatric patients: comparisons between schizophrenia, bipolar disorder and depression. *Molecular Psychiatry.* 2016;21(12):1696-1709. DOI: <https://doi.org/10.1038/mp.2016.3>
5. Miller BJ, Buckley P, Seabolt W, et al. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biological Psychiatry.* 2011;70(7):663-671. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.04.013>
6. Potvin S, Stip E, Sepehry AA, et al. Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review. *Biological Psychiatry.* 2008;63(8):801-808. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.09.024>
7. Malashenkova IK, Krynskiy SA, Ogurtsov DP, et al. Immunoinflammatory profile in patients with episodic and continuous paranoid schizophrenia. Consortium Psychiatricum. 2021;2(1):19-31. DOI: <https://doi.org/10.17816/CP66>
8. Maes M, Plaimas K, Suratane A, et al. First Episode Psychosis and Schizophrenia Are Systemic Neuro-Immune Disorders Triggered by a Biotic Stimulus in Individuals with Reduced Immune Regulation and Neuroprotection. *Cells.* 2021;10(11):2929. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells10112929>
9. Agerbo E, Sullivan PF, Vilhjálmsson BJ, et al. Polygenic Risk Score, Parental Socioeconomic Status, Family History of Psychiatric Disorders, and the Risk for Schizophrenia: A Danish Population-Based Study and Meta-analysis. *JAMA Psychiatry.* 2015;72(7):635-641. DOI: <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2015.0346>
10. Ruzzo EK, Geschwind DH. Schizophrenia genetics complements its mechanistic understanding. *Nature Neuroscience.* 2016;19(4):523-525. DOI: <https://doi.org/10.1038/nn.4277>
11. Sekar A, Bialas AR, de Rivera H, et al. Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature.* 2016;530(7589):177-183. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature16549>
12. Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, et al. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron.* 2012;74(4):691-705. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026>
13. Dickerson F, Boronow J, Stallings C, et al. The lymphotoxin Cys13Arg polymorphism and cognitive functioning in individuals with schizophrenia. *Schizophrenia Research.* 2007;89(1-3):173-176. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.schres.2006.08.015>
14. Li X, Zhang W, Lencz T, et al. Common variants of IRF3 conferring risk of schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research.* 2015;64:67-73. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2015.03.008>
15. Srinivas L, Vellichirammal NN, Alex AM, et al. Pro-inflammatory cytokines and their epistatic interactions in genetic susceptibility to schizophrenia. *Journal of Neuroinflammation.* 2016;13(1):105. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0569-8>
16. García-Bueno B, Gassó P, MacDowell KS, et al. Evidence of Activation of the Toll-like Receptor-4 Proinflammatory Pathway in Patients with Schizophrenia. *Journal of Psychiatry and Neuroscience.* 2016;41(3):E46-E55. DOI: <https://doi.org/10.1503/jpn.150195>
17. Mak M, Misiak B, Frydecka D, et al. Polymorphisms in immune-inflammatory response genes and the risk of deficit schizophrenia. *Schizophrenia Research.* 2018;193:359-363. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.schres.2017.06.050>
18. Pouget JG. The Emerging Immunogenetic Architecture of Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin.* 2018;44(5):993-1004. DOI: <https://doi.org/10.1093/schbul/sby038>
19. MacArthur J, Bowler E, Cerezo M, et al. The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog). *Nucleic Acids Research.* 2017;45(D1):D896-D901. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1133>

20. Wang Q, Yang C, Gelernter J, et al. Pervasive pleiotropy between psychiatric disorders and immune disorders revealed by integrative analysis of multiple GWAS. *Human Genetics*. 2015;134:1195-1209. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00439-015-1596-8>
21. Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*. 2014;511(7510):421-427. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature13595>
22. Bhati MT. Defining Psychosis: The Evolution of Schizophrenic Spectrum Disorders DSM-5. *Current Psychiatry Reports*. 2013;15(110):409. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11920-013-0409-9>
23. Ribeiro-Santos R, de Campos-Carli SM, Ferretjans R, et al. The association of cognitive performance and IL-6 levels in schizophrenia is influenced by age and antipsychotic treatment. *Nordic Journal of Psychiatry*. 2020;74(3):187-193. DOI: <https://doi.org/10.1080/08039488.2019.1688389>
24. Luo Y, He H, Zhang J, et al. Changes in serum TNF- $\alpha$ , IL-18, and IL-6 concentrations in patients with chronic schizophrenia at admission and at discharge. *Comprehensive Psychiatry*. 2019;90:82-87. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.comppsych.2019.01.003>
25. Malashenkova IK, Ushakov VL, Krynskiy SA, et al. The relationship of morphometric changes of the brain with IL-6 levels, systemic inflammation and immune disturbances in the patients with schizophrenia. *Procedia Computer Science*. 2021;190:553-559. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procs.2021.06.064>
26. International Schizophrenia Consortium, Purcell SM, Wray NR, et al. Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature*. 2009;460(7256):748-752. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature08185>
27. Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study Consortium. Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nature Genetics*. 2011;43(10):969-976. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng.940>
28. Chen J, Liu X, Zhong Y. Interleukin-17A: The Key Cytokine in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2020;12:566922. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.566922>
29. Chen H, Wilkins LM, Aziz N, et al. Single nucleotide polymorphisms in the human interleukin-1B gene affect transcription according to haplotype context. *Human Molecular Genetics*. 2006;15(4):519-529. DOI: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi469>
30. Iacoviello L, Di Castelnuovo A, Gattone M, et al. Polymorphisms of the interleukin-1beta gene affect the risk of myocardial infarction and ischemic stroke at young age and the response of mononuclear cells to stimulation in vitro. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005;25:222-227. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000150039.60906.02>
31. Shirts BH, Wood J, Yolken RH, et al. Association study of IL10, IL1 $\beta$ , and IL1RN and schizophrenia using tag SNPs from a comprehensive database: Suggestive association with rs16944 at IL1 $\beta$ . *Schizophrenia Research*. 2006;88(1-3):235-244. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.schres.2006.06.037>
32. Fatjó-Vilas M, Pomarol-Clotet E, Salvador R, et al. Effect of the interleukin-1 $\beta$  gene on dorsolateral prefrontal cortex function in schizophrenia: a genetic neuroimaging study. *Biological Psychiatry*. 2012;72(9):758-765. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.04.035>
33. Papiol S, Molina V, Desco M, et al. Gray matter deficits in bipolar disorder are associated with genetic variability at interleukin-1 beta gene (2q13). *Genes, Brain and Behavior*. 2008;7(7):796-801. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2008.00421.x>
34. Baune BT, Dannlowski U, Domschke K, et al. The interleukin 1 beta (IL1B) gene is associated with failure to achieve remission and impaired emotion processing in major depression. *Biological Psychiatry*. 2010;67(6):543-549. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.11.004>
35. Sasayama D, Hori H, Teraishi T, et al. Possible association between interleukin-1 $\beta$  gene and schizophrenia in a Japanese population. *Behavioral and Brain Functions*. 2011;7:35. DOI: <https://doi.org/10.1186/1744-9081-7-35>
36. Chiang SS, Riedel M, Schwarz M, et al. Is T-helper type 2 shift schizophrenia-specific? Primary results from a comparison of related psychiatric disorders and healthy controls. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*. 2013;67(4):228-236. DOI: <https://doi.org/10.1111/pcn.12040>
37. Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Science Signaling*.

- 2010;3(105):cm1. DOI:  
<https://doi.org/10.1126/scisignal.3105cm1>
38. Diehl S, Rincón M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Molecular Immunology*. 2002;39(9):531-6. DOI:  
[https://doi.org/10.1016/s0161-5890\(02\)00210-9](https://doi.org/10.1016/s0161-5890(02)00210-9)
39. Cardona-Castro N, Sánchez-Jiménez M, Rojas W, et al. IL-10 gene promoter polymorphisms and leprosy in a Colombian population sample. *Biomedica*. 2012;32(1):71-6. DOI:  
<https://doi.org/10.1590/S0120-41572012000100009>
40. Schotte H, Schlüter B, Schmidt H, et al. Putative IL-10 Low Producer Genotypes Are Associated with a Favourable Etanercept Response in Patients with Rheumatoid Arthritis. *PLoS ONE*. 2015;10(6):e0130907. DOI:  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130907>
41. Enache D, Nikkheslat N, Fathalla D, et al. Peripheral immune markers and antipsychotic non-response in psychosis. *Schizophrenia Research*. 2021;230:1-8. DOI:  
<https://doi.org/10.1016/j.schres.2020.12.020>
42. Cho P, Gelinas L, Corbett NP, et al. Association of common single-nucleotide polymorphisms in innate immune genes with differences in TLR-induced cytokine production in neonates. *Genes and Immunity*. 2013;14(4):199-211. DOI:  
<https://doi.org/10.1038/gene.2013.5>
43. Huik K, Avi R, Pauskar M, et al. Association between TLR3 rs3775291 and resistance to HIV among highly exposed Caucasian intravenous drug users. *Infection, Genetics and Evolution*. 2013;20:78-82. DOI:  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.08.008>
44. Svensson A, Tunbäck P, Nordström I, et al. Polymorphisms in Toll-like receptor 3 confer natural resistance to human herpes simplex virus type 2 infection. *Journal of General Virology*. 2012;93(Pt 8):1717-1724. DOI:  
<https://doi.org/10.1099/vir.0.042572-0>
45. Malashenkova IK, Ushakov VL, Zakharyova NV, et al. Neuro-immune aspects of schizophrenia with severe negative symptoms: new diagnostic markers of disease phenotype. *Sovremennye Tehnologii v Medicine*. 2021;13(6):24-35. DOI:  
<https://doi.org/10.17691/stm2021.13.6.03>

## Information about the authors

**Irina K. Malashenkova**, Cand. Sci. (Medicine), Head of the Laboratory of Molecular Immunology and Virology, Kurchatov Institute, Moscow, Senior Researcher at the Laboratory of Clinical Immunology, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia, E-mail: malashenkova.irina@bk.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3604-9098>.

**Vadim L. Ushakov**, Cand. Sci. (Biology), Associate Professor, Senior Researcher, Moscow Engineering Physics Institute, Moscow, Head of Department, Alekseev Psychiatric Clinical Hospital No. 1, Moscow, Leading Researcher at the Institute for Advanced Brain Studies, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, E-mail: tiuuq@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4716-2109>.

**Sergey A. Krynskiy**, Cand. Sci. (Medicine), Researcher at the Laboratory of Molecular Immunology and Virology, Kurchatov Institute, Moscow, Russia, E-mail: srgkr002@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4328-865X>.

**Daniil P. Ogurtsov**, Cand. Sci. (Medicine), Researcher at the Laboratory of Molecular Immunology and Virology, Kurchatov Institute, Moscow, Russia, E-mail: ogurtsovdp@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0257-4713>.

**Nikita A. Khailov**, Cand. Sci. (Medicine), Senior Researcher at the Resource Center of Molecular and Cell Biology, Kurchatov Institute, Moscow, Russia, E-mail: nik\_khailov@bk.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3693-285X>.

**Svetlana N. Moskvina**, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher at the Laboratory of Molecular Immunology and Virology, Kurchatov Institute, Moscow, Russia, E-mail: kasya45@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3901-674X>.

**Natalia V. Zakharova**, Cand. Sci. (Medicine), Head of the Laboratory of Fundamental Research Methods, Alekseev Psychiatric Clinical Hospital No. 1, Moscow, Russia, E-mail: nataliza80@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7507-327X>.

**Ekaterina I. Chekulaeva**, Junior Researcher at the Resource Center of Molecular and Cell Biology, Kurchatov Institute, Moscow, Russia, E-mail: chekulaevakatarina@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2559-2132>.

Received 11 November 2021

Revised 3 March 2022

Accepted 26 March 2022

**Nikolay A. Didkovsky**, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Clinical Immunology, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia, E-mail: didkovskinic@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6567-5998>.

**Georgy P. Kostyuk**, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Chief Physician, Alekseev Psychiatric Clinical Hospital No. 1, Moscow, Russia, E-mail: kgr@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4320-3644>.



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

УДК 616-006.6

# Герминальные мутации как возможные биомаркеры эффективности терапии ингибиторами контрольных точек иммунитета у пациентов с почечно-клеточной карциномой (мини-обзор)

И.Р. Гилязова<sup>\* 1,2,3</sup>, Д.Д. Асадуллина<sup>\* 1,4</sup>, Е.А. Иванова<sup>1,3</sup>, Р.Р. Рахимов<sup>5</sup>,  
А.А. Измайлова<sup>2,5</sup>, М.А. Бермишева<sup>1,3</sup>, Г.Р. Гилязова<sup>2</sup>,  
И.А. Шарифгалеев<sup>2,5</sup>, М.Ф. Урманцев<sup>2</sup>, Е.В. Попова<sup>5</sup>,  
Р.Я. Сафиханов<sup>4</sup>, В.Н. Павлов<sup>2</sup>, Э.К. Хуснутдинова<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, пр-т. Октября, д. 71, г. Уфа, 450054, Российская Федерация

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет», ул. Ленина, д. 3, г. Уфа, 450008, Российская Федерация

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Университетская набережная, д. 7/9, г. Санкт-Петербург, 199034, Российская Федерация

<sup>4</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный университет», ул. Заки Валиди, д. 32, г. Уфа, 450076, Российская Федерация

<sup>5</sup> Государственное автономное учреждение здравоохранения Республиканский клинический онкологический диспансер, пр-т Октября, д. 73/1, г. Уфа, 450054, Российская Федерация

Автор для переписки: Д.Д. Асадуллина (dilara.asadullina@yandex.ru)

## Резюме

**Актуальность:** Применение ингибиторов контрольных точек иммунитета (ИКТИ) является перспективной терапией в лечении онкологических заболеваний, в частности почечно-клеточной карциномы (ПКК). Несмотря на революционный прорыв в лечении рака данной группой препаратов, существенная доля пациентов не демонстрирует ответа на лечение. На сегодняшний день оценка уровня экспрессии белка PD-L1 (лиганда рецептора запрограммированной клеточной гибели 1) на опухолевых клетках является единственным одобренным методом определения показаний к назначению ИКТИ, однако, данный маркер не позволяет точно спрогнозировать ответ на терапию. В связи с этим, актуален поиск дополнительных прогностических факторов для контроля эффективности лечения пациентов препаратами ИКТИ на основе

\* авторы внесли равный вклад в написание статьи

комплексного генетического и эпигенетического анализа. **Цель исследования:** Проанализировать и обобщить результаты молекулярно-генетических исследований с целью возможного использования в качестве прогностических биомаркеров эффективности при назначении препаратов ИКТИ. **Материалы и методы:** Были проведены обзор и анализ российских и зарубежных источников литературы в базах данных Pubmed, Scopus, Google Academy, Elibrary за последние 5 лет по существующим исследованиям, позволяющим оценить возможные эффекты генетических полиморфизмов на результативность терапии ИКТИ и развитие резистентности. **Результаты:** Герминальные мутации генов, связанные с микроокружением опухоли и генов *PD-1*, *CTLA-4*, а также гетерозиготное носительства гена системы человеческого лейкоцитарного антигена класса I (*HLA-I*) были ассоциированы с улучшением показателей эффективности и выживаемости у пациентов, получающих терапию ИКТИ. Несмотря на существующую проблему невысокой эффективности существующих биомаркеров при назначении иммунотерапии, роль молекулярно-генетических особенностей пациентов с опухолями различной локализации мало изучена и требует проведения дальнейших исследований в этой области. **Заключение:** Молекулярно-генетические особенности пациента играют важную роль в формировании ответа на терапию, в том числе противоопухолевую. Использование их в качестве дополнительных прогностических маркеров эффективности терапии ИКТИ у пациентов с различными опухолями позволит персонифицировать подход в лечении онкологических заболеваний, повысить точность отбора кандидатов и уменьшить риск возникновения иммуноопосредованных нежелательных явлений.

**Ключевые слова:** ингибиторы контрольных точек иммунитета; *PD-1*; лекарственная резистентность; почечно-клеточная карцинома; генетика; герминальные мутации

**Для цитирования:** Гилязова ИР, Асадуллина ДД, Иванова ЕА, и др. Герминальные мутации как возможные биомаркеры эффективности терапии ингибиторами контрольных точек иммунитета у пациентов с почечно-клеточной карциномой (мини-обзор). Научные результаты биомедицинских исследований. 2022;8(2): 164-179. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-3

## Germline mutations as possible biomarkers of immune checkpoint inhibitor therapy efficacy in patients with renal cell carcinoma (mini review)

Irina R. Gilyazova<sup>\* 1,2,3</sup> , Dilara D. Asadullina<sup>\* 1,4</sup> , Elizaveta A. Ivanova<sup>1,3</sup> , Radmir R. Rakhimov<sup>5</sup> , Adel A. Izmailov<sup>2,5</sup> , Marina A. Bermisheva<sup>1,3</sup> , Gulshat R. Gilyazova<sup>2</sup> , Ildar A. Sharifgaleev<sup>2,5</sup> , Marat F. Urmantsev<sup>2</sup> , Ekaterina V. Popova<sup>5</sup> , Rishat Ya. Safikhanov<sup>4</sup> , Valentin N. Pavlov<sup>2</sup> , Elza K. Khusnutdinova<sup>1,2,3,4</sup> 

<sup>1</sup> Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, RAS,

71 Oktyabrya Ave., Ufa, 450054, Russia

<sup>2</sup> Bashkir State Medical University,

\* the authors have made an equal contribution to the writing of the article

3 Lenin St., Ufa, 450008, Russia

<sup>3</sup> Saint Petersburg State University,

7/9 Universitetskaya Emb., St. Petersburg, 199034, Russia

<sup>4</sup> Bashkir State University,

32 Zaki Validi St., Ufa, 450076, Russia

<sup>5</sup> Republican Clinical Oncology Dispensary,

73/1 Oktyabrya Ave., Ufa, 450054, Russia

Corresponding author: Dilara D. Asadullina (dilara.asadullina@yandex.ru)

## Abstract

**Background:** The use of immune checkpoint inhibitors (ICIs) is a promising therapy in cancer treatment, in particular renal cell carcinoma (RCC). Despite the revolutionary breakthrough in cancer treatment, a significant part of patients is resistant to ICIs. To date, the assessment of the PD-L1 protein expression level (programmed cell death receptor 1 ligand) on tumor cells is the only approved method for prescribing ICI therapy, however, this marker does not accurately predict the response to therapy. In this regard, the search for additional prognostic factors to control the treatment success of patients with ICI drugs based on complex genetic and epigenetic analysis is relevant. **The aim of the study:** To analyze and summarize the results of molecular genetic studies for the purpose of possible use as efficacy prognostic biomarkers when prescribing ICT drugs. **Materials and methods:** The review and analysis of Russian and foreign literature in the Pubmed, Scopus, Google Academy, Eli-brary databases over the past 5 years was performed based on existing studies that allow to evaluate the possible effects of genetic polymorphisms on the ICI therapy efficacy and the resistance development. **Results:** Germline mutations in genes associated with the tumor microenvironment and *PD-1*, *CTLA-4* genes, as well as heterozygous carriage of the human leukocyte antigen class I (*HLA-I*) gene were associated with improved efficacy and survival rates in patients receiving ICI therapy. Despite the relevant problem of the existing biomarkers failure in the immunotherapy administration, the role of molecular genetic features of cancer patients has been underexplored and requires further research in this area. **Conclusion:** Molecular genetic characteristics of patients play an important role in the therapy response, including antitumor therapy. The use of additional prognostic markers for ICIs therapy efficacy in patients with different tumor types will make it possible to personalize the approach in cancer treatment, increase the accuracy of candidate selection and reduce the risk of immune-mediated adverse events.

**Keywords:** immune checkpoint inhibitors; *PD-1*; drug resistance; renal cell carcinoma; genetics; germline mutations

**For citation:** Gilyazova IR, Asadullina DD, Ivanova EA, et al. Germline mutations as possible biomarkers of immune checkpoint inhibitor therapy efficacy in patients with renal cell carcinoma (mini review). Research Results in Biomedicine. 2022;8(2): 164-179. Russian. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-3

**Введение.** Злокачественные новообразования почек составляют около 2% глобальных диагнозов рака и смертей от него. Около 95% всех случаев рака почки представлены почечно-клеточным раком (ПКР, ПКК). В большинстве молекулярно-биологических и клинических исследований исследуют самую частую форму рака почки –

светлоклеточную почечно-клеточную карциному (скПКК), составляющую около 75% случаев заболевания [1, 2]. За последние полвека заболеваемость ПКК в развитых странах увеличилась более чем вдвое. Согласно статистике GLOBOCAN, смертность от ПКК в 2020 году составила более 179 000 человек [3]. В России ПКК входит

в число наиболее часто возникающих опухолей в общей структуре онкологических заболеваний. В 2019 году в РФ летальный исход при ПКК составил более 8000 человек [4].

Ингибиторы контрольных точек иммунитета (ИКТИ) произвели прорыв в системной противоопухолевой терапии [5-21], в частности, в лечении метастатической ПКК [1]. Их противоопухолевое действие основано на блокаде сигнальных пу-

тей CTLA-4 и PD-1/PD-L1 и усилении противоопухолевой активности лимфоцитов (Рис.1). Внедрение в клиническую практику ингибиторов контрольных точек иммунного ответа, блокирующих цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный протеин 4 (CTLA-4), белок запрограммированной клеточной гибели-1 (PD-1) и лиганд рецептора запрограммированной клеточной гибели (PD-L1), позволило улучшить показатели выживаемости пациентов со злокачественными новообразованиями различной локализации, в том числе при ПКК.

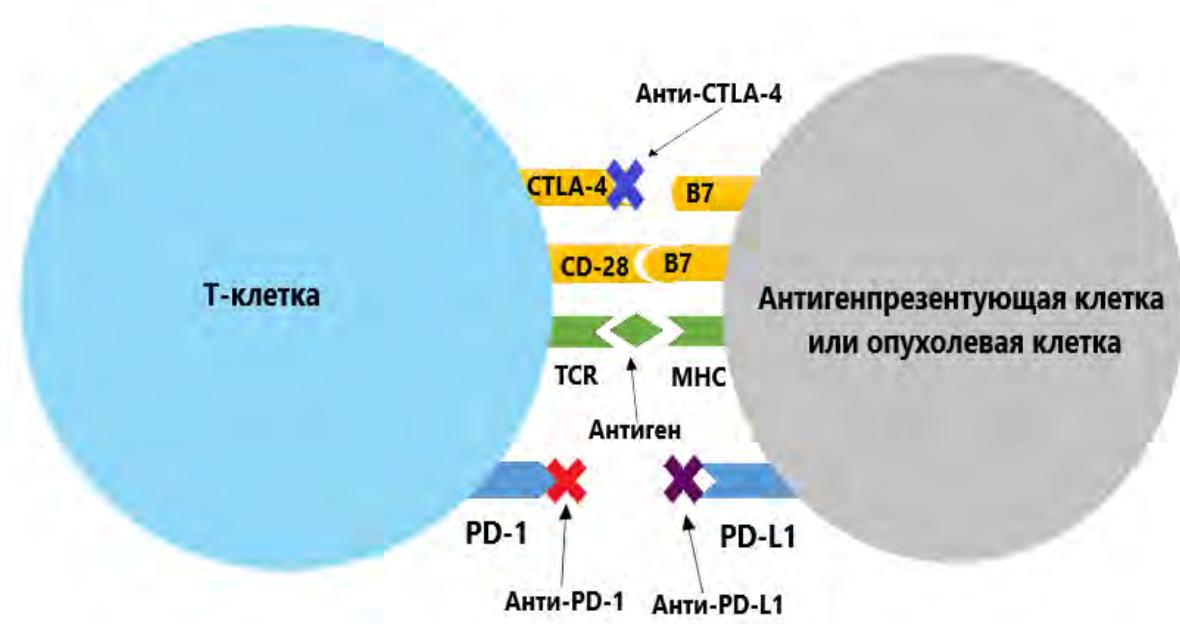


Рис. 1. Механизм действия ингибиторов сигнальных путей PD-1/PD-L1 и CTLA-4.  
МНС – молекулы главного комплекса гистосовместимости; ТСР – рецептор Т-лимфоцитов;  
В7 – мембранный белок на поверхности антиген-презентирующих клеток; CD-28 – костимулирующий поверхностный белок на Т-клетке; PD-1 – белок запрограммированной клеточной гибели-1; PD-L1 – лиганд белка программируемой клеточной гибели 1; CTLA-4 – гликопротеин цитотоксических Т-лимфоцитов 4; анти- PD-1, анти-CTLA-4, анти-PD-L1 – моноклональные антитела к белкам PD-1 и CTLA-4 и лиганду белка PD-L1.

Fig. 1. Mechanism of action of PD-1/PD-L1 and CTLA-4 signaling pathway inhibitors.  
MHC – major histocompatibility complex; TCR – T-cell receptor; B7 – membrane protein on the surface of antigen-presenting cells; CD-28 – costimulating surface protein on T cell; PD-1 – programmed cell death protein 1; PD-L1 – programmed cell death ligand 1; CTLA-4 – glycoprotein of cytotoxic T-lymphocytes 4; anti-PD-1, anti-CTLA-4, anti-PD-L1 – monoclonal antibodies to PD-1, CTLA-4 and PD-L1.

В настоящее время иммуноонкологические препараты, одобренные управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA), применяются

в качестве монотерапии или в комбинации с другими группами препаратов для терапии широкого спектра раковых опухолей (Таблица 1).

Таблица 1

**Перечень препаратов ингибиторов контрольных точек иммунитета, одобренных управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA)**

Table 1

**FDA-approved immune checkpoint inhibitors**

Тип опухоли	Терапевтический агент
Плоскоклеточный рак головы и шеи	Ниволумаб или Пембролизумаб как препараты второй линии терапии
	Пембролизумаб в комбинации с препаратами платины
Злокачественная меланома	Ипилимумаб, ниволумаб или пембролизумаб
	Ниволумаб + Ипилимумаб
Почечно-клеточная карцинома	Ниволумаб + Ипилимумаб
	Ниволумаб
Немелкоклеточный рак лёгкого	Дурвалумаб
	Пембролизумаб
	Пембролизумаб + препараты платины + Пеметрексед
	Атезолизумаб + Бевацизмаб
	Пембролизумаб в комбинации с препаратами платины
	Пембролизумаб
Мелкоклеточный рак лёгкого	Атезолизумаб или Ниволумаб
Лимфома Ходжкина	Пембролизумаб
MSI-высокие или MMR-дефицитные солидные опухоли любой гистологии	Пембролизумаб

Несмотря на улучшение прогноза выживаемости и большое разнообразие схем лечения препаратами данной группы, только небольшая часть пациентов демонстрирует ответ на терапию, большинство остается невосприимчивыми и резистентными к лечению [5, 18, 21, 22, 23].

Существует несколько биомаркеров, ассоциированных с реакцией на терапию анти-PD-1/анти-PD-L1 антителами (Таблица 2). Эти биомаркеры охватывают

как саму опухоль, так и её микроокружение и включают экспрессию белка PD-L1, уровень лактатдегидрогеназы (LDH), мутации генов системы восстановления нессоответствия (репарации) ДНК (MMR), варианты генов, мутационную нагрузку опухоли и т.д. [18]. Однако, перечисленные биомаркеры имеют ряд недостатков, что требует всестороннего поиска кандидатов, которые смогут восполнить недостатки существующих предикторов [19].

Таблица 2

## Биомаркеры, ассоциированные с ответом на терапию ИКТИ

Table 2

## Biomarkers associated with response to ICI therapy

Биомаркер	Заболевание
Уровень лактатдегидрогиназы	Меланома
Уровень проапоптотического белка семейства BCL2 (BIM) в циркулирующих Т-клетках	Меланома
Количество лимфоцитов и относительное количество эозинофилов	Меланома
Уровень SOX2 (SRY-box фактор транскрипции 2), экспрессируемый Т-клетками	Немелкоклеточный рак легкого
Соотношение нейтрофилов к лимфоцитам	Немелкоклеточный рак легкого
Концентрация циркулирующего растворимого белка PD-L1 (sPD-L1) в плазме	Меланома
Концентрация циркулирующего растворимого белка PD-1 (sPD-1) в плазме	Немелкоклеточный рак легкого
Экспрессия генов <i>IFN-γ, IDO1, CXCL9</i>	Меланома, немелкоклеточный рак легкого, почечно-клеточная карцинома
Мутации генов <i>EGFR, MDM2, MDM4</i>	Аденокарцинома лёгких, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, эндометриальная стромальная саркома
Мутации генов <i>EGFR</i> и <i>ALK</i>	Немелкоклеточный рак легкого
Мутации гена <i>KRAS</i> или <i>TP53</i>	Немелкоклеточный рак легкого
Мутация гена <i>STK11</i>	Аденокарцинома лёгкого, сопровождаемая мутацией гена KRAS
Мутации генов системы репарации ошибочно спаренных оснований ( <i>MMR</i> )	12 типов опухолей
Мутация гена <i>PBRM1</i>	Светлоклеточная почечно-клеточная карцинома
Мутация в гене реакции на повреждение ДНК ( <i>DDR</i> )	Прогрессивный уротелиальный рак
Однонуклеотидные полиморфные варианты в генах микроокружения опухоли	Немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточный рак головы и шеи, меланома
rs17388568	Метастатическая меланома
Экспрессия генов, кодирующих белки CD8-, PD-1 PD-L1	Метастатическая меланома
Экспрессия гена, кодирующего белок PD-L2	Плоскоклеточный рак головы и шеи, меланома

**Цель исследования.** Анализ и обобщение результатов молекулярно-генетического изучения герминальных мутаций как возможных предикторов эффективности и безопасности при назначении терапии ИКТИ.

#### Индивидуальные генетические особенности пациента

На сегодняшний день большинство исследований, направленных на прогнозирование клинической эффективности иммunoонкологических препаратов, сосредоточены на анализе молекулярного портрета опухоли [5, 21, 24, 25] и её микроокружения [5, 21, 24, 26, 27]. Очень часто различия эффективности и токсичности любой терапии, в том

числе противоопухолевой, зависят от индивидуальных генетических особенностей пациента [21, 24, 28]. В терапии рака важен комплексный подход и анализ как генома опухоли (соматический), так и генома самого пациента (герминальный), которые определяют исход лечения. Совокупность герминальных изменений в геноме пациента, кодируя соответствующие белки, обеспечивает все жизненно важные процессы в организме. Следовательно, изменчивость генома может иметь последствия для любой системы организма пациента. Герминальные патогенные мутации возникают в половых клетках наследуются в последующих поколениях, обнаруживаются во всех клет-

ках организма [29] и редко встречаются в популяциях (частота их встречаемости меньше 1%). Однако, частота герминальных мутаций, ассоциированных с различными наследственными онкологическими заболеваниями [30, 31], с чувствительностью и резистентностью к определенному виду терапии, с развитием побочных реакций [32] может достигать порядка 15% [29].

Однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) традиционно используются для понимания механизмов реакции на лекарственную терапию при различных заболеваниях и легче стандартизуются [19]. На сегодняшний день влияние генетических полиморфизмов ключевых генов на терапевтический ответ при лечении препаратами ИКТИ при различных онкологических заболеваниях мало изучено [21]. Выявление полиморфных вариантов генов как факторов эффективности иммунотерапии, а также факторов, способных предсказать токсичность, связанную с лечением, является актуальной задачей, решение которой будет способствовать формированию групп пациентов с наибольшей вероятностью отвечающих на терапию. Подобная информация целесообразна для применения в практической онкологии для персонифицированного подхода в иммунотерапии онкологических заболеваний различной локализации, в том числе при ПКК.

В связи с этим во всём мире активно ведутся исследования герминальных и соматических изменений, способных влиять на терапевтический ответ при лечении препаратами ИКТИ.

### Иммунная система и эффективность терапии ИКТИ

Доказано, что гомеостаз иммунной системы организма и ключевые биологические механизмы, её контролирующие, играют важную роль в успешном применении препаратов ИКТИ [5]. Взаимосвязь канцерогенеза с воспалительным компонентом опосредуется через активацию факторов врожденного иммунитета. Иммунная система представляет собой сложный многоуровневый комплекс систем разных типов клеток, распознающих чужеродные клетки. Данный

комплекс состоит из активизирующих и ингибирующих компонентов, включая многочисленные механизмы иммунологической толерантности. Нормальное функционирование иммунной системы подразумевает серию комплексных взаимодействий.

Регуляция защитных реакций организма, в том числе функций клеток-мишений, осуществляется с помощью растворимых медиаторов, называемых цитокинами, на внеклеточном и внутриклеточном уровнях. Они являются ключевыми модуляторами тканевого повреждения, множества гомеостатических и воспалительных процессов, участвуют в патогенезе многих заболеваний. Цитокины классифицируют на отдельные группы на основе их структуры, связанного с ними сигнального пути, а также по характеру действия (интерлейкины, интерфероны, хемокины, факторы роста, фактор некроза опухоли (ФНО) [33]. Так, хемокины могут прямо и косвенно воздействовать на опухолевые клетки и способны регулировать их пролиферацию, миграцию, инвазию, метастазирование [34, 35]. Они также инициируют хемотаксис, который лежит в основе процесса «скользания» опухолевых клеток от иммунного ответа; могут привести к иммунной толерантности и прогрессированию опухоли [36, 37]. Хемокины и цитокины также принимают участие в ангиогенезе опухоли, который необходим для оптимальной прогрессии онкологического процесса. Количество кровеносных сосудов в опухоли коррелирует с более высокой частотой метастазирования и более частыми рецидивами [37].

Не менее важную роль в формировании и регуляции иммунного ответа при раке играют интерлейкины, обеспечивающие медиаторное взаимодействие и связь иммунной системы с другими системами организма, а также интерфероны, которые оказывают антипролиферативную и противоопухолевую активность в отношении опухолевых клеток.

Определяющим фактором поддержания гомеостаза иммунной системы является наследственный компонент индивидуума

[5]; генетические особенности лежат в основе различий в активации определенных типов иммунных клеток, в частности CD4+ и CD8+ Т-клеток [38], иммуностимулирующих молекул и генов, связанных с иммунитетом [39].

Так, в недавнем исследовании обнаружена взаимосвязь между SNP генов, связанными с микроокружением опухоли (*CCL2*, *NOS3*, *IL1RN*, *IL12B*, *CXCR3* и *IL6R*) и эффективностью терапии ингибиторами контрольных точек иммунного ответа у пациентов с опухолями различной локализации, в том числе ПКК [25]. Безопасность данной группы препаратов была ассоциирована с SNP, расположенными в генах *UNG*, *IFNW1*, *CTLA 4*, *PD-L1* и *IFNL4* у тех же пациентов [25].

### Герминальные мутации и прогнозирование ответа на терапию ИКТИ

При анализе однонуклеотидных полиморфных вариантов в генах *PD-L1* показано, что пациенты с немелкоклеточным раком лёгкого – носители генотипов rs4143815\*C/C и rs4143815\*C/G гена *PD-L1* при терапии ниволумабом демонстрировали лучшую эффективность и выживаемость без прогрессирования по сравнению с пациентами-носителями генотипа rs4143815\*G/G [40-44]. Аналогичным образом, взаимосвязь частоты объективного ответа на терапию препаратами ИКТИ и выживаемости без прогрессирования была продемонстрирована у пациентов с генотипами rs2282055\*G/G и rs2282055\*G/T гена *PD-L1* по сравнению с пациентами, являющимися носителями генотипа rs2282055\* T/T [40, 41].

В другом исследовании показано, что носители минорного аллеля rs17388568\*A демонстрировали ответ на терапию антителами к PD-1 рецептору [45].

У пациентов с меланомой, получающих терапию анти-PD-1 антителами, был проанализирован ряд однонуклеотидных полиморфизмов – rs36084323, rs11568821, rs2227981, rs102042256 rs2227982 и обнаружено, что носители генотипа rs11568821\*G/G демонстрировали более полный терапевтический ответ по сравнению с носителями генотипа

rs11568821\*A/G. Это свидетельствует о том, что аллель rs11568821\*G ассоциирован с лучшей выживаемостью без прогрессирования [46].

В работе, проведенной Mirjam de With с коллегами в 2021 году выявлено, что пациенты с сочетанием генотипов rs2227981\*CT и rs2227981\*TT гена *PD-1* демонстрировали ухудшение общей выживаемости по сравнению с пациентами-носителями генотипа rs2227981\*CC. Кроме того, у носителей PDCD1 804C > T обнаружили снижение доли периферических PD-1+CD4+ Т-клеток [47].

С другой стороны, в другом исследовании продемонстрировали влияние полиморфных вариантов гена белка 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4) на ответ на терапию антителами к CTLA-4 у пациентов с меланомой [48].

Недавнее секвенирование нового поколения (NGS) позволило выявить взаимосвязь гетерозиготного носительства гена главного комплекса гистосовместимости (*HLA-I*), презентующего Т-клеткам опухолевые пептиды, с реакцией на терапию анти-PD-антителами и показателями выживаемости у пациентов с меланомой и раком легких [5]. Полученные данные соответствуют результатам более ранних исследований, которые показали, что эффективность терапии ИКТИ зависит от иммунной активности *HLA-I* [21, 49, 50, 51]. При этом эффективность терапии препаратами ИКТИ снижалась при соматической потере гетерозиготного носительства гена системы тканевой совместимости *HLA-I* в опухолевых клетках. Таким образом, это демонстрирует взаимосвязь презентации специфических опухолевых антигенов Т-эффекторным клеткам с разным носительством гена системы *HLA-I* [49]. А Hasan Ali O. с коллегами в своей работе выявили взаимосвязь развития побочных эффектов у пациентов со специфическими мутациями генов системы *HLA-I* при применении ИКТИ [52].

**Заключение.** Таким образом, несмотря на значительное количество проведенных исследований, до сих пор не выяв-

лены какие-либо надежные маркеры, способные предсказать эффективность применения препаратов ИКТИ у пациентов с онкологическими заболеваниями. В связи с этим, понимание механизмов, лежащих в основе индивидуальных особенностей ответа на терапию препаратами ИКТИ, остается одной из ключевых задач персонализированного подхода в современной онкотерапии. Акцент на герминалных изменениях в геноме пациента и использование их в качестве прогностических факторов, ввиду их специфичности, легкодоступности и неинвазивности, позволят потенциально прогнозировать эффективность и безопасность применения препаратов ИКТИ при лечении пациентов. Перечисленные выше исследования демонстрируют ассоциацию герминалных полиморфных вариантов ряда генов с показателями общей выживаемости в ответ на иммунотерапию у пациентов с опухолями различной локализации и должны учитываться вместе со свойствами опухоли и её микроокружением в качестве прогностических биомаркеров эффективности терапии ИКТИ. Полученные на небольших выборках данные подтверждают роль генетических полиморфизмов в прогнозировании эффективности и безопасности иммунотерапии. Последующее изучение и подтверждение данных на больших выборках позволит в дальнейшем применять генетические полиморфизмы в качестве дополнительных биомаркеров прогнозирования эффективности и безопасности иммунотерапии.

## Информация о финансировании

Работа проведена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации [№AAA-A16-116020350032-1] и финансовой поддержки Санкт-Петербургского государственного университета (проект № 93025749).

## Financial support

This work was supported by the Ministry of Science and Education of the Russian Federation [No. AAA-A16-116020350032-1] and financial support from St. Petersburg State University (project No 93025749).

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Conflict of interests

The authors have no conflict of interest to declare.

## Список литературы

1. Tung I, Sahu A. Immune Checkpoint Inhibitor in First-Line Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma: A Review of Current Evidence and Future Directions. *Frontiers in Oncology*. 2021;11:707214. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.707214>
2. Ross K, Jones RJ. Immune checkpoint inhibitors in renal cell carcinoma. *Clinical Science*. 2017;131(21):2627-2642. DOI: <https://doi.org/10.1042/CS20160894>
3. Global Cancer Observatory [Internet] [cited 2022 Mar 15]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/29-Kidney-fact-sheet.pdf>
4. Kaprin AD, Starinskogo VV, Shahzadov AO. The state of cancer care for the population of Russia in 2019. M.: MNIOI P.A. Gerzena; 2020.
5. Chat V, Ferguson R, Kirchhoff T. Germline genetic host factors as predictive biomarkers in immuno-oncology. *Immuno-Oncology and Technology*. 2019;2:14-21. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.iotech.2019.08.001>
6. Sul J, Blumenthal GM, Jiang X, et al. FDA Approval Summary: pembrolizumab for the treatment of patients with metastatic non-small cell lung cancer whose tumors express programmed death-ligand 1. *Oncologist*. 2016;21(5):643-650. DOI: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0498>
7. Pai-Scherf L, Blumenthal GM, Li H, et al. FDA Approval Summary: pembrolizumab for treatment of metastatic non-small cell lung cancer: first-line therapy and beyond. *Oncologist*. 2017;22(11):1392-1399. DOI: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0078>
8. Li H, Yu J, Liu C, et al. Time dependent pharmacokinetics of pembrolizumab in patients with solid tumor and its correlation with best overall response. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2017;44(5):403-414. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10928-017-9528-y>
9. Larkins E, Blumenthal GM, Yuan W, et al. FDA Approval Summary: pembrolizumab for the treatment of recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma with disease pro-

- gression on or after platinum-containing chemotherapy. *Oncologist.* 2017;22(7):873-878. DOI: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0496>
10. Three drugs approved for urothelial carcinoma by FDA. *Cancer Discovery.* 2017;7(7):659-660. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-NB2017-071>
11. Sheng J, Srivastava S, Sanghavi K, et al. Clinical pharmacology considerations for the development of immune checkpoint inhibitors. *Journal of Clinical Pharmacology.* 2017;57(s10):S26-S42. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcph.990>
12. Kazandjian D, Suzman DL, Blumenthal G, et al. FDA Approval Summary: nivolumab for the treatment of metastatic non-small cell lung cancer with progression on or after platinum-based chemotherapy. *Oncologist.* 2016;21(5):634-642. DOI: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0507>
13. Weinstock C, Khozin S, Suzman D, et al. U.S. Food and Drug Administration Approval Summary: atezolizumab for metastatic non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research.* 2017;23(16):4534-4539. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0540>
14. Ning YM, Suzman D, Maher VE, et al. FDA Approval Summary: atezolizumab for the treatment of patients with progressive advanced urothelial carcinoma after platinum-containing chemotherapy. *Oncologist.* 2017;22(6):743-749. DOI: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0087>
15. Nod for atezolizumab in advanced bladder cancer. *Cancer Discovery.* 2017;7(6):OF4. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-NB2017-064>
16. Kaufman HL, Russell J, Hamid O, et al. Avelumab in patients with chemotherapy-refractory metastatic Merkel cell carcinoma: a multicentre, singlegroup, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology.* 2016;17(10):1374-1385. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30364-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30364-3)
17. Syed YY. Durvalumab: first global approval. *Drugs.* 2017;77(12):1369-1376. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0782-5>
18. Guo L, Wei R, Lin Y, et al. Clinical and Recent Patents Applications of PD-1/PD-L1 Targeting Immunotherapy in Cancer Treatment—Current Progress, Strategy, and Future Perspective. *Frontiers in Immunology.* 2020;11:1508. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01508>
19. Chen Q, Li T, Yue W. Drug response to PD-1/PD-L1 blockade: based on biomarkers. *OncoTargets and Therapy.* 2018;11:4673-4683. DOI: <https://doi.org/10.2147/OTT.S168313>
20. Gong J, Chehrazi-Raffle A, Reddi S, et al. Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer.* 2018;6(1):8. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0316-z>
21. Havel JJ, Chowell D, Chan TA. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Nature Reviews Cancer.* 2019;19(3):133-150. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0116-x>
22. Weiss SA, Wolchok JD, Sznol M. Immunotherapy of Melanoma: Facts and Hopes. *Clinical Cancer Research.* 2019;25(17):5191-5201. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1550>
23. Dempke WCM, Fenchel K, Uciechowski P, Dale SP. Second- and third-generation drugs for immuno-oncology treatment-The more the better? *European Journal of Cancer.* 2017;74:55-72. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.01.001>
24. Refaei S, Gal J, Ebran N, et al. Germinal Immunogenetics predict treatment outcome for PD1/PD-L1 checkpoint inhibitors. *Investigational New Drugs.* 2020;38(1):160-171. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10637-019-00845-w>
25. McGranahan N, Furness AJ, Rosenthal R, et al. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science.* 2016;351(6280):1463-1469. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aaf1490>
26. Chen P, Roh W, Reuben A, et al. Analysis of Immune Signatures in Longitudinal Tumor Samples Yields Insight into Biomarkers of Response and Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Discovery.* 2016;6(8):827-837. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1545>
27. Topalian SL, Taube JM, Anders RA, et al. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer.* 2016;16(5):275-287. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.36>
28. Tian C, Hromatka BS, Kiefer AK, et al. Genome-wide association and HLA region fine-mapping studies identify susceptibility loci for multiple common infections. *Nature Communications.* 2017;8:599. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00257-5>

29. Гордиев МГ, Бровкина ОИ, Еникеев РФ, и др. Руководство по интерпретации клинически значимых соматических мутаций при солидных опухолях, выявленных методом секвенирования следующего поколения (NGS), с целью их клинического использования. М.: Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии»; 2020.

30. Баранова ЕЕ, Бодунова НА, Воронцова МВ, и др. Наследственные опухолевые синдромы: современная парадигма. Проблемы Эндокринологии. 2020;66(4):24-34. DOI: <https://doi.org/10.14341/probl12366>

31. Carter H, Marty R, Hofree M, et al. Interaction Landscape of Inherited Polymorphisms with Somatic Events in Cancer. *Cancer Discovery*. 2017;7(4):410-423. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-1045>

32. Yurgelun MB, Chenevix-Trench G, Lippman SM. Translating Germline Cancer Risk into Precision Prevention. *Cell*. 2017;168(4):566-570. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.031>

33. Tait Wojno ED, Hunter CA, Stumhofer JS. The Immunobiology of the Interleukin-12 Family: Room for Discovery. *Immunity*. 2019;50(4):851-870. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.011>

34. Johdi NA, Mazlan L, Sagap I, et al. Profiling of cytokines, chemokines and other soluble proteins as a potential biomarker in colorectal cancer and polyps. *Cytokine*. 2017;99:35-42. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.06.015>

35. Nagarsheth N, Wicha MS, Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*. 2017;17:559-572. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri.2017.49>

36. Korbecki J, Kojder K, Simińska D, et al. CC Chemokines in a Tumor: A Review of Pro-Cancer and Anti-Cancer Properties of the Ligands of Receptors CCR1, CCR2, CCR3, and CCR4. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(21):8412. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21218412>

37. Святич ОА, Филина АБ, Давыдова НВ, и др. Роль факторов врожденного иммунитета в процессе опухолеобразования. *Медицинская иммунология*. 2018;20(2):151-162. DOI: <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2018-2-151-162>

38. Patin E, Hasan M, Bergstedt J, et al. Natural variation in the parameters of innate immune

cells is preferentially driven by genetic factors. *Nature Immunology*. 2018;19(3):302-314. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0049-7>

39. Urrutia A, Duffy D, Rouilly V, et al. Standardized Whole-Blood Transcriptional Profiling Enables the Deconvolution of Complex Induced Immune Responses. *Cell Reports*. 2016;16(10):2777-2791. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.011>

40. Nomizo T, Ozasa H, Tsuji T, et al. Clinical impact of single nucleotide polymorphism in PD-L1 on response to nivolumab for advanced nonsmall-cell lung cancer patients. *Scientific Reports*. 2017;7:45124. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep45124>

41. Refaei S, Gal J, Brest P, et al. Germinal immunogenetics as a predictive factor for immunotherapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2019;141:146-152. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.06.013>

42. Yeo MK, Choi SY, Seong IO, et al. Association of PD-L1 expression and PD-L1 gene polymorphism with poor prognosis in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Human Pathology*. 2017;68:103-111. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2017.08.016>

43. Lee SY, Jung DK, Choi JE, et al. Functional polymorphisms in PD-L1 gene are associated with the prognosis of patients with early stage non-small cell lung cancer. *Gene*. 2017;599:28-35. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.11.007>

44. Minari R, Bonatti F, Mazzaschi G, et al. PD-L1 SNPs as biomarkers to define benefit in patients with advanced NSCLC treated with immune checkpoint inhibitors. *Tumori Journal*. 2022;108(1):47-55. DOI: <https://doi.org/10.1177/03008916211014954>

45. Chat V, Ferguson R, Simpson D, et al. Autoimmune genetic risk variants as germline biomarkers of response to melanoma immune-checkpoint inhibition. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2019;68(6):897-905. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00262-019-02318-8>

46. Parakh S, Musafer A, Paessler S, et al. PDCD1 Polymorphisms May Predict Response to Anti-PD-1 Blockade in Patients With Metastatic Melanoma. *Frontiers in Immunology*. 2021;2:672521. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.672521>

47. With MD, Hurkmans DP, Oomen-de Hoop E, et al. Germline Variation in PDCD1 Is Associated with Overall Survival in Patients with Metastatic Melanoma Treated with anti-PD-1

Monotherapy Germline genetic host factors as predictive biomarkers in immuno-oncology. *Cancers.* 2021;13(6):1370. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers13061370>

48. Queirolo P, Dozin B, Morabito A, et al. Association of CTLA-4 Gene Variants with Response to Therapy and Long-term Survival in Metastatic Melanoma Patients Treated with Ipilimumab: An Italian Melanoma Intergroup Study. *Frontiers in Immunology.* 2017;8:386. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00386>

49. Chowell D, Morris LGT, Grigg CM, et al. Patient HLA class I genotype influences cancer response to checkpoint blockade immunotherapy. *Science.* 2018;359(6375):582-587. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aoa4572>

50. Kvistborg P, Yewdell JW. Enhancing responses to cancer immunotherapy. *Science.* 2018;359(6375):516-517. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aar6574>

51. Chowell D, Krishna C, Pierini F, et al. Evolutionary divergence of HLA class I genotype impacts efficacy of cancer immunotherapy. *Nature Medicine.* 2019;25(11):1715-1720. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0639-4>

52. Ali OH, Berner F, Bomze D, et al. Human leukocyte antigen variation is associated with adverse events of checkpoint inhibitors. *European Journal of Cancer.* 2019;107:8-14. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.11.009>

## References

1. Tung I, Sahu A. Immune Checkpoint Inhibitor in First-Line Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma: A Review of Current Evidence and Future Directions. *Frontiers in Oncology.* 2021;11:707214. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.707214>
2. Ross K, Jones RJ. Immune checkpoint inhibitors in renal cell carcinoma. *Clinical Science.* 2017;131(21):2627-2642. DOI: <https://doi.org/10.1042/CS20160894>
3. Global Cancer Observatory [Internet] [cited 2022 Mar 15]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/29-Kidney-fact-sheet.pdf>
4. Kaprin AD, Starinskogo VV, Shahzadov AO. The state of cancer care for the population of Russia in 2019. M.: MNIOI P.A. Gerzena; 2020.
5. Chat V, Ferguson R, Kirchhoff T. Germline genetic host factors as predictive biomarkers in immuno-oncology. *Immuno-Oncology and Technology.* 2019;2:14-21. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.iotech.2019.08.001>

6. Sul J, Blumenthal GM, Jiang X, et al. FDA Approval Summary: pembrolizumab for the treatment of patients with metastatic non-small cell lung cancer whose tumors express programmed death-ligand 1. *Oncologist.* 2016;21(5):643-650. DOI: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0498>

7. Pai-Scherf L, Blumenthal GM, Li H, et al. FDA Approval Summary: pembrolizumab for treatment of metastatic non-small cell lung cancer: first-line therapy and beyond. *Oncologist.* 2017;22(11):1392-1399. DOI: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0078>

8. Li H, Yu J, Liu C, et al. Time dependent pharmacokinetics of pembrolizumab in patients with solid tumor and its correlation with best overall response. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics.* 2017;44(5):403-414. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10928-017-9528-y>

9. Larkins E, Blumenthal GM, Yuan W, et al. FDA Approval Summary: pembrolizumab for the treatment of recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma with disease progression on or after platinum-containing chemotherapy. *Oncologist.* 2017;22(7):873-878. DOI: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0496>

10. Three drugs approved for urothelial carcinoma by FDA. *Cancer Discovery.* 2017;7(7):659-660. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-NB2017-071>

11. Sheng J, Srivastava S, Sanghavi K, et al. Clinical pharmacology considerations for the development of immune checkpoint inhibitors. *Journal of Clinical Pharmacology.* 2017;57(s10):S26-S42. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcph.990>

12. Kazandjian D, Suzman DL, Blumenthal G, et al. FDA Approval Summary: nivolumab for the treatment of metastatic non-small cell lung cancer with progression on or after platinum-based chemotherapy. *Oncologist.* 2016;21(5):634-642. DOI: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0507>

13. Weinstock C, Khozin S, Suzman D, et al. U.S. Food and Drug Administration Approval Summary: atezolizumab for metastatic non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research.* 2017;23(16):4534-4539. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0540>

14. Ning YM, Suzman D, Maher VE, et al. FDA Approval Summary: atezolizumab for the treatment of patients with progressive advanced urothelial carcinoma after platinum-containing chemotherapy. *Oncologist.* 2017;22(6):743-749.

DOI: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0087>

15. Nod for atezolizumab in advanced bladder cancer. *Cancer Discovery*. 2017;7(6):OF4. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-NB2017-064>

16. Kaufman HL, Russell J, Hamid O, et al. Avelumab in patients with chemotherapy-refractory metastatic Merkel cell carcinoma: a multicentre, singlegroup, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2016;17(10):1374-1385. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30364-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30364-3)

17. Syed YY. Durvalumab: first global approval. *Drugs*. 2017;77(12):1369-1376. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0782-5>

18. Guo L, Wei R, Lin Y, et al. Clinical and Recent Patents Applications of PD-1/PD-L1 Targeting Immunotherapy in Cancer Treatment—Current Progress, Strategy, and Future Perspective. *Frontiers in Immunology*. 2020;11:1508. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01508>

19. Chen Q, Li T, Yue W. Drug response to PD-1/PD-L1 blockade: based on biomarkers. *Oncotargets and Therapy*. 2018;11:4673-4683. DOI: <https://doi.org/10.2147/OTT.S168313>

20. Gong J, Chehrazi-Raffle A, Reddi S, et al. Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2018;6(1):8. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0316-z>

21. Havel JJ, Chowell D, Chan TA. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*. 2019;19(3):133-150. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0116-x>

22. Weiss SA, Wolchok JD, Sznol M. Immunotherapy of Melanoma: Facts and Hopes. *Clinical Cancer Research*. 2019;25(17):5191-5201. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1550>

23. Dempke WCM, Fenchel K, Uciechowski P, Dale SP. Second- and third-generation drugs for immuno-oncology treatment-The more the better? *European Journal of Cancer*. 2017;74:55-72. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.01.001>

24. Refae S, Gal J, Ebran N, et al. Germinal Immunogenetics predict treatment outcome for PD1/PD-L1 checkpoint inhibitors. *Investigational New Drugs*. 2020;38(1):160-171. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10637-019-00845-w>

25. McGranahan N, Furness AJ, Rosenthal R, et al. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint

blockade. *Science*. 2016;351(6280):1463-1469. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aaf1490>

26. Chen P, Roh W, Reuben A, et al. Analysis of Immune Signatures in Longitudinal Tumor Samples Yields Insight into Biomarkers of Response and Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Discovery*. 2016;6(8):827-837. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1545>

27. Topalian SL, Taube JM, Anders RA, et al. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2016;16(5):275-287. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.36>

28. Tian C, Hromatka BS, Kiefer AK, et al. Genome-wide association and HLA region fine-mapping studies identify susceptibility loci for multiple common infections. *Nature Communications*. 2017;8:599. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00257-5>

29. Gordiev MG, Brovkina OI, Enikeev RF, et al. Guidelines for the interpretation of clinically significant somatic mutations in solid tumors identified by next generation sequencing (NGS) for their clinical use. M.: Obshcherossiyskaya obshchestvennaya organizatsiya «Rossiyskoye obshchestvo klinicheskoy onkologii; 2020. Russian.

30. Baranova EE, Bodunova NA, Vorontsova MV, et al. Hereditary cancer syndromes: a modern paradigm. *Problems of Endocrinology*. 2020;66(4):24-34. Russian. DOI: <https://doi.org/10.14341/probl12366>

31. Carter H, Marty R, Hofree M, et al. Interaction Landscape of Inherited Polymorphisms with Somatic Events in Cancer. *Cancer Discovery*. 2017;7(4):410-423. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-1045>

32. Yurgelun MB, Chenevix-Trench G, Lippman SM. Translating Germline Cancer Risk into Precision Prevention. *Cell*. 2017;168(4):566-570. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.031>

33. Tait Wojno ED, Hunter CA, Stumhofer JS. The Immunobiology of the Interleukin-12 Family: Room for Discovery. *Immunity*. 2019;50(4):851-870. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.011>

34. Johdi NA, Mazlan L, Sagap I, et al. Profiling of cytokines, chemokines and other soluble proteins as a potential biomarker in colorectal cancer and polyps. *Cytokine*. 2017;99:35-42. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.06.015>

35. Nagarsheth N, Wicha MS, Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and

- their relevance in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology.* 2017;17:559-572. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri.2017.49>
36. Korbecki J, Kojder K, Simińska D, et al. CC Chemokines in a Tumor: A Review of Pro-Cancer and Anti-Cancer Properties of the Ligands of Receptors CCR1, CCR2, CCR3, and CCR4. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020;21(21):8412. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21218412>
37. Svitich OA, Filina AB, Davydova NV, et al. The role of innate immunity factors in tumorigenesis process. *Medical Immunology (Russia).* 2018;20(2):151-162. Russian. DOI: <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2018-2-151-162>
38. Patin E, Hasan M, Bergstedt J, et al. Natural variation in the parameters of innate immune cells is preferentially driven by genetic factors. *Nature Immunology.* 2018;19(3):302-314. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0049-7>
39. Urrutia A, Duffy D, Rouilly V, et al. Standardized Whole-Blood Transcriptional Profiling Enables the Deconvolution of Complex Induced Immune Responses. *Cell Reports.* 2016;16(10):2777-2791. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.011>
40. Nomizo T, Ozasa H, Tsuji T, et al. Clinical impact of single nucleotide polymorphism in PD-L1 on response to nivolumab for advanced nonsmall-cell lung cancer patients. *Scientific Reports.* 2017;7:45124. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep45124>
41. Refae S, Gal J, Brest P, et al. Germinal immunogenetics as a predictive factor for immunotherapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 2019;141:146-152. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.06.013>
42. Yeo MK, Choi SY, Seong IO, et al. Association of PD-L1 expression and PD-L1 gene polymorphism with poor prognosis in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Human Pathology.* 2017;68:103-111. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2017.08.016>
43. Lee SY, Jung DK, Choi JE, et al. Functional polymorphisms in PD-L1 gene are associated with the prognosis of patients with early stage non-small cell lung cancer. *Gene.* 2017;599:28-35. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.11.007>
44. Minari R, Bonatti F, Mazzaschi G, et al. PD-L1 SNPs as biomarkers to define benefit in patients with advanced NSCLC treated with immune checkpoint inhibitors. *Tumori Journal.* 2022;108(1):47-55. DOI: <https://doi.org/10.1177/03008916211014954>
45. Chat V, Ferguson R, Simpson D, et al. Autoimmune genetic risk variants as germline biomarkers of response to melanoma immune-checkpoint inhibition. *Cancer Immunology, Immunotherapy.* 2019;68(6):897-905. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00262-019-02318-8>
46. Parakh S, Musafer A, Paessler S, et al. PDCD1 Polymorphisms May Predict Response to Anti-PD-1 Blockade in Patients With Metastatic Melanoma. *Frontiers in Immunology.* 2021;2:672521. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.672521>
47. Wit MD, Hurkmans DP, Oomen-de Hoop E, et al. Germline Variation in PDCD1 Is Associated with Overall Survival in Patients with Metastatic Melanoma Treated with anti-PD-1 Monotherapy Germline genetic host factors as predictive biomarkers in immuno-oncology. *Cancers.* 2021;13(6):1370. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers13061370>
48. Queirolo P, Dozin B, Morabito A, et al. Association of CTLA-4 Gene Variants with Response to Therapy and Long-term Survival in Metastatic Melanoma Patients Treated with Ipilimumab: An Italian Melanoma Intergroup Study. *Frontiers in Immunology.* 2017;8:386. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00386>
49. Chowell D, Morris LGT, Grigg CM, et al. Patient HLA class I genotype influences cancer response to checkpoint blockade immunotherapy. *Science.* 2018;359(6375):582-587. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aoa4572>
50. Kvistborg P, Yewdell JW. Enhancing responses to cancer immunotherapy. *Science.* 2018;359(6375):516-517. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aar6574>
51. Chowell D, Krishna C, Pierini F, et al. Evolutionary divergence of HLA class I genotype impacts efficacy of cancer immunotherapy. *Nature Medicine.* 2019;25(11):1715-1720. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0639-4>
52. Ali OH, Berner F, Bomze D, et al. Human leukocyte antigen variation is associated with adverse events of checkpoint inhibitors. *European Journal of Cancer.* 2019;107:8-14. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.11.009>

Статья поступила в редакцию 3 февраля 2022 г.  
Поступила после доработки 21 марта 2022 г.  
Принята к печати 25 марта 2022 г.

Received 3 February 2022

Revised 21 March 2022

Accepted 25 March 2022

## Информация об авторах

**Ирина Ришатовна Гилязова**, кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, г. Уфа, доцент кафедры медицинской генетики и фундаментальной медицины ИДПО ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», г. Уфа, старший научный сотрудник ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, E-mail: gilyasova\_irina@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9499-5632>.

**Дилара Динаровна Асадуллина**, аспирант по научной специальности 1.5.7 – Генетика ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, г. Уфа, младший научный сотрудник лаборатории популяционной и медицинской генетики ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», г. Уфа, Российская Федерация, E-mail: dilara.asadullina@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4911-8037>.

**Елизавета Алексеевна Иванова**, кандидат биологических наук, научный сотрудник ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, г. Уфа, научный сотрудник ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, E-mail: lissa987@yahoo.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7853-8658>.

**Радмир Радимович Рахимов**, кандидат медицинских наук, врач-онколог ГАУЗ Республиканский клинический онкологический диспансер, г. Уфа, Российская Федерация, E-mail: radmir-rr@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2488-597X>.

**Адель Альбертович Измайлов**, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры урологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», г. Уфа, главный врач ГАУЗ Республиканский клинический онкологический диспансер, г. Уфа, Российская Федерация, E-mail: izmailov75@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8461-9243>.

**Марина Алексеевна Бермишева**, доктор биологических наук, старший научный сотрудник

ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, г. Уфа, старший научный сотрудник ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, E-mail: marina\_berm@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0584-3969>.

**Гульшат Руслановна Гилязова**, студент ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», г. Уфа, Российская Федерация, E-mail: gulshatik2001@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7189-5532>.

**Ильдар Асхадуллович Шарифгалеев**, кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», г. Уфа, заведующий отделением, врач-патологоанатом ГАУЗ Республиканский клинический онкологический диспансер, г. Уфа, Российская Федерация, E-mail: ildarado@bk.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8334-4639>.

**Марат Фаязович Урманцев**, кандидат медицинских наук, доцент кафедры урологии ИДПО ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», г. Уфа, Российская Федерация, E-mail: urmantsev85@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4657-6625>.

**Екатерина Владимировна Попова**, врач-онколог, заведующий отделением ГАУЗ Республиканский клинический онкологический диспансер, г. Уфа, Российская Федерация, E-mail: katusha-pv@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1242-759X>.

**Ришат Яхъяевич Сафиханов**, кандидат биологических наук, доцент кафедры биологии, экологии и химии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет» (Бирский филиал), г. Бирск, Российская Федерация, E-mail: safikhanov\_rishat@rambler.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8119-0699>.

**Валентин Николаевич Павлов**, доктор медицинских наук, профессор, ректор ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», г. Уфа, Российская Федерация, E-mail: vpavlov3@yahoo.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2125-4897>.

**Эльза Камилевна Хуснутдинова**, доктор биологических наук, профессор, директор ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, г. Уфа, заведующий кафедры генетики и фунда-

ментальной медицины ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», г. Уфа, заведующий кафедрой медицинской генетики и фундаментальной медицины ИДПО ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», г. Уфа, главный научный сотрудник ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, E-mail: elzakh@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2987-3334>.

### Information about the authors

**Irina R. Gilyazova**, Cand. Sci. (Biology), Associate Professor, Senior Research Fellow, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, RAS, Ufa, Associate Professor at the Department of Medical Genetics and Fundamental Medicine, Bashkir State Medical University, Ufa, Senior Researcher, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia, E-mail: gilyasova\_irina@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9499-5632>.

**Dilara D. Asadullina**, Post-graduate Student in Scientific Specialty 1.5.7 – Genetics, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, RAS, Ufa, Junior Researcher at the Laboratory of Population and Medical Genetics, Bashkir State University, Ufa, Russia, E-mail: dilara.asadullina@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4911-8037>.

**Elizaveta A. Ivanova**, Cand. Sci. (Biology), Researcher, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, RAS, Ufa, Researcher, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia, E-mail: lissa987@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7853-8658>.

**Radmir R. Rakimov**, Cand. Sci. (Medicine), Oncologist, Republican Clinical Oncology Dispensary, Ufa, Russia, E-mail: radmir-rr@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2488-597X>.

**Adel A. Izmailov**, Doct. Sci. (Medicine), Associate Professor, Professor at the Department of Urology, Bashkir State Medical University, Ufa, Head Physician of Republican Clinical Oncology Dispensary, Ufa, Russia, E-mail: izmailov75@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8461-9243>.

**Marina A. Bermisheva**, Doct. Sci. (Biology), Senior Researcher, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, RAS, Ufa, Senior Researcher, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia, E-mail: marina\_berm@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0584-3969>.

**Gulshat R. Gilyazova**, Student, Bashkir State Medical University, Ufa, Russia, E-mail: gulshatik2001@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7189-5532>.

**Ildar A. Sharifgaleev**, Cand. Sci. (Medicine), Associate Professor, Associate Professor at the Department of Pathological Anatomy, Bashkir State Medical University, Ufa, Head of Department, Pathologist, Republican Clinical Oncology Dispensary, Ufa, Russia, E-mail: ildarado@bk.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8334-4639>.

**Marat F. Urmantsev**, Cand. Sci. (Medicine), Associate Professor at the Department of Urology, Bashkir State Medical University, Ufa, Russia, E-mail: urmantsev85@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4657-6625>.

**Ekaterina V. Popova**, Oncologist, Head of Department, Republican Clinical Oncology Dispensary, Ufa, Russia, E-mail: katusha-pv@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1242-759X>.

**Rishat Ya. Safikhanov**, Cand. Sci. (Biology), Associate Professor at the Department of Biology, Ecology and Chemistry, Bashkir State University (Birsk Branch), Birsk, Russia, E-mail: safikhanov\_rishat@rambler.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8119-0699>.

**Valentin N. Pavlov**, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Rector, Bashkir State Medical University, Ufa, Russia, E-mail: vpavlov3@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2125-4897>.

**Elza K. Khusnutdinova**, Doct. Sci. (Biology), Professor, Director of the Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center RAS, Ufa, Head of the Department of Genetics and Fundamental Medicine, Bashkir State University, Ufa, Head of the Department of Medical Genetics and Fundamental Medicine, Bashkir State Medical University, Ufa, Chief Researcher, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia, E-mail: elzakh@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2987-3334>.



DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-4

УДК 575.16

# Роль высокопенетрантных мутаций в генах *BRCA1* и *CHEK2* в характере ассоциаций полиморфизма генов матриксных металлопротеиназ с раком молочной железы

Н.В. Павлова , В.С. Орлова , И.В. Батлуцкая , О.А. Ефремова ,  
И.В. Пономаренко

Федеральное государственное автономное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Белгородский государственный национальный исследовательский университет»,  
ул. Победы, д. 85, г. Белгород, 308015, Российская Федерация  
Автор для переписки: И.В. Пономаренко (*ropomarenko\_i@bsu.edu.ru*)

## Резюме

**Актуальность:** Рак молочной железы (РМЖ) это опухоль молочной железы злокачественного характера, которая занимает ведущее место как в структуре онкозаболеваний у женщин, так и среди причин смертности женского населения от злокачественных новообразований. Роль генетических факторов в формировании РМЖ не вызывает сомнений. **Цель исследования:** Изучить роль высокопенетрантных мутаций в генах *BRCA1* и *CHEK2* в характере ассоциаций полиморфизма генов матриксных металлопротеиназ (*MMP*) с РМЖ. **Материалы и методы:** Для решения поставленной цели исследования были сформированы следующие три выборки: 26 больных РМЖ, имеющие высокопенетрантные мутации в генах *BRCA1* (c.5266dup (5382insC), c.68\_69del (185delAG), 2080delA) и *CHEK2* (I157T)), 332 больных РМЖ без герминальных мутаций в генах *BRCA1* (c.5266dup (5382insC), c.68\_69del (185delAG), 2080delA, 4153delA), *BRCA2* (6174delT) и *CHEK2* (I157T) и 746 женщин контрольной группы. В работе изучены десять полиморфизмов пяти генов матриксных металлопротеиназ (*MMP1*, *MMP2*, *MMP3*, *MMP8* и *MMP9*). Анализ ассоциаций проводился методом логистической регрессии. **Результаты:** Генотип TT rs1940475 *MMP8* у больных РМЖ, имеющих высокопенетрантные мутации в генах *BRCA1* и *CHEK2* (3,84%) встречается в 6-7 раз реже в сравнении как с пациентками, не имеющими этих мутаций (22,80%  $p_{perm}=0,04$ ), так и индивидуумами контрольной группы (26,18%  $OR_{cov}=0,11$  95%CI<sub>cov</sub> 0,01-0,81  $p_{perm}=0,03$ ). Среди больных РМЖ, не имеющих высокопенетрантных мутаций в генах *BRCA1* и *CHEK2*, с заболеванием ассоциирован полиморфизм гена *MMP9*: rs17576 ( $OR_{cov}=0,81$   $p_{perm}=0,03$ ), rs2250889 ( $OR_{cov}=0,61$ -0,66  $p_{perm}=0,03$ ), rs3787268 ( $OR_{cov}=2,03$   $p_{perm}=0,04$ ) и девять различных гаплотипов шести изученных локусов *MMP9* ( $p_{perm}<0,05$ ). **Заключение:** Полиморфный локус rs1940475 *MMP8* связан с риском развития РМЖ у женщин с высокопенетрантными мутациями в генах *BRCA1* и *CHEK2*, а полиморфизм гена *MMP9* ассоциирован с заболеванием у женщин, не имеющих данных мутаций.

**Ключевые слова:** рак молочной железы; *MMP*; полиморфизм; ассоциации; *BRCA1*; *CHEK2*

**Для цитирования:** Павлова НВ, Орлова ВС, Батлутская ИВ, и др. Роль высокопенетрантных мутаций в генах *BRCA1* и *CHEK2* в характере ассоциаций полиморфизма генов матриксных металлопротеиназ с раком молочной железы. Научные результаты биомедицинских исследований. 2022;8(2): 180-197. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-4

# The role of highly penetrant mutations in *BRCA1* and *CHEK2* genes in the pattern of associations of matrix metalloproteinase gene polymorphisms with breast cancer

Nadezhda V. Pavlova , Valentina S. Orlova , Irina V. Batlutskaya ,  
Olga A. Efremova , Irina V. Ponomarenko 

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

Corresponding author: Irina V. Ponomarenko (ponomarenko\_i@bsu.edu.ru)

## Abstract

**Background:** Breast cancer (BC) is a malignant breast tumor, which occupies a leading place both in the structure of oncological diseases in women and among the causes of female mortality from malignant neoplasms. The role of genetic factors in the formation of breast cancer is beyond doubt.

**The aim of the study:** To study the role of highly penetrant mutations in *BRCA1* and *CHEK2* genes in the pattern of associations of matrix metalloproteinase genes (*MMP*) polymorphism with BC. **Materials and methods:** To solve the research goal, the following three samples were formed: 26 BC patients with highly penetrant mutations in the *BRCA1* (c.5266dup (5382insC), c.68\_69del (185delAG), 2080delA) and *CHEK2* (I157T) genes, 332 BC patients without germinal mutations in the *BRCA1* (c.5266dup (5382insC), c.68\_69del (185delAG), 2080delA, 4153delA), *BRCA2* (6174delT) and *CHEK2* (I157T) genes and 746 women of the control group. Ten polymorphisms of five matrix metalloproteinase genes (*MMP1*, *MMP2*, *MMP3*, *MMP8* and *MMP9*) were studied. The analysis of associations was carried out by the method of logistic regression. **Results:** The TT rs1940475 *MMP8* genotype in BC patients with highly penetrant mutations in the *BRCA1* and *CHEK2* genes (3.84%) is 6-7 times less common in comparison with both patients without these mutations (22.80%  $p_{perm}=0.04$ ) and control group individuals (26.18%  $OR_{cov}=0.11$  95%CI<sub>cov</sub> 0.01-0.81  $p_{perm}=0.03$ ). In BC patients who do not have highly penetrant mutations in the *BRCA1* and *CHEK2* genes, *MMP9* gene polymorphisms are associated with the disease: rs17576 ( $OR_{cov}=0.81$   $p_{perm}=0.03$ ), rs2250889 ( $OR_{cov}=0.61-0.66$   $p_{perm}=0.03$ ), rs3787268 ( $OR_{cov}=2.03$   $p_{perm}=0.04$ ) and nine different haplotypes of the six studied *MMP9* loci ( $p_{perm}<0.05$ ). **Conclusion:** The rs1940475 *MMP8* polymorphic locus is associated with the risk of developing BC in women with highly penetrant mutations in the *BRCA1* and *CHEK2* genes, and polymorphisms of the *MMP9* gene are associated with the disease in women without these mutations.

**Keywords:** breast cancer; matrix metalloproteinase genes; polymorphism; associations; *BRCA1*; *CHEK2*

**For citation:** Pavlova NV, Orlova VS, Batlutskaya IV, et al. The role of highly penetrant mutations in *BRCA1* and *CHEK2* genes in the pattern of associations of matrix metalloproteinase gene polymorphisms with breast cancer. Research Results in Biomedicine. 2022;8(2): 180-197. Russian. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-4

Рак молочной железы (РМЖ) это опухоль молочной железы злокачественного характера, имеющая эпителиальное происхождение [1]. Согласно данным мировой статистики (материалы Международного агентства по изучению рака) в настоящее время ежегодно среди населения мира выявляется более 2 миллионов новых случаев РМЖ [2]. Среди всех случаев рака (ежегодно в мире регистрируется 19,3 млн новых случаев онкологии) РМЖ является наиболее частым (11,7%) [2]. Среди женского населения удельный вес РМЖ среди всех онкозаболеваний составляет 24,5% [3]. По данным Росстата в 2020 году в Российской Федерации количество женщин у которых был впервые в жизни установлен диагноз РМЖ составило 65,0 тыс. человек, а показатель заболеваемости был равен 82,8 на 100000 человек [4]. Обращает на себя внимание имеющаяся тенденция к росту заболеваемости РМЖ в РФ: стандартизованный показатель заболеваемости на 100000 населения (мировой стандарт) за последние десять лет вырос с 42,83 в 2008 г. до 51,63 в 2018 г., параметр среднегодового темпа прироста заболеваемости составил 1,97%, а показатель прироста заболеваемости за данный временной период – 22,15% [5].

Наследственные факторы играют важное значение в развитии РМЖ [6-10]. Проведенные к настоящему времени полно-геномные исследования (GWAS) РМЖ указывают на связь с заболеванием более 180 различных генетических вариантов [https://www.ebi.ac.uk/gwas/search?query=breast%20carcinoma], вовлеченность которых в формирование патологии зависит от таких факторов как молекулярный подтип опухоли (люминальный, тройной негативный и др.), наличие мутаций в генах *BRCA1/2* и др. [11, 12, 13]. При этом следует отметить, что данные полиморфные локусы

объясняют лишь 18% наследуемости заболевания [9], а с высокопенетрантными мутациями в генах *BRCA1/BRCA2*, *CHEK2*, *ATM*, *PALB2* и ряде др. генов связано ≈5% РМЖ [6, 7]. Вместе с этим, по современным генетико-эпидемиологическим оценкам вклад наследственной компоненты в формирование РМЖ достигает до 31% [10]. Исходя из этого можно заключить, что несмотря на активное исследование генетических основ РМЖ, которое активно проводится многочисленными научными коллективами, в течении последних десятилетий, значительная часть генетических детерминант, вовлеченных в возникновение заболевания, до настоящего времени остается неизвестной, что диктует необходимость продолжения генетико-эпидемиологических исследований РМЖ.

Среди «потенциальных» генов-кандидатов РМЖ активно изучаются гены матриксных металлопротеиназ (*MMP*) [14, 15]. Связь продуктов экспрессии этих генов (одноименные белки) с заболеванием в настоящее время не вызывает сомнений [16, 17]. За счет своей коллагеназной активности, способности расщеплять проапоптотические факторы, мобилизовывать/активировать проангиогенные факторы (факторы роста), подавлять выработку ингибиторов ангиогенеза (ангиостатин, эндостатин) *MMP* обеспечивают деградацию компонентов стромальной соединительной ткани и базальной мембранны *MMP*, что имеет «ключевое» значение в процессах ангиогенеза, инвазии и метастазирования опухоли [16, 17]. Повышенная экспрессия *MMP* (*MMP1*, *MMP2*, *MMP9*, др.) в очаге поражения индуцирует рост опухолевой ткани, инициирует ее инвазию и метастазирование [15, 18]. Имеются убедительные данные о связи *MMP* с выживаемостью больных РМЖ [16].

Связь функционально значимого полиморфизма генов *MMP* (*MMP1*, *MMP2*,

*MMP9*, др.) с риском развития РМЖ активно изучается различными научными коллективами [15, 19-31 и др.]. При этом несмотря на значительный накопленный фактический материал по этой теме, следует констатировать, что эти данные нередко не согласуются между собой, в ряде случаев они противоречивы, а по отдельным локусам (например, rs17577 *MMP9*, rs1940475 *MMP8* и др. [30, 31]) – единичны и фрагментарны. Например, значимая ассоциация rs1799750 гена *MMP1* с РМЖ обнаружена в пяти работах, тогда как в десяти исследованиях такой связи выявлено не было [15, 19-22 и др.]. Противоречивые данные по ассоциации с РМЖ имеются в литературе для локуса rs3918242 *MMP9*: в одних работах полиморфный вариант Т демонстрировал «рисковое» значение для заболевания [23, 24, 25], по результатам других исследований этот локус не был связан с болезнью [19, 20, 21, 26, 27, 28] или наоборот генетический вариант ТТ проявлял «защитный» эффект для РМЖ [29]. Вышеуказанные данные диктуют необходимость продолжения исследований по этой теме с целью установления «значимых» для РМЖ полиморфных локусов генов *MMP* в отдельных этно-территориальных группах и в том числе Российской Федерации.

**Целью данной работы** явилось изучение роли высокопенетрантных мутаций в генах *BRCA1* и *CHEK2* в характере ассоциаций полиморфизма генов матриксных металлопротеиназ с раком молочной железы.

**Материалы и методы исследования.** Для решения поставленной цели исследования были сформированы следующие три выборки: 26 больных РМЖ, имеющие высокопенетрантные мутации в генах *BRCA1* (c.5266dup (5382insC), c.68\_69del (185delAG), 2080delA) и *CHEK2* (I157T)), 332 больных РМЖ без герминальных мутаций в генах *BRCA1* (c.5266dup (5382insC), c.68\_69del (185delAG), 2080delA, 4153delA), *BRCA2* (6174delT) и *CHEK2* (I157T) и 746 женщин контрольной группы. Следует отметить, что среди 26 больных РМЖ, имеющих высокопенетрантные мутации в генах *BRCA1* и *CHEK2* (доля этой

группы пациентов среди всех больных РМЖ (n=358) равна 7,26 %), генетический вариант c.5266dup (5382insC) *BRCA1* встречался у 22 пациенток (6,14 % среди всех больных РМЖ, n=358), мутация c.68\_69del (185delAG) *BRCA1* была выявлена у 1 женщины (0,28 %), мутация 2080delA *BRCA1* диагностирована у 1 пациентки (0,28 %) и мутация I157T *CHEK2* установлена у 2 женщин (0,56 %). Следует отметить, что мутация в гене *BRCA2* (6174delT) не была выявлена среди больных РМЖ, поэтому при описании результатов работы для характеристики рассматриваемых групп больных РМЖ мы использовали термины «больные РМЖ, имеющие/не имеющие высокопенетрантные мутации в генах *BRCA1* и *CHEK2*».

Обследование больных РМЖ и постановка диагноза заболевания проводились врачами-онкологами Белгородского областного онкологического диспансера в период 2010-2016 гг. Верификация диагноза выполнялась при патогистологическом исследовании образцов опухолевой ткани (материал для морфологического исследования был получен интраоперационно) [1]. Формирование контрольной группы (без клинико-анамнестических признаков РМЖ) проводилось на базе перинатального центра БОКБ (в ходе проф. осмотров). Возрастные характеристики больных и контроля были сопоставимы. Все больные РМЖ и женщины контрольной группы были русскими, проживали (родились) в Центральном Черноземье России [30, 31] и подписали информированное согласие на участие в исследовании (проведение исследования было согласовано с этическим комитетом медицинского института БелГУ).

Генотипирование образцов ДНК (получены из венозной крови обследуемых методом фенольно-хлороформной экстракции) проводилось на амплификаторе фирмы Bio-Rad (CFX96) методом Таq-Манзондов (использовалась технология real-time ПЦР) [32] с использованием реагентов, разработанных фирмой «Тест-Ген». При проведении экспериментальных иссле-

дований было выполнено ре-генотипирование части образцов ( $\approx 5\%$ ) с целью контроля качества генотипирования [33], подтвердившее полную (100%) воспроизводимость результатов. В работе изучались десять полиморфизмов пяти генов матриксных металлопротеиназ и в том числе шесть полиморфизмов гена *MMP9* (rs2250889, rs17576, rs3787268, rs17577, rs3918249, rs3918242) и по одному полиморфизму генов *MMP1* (rs1799750), *MMP2* (rs243865), *MMP3* (rs679620) и *MMP8* (rs1940475). При отборе полиморфизмов для исследования учитывались определенные критерии [34]: их связь с РМЖ в ранее выполненных исследованиях, регуляторный потенциал (для его оценки был проведен *in silico* анализ материалов биоинформационической базы HaploReg [35]), частота альтернативного варианта в европейских популяциях не менее 0,05.

Связь полиморфизма с заболеванием оценивалась на основе рассчитанных методом регрессионного анализа в программе PLINK (версия 1.07) показателей отношения шансов (OR) и их 95% доверительного интервала (95%CI) [36] с включением в анализ ковариант- возраста и индекса массы тела (соответственно были рассчитаны OR<sub>cov</sub> и 95%CI<sub>cov</sub>). Для коррекции на множественные сравнения в работе использовались пермутационные процедуры [37]. При значении показателя p<sub>perm</sub><0,05 различия считались статистически значимыми [38]. Для локусов генов *MMP*, связанных с заболеванием в рассматриваемых подгруппах больных (наличие или отсутствие высокопенетрантных мутаций в генах *BRCA1* и *CHEK2*) проведен «детальный» анализ их регуляторного потенциала [39] (использовалась онлайн база эпигенетической информации HaploReg [35], GTExportal [40] и другие литературные материалы по этой теме).

**Результаты и их обсуждение.** Проведенное исследование распределения десяти полиморфных локусов генов *MMP* среди больных РМЖ, имеющих высокопенетрантные мутации в генах *BRCA1* и *CHEK2* и не

имеющих данные мутации, а также в контрольной группе не выявило достоверных отличий в наблюдаемом распределении генотипов по данным локусам в сравнении с ожидаемым распределением при выполнении закона Харди-Вайнберга (в работе вводилась поправка на множественные сравнения (поправка Бонферрони) в соответствии с количеством изучаемых локусов равная 10- $p_{\text{bonf}}>0,005$  (0,05/10)) (таблица 1).

Данные таблицы 2 свидетельствуют о существенных различиях в характере ассоциации полиморфных локусов генов *MMP* у больных РМЖ, имеющих высокопенетрантные мутации в генах *BRCA1* и *CHEK2* в отличие от больных РМЖ, не имеющих данных мутаций. Так, среди больных РМЖ с высокопенетрантными мутациями в генах *BRCA1* и *CHEK2* с заболеванием ассоциирован полиморфный локус rs1940475 гена *MMP8*, причем аллельный вариант Т этого локуса согласно рецессивной генетической модели (TT vs CT и CC) имеет протективное значение для развития патологии (OR<sub>cov</sub>=0,11 95%CI<sub>cov</sub> 0,01-0,81 p<sub>cov</sub>=0,03 p<sub>perm</sub>=0,03). Тогда как среди больных РМЖ, не имеющих высокопенетрантных мутаций в генах *BRCA1* и *CHEK2*, с заболеванием ассоциированы три полиморфизма гена *MMP9*: rs17576, rs3787268 и rs2250889 (таблица 2). Следует отметить, что минорные аллельные варианты G rs17576 и rs2250889 проявляют «защитный» эффект при развитии патологии согласно аллельной (для rs17576: G vs A, OR<sub>cov</sub>=0,81 95%CI<sub>cov</sub> 0,66-0,98 p<sub>cov</sub>=0,03 p<sub>perm</sub>=0,03), аддитивной и доминантной (для rs2250889: GG vs CG vs CC, OR<sub>cov</sub>=0,66 95%CI<sub>cov</sub> 0,45-0,96 p<sub>cov</sub>=0,03 p<sub>perm</sub>=0,03 и GG и CG vs CC, OR<sub>cov</sub>=0,61 95%CI<sub>cov</sub> 0,40-0,94 p<sub>cov</sub>=0,03 p<sub>perm</sub>=0,03 соответственно) генетическим моделям (таблица 2). Наряду с этим минорный аллельный вариант A rs3787268 в рамках рецессивной генетической модели является фактором риска развития РМЖ у женщин, не имеющих высокопенетрантных мутаций в генах *BRCA1* и *CHEK2* (GG vs CG и CC OR<sub>cov</sub>=2,03 95%CI<sub>cov</sub> 1,05-3,95 p<sub>cov</sub>=0,04 p<sub>perm</sub>=0,04) (таблица 2).

Таблица 1

**Частоты минорных аллелей полиморфных локусов генов *MMP* и данные о соответствии их распределения закону Харди-Вайнберга в изучаемых группах женщин с РМЖ, имеющих и не имеющих высокопенетрантные мутации в генах *BRCA1* и *CHEK2* и в контрольной группе**

Table 1

**Frequencies of minor alleles of polymorphic loci of the *MMP* genes and data on the compliance of their distribution with the Hardy-Weinberg law in the studied groups of women with breast cancer with and without high-penetrance mutations in the *BRCA1* and *CHEK2* genes and in the control group**

Полиморфизм (dbSNP), ген (rs полиморфизма, минорный аллель)	Изучаемые группы		
	Больные РМЖ, имеющие высокопенетрантные мутации в генах <i>BRCA1</i> и <i>CHEK2</i> (n=26)	Больные РМЖ, не имеющие высокопенетрантных мутаций в генах <i>BRCA1</i> и <i>CHEK2</i> (n=332)	Контрольная группа (n=746)
c.-1607 2G>1G <i>MMP1</i> (rs1799750, 2G)	0,442 (P <sub>HWE</sub> =0,69)	0,471 (P <sub>HWE</sub> =0,91)	0,464 (P <sub>HWE</sub> =0,07)
c.-1306 C>T <i>MMP2</i> (rs243865, T)	0,240 (P <sub>HWE</sub> =0,28)	0,235 (P <sub>HWE</sub> =0,88)	0,249 (P <sub>HWE</sub> =0,20)
c.133 T>C <i>MMP3</i> (rs679620, T)	0,440 (P <sub>HWE</sub> =0,69)	0,476 (P <sub>HWE</sub> =0,74)	0,499 (P <sub>HWE</sub> =0,56)
c.259 T>C <i>MMP8</i> (rs1940475, T)	0,404 (P <sub>HWE</sub> =0,02)	0,488 (P <sub>HWE</sub> =0,51)	0,489 (P <sub>HWE</sub> =0,02)
c.-1562 C>T <i>MMP9</i> (rs3918242, T)	0,135 (P <sub>HWE</sub> =0,37)	0,172 (P <sub>HWE</sub> =0,12)	0,167 (P <sub>HWE</sub> =0,57)
c.139-369 T>C <i>MMP9</i> (rs3918249, C)	0,340 (P <sub>HWE</sub> =0,66)	0,361 (P <sub>HWE</sub> =0,09)	0,389 (P <sub>HWE</sub> =0,82)
c.836 A>G <i>MMP9</i> (rs17576, G)	0,385 (P <sub>HWE</sub> =1,00)	0,339 (P <sub>HWE</sub> =0,17)	0,389 (P <sub>HWE</sub> =0,32)
c.1331-163 G>A <i>MMP9</i> (rs3787268, A)	0,231 (P <sub>HWE</sub> =1,00)	0,233 (P <sub>HWE</sub> =0,16)	0,215 (P <sub>HWE</sub> =0,39)
c. 1721 G>C <i>MMP9</i> (rs2250889, G)	0,021 (P <sub>HWE</sub> =1,00)	0,085 (P <sub>HWE</sub> =0,27)	0,109 (P <sub>HWE</sub> =0,02)
c.2003 G>A <i>MMP9</i> (rs17577, A)	0,173 (P <sub>HWE</sub> =1,00)	0,165 (P <sub>HWE</sub> =0,11)	0,170 (P <sub>HWE</sub> =0,90)

Обнаружены ассоциации гаплотипов шести полиморфных локусов гена *MMP9* (расположены на 20 хромосоме на расстоянии  $\approx 7$  kb, участок генома (hg38) 46007337 – 46014472) с РМЖ только среди женщин, не имеющих высокопенетрантных мутаций в генах *BRCA1* и *CHEK2*. В этой группе женщин ассоциированы с РМЖ девять различных гаплотипов, в состав которых входят все шесть изученных в работе SNPs гена *MMP9*. Четыре из этих девяти гаплотипов повышают риск возникновения патологии: CA rs3918249-rs17576 (OR<sub>cov</sub>=2,03 p=0,013), CCA rs3918242-rs3918249-

rs17576 (OR<sub>cov</sub>=2,49 p=0,007), CCAG rs3918242-rs3918249-rs17576-rs3787268 (OR<sub>cov</sub>=3,78 p=0,004), CAGCG rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889-rs17577 (OR<sub>cov</sub>=3,01 p=0,008). Пять гаплотипов ассоциированы с низким риском развития заболевания: GG rs17576-rs3787268 (OR<sub>cov</sub>=0,63 p=0,004), GG rs3787268-rs2250889 (OR<sub>cov</sub>=0,58 p=0,015), GGC rs17576-rs3787268-rs2250889 OR<sub>cov</sub>=0,65 p=0,009), CGG rs3918249-rs17576-rs3787268 (OR<sub>cov</sub>=0,64 p=0,007), CGGC rs3918249-rs17576-rs3787268-rs2250889 OR<sub>cov</sub>=0,64 p=0,009).

Таблица 2

**Данные по ассоциациям полиморфных вариантов генов *MMP* с раком молочной железы в группах больных в зависимости от наличия/отсутствия высокопенетрантных мутаций в генах *BRCA1* и *CHEK2***

Table 2

**Data on associations of polymorphic variants of the *MMP* genes with breast cancer in groups of patients depending on the presence/absence of highly penetrant mutations in the *BRCA1* and *CHEK2* genes**

Полиморфизм (dbSNP), ген (rs полиморфизма, минорный аллель)	N	Аллельная модель			Аддитивная модель			Доминантная модель			Рецессивная модель						
		OR <sub>cov</sub>	95%CI <sub>cov</sub>		P <sub>cov</sub>	OR <sub>cov</sub>	95%CI <sub>cov</sub>		P <sub>cov</sub>	OR <sub>cov</sub>	95%CI <sub>cov</sub>		P <sub>cov</sub>	OR <sub>cov</sub>	95%CI <sub>cov</sub>		P <sub>cov</sub>
			L95 <sub>cov</sub>	U95 <sub>cov</sub>			L95 <sub>cov</sub>	U95 <sub>cov</sub>			L95 <sub>cov</sub>	U95 <sub>cov</sub>			L95 <sub>cov</sub>	U95 <sub>cov</sub>	
в группе больных, имеющих высокопенетрантные мутации в генах <i>BRCA1</i> и <i>CHEK2</i>																	
c.-1607 2G>1G <i>MMP1</i> (rs1799750, 2G)	749	0,92	0,52	1,60	0,76	0,89	0,52	1,53	0,68	1,15	0,47	2,77	0,76	0,57	0,19	1,68	0,31
c.-1306 C>T <i>MMP2</i> (rs243865, T)	757	0,95	0,49	1,84	0,88	0,96	0,50	1,84	0,91	1,26	0,57	2,80	0,57	0,01	0,00	inf	1,00
c.133 T>C <i>MMP3</i> (rs679620, T)	764	0,79	0,45	1,39	0,41	0,81	0,46	1,43	0,47	0,93	0,38	2,28	0,88	0,57	0,19	1,68	0,30
c.259 T>C <i>MMP8</i> (rs1940475, T)	767	0,71	0,40	1,24	0,23	0,73	0,42	1,25	0,25	1,36	0,54	3,44	0,52	<b>0,11</b>	<b>0,01</b>	<b>0,81</b>	<b>0,03</b>
c.-1562 C>T <i>MMP9</i> (rs3918242, T)	761	0,78	0,35	1,75	0,54	0,74	0,33	1,69	0,48	0,64	0,25	1,61	0,34	1,68	0,21	13,19	0,62
c.139-369 T>C <i>MMP9</i> (rs3918249, C)	760	0,81	0,45	1,47	0,48	0,78	0,43	1,43	0,42	0,86	0,38	1,95	0,71	0,47	0,11	2,02	0,31
c.836 A>G <i>MMP9</i> (rs17576, G)	769	0,98	0,56	1,73	0,95	0,95	0,54	1,67	0,86	0,94	0,42	2,10	0,87	0,94	0,32	2,78	0,91
c.1331-163 G>A <i>MMP9</i> (rs3787268, A)	765	1,09	0,57	2,11	0,79	1,10	0,57	2,15	0,77	1,17	0,53	2,58	0,70	0,91	0,12	6,95	0,92
c. 1721 G>C <i>MMP9</i> (rs2250889, G)	759	0,17	0,02	1,26	0,05	0,20	0,03	1,42	0,11	0,19	0,02	1,39	0,10	0,01	0,00	inf	1,00
c.2003 G>A <i>MMP9</i> (rs17577, A)	752	1,02	0,49	2,12	0,96	0,98	0,46	2,08	0,96	0,92	0,39	2,15	0,84	1,59	0,20	12,42	0,66
в группе больных, не имеющих высокопенетрантных мутаций в генах <i>BRCA1</i> и <i>CHEK2</i>																	
c.-1607 2G>1G <i>MMP1</i> (rs1799750, 2G)	1040	1,03	0,85	1,24	0,77	1,09	0,88	1,35	0,45	1,30	0,91	1,84	0,15	0,95	0,65	1,38	0,77
c.-1306 C>T <i>MMP2</i> (rs243865, T)	1046	0,93	0,75	1,15	0,49	0,85	0,66	1,11	0,24	0,91	0,67	1,26	0,58	0,48	0,22	1,06	0,07
c.133 T>C <i>MMP3</i> (rs679620, T)	1059	0,91	0,76	1,10	0,33	0,85	0,68	1,06	0,15	0,84	0,59	1,19	0,33	0,77	0,53	1,11	0,16
c.259 T>C <i>MMP8</i> (rs1940475, T)	1059	0,99	0,83	1,20	0,95	1,07	0,86	1,32	0,56	0,99	0,70	1,40	0,96	1,20	0,85	1,71	0,30
c.-1562 C>T <i>MMP9</i> (rs3918242, T)	1052	1,04	0,81	1,33	0,75	1,04	0,78	1,38	0,81	1,01	0,72	1,41	0,98	1,33	0,56	3,14	0,52
c.139-369 T>C <i>MMP9</i> (rs3918249, C)	1047	0,89	0,73	1,07	0,21	0,96	0,76	1,20	0,69	0,91	0,66	1,25	0,56	1,01	0,65	1,54	0,98
c.836 A>G <i>MMP9</i> (rs17576, G)	1058	<b>0,81</b>	<b>0,66</b>	<b>0,98</b>	<b>0,03</b>	0,82	0,65	1,03	0,09	0,81	0,59	1,10	0,18	0,70	0,44	1,11	0,13
c.1331-163 G>A <i>MMP9</i> (rs3787268, A)	1052	1,11	0,89	1,38	0,36	1,18	0,90	1,53	0,23	1,09	0,79	1,50	0,60	<b>2,03</b>	<b>1,05</b>	<b>3,95</b>	<b>0,04</b>
c. 1721 G>C <i>MMP9</i> (rs2250889, G)	1055	0,75	0,55	1,03	0,08	<b>0,66</b>	<b>0,45</b>	<b>0,96</b>	<b>0,03</b>	<b>0,61</b>	<b>0,40</b>	<b>0,94</b>	<b>0,03</b>	0,62	0,17	2,26	0,47
c.2003 G>A <i>MMP9</i> (rs17577, A)	1042	0,97	0,75	1,24	0,78	0,95	0,71	1,27	0,72	0,94	0,67	1,32	0,72	0,94	0,39	2,26	0,89

Примечание: OR<sub>cov</sub> – отношение шансов, 95%OR<sub>cov</sub> – доверительный интервал отношения шансов (L95<sub>cov</sub> – нижний предел и U95<sub>cov</sub> – верхний предел доверительного интервала), inf – не определяется, P – уровень значимости, жирным выделены статистически значимые показатели с учетом результатов проведенного адаптивного пермутационного теста.

Note: OR<sub>cov</sub> – odds ratio, 95%OR<sub>cov</sub> – confidence interval of the odds ratio (L95<sub>cov</sub> – lower limit and U95<sub>cov</sub> – upper limit of the confidence interval), inf – not determined, P – significance level, statistically significant indicators are highlighted in bold, taking into account the results of the adaptive permutation test.

Все вышеуказанные данные подтверждены пермутационным тестом ( $p_{perm} < 0,05$ ). В группе больных РМЖ с высокопенетрантными мутациями в генах *BRCA1* и *CHEK2* достоверных ассоциаций гаплотипов SNPs гена *MMP9* с заболеванием не выявлено ( $p_{perm} > 0,05$ ).

Проведенный сравнительный анализ распределения аллелей и генотипов изучаемых полиморфных вариантов генов *MMP* в двух группах больных – имеющих/не имеющих высокопенетрантные мутации в генах *BRCA1* и *CHEK2*, показал достоверные различия в распространенности генотипа TT rs1940475 гена *MMP8* (рецессивная генетическая модель, TT vs CT и CC): данный генетический вариант среди больных РМЖ, не имеющих высокопенетрантные мутации

генах *BRCA1* и *CHEK2*, встречается в 5,93 раза чаще чем среди пациенток у которых зарегистрированы данные мутации (22,80% и 3,84% соответственно,  $p_{cov}=0,04$   $p_{perm}=0,04$ ) (таблица 3). Так же, следует отметить, что данный генетический вариант (генотип TT rs1940475 *MMP8*) в контрольной группе встречается с частотой 26,18% и этот показатель достоверно не отличается от аналогичного показателя у больных РМЖ, не имеющих высокопенетрантные мутации в генах *BRCA1* и *CHEK2* (22,80%,  $p>0,05$ ), но при этом он в 6,81 раза превышает данный параметр в сравнении с больными РМЖ, имеющими высокопенетрантные мутации в генах *BRCA1* и *CHEK2* (3,84%,  $p_{perm}<0,05$ ) (таблица 2).

Таблица 3

**Результаты сравнительного анализа частот аллелей и генотипов полиморфных локусов генов *MMP* между группами женщин с РМЖ, имеющих и не имеющих высокопенетрантные мутации в генах *BRCA1* и *CHEK2***

Table 3

**The results of a comparative analysis of the frequencies of alleles and genotypes of polymorphic loci of the *MMP* genes between groups of women with breast cancer with and without high-penetrance mutations in the *BRCA1* and *CHEK2* genes**

Полиморфизм (dbSNP), ген (rs полиморфизма, минорный аллель)	Рассмотренные генетические модели			
	аллельная	аддитивная	доминантная	рецессивная
c.-1607 2G>1G <i>MMP1</i> (rs1799750, 2G)	0,69	0,48	0,86	0,33
c.-1306 C>T <i>MMP2</i> (rs243865, T)	0,94	0,83	0,80	1,00
c.133 T>C <i>MMP3</i> (rs679620, T)	0,62	0,88	0,71	0,87
c.259 T>C <i>MMP8</i> (rs1940475, T)	0,24	0,20	0,82	<b>0,04</b>
c.-1562 C>T <i>MMP9</i> (rs3918242, T)	0,49	0,36	0,35	0,67
c.139-369 T>C <i>MMP9</i> (rs3918249, C)	0,77	0,71	0,88	0,35
c.836 A>G <i>MMP9</i> (rs17576, G)	0,50	0,65	0,57	0,92
c.1331-163 G>A <i>MMP9</i> (rs3787268, A)	0,97	0,86	0,71	0,73
c. 1721 G>C <i>MMP9</i> (rs2250889, G)	0,12	0,12	0,12	1,00
c.2003 G>A <i>MMP9</i> (rs17577, A)	0,88	0,94	0,98	0,78

Примечание: приведены показатели уровня значимости различий  $p$ , жирным выделены статистически значимые показатели с учетом аддитивного пермутационного теста.

Note: indicators of the level of significance of differences  $p$  are given, statistically significant indicators are highlighted in bold, taking into account the adaptive permutation test.

Таким образом, можно заключить, что существенно более низкая частота генотипа TT rs1940475 *MMP8* (практически в 6-7 раз) является «специфической» характеристикой больных РМЖ у которых зарегистрированы высокопенетрантные мутации в генах *BRCA1* и *CHEK2*, отличающая их как от пациенток с РМЖ, не имеющих этих мутаций, так и от индивидуумов контрольной

группы. Наряду с этим, можно констатировать факт того, что полиморфизм гена *MMP9*, как самостоятельно (rs17576, rs2250889 и rs3787268), так и в составе девяти различных гаплотипов (rs17576, rs17577, rs3918249, rs3918242, rs2250889, rs3787268) определяет подверженность РМЖ у женщин, не имеющих высокопенетрантные мутации в генах *BRCA1* и *CHEK2*

и не связан с риском развития заболевания у женщин, у которых диагностированы данные мутации.

Имеющиеся литературные данные о связи полиморфизма rs1940475 *MMP8* с РМЖ малочисленные и неоднозначные. В доступной нам литературе имеется лишь четыре работы по этому вопросу [41-44].

В исследовании, проведенном Decock et al. [41] на выборке из 140 европейских пациенток с РМЖ (Бельгия), установлена связь rs1940475 *MMP8* с развитием метастазов у больных РМЖ – протективным фактором метастазирования является аллельный вариант Т (OR=0,60, p=0,03), что согласуется с нашими данными о «защитной» роли генотипа TT rs1940475 *MMP8* при формировании РМЖ среди женщин европейской части России, имеющих высокопенетрантные мутации в генах *BRCA1* и *CHEK2*.

Wang et al. [42] на выборке из 571 больных РМЖ и 578 контроля из этнической группы Han китайской популяции, с одной стороны, не выявили «главного» эффекта rs1940475 *MMP8* при формировании заболевания ( $p>0,05$ ), с другой стороны, показали значимые ассоциации этого полиморфизма с РМЖ в составе гаплотипа “AGTCA”, включающего полиморфные локусы rs3740938, rs2012390, rs1940475, rs11225394, и rs11225395 гена *MMP8* (OR = 1,23; 95% CI = 1,00–1,51; P = 0,048). Следует отметить, что в составе данного гаплотипа аллельный вариант Т rs1940475 *MMP8* является фактором риска развития заболевания в китайской популяции [42], тогда как согласно наших данных генотип TT rs1940475 *MMP8* имеет протективное значение при формировании патологии среди женщин европейской части России, имеющих высокопенетрантные мутации в генах *BRCA1* и *CHEK2*. Важно подчеркнуть, что у женщин европейской части России, у которых отсутствуют высокопенетрантные мутации в генах *BRCA1* и *CHEK2* (подавляющее большинство больных РМЖ,

92,74%) так же как и в исследовании Wang et al. [42] в китайской популяции rs1940475 *MMP8* не ассоциирован с РМЖ. В двух исследованиях, выполненных в европейских популяциях, значимых ассоциаций rs1940475 *MMP8* с РМЖ выявлено не было [43, 44]. Следует отметить, что в литературе имеются данные о связи rs1940475 *MMP8* с другими формами онкопатологии (рак мочевого пузыря, желудка и др.) [45].

Согласно литературным материалам и базы данных по эпигенетике HaploReg полиморфизм гена *MMP8* и в том числе rs1940475 имеет важное функциональное значение в организме [45, 46]: rs1940475 находится в экзоне гена *MMP8* и является миссенс-мутацией, определяя аминокислотную замену Lys87Glu в соответствующем полипептиде (p.K87E), расположен в функционально активном регионе генома (так называемый «открытый» хроматин), выполняющем регуляторную функцию (энхансер) в различных культурах клеток (monocytes-CD14+ RO01746 primary cells и др.) и тканях (кровь (primary neutrophils from peripheral blood, primary monocytes from peripheral blood, primary mononuclear cells from peripheral blood и пр.) и др.) и в том числе органе-мишени при РМЖ- первичных клетках эпителия молочной железы (HMEC mammary epithelial primary cells), входит в состав сайтов связывания ДНК с тремя факторами транскрипции (CIZ, Mys, NF-AT1). Причем, аллельный вариант Т, имеющий протективное значение для РМЖ у женщин с высокопенетрантными мутациями в генах *BRCA1* и *CHEK2* (в составе генотипа TT), связан с более высокой афинностью регуляторного мотива ДНК к факторам транскрипции CIZ и Mys, и более низкой его чувствительностью к транскрипционному фактору NF-AT1. Полиморфизм rs1940475 *MMP8* ассоциирован с уровнем экспрессии гена *MMP27* в периферической крови, жировой и мышечной тканях, гена *RP11-817J15.3* в периферической крови и печени (данные [40]) (рисунок).

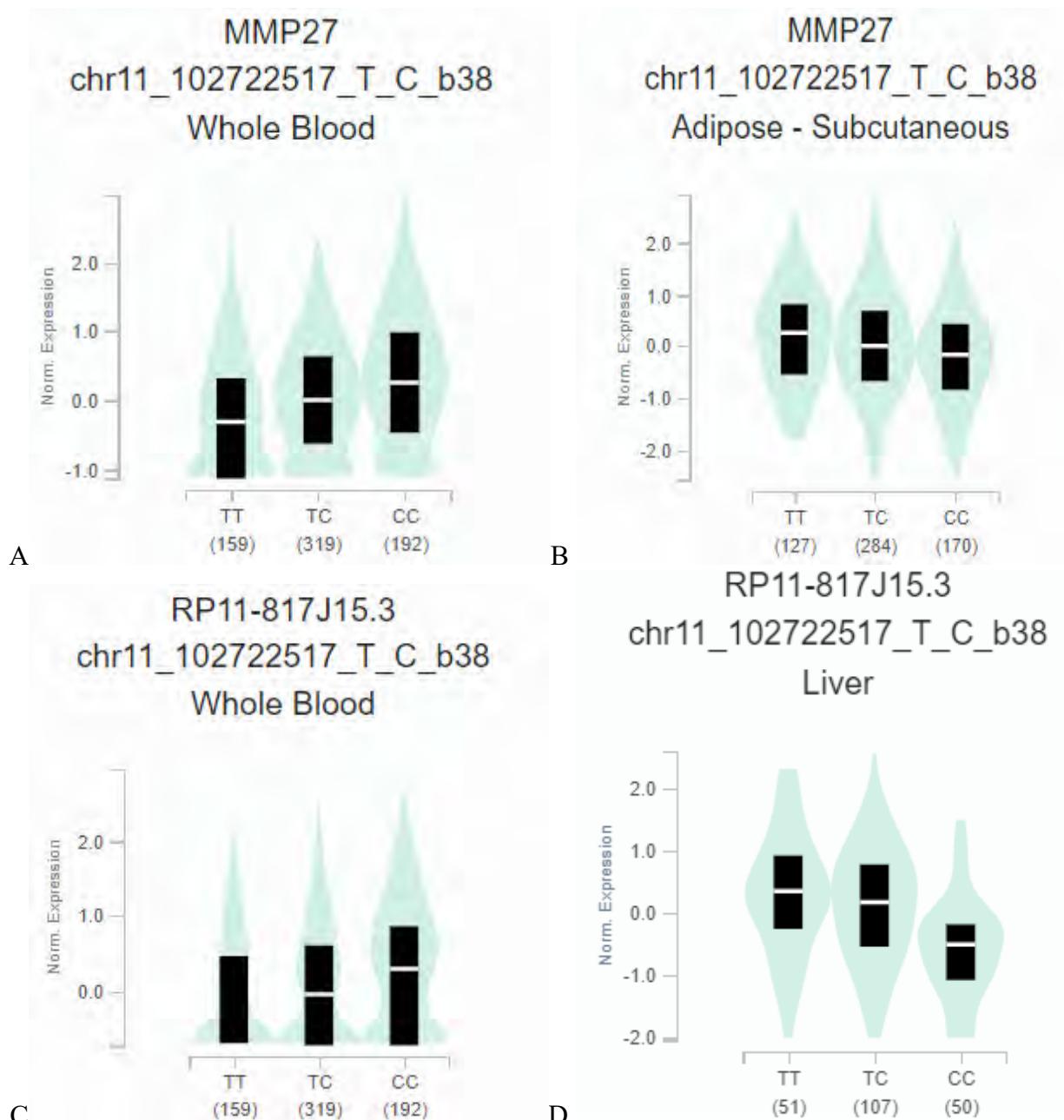


Рис. Ассоциации генотипов rs1940475 MMP8 с уровнем экспрессии гена MMP27 в периферической крови (А) и жировой ткани (Б) и гена RP11-817J15.3 в периферической крови (С) и печени (Д) (<http://www.gtexportal.org/>)

Fig. Associations of the rs1940475 MMP8 genotypes with the expression level of the MMP27 gene in peripheral blood (A) and adipose tissue (B) and the RP11-817J15.3 gene in peripheral blood (C) and liver (D) (<http://www.gtexportal.org/>)

Имеются литературные данные о значимой роли в формировании РМЖ сильно сцепленного с rs1940475 MMP8 полиморфного локуса rs11225395 ( $r^2=0,84$   $D'=1,00$ ) [41, 42]. Данные о значимых ассоциациях rs11225395 MMP8 с РМЖ и патогенетиче-

ски значимыми для РМЖ параметрами получены как для европейской (метастазирование при РМЖ, население Бельгии) [41] так и для азиатской (риск РМЖ, этническая группа Han Китая; стадии РМЖ и выживаемость больных, шанхайская выборка с

РМЖ) популяций [41, 42]. Экспериментальные исследования убедительно показали, что полиморфизм rs11225395, расположенный в регионе промотора гена *MMP8* на расстоянии 799 бп от сайта инициации транскрипции, связан с 1,8-кратным повышением активности промотора в MDA-MB-231 клетках рака молочной железы при наличии аллельного варианта Т в сравнении с аллельным вариантом С [41]. В дальнейших экспериментах установлено, что последовательность ДНК при наличии аллеля Т в регионе rs11225395 взаимодействует с ядерными белками в MDA-MB-231 клетках рака молочной железы, тогда как при наличии аллеля С rs11225395 это ДНК-белковое взаимодействие не было обнаружено [41]. Результаты этих экспериментальных исследований лежат в основе предположения об ингибирующем действии MMP8 на процессы метастазирования рака молочной железы [41, 45].

MMP-8 также известная как нейтрофильная коллагеназа или коллагеназа-2 является эндопептидазой (относится к подсемейству коллагеназ), которая отвечает за гидролитическое расщепление значительно числа фибрillлярных и нефибрillлярных коллагенов (важнейшие компоненты внеклеточного матрикса) [41, 45]. Считается, что MMP8 проявляет некоторые противоопухолевые эффекты за счет расщепления субстрата Эфрин-B1 – принадлежит к семейству белков эфрина, которые передают сигналы, связанные с клеточной адгезией и ангиогенезом [45]. Другим механизмом противоопухолевого действия MMP8 может быть вызванное данной металлопротеиназой усиление экспрессию TGF-β1 вследствие активации PI3K/Akt/Rac1-пути [45]. Наряду с этим, следует отметить, неоднозначность имеющихся к настоящему моменту времени фактических данных о связи уровня MMP8 и РМЖ [45].

В настоящей работе показано, что полиморфизм гена *MMP9*, как самостоятельно (rs17576, rs2250889 и rs3787268), так и в составе девяти различных гаплотипов

(rs17576, rs17577, rs3918249, rs3918242, rs2250889, rs3787268) определяет подверженность РМЖ у женщин, не имеющих высокопенетрантные мутации в генах *BRCA1* и *CHEK2*. При этом минорные аллели G rs17576 ( $OR_{cov}=0,81$   $p_{perm}=0,03$ ) и rs2250889 ( $OR_{cov}=0,61-0,66$   $p_{perm}=0,03$ ) имеют протективное значение для РМЖ, а альтернативный вариант А rs3787268 ( $OR_{cov}=2,03$   $p_{perm}=0,04$ ) является фактором риска развития заболевания. Следует отметить, что литературные данные о связи вышеуказанных полиморфизмов с РМЖ в разных популяциях неоднозначны (ниже приведены только данные экспериментальных исследований, результаты мета-анализов в связи с малочисленностью экспериментальных данных не учитывались): для rs2250889 *MMP9* ассоциации с РМЖ показаны лишь в одной работе [47], тогда как в трех исследованиях статистически значимых результатов выявлено не было [28, 48, 49]; для rs3787268 *MMP9* разнонаправленные связи с РМЖ (рисковое/протективное значение полиморфизма) обнаружены в работах [42, 48, 50] и отсутствие ассоциаций в исследовании [28]; для rs17576 не выявлены ассоциации с заболеванием в работах [28, 48], а противоположные результаты (рисковое/протективное значение полиморфизма) продемонстрированы в исследованиях [47, 51, 52]. Следует отметить, что MMP9 так же известная как желатиназа В или коллагеназа IV типа за счет своего участия в процессах деградации коллагена IV типа и денатурированных коллагенов, согласно литературным данным, играет важную роль в процессах прогрессирования РМЖ и его метастазирования [23].

**Заключение.** В результате проведенного исследования установлены особенности ассоциаций полиморфизма генов *MMP* с РМЖ в зависимости от наличия/отсутствия у больных высокопенетрантных мутаций в генах *BRCA1* и *CHEK2*. Выявлено, что полиморфный локус rs1940475 *MMP8* связан с риском развития РМЖ у женщин с высокопенетрантными мутациями в генах *BRCA1* и *CHEK2*, тогда как полиморфизм

гена *MMP9* ассоциирован с заболеванием у женщин, не имеющих данных мутаций.

### Информация о финансировании

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ «Изучение генетических факторов репродуктивного здоровья женщин» (МД-3284.2022.1.4).

### Financial support

The study was supported by the grant of the President of the Russian Federation "Study of the genetic factors of women's reproductive health" (MD-3284.2022.1.4).

### Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

### Conflict of interests

The authors have no conflict of interest to declare.

### Литература

- Gradishar WJ, Anderson BO, Blair SL, et al. Breast cancer version 3.2014. Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN. 2014;12(4):542-590. DOI: <https://doi.org/10.6004/jnccn.2014.0058>
- Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. International Journal of Cancer. 2021;149:778-789. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. Ca-A Cancer Journal for Clinicians. 2021;71(3):209-249. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Здравоохранение в России. 2021. Статистический сборник. М: Росстат; 2021.
- Каприн АД, Старинский ВВ, Петрова ГВ, редакторы. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2019.
- Lilyquist J, Ruddy KJ, Vachon CM, et al. Common Genetic Variation and Breast Cancer Risk-Past, Present, and Future. Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention. 2018;27(4):380-394. DOI: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-17-1144>

7. Shiovitz S, Korde LA. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. Annals of Oncology. 2015;26(7):1291-1299. DOI: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv022>

8. Валова ЯВ, Мингажева ЭТ, Прокофьева ДС, и др. Рак яичников в составе наследственных онкологических синдромов (обзор). Научные результаты биомедицинских исследований. 2021;7(4):330-362. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2021-7-4-0-2>

9. Michailidou K, Lindström S, Dennis J, et al. Association analysis identifies 65 new breast cancer risk loci. Nature. 2017;551(7678):92-94. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature24284>

10. Mucci LA, Hjelmborg JB, Harris JR, et al. Familial Risk and Heritability of Cancer Among Twins in Nordic Countries. JAMA - Journal of the American Medical Association. 2016;315(1):68-76. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2015.17703>

11. Zhang H, Ahearn TU, Lecarpentier J, et al. Genome-wide association study identifies 32 novel breast cancer susceptibility loci from overall and subtype-specific analyses. Nature Genetics. 2020;52(6):572-581. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41588-020-0609-2>

12. Ahearn TU, Zhang H, Michailidou K, et al. Common variants in breast cancer risk loci predispose to distinct tumor subtypes. Breast Cancer Research. 2022;24(1):2. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13058-021-01484-x>

13. Lee JY, Kim J, Kim SW, et al. BRCA1/2-negative, high-risk breast cancers (BRCAx) for Asian women: genetic susceptibility loci and their potential impacts. Scientific Reports. 2018;8(1):15263. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31859-8>

14. Dofara SG, Chang SL, Diorio C. Gene Polymorphisms and Circulating Levels of MMP-2 and MMP-9: A Review of Their Role in Breast Cancer Risk. Anticancer Research. 2020;40(7):3619-3631. DOI: <https://doi.org/10.21873/anticanres.14351>

15. Przybylowska K, Kluczna A, Zadrożny M, et al. Polymorphisms of the promoter regions of matrix metalloproteinases genes MMP-1 and MMP-9 in breast cancer. Breast Cancer Research and Treatment. 2006;95(1):65-72. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10549-005-9042-6>

16. Radisky ES, Radisky DC. Matrix metalloproteinases as breast cancer drivers and therapeutic targets. Frontiers in Bioscience - Landmark. 2015;20(7):1144-1163. DOI: <https://doi.org/10.2741/4364>

17. Eiro N, Gonzalez LO, Fraile M, et al. Breast Cancer Tumor Stroma: Cellular Components, Phenotypic Heterogeneity, Intercellular Communication, Prognostic Implications and Therapeutic Opportunities. *Cancers.* 2019;11(5):664. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers11050664>
18. Baker EA, Stephenson TJ, Reed MWR, et al. Expression of proteinases and inhibitors in human breast cancer progression and survival. *Molecular pathology : MP.* 2002;55(5):300-304. DOI: <https://doi.org/10.1136/mp.55.5.300>
19. McColgan P, Sharma P. Polymorphisms of matrix metalloproteinases 1, 2, 3 and 9 and susceptibility to lung, breast and colorectal cancer in over 30,000 subjects. *International Journal of Cancer.* 2009;125(6):1473-8. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.24441>
20. Zhou P, Du LF, Lv GQ, et al. Current evidence on the relationship between four polymorphisms in the matrix metalloproteinases (MMP) gene and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Research and Treatment.* 2011;127(3):813-818. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1294-0>
21. Liu D, Guo H, Li Y, et al. Association between polymorphisms in the promoter regions of matrix metalloproteinases (MMPs) and risk of cancer metastasis: a meta-analysis. *PLoS ONE.* 2012;7(2):e31251. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031251>
22. Białkowska K, Marciak W, Muszyńska M, et al. Polymorphisms in MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-13 and MT2A do not contribute to breast, lung and colon cancer risk in polish population. *Heredity Cancer in Clinical Practice.* 2020;18:16. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13053-020-00147-w>
23. Zhang X, Jin G, Li J, Zhang L. Association between four MMP-9 polymorphisms and breast cancer risk: a meta-analysis. *Medical Science Monitor.* 2015;21:1115-1123. DOI: <https://doi.org/10.12659/MSM.893890>
24. Xu T, Zhang S, Qiu D, et al. Association between matrix metalloproteinase 9 polymorphisms and breast cancer risk: An updated meta-analysis and trial sequential analysis. *Gene.* 2020;759:144972. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144972>
25. Yan C, Sun C, Lu D, et al. Estimation of associations between MMP9 gene polymorphisms and breast cancer: Evidence from a meta-analysis. *International Journal of Biological Markers.* 2022;37(1):17246008221076145. DOI: <https://doi.org/10.1177/17246008221076145>
26. Lei H, Hemminki K, Altieri A, et al. Promoter polymorphisms in matrix metalloproteinases and their inhibitors: few associations with breast cancer susceptibility and progression. *Breast Cancer Research and Treatment.* 2007;103(1):61-69. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10549-006-9345-2>
27. Roehe AV, Frazzon APG, Agnes G, et al. Detection of polymorphisms in the promoters of matrix metalloproteinases 2 and 9 genes in breast cancer in South Brazil: preliminary results. *Breast Cancer Research and Treatment.* 2007;102(1):123-124. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10549-006-9273-1>
28. Beeghly-Fadiel A, Lu W, Shu XO, et al. MMP9 polymorphisms and breast cancer risk: a report from the Shanghai Breast Cancer Genetics Study. *Breast Cancer Research and Treatment.* 2011;126(2):507-13. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1119-1>
29. Шевченко АВ, Коненков ВИ, Гарбуков ЕЮ, и др. Ассоциированность полиморфизма в промоторных участках генов металло-протеиназ (MMP2, MMP3, MMP9) с вариантами клинического течения рака молочной железы у женщин россии. *Вопросы онкологии.* 2014;60(5):630-635. DOI: <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2014-60-5-630-635>
30. Churnosov MI, Altuchova OB, Demakova NA, et al. Associations of cytokines genetic variants with myomatous knots sizes. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences.* 2014;5(6):1344-1347.
31. Krivoshei IV, Altuchova OB, Golovchenko OV, et al. Genetic factors of hysteromyoma. *Research Journal of Medical Sciences.* 2015;9(4):182-185. DOI: <https://doi.org/10.3923/rjmsci.2015.182.185>
32. Москаленко МИ, Пономаренко ИВ, Полоников АВ, и др. Полиморфный локус rs652438 гена MMP12 ассоциирован с развитием артериальной гипертензии у женщин. *Артериальная гипертензия.* 2019;25(1):60-65. DOI: <https://doi.org/10.18705/1607-419X-2019-25-1-60-65>
33. Bushueva O, Solodilova M, Churnosov M, et al. The Flavin-Containing Monooxygenase 3 Gene and Essential Hypertension: The Joint Effect of Polymorphism E158K and Cigarette Smoking on Disease Susceptibility. *International Journal of Hypertension.* 2014;712169. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/712169>

34. Golovchenko O, Abramova M, Ponomarenko I, et al. Functionally significant polymorphisms of ESR1 and PGR and risk of intrauterine growth restriction in population of Central Russia. European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology. 2020;253:52-57. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2020.07.045>
35. Ward LD, Kellis M. HaploReg v4: systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease. Nucleic Acids Research. 2016;44(D1):D877-D881. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1340>
36. Пономаренко ИВ, Полоников АВ, Чурносов МИ. Ассоциация полиморфизма rs4986938 гена ESR2 с развитием гиперплазии эндометрия. Акушерство и гинекология. 2019;4:66-72. DOI: <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2019.4.66-72>
37. Che R, Jack JR, Motsinger-Reif AA, et al. An adaptive permutation approach for genome-wide association study: evaluation and recommendations for use. BioData Mining. 2014;7:9. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-0381-7-9>
38. Yarosh SL, Kokhtenko EV, Churnosov MI, et al. Joint effect of glutathione S-transferase genotypes and cigarette smoking on idiopathic male infertility. Andrologia. 2015;47(9):980-986. DOI: <https://doi.org/10.1111/and.12367>
39. Polonikov A, Bykanova M, Ponomarenko I, et al. The contribution of CYP2C gene subfamily involved in epoxygenase pathway of arachidonic acids metabolism to hypertension susceptibility in Russian population. Clinical and Experimental Hypertension. 2017;39(4):306-311. DOI: <https://doi.org/10.1080/10641963.2016.1246562>
40. GTEx Consortium. The GTEx Consortium atlas of genetic regulatory effects across human tissues. Science. 2020;369(6509):1318-1330. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aaz1776>
41. Decock J, Long JR, Laxton RC, et al. Association of matrix metalloproteinase-8 gene variation with breast cancer prognosis. Cancer Research. 2007;67(21):10214-10221. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1683>
42. Wang K, Zhou Y, Li G, et al. MMP8 and MMP9 gene polymorphisms were associated with breast cancer risk in a Chinese Han population. Scientific Reports. 2018;8(1):13422. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31664-3>
43. Mavaddat N, Dunning AM, Ponder BA, et al. Common genetic variation in candidate genes and susceptibility to subtypes of breast cancer. Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention. 2009;18(1):255-259. DOI: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0704>
44. Pharoah PD, Tyrer J, Dunning AM, et al. Association between common variation in 120 candidate genes and breast cancer risk. PLoS Genetics. 2007;3(3):e42. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030042>
45. Juurikka K, Butler GS, Salo T, et al. The Role of MMP8 in Cancer: A Systematic Review. International Journal of Molecular Sciences. 2019;20(18):4506. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20184506>
46. Москаленко МИ. Вовлеченность генов матриксных металлопротеиназ в формирование артериальной гипертензии и еесложнений (обзор). Научный результат. Медицина и фармация. 2018;4(1):53-69. DOI: <https://doi.org/10.18413/2313-8955-2018-4-1-53-69>
47. Chahil JK, Munretnam K, Samsudin N, et al. Genetic polymorphisms associated with breast cancer in malaysian cohort. Indian Journal of Clinical Biochemistry. 2015;30(2):134-9. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12291-013-0414-0>
48. Fu F, Wang C, Chen LM, et al. The influence of functional polymorphisms in matrix metalloproteinase 9 on survival of breast cancer patients in a Chinese population. DNA and Cell Biology. 2013;32(5):274-82. DOI: <https://doi.org/10.1089/dna.2012.1928>
49. Al-Eitan LN, Jamous RI, Khasawneh RH. Candidate Gene Analysis of Breast Cancer in the Jordanian Population of Arab Descent: A Case-Control Study. Cancer Investigation. 2017;35(4):256-270. DOI: <https://doi.org/10.1080/07357907.2017.1289217>
50. Slattery ML, John E, Torres-Mejia G, et al. Matrix metalloproteinase genes are associated with breast cancer risk and survival: The Breast Cancer Health Disparities Study. PLoS ONE. 2013;8:e63165. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063165>
51. Resler AJ, Malone KE, Johnson LG, et al. Genetic variation in TLR or NFκB pathways and the risk of breast cancer: a case-control study. BMC Cancer. 2013;13:219. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-219>
52. Oliveira VA, Chagas DC, Amorim JR, et al. Association between matrix metalloproteinase-9 gene polymorphism and breast cancer in Brazilian women. Clinics. 2020;75:e1762. DOI: <https://doi.org/10.6061/clinics/2020/e1762>

## References

1. Gradishar WJ, Anderson BO, Blair SL, et al. Breast cancer version 3.2014. Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN. 2014;12(4):542-590. DOI: <https://doi.org/10.6004/jnccn.2014.0058>
2. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. International Journal of Cancer. 2021;149:778-789. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. Ca-A Cancer Journal for Clinicians. 2021;71(3):209-249. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
4. Health care in Russia. 2021. Statistical compendium. Moscow: Rosstat; 2021. Russian.
5. Kaprin AD, Starinsky VV, Petrova GV, editors. Malignant neoplasms in Russia in 2018 (morbidity and mortality). Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU «NMITS radiologii» Minzdrava Rossii; 2019. Russian.
6. Lilyquist J, Ruddy KJ, Vachon CM, et al. Common Genetic Variation and Breast Cancer Risk-Past, Present, and Future. Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention. 2018;27(4):380-394. DOI: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-17-1144>
7. Shiovitz S, Korde LA. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. Annals of Oncology. 2015;26(7):1291-1299. DOI: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv022>
8. Valova YV, Mingazheva ET, Prokofieva DS, et al. Ovarian cancer as part of hereditary cancer syndromes (review). Research Results in Biomedicine. 2021;7(4):330-362. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2021-7-4-0-2>
9. Michailidou K, Lindström S, Dennis J, et al. Association analysis identifies 65 new breast cancer risk loci. Nature. 2017;551(7678):92-94. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature24284>
10. Mucci LA, Hjelmborg JB, Harris JR, et al. Familial Risk and Heritability of Cancer Among Twins in Nordic Countries. JAMA - Journal of the American Medical Association. 2016;315(1):68-76. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2015.17703>
11. Zhang H, Ahearn TU, Lecarpentier J, et al. Genome-wide association study identifies 32 novel breast cancer susceptibility loci from overall and subtype-specific analyses. Nature Genetics. 2020;52(6):572-581. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41588-020-0609-2>
12. Ahearn TU, Zhang H, Michailidou K, et al. Common variants in breast cancer risk loci predispose to distinct tumor subtypes. Breast Cancer Research. 2022;24(1):2. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13058-021-01484-x>
13. Lee JY, Kim J, Kim SW, et al. BRCA1/2-negative, high-risk breast cancers (BRCAx) for Asian women: genetic susceptibility loci and their potential impacts. Scientific Reports. 2018;8(1):15263. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31859-8>
14. Dofara SG, Chang SL, Diorio C. Gene Polymorphisms and Circulating Levels of MMP-2 and MMP-9: A Review of Their Role in Breast Cancer Risk. Anticancer Research. 2020;40(7):3619-3631. DOI: <https://doi.org/10.21873/anticanres.14351>
15. Przybylowska K, Kluczna A, Zadrozny M, et al. Polymorphisms of the promoter regions of matrix metalloproteinases genes MMP-1 and MMP-9 in breast cancer. Breast Cancer Research and Treatment. 2006;95(1):65-72. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10549-005-9042-6>
16. Radisky ES, Radisky DC. Matrix metalloproteinases as breast cancer drivers and therapeutic targets. Frontiers in Bioscience - Landmark. 2015;20(7):1144-1163. DOI: <https://doi.org/10.2741/4364>
17. Eiro N, Gonzalez LO, Fraile M, et al. Breast Cancer Tumor Stroma: Cellular Components, Phenotypic Heterogeneity, Intercellular Communication, Prognostic Implications and Therapeutic Opportunities. Cancers. 2019;11(5):664. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers11050664>
18. Baker EA, Stephenson TJ, Reed MWR, et al. Expression of proteinases and inhibitors in human breast cancer progression and survival. Molecular pathology : MP. 2002;55(5):300-304. DOI: <https://doi.org/10.1136/mp.55.5.300>
19. McColgan P, Sharma P. Polymorphisms of matrix metalloproteinases 1, 2, 3 and 9 and susceptibility to lung, breast and colorectal cancer in over 30,000 subjects. International Journal of Cancer. 2009;125(6):1473-8. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.24441>
20. Zhou P, Du LF, Lv GQ, et al. Current evidence on the relationship between four polymorphisms in the matrix metalloproteinases (MMP) gene and breast cancer risk: a meta-analysis. Breast Cancer Research and Treatment. 2011;127(3):813-

818. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1294-0>
21. Liu D, Guo H, Li Y, et al. Association between polymorphisms in the promoter regions of matrix metalloproteinases (MMPs) and risk of cancer metastasis: a meta-analysis. PLoS ONE. 2012;7(2):e31251. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031251>
22. Białkowska K, Marciak W, Muszyńska M, et al. Polymorphisms in MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-13 and MT2A do not contribute to breast, lung and colon cancer risk in polish population. Hereditary Cancer in Clinical Practice. 2020;18:16. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13053-020-00147-w>
23. Zhang X, Jin G, Li J, Zhang L. Association between four MMP-9 polymorphisms and breast cancer risk: a meta-analysis. Medical Science Monitor. 2015;21:1115-1123. DOI: <https://doi.org/10.12659/MSM.893890>
24. Xu T, Zhang S, Qiu D, et al. Association between matrix metalloproteinase 9 polymorphisms and breast cancer risk: An updated meta-analysis and trial sequential analysis. Gene. 2020;759:144972. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144972>
25. Yan C, Sun C, Lu D, et al. Estimation of associations between MMP9 gene polymorphisms and breast cancer: Evidence from a meta-analysis. International Journal of Biological Markers. 2022;37(1):17246008221076145. DOI: <https://doi.org/10.1177/17246008221076145>
26. Lei H, Hemminki K, Altieri A, et al. Promoter polymorphisms in matrix metalloproteinases and their inhibitors: few associations with breast cancer susceptibility and progression. Breast Cancer Research and Treatment. 2007;103(1):61-69. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10549-006-9345-2>
27. Roehe AV, Frazzon APG, Agnes G, et al. Detection of polymorphisms in the promoters of matrix metalloproteinases 2 and 9 genes in breast cancer in South Brazil: preliminary results. Breast Cancer Research and Treatment. 2007;102(1):123-124. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10549-006-9273-1>
28. Beeghly-Fadiel A, Lu W, Shu XO, et al. MMP9 polymorphisms and breast cancer risk: a report from the Shanghai Breast Cancer Genetics Study. Breast Cancer Research and Treatment. 2011;126(2):507-13. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1119-1>
29. Shevchenko AV, Konenkov VI, Garbukov EIu, et al. Associating of polymorphism in the promoter regions of genes of metalloproteinase (MMP2, MMP3, MMP9) with options of the clinical course of breast cancer in Russian women. Voprosy onkologii. 2014;60(5):630-635. Russian. DOI: <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2014-60-5-630-635>
30. Churnosov MI, Altuchova OB, Demakova NA, et al. Associations of cytokines genetic variants with myomatous knots sizes. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2014;5(6):1344-1347.
31. Krivoshei IV, Altuchova OB, Golovchenko OV, et al. Genetic factors of hysteromyoma. Research Journal of Medical Sciences. 2015;9(4):182-185. DOI: <https://doi.org/10.3923/rjmsci.2015.182.185>
32. Moskalenko MI, Ponomarenko IV, Polonikov AV, et al. Polymorphic locus rs652438 of the MMP12 gene is associated with the development of hypertension in women. Arterial Hypertension. 2019;25(1):60-65. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18705/1607-419X-2019-25-1-60-65>
33. Bushueva O, Solodilova M, Churnosov M, et al. The Flavin-Containing Monooxygenase 3 Gene and Essential Hypertension: The Joint Effect of Polymorphism E158K and Cigarette Smoking on Disease Susceptibility. International Journal of Hypertension. 2014;712169. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/712169>
34. Golovchenko O, Abramova M, Ponomarenko I, et al. Functionally significant polymorphisms of ESR1 and PGR and risk of intrauterine growth restriction in population of Central Russia. European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology. 2020;253:52-57. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2020.07.045>
35. Ward LD, Kellis M. HaploReg v4: systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease. Nucleic Acids Research. 2016;44(D1):D877-D881. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1340>
36. Ponomarenko IV, Polonikov AV, Churnosov MI. Association of ESR2 rs4986938 polymorphism with the development of endometrial hyperplasia. Obstetrics and Gynecology. 2019;4:66-72. Russian. DOI: <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2019.4.66-72>

- 37.Che R, Jack JR, Motsinger-Reif AA, et al. An adaptive permutation approach for genome-wide association study: evaluation and recommendations for use. *BioData Mining*. 2014;7:9. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-0381-7-9>
- 38.Yarosh SL, Kokhtenko EV, Churnosov MI, et al. Joint effect of glutathione S-transferase genotypes and cigarette smoking on idiopathic male infertility. *Andrologia*. 2015;47(9):980-986. DOI: <https://doi.org/10.1111/and.12367>
- 39.Polonikov A, Bykanova M, Ponomarenko I, et al. The contribution of CYP2C gene subfamily involved in epoxygenase pathway of arachidonic acids metabolism to hypertension susceptibility in Russian population. *Clinical and Experimental Hypertension*. 2017;39(4):306-311. DOI: <https://doi.org/10.1080/10641963.2016.1246562>
- 40.GTEx Consortium. The GTEx Consortium atlas of genetic regulatory effects across human tissues. *Science*. 2020;369(6509):1318-1330. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aaz1776>
- 41.Decock J, Long JR, Laxton RC, et al. Association of matrix metalloproteinase-8 gene variation with breast cancer prognosis. *Cancer Research*. 2007;67(21):10214-10221. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1683>
- 42.Wang K, Zhou Y, Li G, et al. MMP8 and MMP9 gene polymorphisms were associated with breast cancer risk in a Chinese Han population. *Scientific Reports*. 2018;8(1):13422. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31664-3>
- 43.Mavaddat N, Dunning AM, Ponder BA, et al. Common genetic variation in candidate genes and susceptibility to subtypes of breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2009;18(1):255-259. DOI: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0704>
- 44.Pharoah PD, Tyrer J, Dunning AM, et al. Association between common variation in 120 candidate genes and breast cancer risk. *PLoS Genetics*. 2007;3(3):e42. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030042>
- 45.Juurikka K, Butler GS, Salo T, et al. The Role of MMP8 in Cancer: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(18):4506. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20184506>
- 46.Moskalenko MI. The involvement of genes of matrix metalloproteinases in the development of arterial hypertension and its complication (review). *Research Result. Medicine and Pharmacy*. 2018;4(1):53-69. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18413/2313-8955-2018-4-1-53-69>
- 47.Chahil JK, Munretnam K, Samsudin N, et al. Genetic polymorphisms associated with breast cancer in malaysian cohort. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2015;30(2):134-9. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12291-013-0414-0>
- 48.Fu F, Wang C, Chen LM, et al. The influence of functional polymorphisms in matrix metalloproteinase 9 on survival of breast cancer patients in a Chinese population. *DNA and Cell Biology*. 2013;32(5):274-82. DOI: <https://doi.org/10.1089/dna.2012.1928>
- 49.Al-Eitan LN, Jamous RI, Khasawneh RH. Candidate Gene Analysis of Breast Cancer in the Jordanian Population of Arab Descent: A Case-Control Study. *Cancer Investigation*. 2017;35(4):256-270. DOI: <https://doi.org/10.1080/07357907.2017.1289217>
- 50.Slattery ML, John E, Torres-Mejia G, et al. Matrix metalloproteinase genes are associated with breast cancer risk and survival: The Breast Cancer Health Disparities Study. *PLoS ONE*. 2013;8:e63165. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063165>
- 51.Resler AJ, Malone KE, Johnson LG, et al. Genetic variation in TLR or NFkappaB pathways and the risk of breast cancer: a case-control study. *BMC Cancer*. 2013;13:219. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-219>
- 52.Oliveira VA, Chagas DC, Amorim JR, et al. Association between matrix metalloproteinase-9 gene polymorphism and breast cancer in Brazilian women. *Clinics*. 2020;75:e1762. DOI: <https://doi.org/10.6061/clinics/2020/e1762>

Статья поступила в редакцию 12 января 2022 г.  
Поступила после доработки 25 февраля 2022 г.  
Принята к печати 2 марта 2022 г.

Received 12 January 2022

Revised 25 February 2022

Accepted 2 March 2022

## Информация об авторах

**Надежда Витальевна Павлова**, соискатель по научной специальности 1.5.7 – Генетика ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Российская Федерация, E-mail: doc.ss@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7754-5231>.

**Валентина Семеновна Орлова**, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры

акушерства и гинекологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Российская Федерация, E-mail: orlova@bsu.edu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3882-9191>.

**Ирина Витальевна Батлутская**, доктор биологических наук, доцент, заведующий кафедрой биотехнологии и микробиологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Российская Федерация, E-mail: bat@bsu.edu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0068-6586>.

**Ольга Алексеевна Ефремова**, доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой факультетской терапии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Российская Федерация, E-mail: efremova@bsu.edu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6395-1626>.

**Ирина Васильевна Пономаренко**, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры медико-биологических дисциплин ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Российская Федерация, E-mail: ponamarenko\_i@bsu.edu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5652-0166>.

### Information about the authors

**Nadezhda V. Pavlova**, Applicant in Scientific Specialty 1.5.7 – Genetics, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, E-mail: doc.ss@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7754-5231>.

**Valentina S. Orlova**, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Professor at the Department of Obstetrics and Gynecology, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, E-mail: orlova@bsu.edu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3882-9191>.

**Irina V. Batlutskaya**, Doct. Sci. (Biology), Associate Professor, Head of the Department of Biotechnology and Microbiology, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, E-mail: bat@bsu.edu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0068-6586>.

**Olga A. Efremova**, Doct. Sci. (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Faculty Therapy, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, E-mail: efremova@bsu.edu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6395-1626>.

**Irina V. Ponomarenko**, Doct. Sci. (Medicine), Associate Professor, Professor at the Department of Biomedical Disciplines, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, E-mail: ponamarenko\_i@bsu.edu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5652-0166>.

## ФАРМАКОЛОГИЯ, КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ PHARMACOLOGY



DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-5

УДК 651.4

# Pharmacological characteristics of intranasal dosage forms containing Ginkgo biloba extracts

Elena V. Kovtun<sup>1</sup> , Eleonora F. Stepanova<sup>1</sup> , Maxim V. Chernikov<sup>1</sup> ,  
Dmitry I. Pozdnyakov<sup>1</sup> , Natalia B. Shabanova<sup>1</sup> , Anastasia D. Gerashchenko<sup>1</sup> ,  
Lyudmila V. Pogrebnyak<sup>1</sup> , Dmitry Tworowsky<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Volgograd State Medical University,  
1 Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, 400131, Russia

<sup>2</sup> Weizmann Institute of Science Israel,  
234 Herzl St., Rehovot, 7610001, Israel

<sup>3</sup> Bar-Ilan University,  
5 Nahala St., Ramat Gan, 52000, Israel  
Corresponding author: Elena V. Kovtun (elena.f.73@mail.ru)

### Abstract

**Background:** This article reviews the pharmacological characteristics of developed dosage forms for intranasal administration. The influence of the type of dosage form on the efficacy of the drug is significant. Gel-like structures are interesting objects for research. Interest in understanding the nature and properties of such structures is due to the variety of effects observed when gels are used. The active ingredient in the studied forms is ginkgo biloba extract obtained by ultrasonic extraction followed by thickening. The object of comparison is standardized dried ginkgo biloba extract (EGB 76). The study of cerebrotropic activity of the developed gels was conducted on the model of bilateral occlusion of the common carotid arteries. The studied objects and the reference preparation were administered therapeutically after modeling cerebral ischemia once a day for 3 weeks. **Aim of the study:** To evaluate specific pharmacological activity of the developed dosage forms of ginkgo biloba.

**Materials and Methods:** Studies were performed in an appropriate design by simulating cerebral ischaemia in rabbits using simultaneous bilateral occlusion of the common carotid arteries. Changes in cerebral blood flow velocity were performed by Doppler using an appropriate transducer and software package. The data obtained were statistically processed using an application software package.

**Results:** Conducted investigations revealed that under conditions of experimental cerebral ischemia simulated by simultaneous occlusion of the common carotid arteries in large laboratory animals (rabbits), the use of the developed dosage forms promoted the reduction of the severity of neurological deficit, the restoration of cerebral hemodynamics and pro/antioxidant balance in the hippocampus.

**Conclusions:** Developed nasal gels based on chitosan and sodium alginate are promising agents for chronic cerebrovascular accident with antioxidant mechanism of action and therapeutic potential similar to oral administration of standardized ginkgo biloba extract – EGB 761.

**Key words:** intranasal dosage forms; ginkgo biloba extract; cerebrotropic activity

**For citation:** Kovtun EV, Stepanova EF, Chernikov MV, et al. Pharmacological characteristics of intranasal dosage forms containing Ginkgo biloba extracts. Research Results in Biomedicine. 2022;8(2): 198-206. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-5

**Introduction.** The impact of dosage forms as one of the basic building blocks of biopharmacy is now increasingly seen in relation to efficacy and safety of medicines. The range of dosage forms today is very broad. It ranges from the traditional group, led by the classic tablet, to more recent generations of dosage forms and innovative dosage forms that include delivery agents. However, even within this considerable list, there are areas of priority. These include the intranasal route of administration and, accordingly, intranasal dosage forms. At present, the choice for this group is still limited, primarily in terms of research subjects, of which there are many and their pharmacological areas are quite large, but the effectiveness of research is low, and the transfer of relevant developments into production is extremely rare. This is due to the complexity of creating rational nasal dosage forms, developing appropriate adjuvant compositions and, of course, solving questions about research models, due to the peculiarities of the application surface. As a model we chose one of the well-known and sought-after medicines – Ginkgo biloba, which has undoubtedly cerebrotropic activity. It is known that the Ginkgo biloba phytocomplex reduces capillary permeability, activates blood circulation, first of all, at the level of arterioles and capillaries, increases venous tone. However, the range of dosage forms of this object is represented rather narrowly; for the most part these are solid dosage forms and, what is important, mostly by preparations of foreign origin. In this regard, it was decided to use the drops and gel as the studied dosage forms, presented in 2 variants, as different gel formers were considered. Thus, studies regarding the pharmacological activity of developed specific models of intranasal forms – drops and gel based on Ginkgo biloba are quite relevant and appropriate [1, 2, 3].

**Materials and methods.** Experimental animals.

The assessment of the specific pharmacological activity of the developed dosage forms of Ginkgo biloba was performed on 24 male Californian rabbits weighing 2.5-3.0 kg, obtained from the laboratory animal nursery "Rappolovo" (Leningrad Region). The standardized extract of Ginkgo biloba (EGB 761), obtained from Hunan Warrant Pharmaceuticals (PRC), was used as a comparison drug. The analyzed dosage forms were drops, sodium alginate-based gel, and chitosan-based gel with the Ginkgo biloba phytocomplex obtained by ultrasonic extraction. [4]. Before the study, the animals were kept in quarantine conditions for 14 days. During the direct conduct of the experiment, the rabbits were kept in a vivarium under controlled climatic conditions: at an air temperature of  $20\pm2$  °C, a relative humidity of  $60\pm5\%$  and a 12-hour change of the daily cycle in mesh metal cages equipped with a drip drinker and a feed supply tank. The number of species in one cell was four. The animals' access to food and water was not restricted. The experimental procedures and the keeping of animals corresponded to the generally accepted principles of the international ethical principles of working with laboratory animals, set out in ARRIVE 2.0 [4].

**Study design (Fig. 1):** The study of the cerebrotropic activity of the developed dosage forms of Ginkgo biloba was carried out on a model of bilateral occlusion of the common carotid arteries. The standardized extract of Ginkgo biloba (EGB 761), obtained from Hunan Warrant Pharmaceuticals (PRC), was used as a comparison drug. The studied dosage forms and the reference drug were administered in a therapeutic mode after modeling brain ischemia once a day for 3 weeks. The comparison drug was administered orally at a dose of 35 mg/kg [5], the analyzed dosage forms (drops, a gel based on sodium alginate and a gel based on chitosan) were administered

intranasally at a dose equivalent to the reference drug, calculated in such a way that one drop and one dose of the gel contained 35 mg/kg of the extract obtained by us. The comparison drug was administered orally at a dose of 35 mg/kg [5, 6], the analyzed dosage forms (drops, sodium alginate-based gel and chitosan-based gel) were administered intranasally at a dose equivalent to that of the compar-

ison drug. During the study, changes in neurological deficits were determined according to the McGraw scale (the initial indicator, as well as that on the 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days of the experiment), the average systolic velocity of cerebral blood flow (on the 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days of the experiment) and the pro/antioxidant balance in the hippocampus (on the 21<sup>st</sup> day of the study).

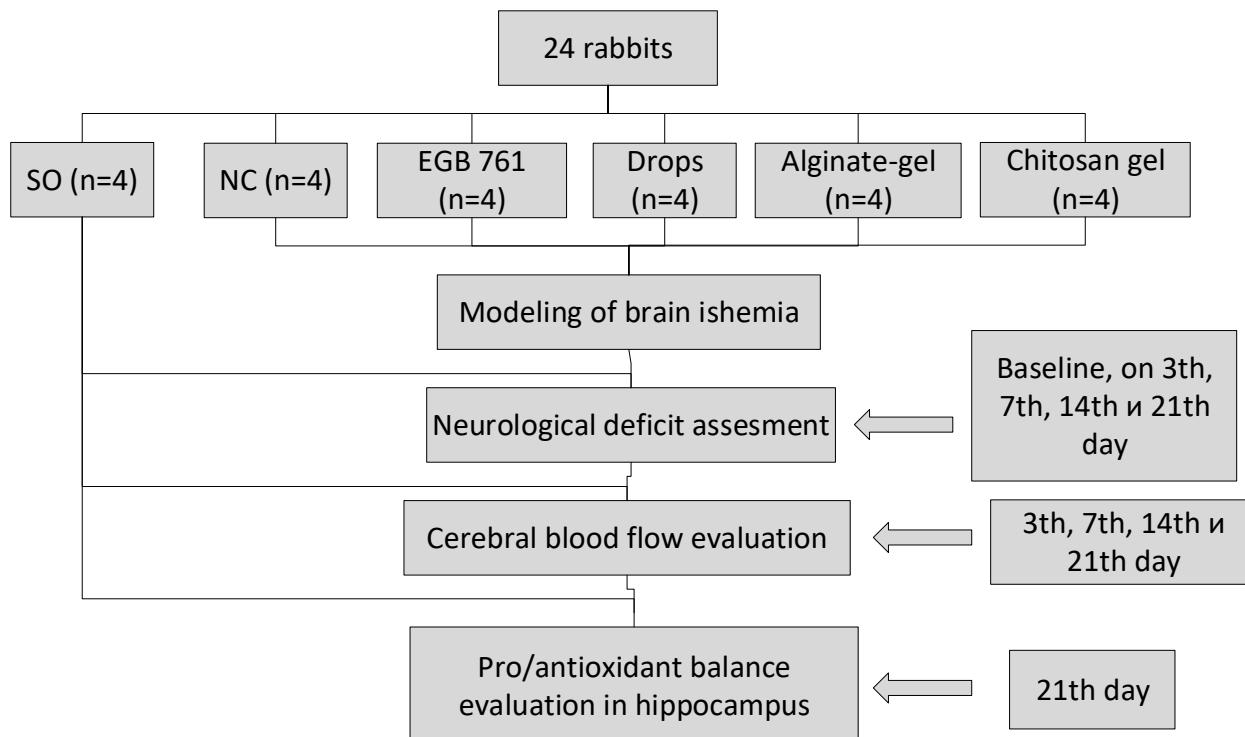


Fig. 1. Study design. SO – sham-operate animals, NC – negative control animals

### Experimental modeling of brain ischemia

Cerebral ischemia was modeled in rabbits by simultaneous bilateral occlusion of the common carotid arteries. The animals were anesthetized by chloral hydrate 350 mg/kg, intraperitoneally. Their skin area on the neck near the trachea was depilated. Then, an incision of the skin was made and soft tissues were dissected, exposing the carotid arteries. A silk thread was placed under the arteries and tied at the same time. The topography of soft tissues was restored, the wound was sutured and

treated with an antiseptic solution (povidone-iodine 10%) [7].

### Methods for assessing neurological deficits.

The McGraw psychometric scale was used to assess the degree of development of neurological deficits. The estimated indicators are presented in Table 1. According to this scale, the sum of points 0.5-2.0 corresponds to a mild degree of neurological deficit; 2.5-5.0 – to moderate severity; 5.5-10 – to severe neurological deficit. The neurological deficit was defined by the sum of the corresponding points [8].

Table 1

**McGraw neurological deficit assessment scale**

Parameter	Score
Lethargy	0.5
Tremor	1
Unilateral semitosis	1
Bilateral semitosis	1.5
Inability to pull back a limb while holding it	1.5
Unilateral ptosis	1.5
Bilateral ptosis	1.5
Short movements	2.0
Paresis of 1-4 limbs	2-5
Paralysis of 1-4 limbs	3-6
Coma	7.0
Mortality rate	10.0

**Methods for assessing changes in the speed of local cerebral blood flow**

The speed of cerebral blood flow was measured by the Doppler method using the ultrasound Doppler system sensor UZOP-010-01 with an operating frequency of 25 MHz and the MM-D-K-Minimax Doppler v. 2. 1 software package ("Minimax", St. Petersburg, Russia). The registration of changes in cerebral hemodynamics was carried out in the middle cerebral artery circulation. For this, a burr hole was made in this area with a boron, the dura mater was removed and a sensor was installed. The contact gel "UNIAGEL" was used as a sound-conducting medium. After recording the blood flow level, the integrity of the cranial box was restored with a polycarboxylate polymer [7].

**Preparation of biological material for the assessment of changes in the pro/antioxidant balance**

Changes in the pro / antioxidant balance were evaluated in the hippocampus of experimental animals, for which the rabbits were decapitated under chloral hydrate anesthesia and the brain was extracted. Then, the hippocampus was separated and was homogenized in a Tris-HCl buffer with pH= 7.4. The obtained homogenate was centrifuged at 1000g for 10 min. The supernatant was removed for analysis.

**Methods for assessing changes in the pro/antioxidant balance**

*Determination of the activity of superoxide dismutase (SOD).* The activity of SOD was

evaluated in the post-nuclear fraction by inhibiting the formation of nitrotetrazolium chloride (NTH) formazane. NTH was used as an indicator of the formation of a superoxide anion. For the production of O<sub>2</sub> a system containing a solution of riboflavin (2.8\*10<sup>-5</sup> M), TMED – Tetramethylmethylenediamine (0.01 M in a 0.05 M phosphate buffer pH 7.8) was used when irradiated with a daylight lamp for 5 minutes. The reaction was terminated by adding a 20% solution of TCA (trichloracetic acid) and acetone. The optical density was recorded on CPK-3 at 440 nm. The activity of SOD was expressed in units/ mg of protein [8]. The protein content was determined in the reaction with the dye Coomassie Brilliant Blue G-250 [9].

*Determination of the concentration of TBA (2-thiobarbituric acid)-active products.* The concentration of TBA-active products (TBA-AP) was determined by the thiobarbituric method. The method is based on the formation of a colored complex with an absorption maximum at 532 nm. The protein was precipitated by adding a 17% solution of TCA. The measurement of extinction of the colored complex of malondialdehyde with thiobarbituric acid (0.8% solution) was made by using a PE-8000 spectrophotometer at a wavelength of 532 nm and expressed in micromol/ mg of protein [10].

*Determination of the reduced glutathione (GHS) concentration.* The concentration of reduced glutathione was determined by a spectrophotometric method based on the oxidation reaction of glutathione with a sulphydryl

reagent of 5.5' – dithio-bis-2-nitrobenzoic acid with formation of 5'-thio-2-nitrobenzoic acid, colored yellow. The optical density was recorded at 412 nm [11].

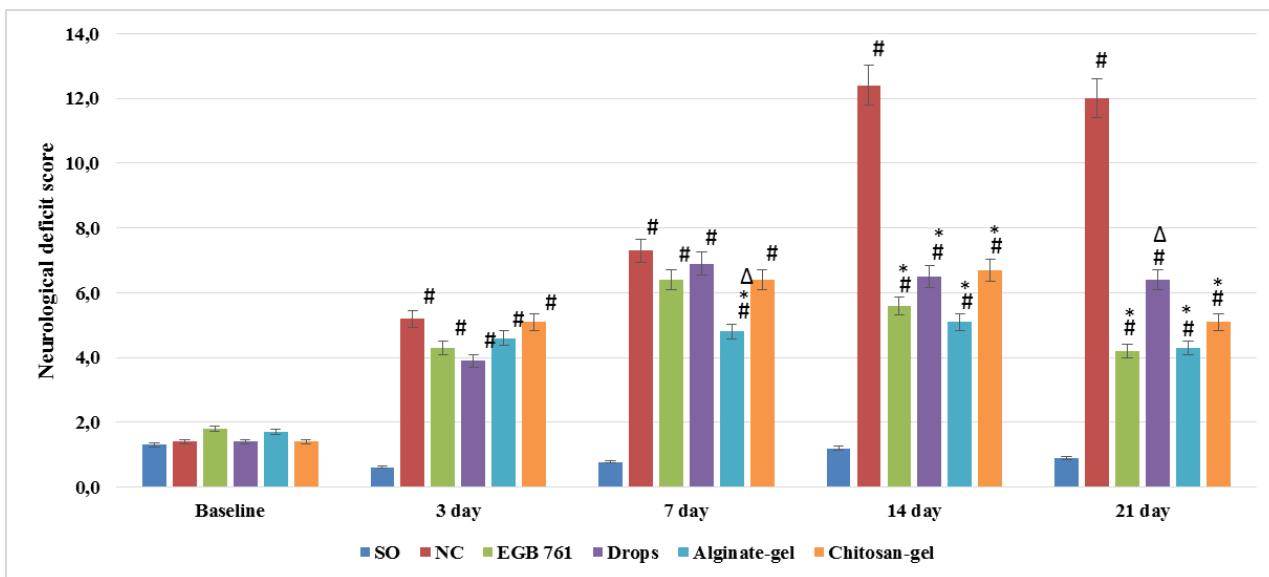
**Statistical methods.** The data obtained during the study were subjected to statistical processing by using the STATISTICA 6.0 application software package (StatSoft, USA) and MS Excel 10 for the Windows operating system. The average value (median value) and the standard error of the average were calculated, the data were presented in the form of  $M \pm m$ . The obtained results were subjected to a test for the normality of the distribution (the Shapiro-Wilk criterion). If the data obeyed the law of normal distribution, ANOVA with the Tukey post-test was used to compare the averages. Otherwise the statistic processing of the experimental results was carried out by using the Kruskall-Wallis criterion.

## Results

*The influence of the studied dosage forms and the referent on the change of*

*neurological deficit in animals under conditions of cerebral ischemia.*

When analyzing the changes in neurological deficit in rabbits under conditions of brain ischemia, it was found that after occlusion of the common carotid arteries in animals of the NC group, the neurological deficit on the 3<sup>rd</sup> day of the study was 8.5 times ( $p < 0.05$ ) higher compared to the SO group of rabbits. Subsequently, on the 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days of the experiment, the neurological deficit in the NC group of animals was higher than that in the SO group of rabbits by 9.4 ( $p < 0.05$ ); 10.3 ( $p < 0.05$ ) and 13.3 ( $p < 0.05$ ) times respectively (Fig. 2). The use of EGB 761 contributed to a decrease in the degree of neurological deficit compared to the NC group of animals on the 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days of the study by 54.8% ( $p < 0.05$ ) and 65.0% ( $p < 0.05$ ) respectively, while the indicators of the 3<sup>rd</sup> and 7<sup>th</sup> days in rabbits treated with EGB 761 did not significantly differ from those in the NC group of animals.



Note: SO - sham-operate animals, NC – negative control animals. The figure shows the median value; # - is statistically significant relative to SO animals (Kruskall-Wallis criterion,  $p < 0.05$ ); \* - is statistically significant relative to the NC group of animals (Kruskall-Wallis criterion,  $p < 0.05$ ); Δ - is statistically significant relative to animals treated with EGB 761 (Kruskall-Wallis criterion,  $p < 0.05$ ).

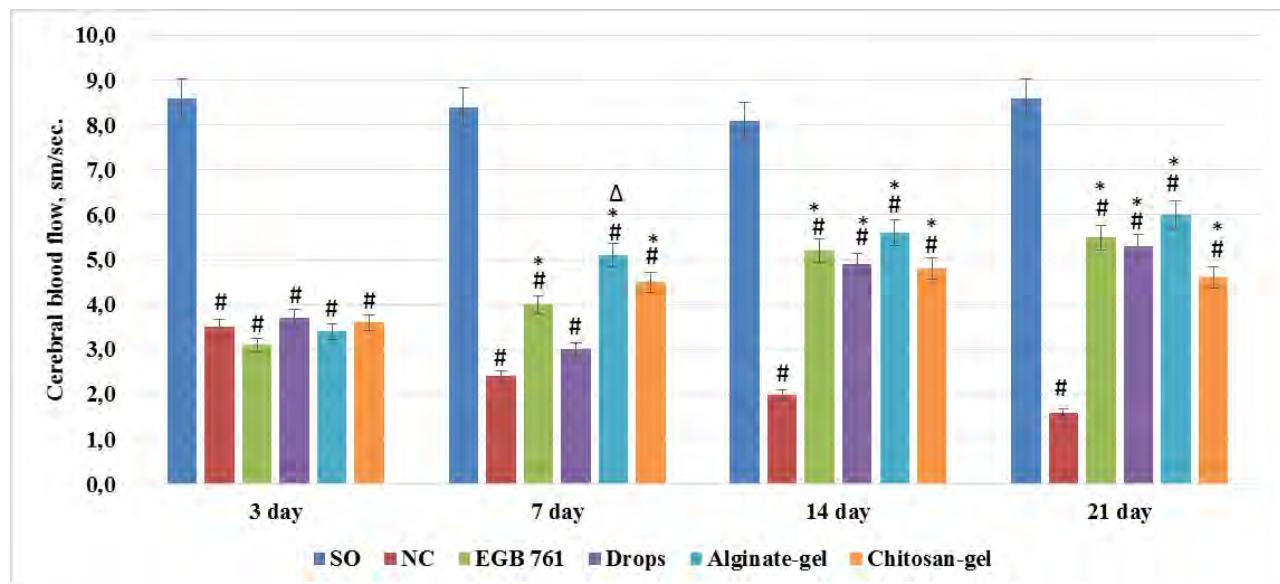
Fig. 2. The effect of the developed dosage forms and the comparison drug on the change of neurological deficit in rabbits under conditions of brain ischemia

Against the background of the injection of the developed nasal drops, there was a decrease (in comparison with the NC group of animals) in neurological symptoms in rabbits

on the 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days of the experiment by 47.6% ( $p < 0.05$ ) and 45.8% ( $p < 0.05$ ), respectively. When using the studied nasal gel based on sodium alginate, the neurological deficit in

animals decreased compared to the NC group of rabbits on the 7<sup>th</sup> day of the study by 34.2% ( $p<0.05$ ); on the 14<sup>th</sup> day – by 58.9% ( $p<0.05$ ) and on the 21<sup>st</sup> day – by 54.2% ( $p<0.05$ ). It should be noted that in animals receiving the developed sodium alginate gel, the neurological deficit on the 7<sup>th</sup> day of the experiment was

lower than that in rabbits injected with EGB 761 by 25.2% ( $p<0.05$ ). The injection of a chitosan-based gel helped to reduce the severity of neurological deficit compared to the NC group of animals on the 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days of the study by 46% ( $p<0.05$ ) and 57.5% ( $p<0.05$ ), respectively (Fig. 2).



Note: SO - sham-operate animals, NC – negative control animals # - is statistically significant relative to the SO group of animals (Tukey criterion,  $p<0.05$ ); \* - is statistically significant relative to the NC group of animals (Tukey criterion,  $p<0.05$ ); Δ – is statistically significant relative to animals treated with EGB 761 (Tukey criterion,  $p<0.05$ ).

Fig. 3. The influence of the developed dosage forms and the comparison drug on the change in the speed of cerebral blood flow in rabbits under conditions of cerebral ischemia

#### *The effect of the studied dosage forms and the referent on the change in the rate of cerebral blood flow in animals under conditions of cerebral ischemia.*

After modeling brain ischemia on the 3<sup>rd</sup> day of the experiment, the NC group of animals, as well as rabbits that received the reference drug, the studied nasal drops, sodium alginate based gel and chitosan based gel, showed an almost equivalent decrease in the level of cerebral blood flow compared to SO animals by 59.3% ( $p<0.05$ ); 63.6% ( $p<0.05$ ); 59.6% ( $p<0.05$ ) 60.4% ( $p<0.05$ ) and 58.1% ( $p<0.05$ ), respectively. This allows an identical course of the ischemic process in all experimental groups. Then, a progressive deterioration of cerebral hemodynamics was noted in the animals of the NC group, which is evidenced by a decrease in the rate of cerebral blood flow in this group of rabbits compared to SO animals on the 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days of the

experiment by 71.4% ( $p<0.05$ ), 75.3% and 81.4% ( $p<0.05$ ), respectively (Fig. 3). Against the background of injection of EGB761 to the rabbits, the rate of cerebral blood flow on the 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days of the study were higher than the same in the NC group of animals by 66.7% ( $p<0.05$ ); 160.0% ( $p<0.05$ ) and 243.8% ( $p<0.05$ ), respectively. The use of the developed nasal drops helped to restore the level of cerebral blood flow, which was reflected in an increase in the average systolic blood flow rate on the 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days of the experiment by 145.0% ( $p<0.05$ ) and 231.3% ( $p<0.05$ ), respectively. In animals treated with the studied sodium alginate-based gel, the rate of cerebral blood flow increased on the 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days of the study, compared with the NC group of rabbits, by 112.5% ( $p<0.05$ ); 180.0% ( $p<0.05$ ) and 275.3% ( $p<0.05$ ), respectively. At the same time, on the 3<sup>rd</sup> day of the experi-

ment, the level of cerebral blood flow in animals receiving the developed sodium alginate-based gel was 27.5% higher than that in rabbits injected with EGB 761 ( $p<0.05$ ). When using a chitosan-based gel, an increase in the rate of cerebral blood flow was observed in relation to NC group rabbits on the 7<sup>th</sup> day of the experiment by 87.5% ( $p<0.05$ ); on the 14<sup>th</sup> day – by 140.0% ( $p<0.05$ ) and on the 21<sup>st</sup> day - by 187.5% ( $p<0.05$ ).

*The effect of the studied dosage forms and the referent on the change in the pro / antioxidant balance in the hippocampus of animals under conditions of cerebral ischemia.*

#### **The effect of the studied dosage forms and the referent on the change in the pro/antioxidant balance in the hippocampus of animals under conditions of cerebral ischemia**

Rate	SOD, unit/mg of protein	TBA-AP, $\mu\text{M}/\text{mg}$ of protein	GSH nM/ mg of protein
SO	75.6±5	1.4±0.2	45.3±5.3
NC	23.4±5.3#	12.7±2.5#	21.1±4.7#
EGB 761	45.6±5.1*	5.6±0.9*	36.1±5*
Drops	34.1±4.3*	6.8±1.2*	27.9±6.5*
Alginate gel	56.9±4.6*	4.1±0.7*	39.1±6.2*
Chitosan-based gel	50.2±7.1*	6.4±1.1*	30.7±4.9*

Note: SO - sham-operate animals, NC – negative control animals. # - is statistically significant relative to the SO group of animals (Tukey criterion,  $p<0.05$ ); \* - is statistically significant relative to the NC group of animals (Tukey criterion,  $p<0.05$ ).

During the course of the study, it was found that in the NC group of animals, compared with SO rabbits, there was a decrease in SOD activity by 69.0% ( $p<0.05$ ) and the concentration of reduced glutathione by 53.4% ( $p<0.05$ ) with an increase in the content of TBA-AP by 9.1 times ( $p<0.05$ ). The use of the comparison drug contributed to an increase in the activity of SOD and the concentration of GSH, as well as a decrease in the content of TBA-AP by 94.9% ( $p<0.05$ ); 71.1% ( $p<0.05$ ) and 55.9% ( $p<0.05$ ) relative to similar indicators of the NC group of animals. In rabbits receiving the studied nasal drops, the SOD activity was increased by 45.7% ( $p<0.05$ ); glutathione concentration – by 32.2% ( $p<0.05$ ), accompanied by a decrease in the content of TBA-AP by 46.5% ( $p<0.05$ ). Against the background of the injection of a sodium alginate based gel to animals, the activity of SOD and the GSH content were higher, and the concentration of TBA-AP, respectively, was lower

Taking into account the fact that cerebral hypoperfusion changes primarily affect the hippocampal zone, which leads to impaired cognitive functions and the development of neurological deficits, the influence of the developed dosage forms and the referent on the course of oxidative stress reactions in the hippocampus of animals as one of the main pathogenetic mechanisms of damage to brain structures in ischemia was evaluated in this work [12].

The results of the study are presented in Table 2.

*Table 2*

#### **The effect of the studied dosage forms and the referent on the change in the pro/antioxidant balance in the hippocampus of animals under conditions of cerebral ischemia**

than those in the NC group of rabbits by 143.2% ( $p<0.05$ ); 85.3% ( $p<0.05$ ) and 67.7% ( $p<0.05$ ), while when using a chitosan based gel, these indicators changed by 114.5% ( $p<0.05$ ); 45.5% ( $p<0.05$ ) and 49.6% ( $p<0.05$ ), respectively (Table 2).

**Conclusion.** The conducted complex of studies allowed us to establish that in the conditions of experimental cerebral ischemia modeled by simultaneous occlusion of the common carotid arteries in large laboratory animals (rabbits), the use of the developed dosage forms contributed to reducing the severity of neurological deficit, restoring cerebral hemodynamics and pro/ antioxidant balance in the hippocampus. At the same time, the chitosan-based drops and gel demonstrated equivalent therapeutic efficacy to the EGB 761 comparison drug administered orally. The sodium alginate based gel in comparison with the referent, that is the studied nasal drops and the chitosan based gel, provided a faster development of the

pharmacological effect and its maintenance throughout the experiment, that is evidenced by the indicators of neurological deficit and the speed of cerebral blood flow analyzed on the 7<sup>th</sup> day of the study. Thus, based on the results obtained, it can be assumed that the developed nasal sodium alginate based gel may be a promising means of correcting chronic cerebral circulatory disorders with an antioxidant mechanism of action and therapeutic potential which is similar to the oral use of a standardized extract of *Ginkgo biloba* EGB 761.

### 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. Nash KM, Shah ZA. Current Perspectives on the Beneficial Role of *Ginkgo biloba* in Neurological and Cerebrovascular Disorders. Integrative Medicine Insights. 2015;10:1-9. DOI: <https://doi.org/10.4137/IMI.S25054>
2. Korchagin DV, Kurkina AV, Dubishcheva AV, et al. Study of neurotropic activity of drugs based on ginkgo leaves of bilobate. Fundamentalnye issledovaniya [Fundamental research]. 2013;10-4:812-815. Russian.
3. Wang N, Chen X, Geng D, et al. *Ginkgo biloba* leaf extract improves cognitive abilities of rats with dementia caused by D-galactose. Journal of Biomedical Research. 2013;27(1):29-36. DOI: <https://doi.org/10.7555/JBR.27.20120047>
4. du Cert NP, Hurst V, Ahluwalia A, et al. The ARRIVE 2.0 Guidelines: Updated guidelines for reporting on animal research. PLoS Biology. 2020;18(7):e3000410. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>
5. Lee D, Miwa Y, Jung H, et al. A Murine Model of Ischemic Retinal Injury Induced by Transient Bilateral Common Carotid Artery Occlusion. Journal of Visualized Experiments. 2020;165. DOI: <https://doi.org/10.3791/61865>
6. McGraw CP, Pashayan AG, Wendel OT. Brain infarction in the Mongolian gerbil, aggravated by treatment with phenoxybenzamine. Stroke. 1976;7(5):485-488. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.STR.7.5.485>
7. Tyurenkov IN, Voronkov AV, Dorkina EG. The effect of hesperidin and flavicin on hepatic blood flow in normal conditions and under conditions of stimulation and blockade of the synthesis of endogenous nitric oxide. Regional blood circulation and microcirculation. 2006;5(3):84-87. Russian.
8. Chumakov VN, Osinskaya LF. Quantitative method for determining the activity of zinc, copper-dependent superoxide dismutase in biological material. Voprosy meditsinskoy khimii. 1977;5:712-716. Russian.
9. Kilkopf KL, Bauer W, Urbach IL. Bradford analysis for determining protein concentration. Cold Spring Harbor Protocols. 2020;2020(4):102269. DOI: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot102269>
10. Stalnaya ID, Garishvili TG. Method for determining malondialdehyde using TBK // Modern methods in biochemistry. Moscow: Meditsina; 1977. Russian.
11. Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. Nature Protocols. 2006;1:3159-3165. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.378>
12. Farkas E, Luiten PG, Bari F. Permanent bilateral occlusion of the common carotid artery in a rat: a model of chronic neurodegenerative diseases associated with brain hypoperfusion. Brain Research. 2007;54(1):162-80. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.01.003>

Received 2 August 2021

Revised 20 January 2022

Accepted 15 February 2022

### Information about the authors

**Elena V. Kovtun**, Cand. Sci. (Pharmacy), Associate Professor at the Department of Pharmaceutical Technology with a Course in Medical Biotechnology, Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute – Branch of Volgograd Medical State University, Pyatigorsk, Russia, E-mail: elena.f.73@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3437-760X>.

**Eleonora F. Stepanova**, Doct. Sci. (Pharmacy), Professor, Professor at the Department of Pharmaceutical Technology with a Course in Medical Biotechnology, Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute – Branch of Volgograd Medical State University, Pyatigorsk, Russia, E-mail: efstepanova@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4082-3330>.

**Maxim V. Chernikov**, Doct. Sci. (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Pharmacology with a Course in Clinical Pharmacology, Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute – Branch of Volgograd Medical State University, Pyatigorsk, Russia, E-mail: pharmax@list.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8340-1296>.

**Dmitry I. Pozdnyakov**, Cand. Sci. (Pharmacy), Head of the Laboratory of Living Systems, Associate Professor at the Department of Pharmacology with a Course in Clinical Pharmacology, Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute – Branch of Volgograd Medical State University, Pyatigorsk, Russia, E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5595-8182>.

**Natalia B. Shabanova**, Cand. Sci. (Pharmacy), Senior Lecturer at the Department of Pharmacology with a Course in Clinical Pharmacology, Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute – Branch of Volgograd Medical State University, Pyatigorsk, Russia, E-mail: Vahlushina@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7693-5182>.

**Anastasia D. Gerashchenko**, Cand. Sci. (Pharmacy), Senior Lecturer at the Department of Pharmacology with a Course in Clinical Pharmacology, Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute, Volgograd Medical State University, Pyatigorsk, Russia, E-mail: anastasia\_gerashchenko@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0294-2926>.

**Lyudmila V. Pogrebnyak**, Cand. Sci. (Pharmacy), Associate Professor at the Department of Pharmaceutical Technology with a Course in Medical Biotechnology, Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute – Branch of Volgograd Medical State University, Pyatigorsk, Russia, E-mail: lyupin@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3683-9196>.

**Dmitry Tworowsky**, Cand. Sci. (Pharmacy), Scientific Adviser at the Department of Structural Biology, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel, Researcher at the Laboratory of Genomics and Computer Modeling of Complex Diseases, Bar-Ilan University, Ramat Gan, Israel, E-mail: dmitwor@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9414-9951>.



DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-6

УДК 616-099:543.393

# Состояние глутатионового звена антиоксидантной защиты организма при фунгицидной интоксикации и коррекции витамином А и расторопшой

В.А. Королев , А.В. Седых , Ю.Э. Азарова , Е.В. Фелькер ,  
Л.А. Ячменева , И.В. Королев , Е.В. Королев

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

Авторы для переписки: В.А. Королев ([medecoll@yandex.ru](mailto:medecoll@yandex.ru)), А.В. Седых ([turquoise95@mail.ru](mailto:turquoise95@mail.ru))

## Резюме

**Актуальность:** Поступление тирама с пищевой продукцией в ткани, органы животных и человека может приводить к активации процессов свободнорадикального окисления и, как следствие, дисбалансу функционирования системы антиоксидантной защиты организма. **Цель исследования:** Определение состояния глутатионового звена антиоксидантной защиты организма при фунгицидной интоксикации и коррекции витамином А и расторопшой. **Материалы и методы:** Проведена субхроническая интоксикация тирамом в дозе 1/50 LD50 (1,6 мг) на протяжении 4 недель при воздействии *in vivo* на организм 240 крыс линии Вистар в возрасте 2 мес. Исследовано влияние тирама на показатели антиоксидантной защиты организма, на примере вариабельности каталитической активности глутатионпероксидазы (GPX), глутатионредуктазы (GSR), количественного содержания активных форм кислорода (ROS) и подфракций глутатиона (GSH/GSSG). **Результаты:** Моделирование субхронической интоксикации сопровождалось значимым увеличением содержания ROS, повышением активности GPX, GSR ( $p<0,05$ ). В тоже время отмечается значительное снижение соотношения GSH/GSSG в плазме крови и ротовой жидкости крыс в сравнении с группой контроля. После проведения экспериментальной субхронической интоксикации были использованы антиоксиданты – витамин А (ретинола ацетат) и расторопша. Их применение в течение 30 суток привело к восстановлению уровня исследуемых показателей. **Заключение:** Таким образом, нами показано, что усиление образования свободных радикалов и дисбаланс в функционировании глутатионового пула антиоксидантной защиты происходит вследствие поступления в организм микроколичеств фунгицида тирам. Использование витамина А и расторопши способствует восстановлению прооксидантно-антиоксидантного баланса организма. Полученные результаты могут быть использованы при проведении антиоксидантной терапии для купирования процессов окислительного стресса при пестицидных интоксикациях.

**Ключевые слова:** тирам; глутатион; глутатионредуктаза; глутатионпероксидаза; ROS; витамин А; расторопша

**Для цитирования:** Королев ВА, Седых АВ, Азарова ЮЭ, и др. Состояние глутатионового звена антиоксидантной защиты организма при фунгицидной интоксикации и коррекции витамином А и расторопшей. Научные результаты биомедицинских исследований. 2022;8(2): 207-220. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-6

# Status of the glutathione antioxidant defense in fungicide intoxication and correction with vitamin A and milk thistle

Vladimir A. Korolev , Anastasia V. Sedykh , Yulia E. Azarova ,  
Elena V. Felker , Lilia A. Yachmeneva , Ivan V. Korolev ,  
Egor V. Korolev 

Kursk State Medical University,  
3 Karl Marx St., Kursk, 305041, Russia

Corresponding authors: Vladimir A. Korolev ([medecoll@yandex.ru](mailto:medecoll@yandex.ru)),  
Anastasia V. Sedykh ([turquoise95@mail.ru](mailto:turquoise95@mail.ru))

## Abstract

**Background:** Thiram entering with food products into tissues and organs of animals and humans can lead to the activation of free-radical oxidation processes and, as a consequence, imbalance in the functioning of the antioxidant defense system of the body. **The aim of the study:** Determination of the state of the glutathione unit of the antioxidant defense of the body during fungicidal intoxication and correction with vitamin A and milk thistle. **Materials and methods:** Subchronic intoxication with thiram at a dose of 1/50 LD<sub>50</sub> (1.6 mg) was carried out for 4 weeks under in vivo exposure to 240 Wistar rats at the age of 2 months. The effect of thiram on the indicators of the antioxidant defense of the body was studied using the example of the variability of the catalytic activity of glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GSR), the quantitative content of reactive oxygen species (ROS) and glutathione subfractions (GSH/GSSG). **Results:** In this publication, the effect of thiram intoxication on the antioxidant defense parameters on the body of white Wistar rats' antioxidant defense parameters using the sample of the variability of the catalytic activity of glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GSR), the quantitative content of reactive oxygen species (ROS) and glutathione subfractions (GSH/GSSG). The modeling of subchronic intoxication was accompanied by a significant increase in the content of ROS, an increase in the activity of GPX, GSR (p<0.05). At the same time there is a significant decrease in the GSH/GSSG ratio in the blood plasma and oral fluid of rats in comparison with the control group. After the experimental subchronic intoxication some antioxidants were used, such as vitamin A (retinol acetate) and milk thistle. Their usage for 30 days has led to the restoration of the studied parameters. **Conclusion:** Thus, we have shown that an increase in the formation of free radicals and an imbalance in the functioning of the glutathione pool of antioxidant protection occurs due to the intake of micro-amounts of the fungicide thiram into the body. The use of vitamin A and milk thistle helps to restore the prooxidant-antioxidant balance of the body. The results obtained can be used in antioxidant therapy to stop the processes of oxidative stress in pesticide intoxication.

**Keywords:** thiram; glutathione; glutathione reductase; glutathione peroxidase; ROS; vitamin A; milk thistle

**For citation:** Korolev VA, Sedykh AV, Azarova YuE, et al. Status of the glutathione antioxidant defense in fungicide intoxication and correction with vitamin A and milk thistle. Research Results in Biomedicine. 2022;8(2): 207-220. Russian. DOI:10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-6

**Введение.** В настоящее время широкое применение в агропромышленном комплексе (АПК) получило пестицидный препарат тирам (тетраметилтиурамдисульфид, ТМДТ), который является фунгицидом контактного действия, II класса опасности [1]. Несмотря на высокую экономическую эффективность применения, данный препарат имеет высокие кумулятивные, токсические свойства и способен сохраняться в продуктах переработки агрокультур до полутора лет, в связи с чем представляет экологическую опасность [2, 3]. Поступление тирама в ткани, органы животных и человека приводит к активации процессов свободнорадикального окисления и как следствие, к образованию свободных радикалов (СР) в том числе в виде реактивных форм кислорода (ROS) [4, 5]. Возникновение окислительного стресса происходит в том случае, когда скорость образования активных форм кислорода превышает способность клетки к детоксикации [6]. Ключевым звеном антиоксидантной защиты (АОЗ) организма является система глутатиона, которая включает в себя глутатион и ферменты его метаболизма [7]. Внутриклеточный глутатион представлен в виде 2 форм: восстановленной (GSH), которая синтезируется в цитоплазме клетки, и окисленной (GSSG) [8, 9]. GSH служит низкомолекулярным антиоксидантом. Окисленный глутатион в норме должен поддерживаться на низком уровне. За поддержание высокого соотношения GSH/GSSG, а также защиту клеток от активных форм кислорода (АФК) отвечает глутатионредуктаза (GSR) и глутатионпероксидаза (GPx). Активность GSR регулирует редокс-гомеостаз клетки, функционирование редокс-зависимых белков и защиту клеток от активных форм кислорода (АФК), таких как  $H_2O_2$ ,  $O^-$  и  $\cdot OH$  [10, 11]. GPx инактивирует суперрадикалы и восстанавливает их в органические гидро-

перекиси. Однако, влияние тирама на изменение состояния глутатионового звена антиоксидантной защиты организма не до конца изучено [12].

С учетом высокого удельного веса экопатологий в структуре общей заболеваемости необходима разработка методов коррекции антиоксидантного статуса с помощью антиоксидантной терапии [13, 14]. Для торможения процессов окислительной стресса и нейтрализации свободных радикалов перспективным является применение витамина А (ретинола ацетат) и экстракта расторопши [15, 16].

В настоящей работе представлены биохимические исследования плазмы крови и ротовой жидкости крыс, подвергшихся интоксикации фунгицидным препаратом тирам, а также коррекции витамином А и расторопшей.

**Материалы и методы исследования.** Исследование проводилось на 240 крысах-самцах линии Вистар массой 200-220 грамм. В эксперименте животные были разделены на 8 групп. 1 группа - здоровые, интактные крысы, которые являлись биологическим контролем. 2, 3, 4 и 5 группы получали тирам вместе с гранулированным кормом в дозе 1,6 мг, что является 1/50 LD<sub>50</sub>, в течение 28 дней. Гранулы комбикорма измельчали в фарфоровой ступке до порошкообразного состояния, добавляли 2 мл дистиллированной воды и взвешенный тирам, формировали гранулы и сушили на открытом воздухе в течение 12 часов. Таким образом, интоксикация достигалась путем естественного кормления исключая физиологический стресс при проведении эксперимента. Забор образцов проводился на 7, 14, 21 и 28 сутки, после декапитации под эфирным наркозом. Шестая группа после 28 дней интоксикации тирамом 30 дней получали обычную еду, согласно их стандартного рациона. В седьмой группе моделировалась субхроническая ин-

токсикация на протяжении 28 суток, с последующим применением антиоксиданта – витамина А в течение 30 суток. В перерасчете на 1 кг веса человека необходимо 0,020 мг/кг препарата. Коэффициент пересчета дозы с отдельного животного на человека составляет – 39,0. Для крысы массой 200 грамм коэффициент пересчета составляет 6,5. Следовательно, расчетная терапевтическая доза витамина А для экспериментальных крыс-самцов линии Вистар массой 200 грамм составляет:  $(0,020 * 39) / 6,5 = 0,12 \text{ мг/кг} * 0,2 = 0,024 \text{ мг}$ . В группе восемь проводилась субхроническая интоксикация в течение 28 суток, с последующим использованием антиоксиданта – расторопши, на протяжение 30 суток. В перерасчете на 1 кг веса человека необходимо 2,29 мг/кг препарата. Расчетная терапевтическая доза расторопши для экспериментальных крыс-самцов линии Вистар массой 200 грамм составляет:  $(2,29 * 39) / 6,5 = 13,74 \text{ мг/кг} * 0,2 = 2,75 \text{ мг}$ .

Расчет дозы препарата тирам выполнялся исходя из токсикологических данных: LD50 для крыс составляет 400 мг/кг [17]. В связи с тем, что в эксперименте использовались дозы 1/50 LD50, то после расчета доза для экспериментальных крыс-самцов линии Вистар массой 200 грамм составила:  $400 \text{ мг/кг} / 50 = 8 \text{ мг/кг} * 0,2 = 1,6 \text{ мг}$  [18].

Сроки забора биожидкостей были выбраны для оценки изменений антиоксидантного статуса при острой, подострой и субхронической интоксикации для анализа динамики изменений и компенсаторных возможностей организма.

Исследования проводили с соблюдением принципов, изложенных в Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей (г. Страсбург, Франция, 1986).

Для проведения анализа плазмы крови в течение 30 мин после забора центрифугировали кровь 15 мин на 3000 об/мин при 4°C. Производили забор надосадочной жидкости в микроцентрифужные пробирки в объеме 50 мкл.

Нестимулированная ротовая жидкость была получена путем её забора с помощью микропипетки в чистую пробирку, которую центрифугировали 20 минут на 1500 об/мин. Ротовую жидкость забирали и помещали в микроцентрифужные пробирки, в объеме 50 мкл.

Материалом исследования явилась ротовая жидкость и плазма крови.

После забора и пробоподготовки биообъектов было проведено лабораторное исследование, включающее определение функциональной активности антиоксидантной системы по следующим показателям: глутатион окисленный, глутатион восстановленный, глутатионредуктаза и глутатионпероксидаза, ROS. Для исследования использовались следующие наборы: Catalase Assay Kit, 707002, 96 тестов (Cayman Chemical, USA); Superoxide Dismutases Assay Kit, 706002, 96 тестов (Cayman Chemical, USA); Glutathione Reductase Assay, STA-812, 100 тестов (Cell Biolabs, USA); Glutathione Peroxidase Activity Colorimetric Assay Kit, K762, 100 тестов (BioVision, USA); OxiSelect™ In Vitro ROS/RNS Assay Kit (Green Fluorescence), STA-347, 96 assays (Cell Biolabs, USA); CEA294Ge ELISA Kit for Glutathione (GSH) (Cloud-Clone Corp., USA) и CEK518Ge ELISA Kit for Oxidized Glutathione (GSSG) (Cloud-Clone Corp., USA), Helicon (Москва). Для проведения интоксикации использовали тирам (137-26-8) чистотой 97% (Sigma-Aldrich, USA). Для проведения коррекции использовали витамин А (ретинол ацетат) (Химптиерторг Групп, Россия) и расторопшу (Грин Сайд, Россия).

*Определение глутатиона восстановленного*

Исследование основано на конкурентном методе иммуноферментного анализа (ИФА). В наборе для исследования использовался микропланшет, сорбированный monoclonalными антителами специфичными к GSH. Между GSH, меченым биотином, немеченым GSH (содержащимся в образцах и контроле) и сорбированными

антителами специфичными к GSH происходит конкурентная реакция в процессе инкубированния в течение 30 мин при температуре 37° С. Несвязавшийся конъюгат удаляли отмывкой. Затем avidin, коньюгированный с пероксидазой хрена (Horseradish peroxidase, HRP) добавляли в каждую лунку планшета и проводили инкубацию в течение 10 мин при температуре 37° С. Далее тщательно удаляли следы жидкости из планшета и отправляли его в микропланшетный ридер Varioscan Flash (Thermo Fisher Scientific, USA), в котором проводили исследование при длине волны 450 нм. Количество связанного конъюгата пероксидазы хрена обратно пропорционально концентрации GSH в образце.

#### *Определение глутатиона окисленного*

Анализ основан на конкурентном методе ИФА. Микропланшет в наборе сорбирован моноклональными антителами специфичными к овальбумину (OVA). Конкурентная реакция происходит в процессе инкубации в течение 30 мин при температуре 37° С между OVA, меченым биотином, немеченым OVA (содержащимся в образцах или контроле) и сорбированными антителами специфичными к OVA. После инкубации не связавшийся конъюгат удаляли отмывкой. Затем в микропланшет добавляли avidin, коньюгированный с пероксидазой хрена (HRP) и проводили инкубацию в течение 10 мин при температуре 37° С. Далее тщательно удаляли следы жидкости из планшета и отправляли его в микропланшетный ридер Varioscan Flash (Thermo Fisher Scientific, USA), для проведения исследования при длине волны 450 нм. Количество связанного конъюгата пероксидазы хрена обратно пропорционально концентрации OVA в образце.

#### *Определение глутатионпероксидазы*

Анализ проводили с использованием набора реагентов фирмы Cell Biolabs на микропланшетном ридере (Varioscan Thermo Fisher Scientific) при длине волны 340 нм. В качестве субстрата использовали гидропероксида кумола. GPX снижает

концентрацию гидропероксида кумола при окислении GSH до GSSG. Одна единица активности GPX была определена 1 мкмоль NADPH к NADP +.

#### *Определение глутатионредуктазы*

Для анализа в 96-луночный планшет добавили 25 мкл раствора 1Х NADPH в каждую лунку, а затем по 100 мкл подготовленных стандартов глутатионредуктазы и исследуемых образцов. Затем в каждую лунку микропланшета внесли по 50 мкл 1Х хромогена и перемешали. Завершающим этапом было внесение в каждую лунку планшета 25 мкл глутатиона дисульфида (GSSG). После перемешивания планшет немедленно отправляли в микропланшетный ридер Varioscan Flash (Thermo Fisher Scientific, USA) и проводили измерение оптической плотности при длине волны 405 нм с интервалом в 1 минуту в течение 10 минут (кинетический анализ).

#### *Определение ROS*

Анализ проводили с использованием набора реагентов фирмы Cell Biolabs на микропланшетном ридере Varioscan Flash (Thermo Fisher Scientific, USA) при длине волны 480 нм. Концентрацию перекиси водорода в опытных пробах определяли по калибровочной кривой.

**Статистический анализ.** Полученные данные статистически обрабатывались с использованием пакета прикладных программ «STATISTICA 13.0» (Stat Soft, USA). Результаты исследования представлены как среднее значение со стандартной ошибкой ( $M \pm m$ ). Для определения статистически значимых различий между группами использовался t-критерия Стьюдента. Различия между группами считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** В результате анализа полученных данных эксперимента было определено соотношение GSH/GSSG. Данные восстановленного (GSH) и окисленного глутатиона (GSSG) показали значимые различия между контрольной группой и группами с субхронической интоксикацией тирамом (табл. 1).

Таблица 1

**Влияние субхронической интоксикации тирамом и коррекции витамином А и расторопшой на соотношение GSH/GSSG**

Table I

**Effect of subchronic intoxication with thiram and correction with vitamin A and milk thistle on the GSH / GSSG ratio**

Показатель	Плазма крови			Ротовая жидкость		
	GSH, мкг/мл, (M ± m)	GSSG, мкг/мл, (M ± m)	GSH/GSSG	GSH, мкг/мл, (M ± m)	GSSG, мкг/мл, (M ± m)	GSH/GSS G
Группа 1. Контроль	148,43±14,16	0,69±0,06	215,11	256,98±25,89	1,50±0,15	171,32
Группа 2. Интоксикация 7-е сутки	90,15±9,38***	1,43±0,14***	63,04	160,31±16,63**	2,79±0,27***	57,45
Группа 3. Интоксикация 14-е сутки	81,52±8,44***	1,76±0,17***	46,31	148,03±14,90***	3,05±0,32***	48,53
Группа 4. Интоксикация 21-е сутки	60,94±6,21***	1,93±0,19***	31,57	128,42±13,13***	3,79±0,40***	33,88
Группа 5. Интоксикация 28-е сутки	56,33±6,90***	2,28±0,22***	24,71	112,94±11,53***	3,92±0,41***	28,81
Группа 6. Интоксикация+обычная еда	90,32±9,24*** XX	1,99±0,20***	45,38	127,93±12,98***	2,76±0,30***X	46,35
Группа 7. Интоксикация+витамин А	153,07±15,10***XXX	0,45±0,04***XXX	340,15	264,30±27,53***XXX	1,54±0,15***XXX	171,62
Группа 8. Интоксикация+расторопша	136,82±13,51**XXX	0,74±0,07***XXX	184,89	233,88±25,59***XXX	1,69±0,17**XX X	138,39

Примечание: Данные представляют собой среднее значение ± стандартная ошибка. \*\* – p<0,01 по сравнению с контрольной группой; \*\*\* – p<0,001 по сравнению с контрольной группой; X – p<0,05 по сравнению с группой «тирам 28 сут.»; XX – p<0,01 по сравнению с группой «тирам 28 сут.», XXX- p<0,001 по сравнению с группой «тирам 28 сут.».

Note: Data represent mean ± standard error. \*\* – p <0.01 compared with the control group; \*\*\* – p <0.001 compared with the control group; X – p <0.05 compared with the group "Thir. 28 days"; XX – p <0.01 compared with the group "Thir. 28 days", XXX – p <0.001 compared with the group "Thir. 28 days".

Применение тирама привело к значительному снижению показателей GSH и повышению значений GSSG, как в плазме крови, так и в ротовой жидкости. Максимальные изменения были достигнуты в группе 5. На 28 день интоксикации в плазме крови значение восстановленного глутатиона снизилось в 2,63 раза, в ротовой жидкости – в 2,27 раза. Окисленный глутатион в группе 5 увеличился в плазме в 3,3 раза, в ротовой жидкости – в 2,61 раза. Возврат к стандартному рациону после проведения субхронической интоксикации тирамом привел к незначительному восстановлению исследуемых показателей. В плазме крови GSH изменился в 1,6 раза по отношению к группе 5 и в 1,64 раза по отношению к контрольным значениям, в ротовой жидкости: в 1,13 раза и в 2,01 раза, соответственно. GSSG в плазме крови был восстановлен в 1,14 раза по отношению к значениям полученным в группе 5 и в 2,88 раза по отношению к значениям в группе 1. При исследовании окисленного глутатиона наблюдалась аналогичная тенденция: в плазме крови значения изменились в 1,42 раза и в 1,84 раза, соответственно. Применение витамина А позволило полностью восстановить показатели GSH и GSSG до контрольных значений в плазме крови. Однако при исследовании ротовой жидкости до контрольных цифр был восстановлен только GSH. В группе 8 контрольные значения не были достигнуты ни в одном из образцов.

Соотношение восстановленного и окисленного глутатиона снижалось на протяжении всего периода моделирования субхронической интоксикации тирамом в плазме крови и ротовой жидкости. Максимальные изменения были отмечены в группе 5: в плазме крови соотношение GSH/GSSG снизилось в 8,71 раза, а в ротовой жидкости – в 5,95 раза, по отношению к контрольным значениям. Незначительное восстановление исследуемого соотношения отмечалось при переходе к стандартному рациону после проведения интоксикации на протяжении 28 дней. В плазме значение изменилось в 1,84 раза по отношению к

группе 5 и в 4,74 раза по отношению к контрольному показателю. В сравнении с группой 5 в ротовой жидкости соотношение GSH/GSSG восстановилось в 1,61 раза, а по отношению к группе 1 – в 3,69 раза. При проведении антиоксидантной терапии наибольший восстановительный эффект был отмечен в группе 7, где произошло полное восстановление баланса между восстановленным и окисленным глутатионом, по отношению к контрольной группе, как в плазме крови так и в ротовой жидкости. Экстракт расторопши также обладает выраженным антиоксидантным действием, но значения контрольной группы достигнуты не были.

В таблице 2 указаны изменения GPX и GSR.

При исследовании активности антиоксидантных ферментов показано, что катализическая активность глутатионредуктазы на протяжении всего периода хронической интоксикации ТМДТ увеличивалась и на 28 сутки достигла максимальных значений (в плазме крови увеличение произошло в 2,66 раза, в ротовой жидкости – в 2,25 раза, в сравнении с группой контроля). При переходе на стандартный рацион значения GSR незначительно изменились и в плазме крови и в ротовой жидкости. После проведения антиоксидантной терапии витамином А активность глутатионпероксидазы значительно была восстановлена в ротовой жидкости и достигла контрольных значений в плазме крови. При применении экстракта расторопши восстановление до контрольных значений GSR отмечено не было.

Максимальные значения GPX были достигнуты на 28 сутки субхронической интоксикации (в плазме крови в 1,42 раза, в ротовой жидкости в 2,09 раза выше в сравнении с группой 1). Перевод животных на обычное питание незначительно снизило показатель GPX. В плазме крови GPX изменился в 1,12 раза по отношению к группе 5 и в 1,25 раза по отношению к группе 1; в ротовой жидкости: в 1,32 раза и в 1,58 раза, соответственно.

Таблица 2

**Влияние субхронической интоксикации тирамом и коррекции витамином А и расторопшой на показатели GPX и GSR**

Table 2

**Effect of subchronic intoxication with thiram and correction with vitamin A and milk thistle on GPX and GSR**

Показатель	Плазма крови		Ротовая жидкость	
	GPX, мU/mL, (M ± m)	GSR, мU/ml, (M ± m)	GPX, мU/mL, (M ± m)	GSR, мU/ml, (M ± m)
Группа 1. Контроль	40,12±4,75	4,75±0,53	23,94±2,43	3,11±0,33
Группа 2. Интоксикация 7-е сутки	59,65±5,95*	7,23±0,73**	40,13±4,07***	5,37±0,59***
Группа 3. Интоксикация 14-е сутки	61,73±6,56*	9,39±0,93***	45,77±4,96***	5,98±0,62***
Группа 4. Интоксикация 21-е сутки	58,42±6,77*	11,44±1,21***	47,44±4,82***	6,31±0,63***
Группа 5. Интоксикация 28-е сутки	56,98±5,44*	12,64±1,24***	50,21±5,41***	7,02±0,72***
Группа 6. Интоксикация+обычная еда	50,54±5,46	12,46±1,26***	37,92±3,91**	6,92±0,72***
Группа 7. Интоксикация+витамин А	30,31±3,46**XXX	3,80±0,37***XXX	19,03±1,99***XXX	3,36±0,49*XX
Группа 8. Интоксикация+расторопша	45,29±4,92	5,81±0,60***XXX	26,62±2,93*XX	4,65±0,34***XXX

Примечание: Данные представляют собой среднее значение ± стандартная ошибка. \* - p<0,05 по сравнению с контрольной группой, \*\* - p<0,01 по сравнению с контрольной группой, \*\*\* - p<0,001 по сравнению с контрольной группой; XX - p<0,01 по сравнению с группой «тирам 28 сут.», XXX - p<0,001 по сравнению с группой «тирам 28 сут.».

Note: Data represent mean ± standard error. \* - p <0.05 compared with the control group; \*\* - p <0.01 compared with the control group; \*\*\* - p <0.001 compared with the control group; XX - p <0.01 compared with the group "Thir. 28 days"; XX - p <0.01 compared with the group "Thir. 28 days", XXX - p <0.001 compared with the group "Thir. 28 days".

После интоксикации проведение антиоксидантной терапии витамином А и экстрактом расторопши дали положительный результат по снижению активности глутатионпероксидазы, но применение ретинола

ацетата показало большую эффективность и привело к ее полному восстановлению до контрольных значений в плазме крови и ротовой жидкости.

В таблице 3 указаны изменения ROS.

Таблица 3

### Влияние субхронической интоксикации тирамом и коррекции витамином А и расторопшей на показатель ROS

Table 3

#### Influence of subchronic intoxication with thiram and correction with vitamin A and milk thistle on ROS

Показатель	Плазма крови	Ротовая жидкость
	ROS, мкмоль/Л, (M ± m)	ROS, мкмоль/Л, (M ± m)
Группа 1. Контроль	0,26±0,02	26,98±0,47
Группа 2. Интоксикация 7-е сутки	0,50±0,05***	45,81±4,73***
Группа 3. Интоксикация 14-е сутки	0,61±0,06***	49,69±4,99***
Группа 4. Интоксикация 21-е сутки	0,72±0,07***	53,71±5,67***
Группа 5. Интоксикация 28-е сутки	0,85±0,08***	55,06±5,68***
Группа 6. Интоксикация+обычная еда	0,64±0,06*** <sup>X</sup>	51,88±5,40***
Группа 7. Интоксикация+витамин А	0,28±0,02*** <sup>XXX</sup>	25,22±2,85*** <sup>XXX</sup>
Группа 8. Интоксикация+расторопша	0,30±0,03*** <sup>XXX</sup>	33,24±3,67** <sup>XXX</sup>

Примечание: Данные представляют собой среднее значение ± стандартная ошибка. \*\*\* - p<0,001 по сравнению с контрольной группой; <sup>X</sup> - p<0,05 по сравнению с группой «тирам 28 сут.»; <sup>XXX</sup> - p<0,001 по сравнению с группой «тирам 28 сут.».

Note: Data represent mean ± standard error. \*\*\* - p <0.001 compared with the control group; XX - p <0.01 compared with the group "Thir. 28 days"; <sup>X</sup> - p <0.05 compared with the group "Thir. 28 days", <sup>XXX</sup> - p <0.001 compared with the group "Thir. 28 days".

В результате субхронической интоксикации ТМДТ в плазме крови и ротовой жидкости наблюдалось увеличение ROS. Максимальных значений этот показатель достиг на 28 сутки. В 6 группе активность свободных радикалов снизилась незначительно по отношению к группе 1 (в плазме крови – в 2,46 раза; в ротовой жидкости – в 1,92 раза) и по отношению к группе 5 (в плазме крови – в 1,32 раза; в ротовой жидкости – в 1,06 раза). В 7 группе при применении после интоксикации витамина А в качестве антиоксиданта показатель свободных радикалов снизился до контрольных значений только в ротовой жидкости. После применения экстракта расторопши в качестве антиоксиданта показатель снижался, но контрольных значений не достиг ни в одном из образцов.

**Обсуждение.** Поступление в организм пестицидных препаратов оказывает

токсическое воздействие посредством образования активных форм кислорода. Подавление образования свободных радикалов происходит за счет выработки антиоксидантных ферментов, одним из которых является глутатионпероксидаза. Нами показано, что введениеfungицидного препарата тирам на протяжении 28-и суток приводит к значительному увеличению содержания ROS, повышению активности GPX, GSR (p<0,05).

В плазме крови и ротовой жидкости животных во время моделирования субхронической интоксикации ТМДТ отмечалось снижение соотношения GSH/GSSG. Использование витамина А и экстракта расторопши в течение 28 суток после проведения экспериментальной субхронической интоксикации, привело к восстановлению показателей активности исследуемых ферментов. При коррекции витамином А значения

GSH, GSSG и соотношение GSH/GSSG было полностью восстановлено до контрольных значений, а использование экстракта расторопши привело показатели к значениям максимально приближенным к контрольным.

Рядом исследователей показано, что снижение количества GSH в клетках являлось результатом действия тирама. Однако до конца не было изучено влияние тирама на ферментативное звено антиоксидантной системы и не показано, как изменяется соотношение восстановленного глутатиона к окисленному после проведения интоксикации тирамом, а также после применения антиоксидантной терапии.

Детоксикация АФК происходит с помощью ферментативной системы (через глутатионпероксидазу). Чрезмерное образование GSSG опасно для клеток организма, так как избыток окисленного глутатиона приводит к истощению общего GSH, что мы наблюдали на 28 сутки интоксикации тирама. Удаление GSSG связано с увеличением активности глутатионредуктазы (GSR), которая превращает GSH из GSSG в НАДФН зависимой реакции [12]. В нашей работе отмечено, что уровень GSSG и активность GSR одновременно увеличиваются после применения тирама по сравнению с контрольными значениями. Похожие результаты были получены и при применении тирама в дозе 150 мкг [9]. Несмотря на повышенные уровни GSSG, а также активность GSR, соотношение GSH/GSSG при интоксикации было значительно ниже, чем в контрольной группе, что говорит о истощении активности антиоксидантного барьера.

Во время проведения интоксикации в плазме крови отмечается постепенное снижение активность GPX, что вероятно нарушает процесс перехода  $H_2O_2$  в  $H_2O$ . Накопление  $H_2O_2$ , влечет за собой высокое производство OH радикалов, что в свою очередь подтверждается увеличением значения ROS в течение всего периода интоксикации. Блюм и Фридович (1985) обнаружили, что активность GPX может быть инактивирована в условиях окислительного стресса

супероксид-анионом и токсичными лигандами, такими как малоновый диальдегид, которые могут частично подавляют активность глутатионпероксидазы [11].

Ротовая полость является первой линией защиты от действия ксенобиотиков при их поступлении в организм [19]. При увеличении производства активных форм кислорода (АФК) и снижении каталитической активности антиоксидантных ферментов может происходить окислительное повреждение клеточных компонентов, как в слюнных железах, так и в пародонте [20, 21]. Окислительный стресс играет основную роль в патогенезе дисфункции слюнных желез, ксеростомии, пародонтита, предраковых состояний и рака полости рта [22, 23]. Поэтому ротовая жидкость может рассматриваться как своеобразный индикатор прооксидантно-антиоксидантного баланса как в ротовой полости, так и в организме в целом. В нашем исследовании показано, что окислительный стресс в ротовой полости вызывает более значимые изменения в системе антиоксидантной защиты, чем в плазме крови: отмечается более высокая концентрация GSH, GSSG и ROS, а при проведении фармакологической коррекции растительные антиоксиданты в ротовой жидкости в большей степени проявляют антиокислительные свойства.

**Заключение.** В настоящем исследовании, нами установлено, что переход к стандартному рациону после субхронической интоксикации позволяет незначительно восстановить контрольные значения всех исследуемых показателей. Это является следствием включения компенсаторных механизмов организма, направленных на борьбу с негативными последствиями окислительного стресса. Использование витамина A, а также экстракта расторопши привело к значительному восстановлению системы АОЗ до уровня контрольных значений. Значительные изменения в нашем исследовании были отмечены при применении витамина A, что подтверждает его высокие антиоксидантные свойства. Полученные результаты могут быть использованы при проведении антиоксидантной терапии

для купирования процессов окислительного стресса.

### Информация о финансировании

Работа выполнена за счет средств Курского государственного медицинского университета.

### Financial support

The study was carried out at the expenses of Kursk State Medical University.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Conflict of interests

The authors have no conflict of interest to declare.

### Список литературы

1. International Agency for Research on Cancer, 1991. IARC working group, Thiram. In: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 53. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1991:403-422.
2. Cereser C, Boget S, Parvaz P, et al. Thiram-induced cytotoxicity is accompanied by a rapid and drastic oxidation of reduced glutathione with consecutive lipid peroxidation and cell death. *Toxicology Reports*. 2001;163(2-3):153-162. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(01\)00401-2](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(01)00401-2)
3. Королев ВА, Королев ИВ, Харланов НА, и др. Изменение показателей липидного состава клеточных мембран в условиях пестицидной интоксикации и способы их профилактики. Научный результат. Медицина и фармация. 2017;3(4):11-16. DOI: <https://doi.org/10.18413/2313-8955-2017-3-4-11-16>
4. Терехина НА, Петрович ЮА. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная система. Пермь: ГОУ ВПО «ПГМА МЗ»; 2005.
5. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility*. 2003;79(4):829-843. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)04948-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)04948-8)
6. Banerjee BD, Seth V, Ahmed RS. Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. *Reviews on Environmental Health*. 2001;16(1):1-40. DOI: <https://doi.org/10.1515/reveh.2001.16.1.1>
7. Elskens MT, Penninckx MJ. Thiram and dimethyldithiocarbamic acid interconversion in *Saccharomyces cerevisiae*: a possible metabolic pathway under the control of the glutathione redox cycle. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997;63(7):2857-2862. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.63.7.2857-2862.1997>
8. Калинина ЕВ, Чернов НН, Новичкова МД. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов. Успехи биологической химии. 2014;54:299-348.
9. Grosicka E, Sadurska B, Szumiło M, et al. Effect of glutathione depletion on apoptosis induced by thiram in chinese hamster fibroblasts. *International Immunopharmacology*. 2005;5(13-14):1945-1956. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2005.06.017>
10. Arthur JR. The glutathione peroxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2000;57:1825-1835. DOI: <https://doi.org/10.1007/PL00000664>
11. Blum J, Fridovich I. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1985;240(2):500-508. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(85\)90056-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(85)90056-6)
12. Yang MS, Chan HW, Yu LC. Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determining the susceptibility of cells to oxidative stress. *Toxicology Reports*. 2006;226(2-3):126-130. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.06.008>
13. Королев ВА, Ляшев ЮД, Грибач ИВ, и др. Изменение прооксидантно-антиоксидантного баланса при хронической интоксикации банкомом и эффективность профилактических мероприятий с применением мексидола. Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье". 2014;2:19-22.
14. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 2006;160(1):1-40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
15. Питкевич ЭС, Лызиков АН, Цаприлова СВ. Растворимая пятнистая – *Silybum marianum* (L.). Проблемы здоровья и экологии. 2008;4:119-126.
16. Goodman DS. Vitamin A and retinoids in health and disease. *New England Journal of Medicine*. 1984;310(16):1023-31. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJM198404193101605>

17. Белов ДА. Химические методы и средства защиты растений в лесном хозяйстве и озеленении: Учебное пособие для студентов. М.: МГУЛ. 2003;128.
18. Хабриев РУ. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина. 2005;832.
19. Zalewska A, Knaś M, Kuźmiuk A, et al. Salivary innate defense system in type 1 diabetes mellitus in children with mixed and permanent dentition. *Acta Odontologica Scandinavica*. 2013;71(6):1493-1500. DOI: <https://doi.org/10.3109/00016357.2013.773071>
20. Zalewska A, Knaś M, Maciejczyk M, et al. Antioxidant profile, carbonyl and lipid oxidation marker in the parotid and submandibular glands of rats in different periods of streptozotocin induced diabetes. *Archives of Oral Biology*. 2015;60(9):1375-1386. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.06.012>
21. Żukowski P, Maciejczyk M, Danuta W. Sources of free radicals and oxidative stress in the oral cavity. *Archives of Oral Biology*. 2018;92:8-17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.04.018>
22. Jankowska AK, Waszkiel D, Kobus A, et al. Saliva as a main component of oral cavity ecosystem. *Wiadomosci Lekarskie*. 2007;60(5-6):253-257.
23. Reznick AZ, Klein I, Eiserich JP, et al. Inhibition of oral peroxidase activity by cigarette smoke: in vivo and in vitro studies. *Free Radical Biology and Medicine*. 2003;34(3):377-384. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01297-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01297-2)

## References

1. International Agency for Research on Cancer, 1991. IARC working group, Thiram. In: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 53. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1991:403-422.
2. Cereser C, Boget S, Parvaz P, et al. Thiram-induced cytotoxicity is accompanied by a rapid and drastic oxidation of reduced glutathione with consecutive lipid peroxidation and cell death. *Toxicology Reports*. 2001;163(2-3):153-162. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(01\)00401-2](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(01)00401-2)
3. Korolev VA, Korolev IV, Kharlanov NA, et al. Change of indicators of lipid composition of cell membranes in the conditions of pesticidal intoxication and methods of their prevention. *Research Result. Medicine and Pharmacy*. 2017;3(4):11-16. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18413/2313-8955-2017-3-4-11-16>
4. Terekhina NA, Petrovich YuA. Free radical oxidation and antioxidant system. Perm: GOU VPO «PGMA MZ»; 2005. Russian.
5. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility*. 2003;79(4):829-843. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)04948-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)04948-8)
6. Banerjee BD, Seth V, Ahmed RS. Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. *Reviews on Environmental Health*. 2001;16(1):1-40. DOI: <https://doi.org/10.1515/reveh.2001.16.1.1>
7. Elskens MT, Penninckx MJ. Thiram and dimethyldithiocarbamic acid interconversion in *Saccharomyces cerevisiae*: a possible metabolic pathway under the control of the glutathione redox cycle. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997;63(7):2857-2862. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.63.7.2857-2862.1997>
8. Kalinina. EV, Chernov NN, Novichkova MD. The role of glutathione, glutathione transferase and glutaredoxin in the regulation of redox-dependent processes. *Advances in biological chemistry. Uspekhi biologicheskoy khimii*. 2014;54:299-348. Russian.
9. Grosicka E, Sadurska B, Szumiło M, et al. Effect of glutathione depletion on apoptosis induced by thiram in Chinese hamster fibroblasts. *International Immunopharmacology*. 2005;5(13-14):1945-1956. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2005.06.017>
10. Arthur JR. The glutathione peroxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2000;57:1825-1835. DOI: <https://doi.org/10.1007/PL00000664>
11. Blum J, Fridovich I. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1985;240(2):500-508. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(85\)90056-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(85)90056-6)
12. Yang MS, Chan HW, Yu LC. Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determining the susceptibility of cells to oxidative stress. *Toxicology Reports*. 2006;226(2-3):126-130. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.06.008>
13. Korolev VA, Lyashev YuD, Gribach IV, et al. Changes in the prooxidant-antioxidant balance in chronic intoxication with bankkol and the effectiveness of preventive measures with the use

of Mexidol. Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik "Chelovek i ego zdorovye". 2014;2:19-22. Russian.

14. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 2006;160(1):1-40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>

15. Pitkevich. ES, Lyzikov AN, Tsaprilova SV. Milk thistle - *Silybum marianum* (L.). *Health and Ecology Issues*. 2008;4:119-126. Russian.

16. Goodman DS. Vitamin A and retinoids in health and disease. *New England Journal of Medicine*. 1984;310(16):1023-31. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJM198404193101605>

17. Belov DA. Chemical methods and means of plant protection in forestry and landscaping: A textbook for students. M.: MGUL. 2003;128. Russian.

18. Habriev RU. Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological agents. M.: Medicina. 2005;832. Russian.

19. Zalewska A, Knaś M, Kuźmiuk A, et al. Salivary innate defense system in type 1 diabetes mellitus in children with mixed and permanent dentition. *Acta Odontologica Scandinavica*. 2013;71(6):1493-1500. DOI: <https://doi.org/10.3109/00016357.2013.773071>

20. Zalewska A, Knaś M, Maciejczyk M, et al. Antioxidant profile, carbonyl and lipid oxidation marker in the parotid and submandibular glands of rats in different periods of streptozotocin induced diabetes. *Archives of Oral Biology*. 2015;60(9):1375-1386. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.06.012>

21. Żukowski P, Maciejczyk M, Danuta W. Sources of free radicals and oxidative stress in the oral cavity. *Archives of Oral Biology*. 2018;92:8-17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.04.018>

22. Jankowska AK, Waszkiel D, Kobus A, et al. Saliva as a main component of oral cavity ecosystem. *Wiadomosci Lekarskie*. 2007;60(5-6):253-257.

23. Reznick AZ, Klein I, Eiserich JP, et al. Inhibition of oral peroxidase activity by cigarette smoke: in vivo and in vitro studies. *Free Radical Biology and Medicine*. 2003;34(3):377-384. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01297-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01297-2)

Received 13 October 2021

Revised 10 February 2022

Accepted 28 February 2022

### Информация об авторах

**Владимир Анатольевич Королев**, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биологии, медицинской генетики и экологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», г. Курск, Российская Федерация, E-mail: medecoll@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4376-4284>.

**Анастасия Валерьевна Седых**, ассистент кафедры биологии, медицинской генетики и экологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», г. Курск, Российская Федерация, E-mail: turquoise95@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6117-0666>.

**Юлия Эдуардовна Азарова**, кандидат медицинских наук, доцент, заведующая лабораторией НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», г. Курск, Российская Федерация, E-mail: azarovaje@kursksmu.net, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8098-8052>.

**Елена Викторовна Фелькер**, кандидат медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой ортопедической стоматологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», г. Курск, Российская Федерация, E-mail: felkerev@kursksmu.net, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7948-7290>.

**Лилия Александровна Ячменева**, ассистент кафедры ортопедической стоматологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», г. Курск, Российская Федерация E-mail: baggyrita@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2642-6512>.

**Иван Владимирович Королев**, студент ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», г. Курск, Российская Федерация, E-mail: korolevva@kursksmu.net, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6335-4311>.

**Егор Владимирович Королев**, студент ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», г. Курск, Российская Федерация, E-mail: korolevva@kursksmu.net, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3324-8689>.

### Information about the authors

**Vladimir A. Korolev**, Doct. Sci. (Biology), Professor, Head of the Department of Biology, Medical Genetics and Ecology, Kursk State Medical

Статья поступила в редакцию 13 октября 2021 г.

Поступила после доработки 10 февраля 2022 г.  
Принята к печати 28 февраля 2022 г.

University, Kursk, Russia, E-mail:  
[medecol1@yandex.ru](mailto:medecol1@yandex.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4376-4284>.

**Anastasia V. Sedykh**, Assistant Lecturer at the Department of Biology, Medical Genetics and Ecology, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, E-mail: [turquoise95@mail.ru](mailto:turquoise95@mail.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6117-0666>.

**Yulia E. Azarova**, Cand. Sci. (Medicine), Associate Professor, Head of Laboratory, Research Institute of Genetic and Molecular Epidemiology, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, E-mail: [azarovaje@kursksmu.net](mailto:azarovaje@kursksmu.net), ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8098-8052>.

**Elena V. Felker**, Cand. Sci. (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Prosthetic

Dentistry, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, E-mail: [felkerev@kursksmu.net](mailto:felkerev@kursksmu.net), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7948-7290>.

**Lilia A. Yachmeneva**, Assistant Lecturer at the Department of Prosthetic Dentistry, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, E-mail: [baggyrita@gmail.com](mailto:baggyrita@gmail.com), ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2642-6512>.

**Ivan V. Korolev**, Student, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, E-mail: [korolevva@kursksmu.net](mailto:korolevva@kursksmu.net), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6335-4311>.

**Egor V. Korolev**, Student, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, E-mail: [korolevva@kursksmu.net](mailto:korolevva@kursksmu.net), ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3324-8689>.

## КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА MEDICINE



DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-7

# Correlation of Biochemical Abnormalities with the Severity of Hospitalized Covid-19 Patients

Santhi Silambanan<sup>1</sup> , Teena Koshy<sup>1</sup> , Mahesh K. K<sup>2</sup> , Jasmine Ch. A<sup>1</sup> , Emmanuel Bhaskar<sup>1</sup> , Swathy Moorthy<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sri Ramachandra Institute of Higher Education and Research,  
No.1 Ramachandra Nagar, Chennai, 600116, India

<sup>2</sup> Government Yoga and Naturopathy Medical College and Hospital,  
Arumbakkam, Chennai, 600106, India

Corresponding author: Swathy Moorthy ([drswathymoorthy@sriramachandra.edu.in](mailto:drswathymoorthy@sriramachandra.edu.in))

## Abstract

**Background:** Coronavirus Disease-19 (COVID-19) has a global impact. The laboratory assessments in Covid-19 illness help in better understanding the disease pathophysiology useful in screening asymptomatic individuals to diagnosis, prognosis and monitoring the affected patients. **The aim of the study:** To observe the association between biochemical and inflammatory parameters among the hospitalised COVID-19 patients of different clinical severity. **Materials and methods:** This was a retrospective study carried out with the approval of the Institutional Ethics Committee. The study included patients over 18 years, hospitalised with COVID-19 infection, grouped into three severity groups, admitted to ward, high dependency unit or intensive care unit between May to September 2020. Data collection was carried out by manual perusal of inpatient case sheets, computerised patient data system and transcription database for discharge summaries. The biochemical and inflammatory markers like plasma glucose, renal function tests, serum electrolytes, liver function tests, erythrocyte sedimentation rate (ESR), C-Reactive protein (CRP), d-dimer, ferritin, Lactate dehydrogenase (LDH) at the time of admission were collected. Data was expressed as mean and standard deviation or median and range. ANOVA test followed by post hoc (Tukey) test, Pearson correlation and Receiver Operating Characteristics (ROC) Curve analysis were performed. **Results:** Significant correlations were observed between the mild and moderate-severe illness groups with respect to fasting plasma glucose, blood urea nitrogen, creatinine, direct bilirubin, total protein, albumin, ferritin and LDH. The AUC was the highest for LDH at 0.64 followed by blood urea nitrogen to creatinine ratio at 0.62. **Conclusion:** High levels of renal function parameters were potential predictors of acute kidney injury among patients with COVID-19. Fasting plasma glucose, serum albumin, LDH, Blood urea nitrogen (BUN) and BUN-creatinine ratio are better indicators of the severity of the disease with multiorgan dysfunction.

**Keywords:** COVID-19; SARS-CoV2; acute kidney injury; liver impairment; ferritin; angiotensin converting enzyme 2; electrolyte alteration; lactate dehydrogenase

**Acknowledgements:** The authors wish to thank the participants who have provided the data for conducting the study and publication of this article. The authors wish to thank the management for

providing the necessary infrastructure and support for conducting the study and publication of the article.

**For citation:** Silambanan S, Koshy T, K MK, et al. Correlation of Biochemical Abnormalities with the Severity of Hospitalized Covid-19 Patients. Research Results in Biomedicine. 2022;8(2): 221-233. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-7

**Introduction.** The severe acute respiratory syndrome corona virus 2 (SARS-2), defined as Coronavirus disease 2019 (COVID-19) by the WHO, causes acute respiratory disease. Clinically, almost 80% of the COVID-19 patients are asymptomatic or having mild infection, while 13.8% have severe disease and 6.1% have critical life-threatening disease requiring hospital admission mostly with intensive care support [1, 2]. Individuals over the age of 65 years those with associated co-morbid conditions such as diabetes mellitus, hypertension, Coronary Artery Disease (CAD), Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) and obesity are highly susceptible to severe form of the disease. Early screening and identification of these risk factors will avert the chances of developing severe disease, thereby reducing the morbidity and mortality [3].

Assessment of biochemical alterations induced by the COVID-19 infection could help in better understanding of the disease pathophysiology which could help the clinicians in both assessment and treatment of the affected patients. With surging new cases causing overstretched health care systems with limited resources, risk stratification becomes crucial in identifying patients requiring intensive care support or hospital admissions.

**The aim of the study.** Hence this study was conducted to study the biochemical alterations and their association with inflammatory parameters among the hospitalised COVID-19 patients of different clinical severity.

**Methods.** The index study was a retrospective study carried out at a tertiary care teaching hospital in India. The study population consisted of patients over 18 years of age, hospitalised with COVID-19 infection, confirmed by RT PCR of nasopharyngeal swab. They were admitted to the ward, high dependency unit and intensive care unit between May to September 2020.

Patients were classified into three groups based on the clinical severity as the following:

Group-1: Mild disease – defined as peripheral oxygen saturation  $>94\%$

Group-2: Moderate disease -defined as peripheral oxygen saturation between 90-93

Group-3: Severe disease -defined as the peripheral oxygen saturation less than 89%

Data collection was carried out by manual perusal of inpatient case sheets, computerised patient data system and transcription database for discharge summaries. Details of their demographic parameters, presentation symptoms like fever, throat pain, cough, breathing difficulty, anosmia, diarrhoea, myalgia etc, biochemical laboratory test reports such as plasma glucose, renal function tests, serum electrolytes, liver function tests, inflammatory markers like ferritin and Lactate dehydrogenase (LDH) done at the time of admission were collected. The primary outcomes of interest in this study were the clinical severity, elevated inflammatory markers and abnormal biochemical parameters. The study was approved by the Institutional Ethics Committee (IEC-NI/20/AUG/75/49, dated 08-08-2020).

Data were expressed as mean and standard deviation or median and range. An ANOVA test followed by post hoc (Tukey) test was done to compare the variables between the groups and Pearson correlation to obtain the association between the variables. Receiver Operating Characteristics (ROC) Curve analysis was performed to the estimate area under curve (AUC) with 95% confidence interval and cut off point was obtained according to the Youden index. All statistical analyses were conducted using SPSS Software version 16. P value of  $<0.005$  was considered to be statistically significant.

**Results.** In the present study, a total of 996 patients with confirmed COVID-19 (338 males and 651 females) were included in the

analysis of biochemical abnormalities. Out of the 996 included patients, 855 patients (85.89%) had mild, 67 patients (6.73%) had moderate and 74 patients (7.43%) had severe COVID-19 infection. The median age of the patients was  $50.02 \pm 14.55$ ,  $58.53 \pm 15.68$  and  $57.05 \pm 12.73$  years among the mild, moderate and severe patients respectively. Among the 996 patients, 54% patients had one or more comorbidities. The most common comorbidities were diabetes mellitus in 487 (48.9%) and systemic hypertension in 345 (34.6%).

The common presenting clinical features were fever, throat pain, cough, dyspnoea, diarrhoea, anosmia, myalgias. Compared to the mild group, both moderate and severe groups

were significantly older in their age and were more likely to have underlying medical conditions (62.92% in the mild group vs 86.57% in the moderate group and 86.49% in the severe group). Table 1 compares the baseline characteristics of the patients among the mild, moderate and severe COVID-19 infections. As the glycaemic control worsened the severity of the disease progressed. The severe disease was observed more among the patients with autoimmune diseases, coronary artery disease, kidney disease and chronic airway disorders, while systemic hypertension and malignancies were observed at higher frequencies among the patients with moderate disease.

Table 1

## Characteristics of patients with COVID-19

Demographics n=997		Mild n=855	Moderate n=66	Severe n=76
<b>Age (years) mean<math>\pm</math>SD</b>		50.02 $\pm$ 14.55	58.53 $\pm$ 15.69	57.05 $\pm$ 12.73
Sex	Male n (%)	554 (64.79)	51 (77.27)	49 (64.5)
	Female n (%)	301 (35.20)	15 (22.73)	27 (35.5)
Comorbid conditions	Diabetes mellitus n (%)	422 (49.36)	42 (63.64)	51 (67.1)
	Systemic HT n (%)	282 (32.98)	32 (48.48)	32 (42.1)
	Dyslipidemia n (%)	24 (2.81)	2 (3.03)	3 (3.95)
	CAD n (%)	53 (6.2)	6 (9.09)	13 (17.1)
	Kidney diseases n (%)	32 (3.74)	1 (1.51)	3 (3.95)
	COAD n (%)	22 (2.57)	1 (1.51)	22 (28.95)
	Autoimmune diseases n (%)	45 (5.26)	4 (6.06)	9 (11.84)
	Malignancies n (%)	11 (1.28)	8 (12.12)	4 (5.26)
	Obesity n (%)	3 (0.35)	-	-
	Others (anemia, mental disorders, seizures, electrolyte imbalances, acid peptic disease) n (%)	39 (4.56)	4 (6.06)	0 (0.0)
No comorbid conditions n (%)		79 (9.24)	12 (18.18)	8 (10.53)

Note: Data are expressed as Median and Interquartile range except for age which is expressed in both mean $\pm$ SD and median and interquartile range.

There were significant differences between the mild and moderate / severe group in the variables such as markers of glycaemic control, inflammatory markers, renal and liver function tests. Tables 2, 3, 4 show the distribution of the biochemical markers among the study participants. Significant correlations were observed between the mild and moderate/severe illness groups with respect to fasting plasma glucose, blood urea nitrogen, creatinine, sodium, potassium, bicarbonate, urinary

protein leak, presence of red blood cells in the urine, direct bilirubin, total protein and albumin. The serum electrolytes sodium, potassium and bicarbonate showed a significant variation as the disease progressed from mild to severe disease. Among them serum bicarbonate showed a very significant variability while the disease progressed from mild to severe, while chloride did not exhibit such variation. Similar findings were noted among the inflammatory markers such as ferritin and LDH.

Table 2

**Distribution of renal function parameters and electrolytes among the study participants**

Variables	Mild		Moderate		Severe		F statistics/ P value	Post hoc test
	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR		
Serum BUN (mg/dL)	11.0	3-52	13.0	6-56	14	5-78	26.33/ 0.001**	Mild vs Moderate:0.24 Mild vs Severe : 0.0001** Moderate vs Severe: 0.003**
Serum Creatinine (mg/dL)	0.8	0.2-6.5	0.8	0.4-2.5	0.8	0.4-5.5	3.20/ 0.04*	Mild vs Moderate:0.96 Mild vs Severe : 0.03* Moderate vs Severe: 0.11
BUN: creatinine ratio	13.80	0-105	15.0	8.9- 50.0	17.80	4.8- 64.30	22.13/ 0.001**	Mild vs Moderate:0.08 Mild vs Severe : 0.0001** Moderate vs Severe: 0.008**
Serum Sodium (mEq/L)	136	115- 150	136	116- 141	135	120-142	7.82/ 0.0004**	Mild vs Moderate:0.06 Mild vs Severe : 0.001** Moderate vs Severe: 0.77
Serum Potassium (mEq/L)	4.0	2.7-5.9	4.05	3.3-5.1	4.10	3.0-5.2	4.30/ 0.01*	Mild vs Moderate:0.99 Mild vs Severe : 0.01* Moderate vs Severe: 0.08
Serum Chloride (mEq/L)	103.0	87-112	103	88-109	101.0	91-110	1.59/ 0.20	Mild vs Moderate:0.71 Mild vs Severe : 0.22 Moderate vs Severe: 0.82
Serum Bicarbonate (mEq/L)	25.0	12-32	24	16-30	24	12-30	8.44/ 0.0002**	Mild vs Moderate:0.19 Mild vs Severe : 0.0003** Moderate vs Severe: 0.34
Urine Protein							0.002**	NA
0	469	-	34	-	27	-		
1+	257	-	21	-	22	-		
2+	83	-	7	-	14	-		
3+	31	-	3	-	7	-		
4+	14	-	2	-	6	-		
Urine RBC							0.007**	NA
0	572	-	39	-	45	-		
1+	145	-	15	-	9	-		
2+	70	-	5	-	10	-		
3+	17	-	2	-	3	-		
4+	19	-	4	-	3	-		
Casts	17	-	2	-	7	-		NA
Casts	1		0		0			

Note: Data are expressed as Median and Interquartile range. \*\*P value: Highly significant; \*P value: significant.

Table 3

**Distribution of liver function parameters among the study participants**

Variables	Mild		Moderate		Severe		F statistics/ P value	Post hoc test
	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR		
AST (U/L)	30.0	9-845	29.5	13-156	36.0	14-143	1.46/ 0.23	Mild vs Moderate:0.90 Mild vs Severe : 0.23 Moderate vs Severe: 0.31
ALT (U/L)	26.0	7-449.0	24.5	11-126	27	9-198	0.46/ 0.62	Mild vs Moderate:0.18 Mild vs Severe : 0.01* Moderate vs Severe: 0.69
AST: ALT ratio	1.19	0.29-8.19	1.24	0.58-2.07	1.31	0.57-2.89	2.51/ 0.08	Mild vs Moderate:0.91 Mild vs Severe : 0.07 Moderate vs Severe: 0.16
ALP (U/L)	73	24-558.0	73	20-204	77	36-222	0.02/ 0.97	Mild vs Moderate:0.97 Mild vs Severe : 99 Moderate vs Severe: 0.98
Total bilirubin (mg/dL)	0.54	0.15-12.88	0.53	0.2-2.1	0.59	0.28-6.98	1.97/ 0.14	Mild vs Moderate:0.97 Mild vs Severe : 0.11 Moderate vs Severe: 0.43
Direct bilirubin (mg/dL)	0.12	0.01-6.62	0.12	0.04-0.96	0.15	0.04-3.69	3.69/ *0.02	Mild vs Moderate:0.97 Mild vs Severe : 0.01* Moderate vs Severe: 0.20
Indirect bilirubin (mg/dL)	0.41	0.09-6.26	0.41	0.11-1.46	0.45	0.17-3.29	0.62/0.53	Mild vs Moderate:0.99 Mild vs Severe : 0.50 Moderate vs Severe: 0.76
Total protein (g/dL)	7.10	5.0-8.6	6.85	4.6-8.6	6.80	5.2-8.2	15.63/ 0.001**	Mild vs Moderate:0.06 Mild vs Severe : 0.0001** Moderate vs Severe: 0.12
Albumin (g/dL)	4.0	2.1-5.0	3.80	2.3-5.2	3.56	1.9-4.6	34.56/ 0.001**	Mild vs Moderate:0.01* Mild vs Severe : 0.0001** Moderate vs Severe: 0.01*
Globulin (g/dL)	3.0	0.54-4.4	3.10	2.3-4.3	3.10	1.7-4.5	2.66/0.07	Mild vs Moderate:0.42 Mild vs Severe : 0.15 Moderate vs Severe: 0.06
A:G ratio	1.30	0.6-2.3	1.25	0.9-1.9	1.20	0.4-2.1	19.52/ 0.001**	Mild vs Moderate:0.12 Mild vs Severe : 0.0001** Moderate vs Severe: 0.01*

Note: Data are expressed as Median and Interquartile range. \*\*P value: Highly significant; \*P value: significant.

Table 4

**Distribution of inflammatory markers and glycemic status indicators among the study participants**

Variables	Mild		Moderate		Severe		F statistics/ P value	Post hoc test
	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR		
Ferritin (microg/L)	136.4	0.2- 1755	168.20	6.9- 4820	233.4	4.3- 7500	14.13/ 0.001**	Mild vs Moderate:0.11 Mild vs Severe : 0.0001** Moderate vs Severe: 0.06
LDH (U/L)	243.5	10.5- 946.0	286.0	117- 645	354	124- 978	27.34/ 0.001**	Mild vs Moderate:0.11 Mild vs Severe : 0.0001** Moderate vs Severe: 0.06
Fasting plasma glucose (mg/dL)	107	34-551	117	71- 658	141	95- 416	4.87/ 0.001**	Mild vs Moderate:0.43 Mild vs Severe : 0.0001** Moderate vs Severe: 0.0003 **
Postprandial plasma glucose (mg/dL)	202	35-658	266	88- 886	232	119- 500	2.83/ 0.05*	Mild vs Moderate:0.05* Mild vs Severe : 0.68
								Moderate vs Severe: 0.50
HbA1c (%)	7.80	1.1- 15.30	7.55	4.9- 14.7	8.40	5.7- 15.40	0.61/ 0.53	Mild vs Moderate:0.82 Mild vs Severe : 0.66 Moderate vs Severe: 0.51

Note: Data are expressed as Median and Interquartile range. \*\*P value: Highly significant; \*P value: significant.

Similarly, the total protein, serum albumin and the albumin-globulin ratio displayed striking significance between the mild and severe disease. Serum ferritin and lactate dehydrogenase showed a very significant difference when compared between the mild and severe diseases. Such a striking variation was also demonstrated by the fasting glucose levels.

Table 5 demonstrates the area under curve, cut off values along with sensitivity and

specificity of the various biochemical markers studied. The AUC was the highest for LDH at 0.64 followed by blood urea nitrogen to creatinine ratio and fasting plasma glucose at 0.62 followed by blood urea nitrogen at 0.61. Fasting plasma glucose had the highest sensitivity of 75% while albumin to globulin ratio had the highest specificity of 76%.

Table 5

#### Biochemical markers associated with the disease severity

Variables	AUC	95% CI	Cut-off	Sensitivity (%)	Specificity (%)
BUN	0.61	0.55-0.63	11.50	60	46
Creatinine	0.51	0.46-0.56	0.75	60	59
BUN: creatinine ratio	0.62	0.56-0.67	14.50	60	42
Sodium	0.40	0.35-0.45	135.50	45	57
Potassium	0.52	0.47-0.58	4.05	53	49
Chloride	0.44	0.39-0.49	102.50	42	52
Bicarbonate	0.41	0.35-0.46	24.50	41	59
AST	0.56	0.50-0.61	29.50	59	50
ALT	0.51	0.46-0.56	23.50	57	56
AST: ALT ratio	0.54	0.49-0.60	1.15	57	54
ALP	0.49	0.43-0.55	72.50	54	51
Total bilirubin	0.54	0.48-0.59	0.52	57	52
Direct bilirubin	0.56	0.51-0.62	0.12	57	46
Indirect bilirubin	0.52	0.46-0.57	0.40	57	51
Total protein	0.36	0.31-0.41	6.8	46	67
Albumin	0.31	0.26-0.36	3.8	35	63
Globulin	0.52	0.47-0.57	3.05	54	68
A:G ratio	0.35	0.30-0.40	1.15	56	76
Ferritin	0.58	0.52-0.63	150.0	59	45
LDH	0.64	0.59-0.70	251	69	46
Fasting plasma glucose	0.62	0.56-0.68	170.5	75	51
Postprandial plasma glucose	0.57	0.51-0.63	201.50	57	50
HbA1c	0.51	0.45-0.57	7.55	57	54

**Discussion.** COVID-19 has a massive impact globally causing enormous burden on the healthcare system.

The SARS-CoV2 infection is highly contagious and carries a high morbidity and mortality with it [4]. Most of the infected patients suffer from a less severe form of the infection and have a better prognosis [5], however, higher mortality is observed among patients with severe infections. The progress of the disease is highly unpredictable, ranging from asymptomatic or mild to very severe dis-

ease. COVID-19 is a multisystem disease affecting almost all organs in the body. Hence the use of biomarkers could help in the diagnosis and management of these patients. An attempt was made to study the common abnormalities noted in the biochemical parameters and their correlation with the disease severity. The patients with moderate and severe illnesses were older and had more than one comorbid condition than the patients with mild disease. This finding was consistent with previous studies which suggested both age and co-

morbid conditions would be strong risk factors for poorer outcomes [6, 7].

Renal function alterations in the form of elevated blood urea nitrogen (BUN), raised creatinine and increased BUN: creatinine ratios have been reported in previous studies among patients with COVID-19 infection. A significant increase was observed in the index study in BUN, creatinine and BUN: creatinine ratio among the severe cases compared to the mild patients. The likely mechanisms for this could be the kidney tubular cells, that express the ACE2 receptor on their surface get directly infected with SARS-CoV2. The kidney resident cells are affected by circulating inflammatory mediators causing endothelial dysfunction, microcirculatory derangements and tubular injury. Acute kidney injury has been observed among 25-30% of COVID-19 patients and carries higher mortality risk [8, 9].

According to Durvasula et al, the acute kidney injury could be due to the poor inflammatory response and its impact on the renal tubular perfusion [10]. SARS-CoV2 also has a direct cytopathic effect on podocytes and the tubule epithelial cells as the cell entry receptor ACE2 is expressed on them followed by glomerular insult [10, 11]. This explains the progressive elevation noted in blood urea nitrogen and creatinine. In the present study, patients had a steady increase in the BUN as the severity of COVID progressed with P value of 0.001. Within-group comparisons showed that there was significant increase in BUN when mild was compared with severe COVID infections as well as when moderate cases were compared against severe cases. The median value of serum creatinine was almost the same in all the three groups with mild significance due to variation in interquartile range ( $P=0.04$ ). BUN: creatinine ratio showed significant change across the groups ( $P=0.001$ ) with the intergroup changes being the same as for BUN. This clearly indicated that patients in the moderate and severe groups could have been in acute kidney injury as indicated by the highly

significant alterations in BUN and BUN-creatinine ratio with mild alterations in serum creatinine (Table 2).

In the present study electrolyte imbalances were observed among severe COVID-19 disease. In the index study significant alterations in the levels of serum sodium, potassium and bicarbonate were observed while comparing the mild and severe cases. Median serum sodium levels were in the lower limit of biological reference interval in the three groups ( $P=0.0004$ ) and potassium values were normal ( $P=0.01$ ). There was no significant change in serum chloride values. Serum bicarbonate values were decreased ( $P=0.0002$ ). Within groups comparisons showed there was a significant difference between mild and severe cases but not between moderate and severe cases. This showed that electrolyte alterations became prominent only when the disease progressed to a severe state (Table 2).

The SARS-CoV2 virus interacts with the ACE2 receptors probably reducing their expression (Fig.).

ACE2 is highly expressed in capillary rich organs such as lungs, kidneys, gut and brain. ACE2 regulates the renin-angiotensin-aldosterone system. Normally ACE2 lowers blood pressure by catalyzing the hydrolysis of angiotensin II which is a vasoconstrictor into angiotensin I which is a vasodilator. The pathophysiological changes that occur as a result of increased angiotensin II [12, 13]:

- Angiotensin II acts on the adrenal cortex to stimulate the release of aldosterone, leading to sodium and water retention and excretion of potassium.

- Binding of Ang II to angiotensin receptors causes vasoconstriction, endothelial injury, endovascular thrombosis and increase blood volume.

- Precipitates hypertension and accelerated thrombosis in arterioles by activating the coagulation cascade (both thrombin and platelets). These thrombogenic effects on the platelets were not reversible with aspirin

- At the cellular level, angiotensin II induces various signalling pathways: serine/threonine kinase, ERK, JNK/MAPK as well as PKC.
- Angiotensin II induces production of IL-6 and TNF- $\alpha$ , possibly through above mentioned pathways.

• Angiotensin II is a potent activator of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase; thus it induces production of reactive oxygen species (ROS).

• Angiotensin II activates neutrophils and macrophages flux to the affected tissues and inhibits the production of nitric oxide and hence promotes vascular injury.

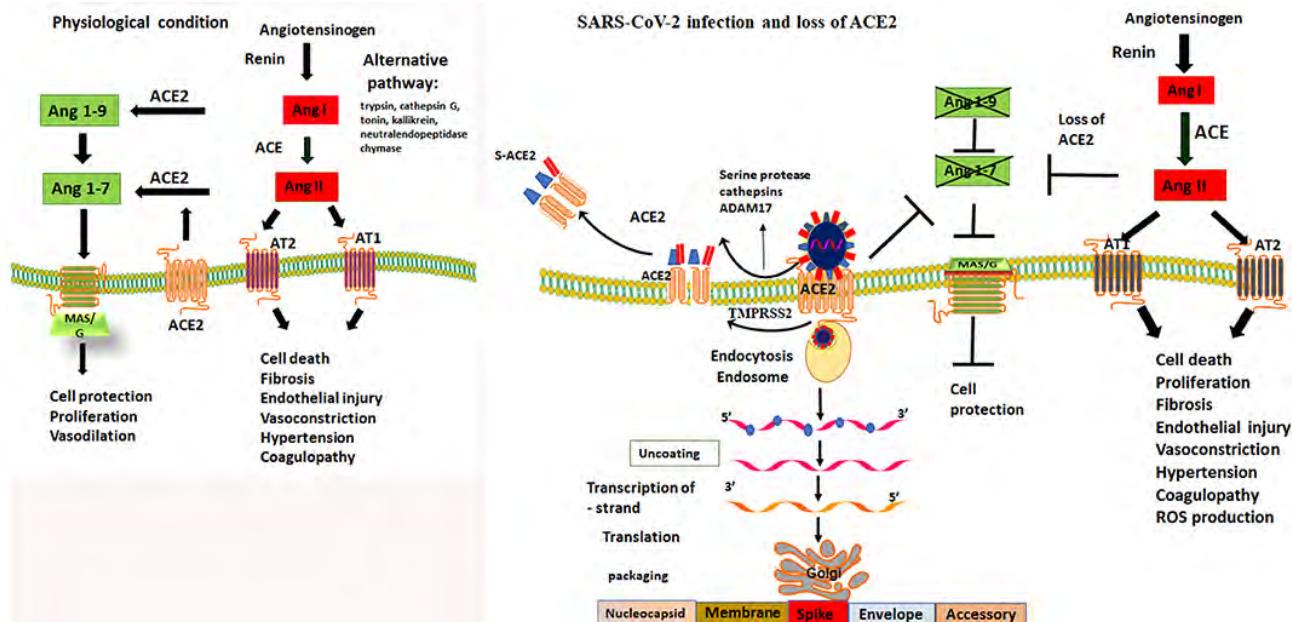


Fig. Loss of ACE2 in Sars CoV2 infection

Hypokalemia can further be augmented by the gastro-intestinal manifestations of COVID in the form of diarrhoea [14, 15]. The progressive renal insult is also reflected in the steady increase in the urinary protein loss and presence of red blood cells in the urine as the severity of COVID progressed from mild to severe stage (Table 2).

Cholestatic involvement with elevated conjugated bilirubin and cytosis have been observed previously, which could probably be due to the direct toxic effect of the virus on the hepatocytes and bile duct epithelium due to the higher expression of ACE2 receptors in them [16, 17]. But, no significant alterations have been detected in the histopathology of these cells, which raises the possibilities of COVID-19 related liver dysfunction resulting from hepatotoxic drugs, systemic inflammatory re-

sponse, hypoxia related, multiorgan dysfunction – all causing secondary liver injury [18, 19].

In the present study, there were no statistically significant differences in serum aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), De Ritis ratio, alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin and indirect bilirubin. There was a significant difference in direct bilirubin ( $P=0.023$ ) with significant differences especially between mild and severe groups. Conjugated hyperbilirubinemia was significantly increasing with progressive severity of COVID-19 illness (Table 3).

The present study showed a significant increase in the alanine transaminase (ALT) between mild to severe cases. The De Ritis (AST:ALT) ratio however did not demonstrate a statistically significant difference with progressing severity of the disease. Altered De Ri-

tis ratio was found to have an association in hyperbilirubinemia patients [20]. Studies have shown that more than 50% of the hospitalised patients were found to have varying degree of liver involvement. Though serum transaminases are found to be elevated in COVID-19 patients, their propensity to predict survival or mortality among these patients is unclear. Moderate to severe liver damage is characterised by AST:ALT ratio <1.0 while it is more than 1.0 in severe liver diseases [21]. In the present study, though there was a steady increase in AST:ALT ratio from mild to severe cases, the increase was not statistically significant.

Albumin is largely distributed in intestine, muscle, skin and various body fluids. It is a negative acute phase reactant with low serum levels in acute inflammation and is inversely proportional to the extent of systemic inflammation. Among the COVID-19 patients, an inverse relationship was found between serum albumin levels and the severity of the disease [22]. In the present study, total protein ( $P=0.0016$ ), serum albumin ( $P=0.001$ ) and albumin: globulin (AG) ratio ( $P=0.001$ ) showed statistically significant differences across the groups. When compared within groups total protein showed statistically significant difference between groups mild and severe, whereas albumin showed statistically significant decrease in values between mild and moderate as well as between moderate and severe. And albumin:globulin (AG) ratio also showed statistically significant difference between mild and moderate as well as between moderate and severe. There was no significant change in the globulin values. Thus, serum albumin and AG ratio could serve as good biomarkers for the progression of the disease especially in cases of liver involvement (Table 3).

COVID-19 patients have been found to have elevated muscle injury biomarkers like creatinine kinase, and myoglobin [23]. Such alterations could be a direct effect of the virus on the muscle due to the ACE2 receptor expression or indirect effect as a result of cardiac or renal injury. Significant elevation of lactate dehydrogenase (LDH) was observed in the index study ( $P=0.001$ ) as observed previously

and it progressively increased with worsening severity [24, 25] (Table 4). LDH is a non-specific marker of tissue damage, hence, it emerges as one of the most consistently elevated markers among COVID-19 patients at risk of developing adverse outcomes [26].

Ferritin is an acute phase reactant and it has been well established as a marker for disease progression in COVID-19 [27]. In this study, ferritin showed a steady and significant increase from mild to severe illness ( $P=0.001$ ). Within-group comparisons showed that both LDH and ferritin showed significant differences only between mild and severe cases and not between moderate and severe cases. Hence LDH and ferritin may not indicate early stage of the disease (Table 4). During any widespread acute inflammation, IL-6 increases the vascular permeability which extravasates the serum albumin into the interstitium causing a drop in its serum level. Moreover, severe COVID-19 patients who were found to have significantly elevated levels of ESR, CRP, ferritin had increased mortality rates. This favours an exaggerated immune response among them [28].

Glycaemic status of the patients was found to have its impact on the COVID severity in the index study. The fasting blood glucose showed a steady increase as the disease severity progressed ( $P=0.001$ ) and within-group comparisons showed statistically significant differences between mild and moderate as well as between moderate and severe. Hence fasting plasma glucose could serve as a biomarker of the advancement of the disease. Postprandial glucose showed just significance between the groups while glycated hemoglobin did not show significant differences across the groups (Table 4). Data on new onset diabetes from 8 studies with a total patient population of 3711 has shown that a pooled proportion of 14.4% were newly diagnosed [29]. A greater release of hyperglycaemic hormones due to stress induced by the disease leading to increased blood glucose levels appear to play a significant role [30]. The effects of the virus on ACE2 receptor on pancreatic islets and their subsequent changes like direct beta cell damage and unopposed angiotensin II effect which

can impede the insulin secretion can explain the glycaemic abnormality in SARS-CoV2 infection [31]. The present study also concurred with this finding as the fasting blood glucose showed a significant trend but the HbA1C did not show such variation among mild to severe covid cases. Fasting plasma glucose, LDH, BUN, and BUN-creatinine ratio are better indicators of the severity of the disease with multiorgan dysfunction (Table 5).

**Conclusion.** In conclusion, high levels of urea nitrogen, creatinine were potential predictors of Acute Kidney Injury among patients with COVID-19 and also predicted the progression of the disease severity. Similarly, serum albumin, LDH, ferritin and fasting blood glucose potentially predicted disease progression. Electrolyte disturbances in the form of low serum sodium, low potassium and alterations in the bicarbonate levels have been observed among the SARS-COV2 infected patients, which requires further studies to understand their propensity as morbidity and mortality predictors.

## Limitations

*It was a retrospective, longitudinal cohort study yet the data were collected from a structured, prospectively maintained database. The exact time of parameter sampling could not be estimated. So, the biomarkers kinetics during the disease progression could not be established. The sample size was small and single centre study and its generalizability across different ethnic groups is unclear.*

## 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. Xu H, Zhong L, Deng J, et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. International journal of oral science. 2020;12:8. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41368-020-0074-x>
2. Report of the WHO-China Joint Mission on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) [Internet]. [cited 2021 Nov 21]. Available from: [https://www.who.int/publications-detail/report-of-the-who-china-joint-mission-on-coronavirus-disease-2019-\(covid-19\)](https://www.who.int/publications-detail/report-of-the-who-china-joint-mission-on-coronavirus-disease-2019-(covid-19)).
3. Liu J, Liu Y, Xiang P, et al. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Predicts Severe Illness Patients with 2019 Novel Coronavirus in the Early Stage. Journal of Translational Medicine. 2020;18(1):206. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02374-0>
4. Big data on Covid-19 around the world [Internet]. China Daily Network. 2020 [cited 2021 Nov 21]. Available from: [https://www.china-daily.com.cn/china/special\\_coverage/2020latest-data](https://www.china-daily.com.cn/china/special_coverage/2020latest-data).
5. Team NCPERE. The epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 novel corona diseases (COVID-19) in China. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. 2020;41(2):145-51. DOI: <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2020.02.003>
6. Wang D, Hu B, Hu C, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalised patients with 2019 novel corona virus- infected pneumonia in Wuhan, China. Journal of the American Medical Association. 2020;323(11):1061-1069. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585>
7. Wang D, Li R, Wang J, et al. Correlation analysis between disease severity and clinical and biochemical characteristics of 143 cases of COVID-19 in Wuhan, China: a descriptive study. BMC Infectious Diseases. 2020;20:519. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05242-w>
8. Joannidis M, Forni LG, Klein SJ, et al. Lung-kidney interactions in critically ill patients: consensus report of the Acute Disease Quality Initiative (ADQI) 21 Workgroup. Intensive Care Medicine. 2020;46:654-672. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00134-019-05869-7>
9. Cheng Y, Luo R, Wang K, et al. Kidney disease is associated with in-hospital death of patients with COVID-19. Kidney International. 2020;97(5):829-838. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.kint.2020.03.005>
10. Durvasula R, Wellington T, McNamara E, et al. COVID-19 and kidney failure in the acute care setting: our experience from Seattle. American Journal of Kidney Diseases. 2020;76:4-6. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2020.04.001>
11. South AM, Diz DI, Chapell MC. COVID-19, ACE2 and the cardiovascular consequences. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology. 2020;318(5):H1084-

90. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00217.2020>
12. Lippi G, South AM, Henry BM. Electrolyte imbalances in patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Annals of Clinical Biochemistry*. 2020;57(3). <https://doi.org/10.1177/0004563220922255>
13. Samavati S, Uhal BD. ACE2, Much More Than Just a Receptor for SARS-CoV-2. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020;10:317. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00317>
14. Chen D, Li X, Song Q, et al. Hypokalemia and clinical implications in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) [Internet]. medRxiv. 2020 [cited 2021 Nov 21]. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.02.27.20028530>. Available from: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.02.27.20028530v1.full.pdf>
15. Pan L, Mu MI, Yang P, et al. clinical characteristics of COVID-19 patients with digestive symptoms in Hubei, China: a descriptive, cross-sectional, multicentric study. *American Journal of Gastroenterology*. 2020;115:766-73. DOI: <https://doi.org/10.14309/ajg.00000000000000620>
16. Oussalah A, Gleye S, Urmet IC, et al. the spectrum of biochemical alterations associated with organ dysfunction and inflammatory status and their association with disease outcomes in severe COVID-19: A longitudinal cohort and time-series design study. *EClinicalMedicine*. 2020;27:100554. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100554>
17. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, et al. Tissue based map of the human proteome. *Science*. 2015;347(6220):1260419. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1260419>
18. Xu Z, Shi L, Wang Y, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2020;8(4):420-422. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30076-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30076-X)
19. Feng G, Zheng KI, Yan QQ, et al. COVID-19 and liver dysfunction: current insights and emergent therapeutic strategies. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. 2020;8(1):18-24. DOI: <https://doi.org/10.14218/JCTH.2020.00018>
20. Yazar H, Kayacan Y, Ozdin M. De Ritis ratio and biochemical parameters in COVID-19 patients. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2020;6. DOI: <https://doi.org/10.1080/13813455.2020.1788604>
21. Zinelli A, Arru F, De Vito A, et al. The De Ritis ratio as prognostic biomarker of in-hospital mortality in COVID-19 patients. *European Journal of Clinical Investigation*. 2021;51(1):e13427. DOI: <https://doi.org/10.1111/eci.13427>
22. Varim C, Yaylac S, Demirci T, et al. Neutrophil count to albumin ratio as a new predictor of mortality in patients with COVID-19 Infection. *Revista da Associacao Medica Brasileira*. 2020;66(2):77-81. DOI: <https://doi.org/10.1590/1806-9282.66.S2.77>
23. Lippi G, Plebani M. the critical role of laboratory medicine during coronavirus disease 2019 (COVID-19) and other viral outbreaks. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2020;58(7):1063-9. DOI: <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0240>
24. Chen T, Wu DI, Chen H, et al. clinical characteristics of 113 deceased patients with coronavirus disease 2019: retrospective study. *BMJ*. 2020;368:m1091. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.m1091>
25. Qui H, Wu J, Hong L, et al. Clinical and epidemiological features of 36 children with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in Zhejiang, China: an observational cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2020;20(6):689-696. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30198-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30198-5)
26. Toutkaboni MP, Askari E, Khalili N, et al. Demographics, laboratory parameters and outcomes of 1061 patients with coronavirus disease 2019: a report from Tehran, Iran. *New Microbes and New Infections*. 2020;38:100777. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100777>
27. Thompson S, Bohn MK, Mancini N, et al. IFCC Interim Guidelines on Biochemical/ Hematological Monitoring of COVID-19 Patients. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2020;58(12):2009-2016. DOI: <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-1414>
28. Danwang C, Endomba FT, Nkeck JR, et al. A meta-analysis of potential biomarkers associated with severity of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Biomarker Research*. 2020;8:37. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00217-0>
29. Satish T, Kapoor N, Cao Y, Tapp RJ, Zimmet P. Proportion of newly diagnosed diabetes in COVID-19 patients: a systematic review and meta analysis. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2021;23(3):870-874. DOI: <https://dx.doi.org/10.1111/dom.14269>
30. Wang A, Zhao W, Xu Z, et al. Timely blood glucose management for the outbreak of 2019 novel coronavirus disease (COVID-19) is urgently needed. *Diabetes Research and Clinical*

Practice. 2020;162:108118. DOI:  
<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2020.108118>  
31. Satish T, Tapp RJ, Cooper ME, et al.  
Potential metabolic and inflammatory pathways  
between COVID-19 and new onset diabetes. Diabetes  
and Metabolism. 2021;47(2):101204. DOI:  
<https://doi.org/10.1016/j.diabet.2020.10.002>

Received 21 November 2021

Revised 24 February 2022

Accepted 6 March 2022

### Information about the authors

**Santhi Silambanan**, MD, Professor at the Department of Biochemistry, Sri Ramachandra Institute of Higher Education and Research, Chennai, India, E-mail: [santhisilambanan@sriramachandra.edu.in](mailto:santhisilambanan@sriramachandra.edu.in), ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0720-6063>.

**Teena Koshy**, PhD, Assistant Professor at the Department of Human Genetics, Sri Ramachandra Institute of Higher Education and Research, Chennai, India, E-mail: [teenak@sriramachandra.edu.in](mailto:teenak@sriramachandra.edu.in), ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5193-1436>.

**Mahesh K. K.**, PhD, Assistant Medical Officer/Lecturer Grade II at the Department of Physiology and Biochemistry, Government Yoga and Naturopathy Medical College and Hospital, Chennai, India, E-mail: [doctor.mahesh1985@gmail.com](mailto:doctor.mahesh1985@gmail.com), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5377-7847>.

**Jasmine Ch. A.**, MSc, PhD Scholar at the Department of Biochemistry, Sri Ramachandra Institute of Higher Education and Research, Chennai, India, E-mail: [jasminechandra96@gmail.com](mailto:jasminechandra96@gmail.com), ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5224-5534>.

**Emmanuel Bhaskar**, MD, Professor, Unit Head of the Department of General Medicine, Sri Ramachandra Institute of Higher Education and Research, Chennai, India, E-mail: [drebhaskar@gmail.com](mailto:drebhaskar@gmail.com), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3524-641X>.

**Swathy Moorthy**, MD, Associate Professor at the Department of General Medicine, Sri Ramachandra Institute of Higher Education and Research, Chennai, India, E-mail: [drswathymoorthy@sriramachandra.edu.in](mailto:drswathymoorthy@sriramachandra.edu.in), ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0981-6551>.



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

УДК 612.821.7

# Сравнительный анализ качества сна здоровых девушек и женщин в период гестации

М.Д. Бароева<sup>1,2</sup> , Л.С. Попова<sup>1,2</sup> , Ф.С. Датиева<sup>2</sup> , Л.В. Цаллагова<sup>1,2</sup> ,  
Е.К. Басаева<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Осетинская государственная медицинская академия»,  
ул. Пушкинская, д. 40, г. Владикавказ, 362019, Российская Федерация

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный научный центр  
«Владикавказский научный центр Российской академии наук»,  
ул. Вильямса, д. 1, с. Михайловское, 363110, Российская Федерация

<sup>3</sup> Северо-Осетинский государственный университет им. К. Л. Хетагурова,  
ул. Ватутина, д. 44-46, г. Владикавказ, 362025, Российская Федерация  
*Автор для переписки: М.Д. Бароева (vip.baroeva@mail.ru)*

## Резюме

**Актуальность:** Расстройства сна во время беременности представляют реальную угрозу для матери и плода ввиду нарушения физиологического течения процесса гестации и выброса мелатонина (центрального и периферического). **Цель исследования:** Сравнительная оценка показателей сна и хронотипа у здоровых беременных и здоровых небеременных женщин. **Материалы и методы:** Проведено добровольное анкетирование 210 здоровых небеременных девушек, средний возраст –  $20 \pm 3,5$  лет, и 69 женщин с физиологической беременностью (средний возраст –  $29,69 \pm 5,03$  лет) по русской версии Мюнхенского опросника в условиях г. Владикавказ без блока субъективной самооценки хронотипа. Из группы здоровых девушек случайным образом выбрали 100 человек – 1 группа; беременных разделили по триместрам: 2 группа (I триместр, 10 женщин), 3 группа (II триместр, 20 женщин), 4 группа – (III триместр, 39 женщин). Рассчитывали интегральные показатели в выходные и рабочие дни: середину и продолжительность сна, время пробуждения, «джетлаг» (десинхроноз), оценивали хронотип. Статистическую обработку проводили методами вариационной статистики IBM SPSS 23 и Statistica 10.0. **Результаты:** Физиологическая беременность характеризуется статистически значимым улучшением показателей сна, смещением середины сна к периоду максимальной концентрации мелатонина, снижению дефицита сна в рабочие дни, сокращению джетлага. Отмеченное у беременных увеличение продолжительности сна предотвращает целый ряд нарушений физического и психического здоровья, связанных с секрецией мелатонина и перестройкой НЭИМ-системы. Во всех триместрах беременности был определен intermediate chronotype (ImCht) – «средний» хронотип, у небеременных slightly late chronotype (SLCht) – «слегка поздний» хронотип, что также говорит в пользу большей стабильности сна при физиологическом течении беременности. **Заключение:** Использование Мюнхенского опросника (MCTQ) у беременных позволило определить тенденции физиологических изменений показателей сна в норме.

**Ключевые слова:** беременные; цикл сон-бодрствование; показатели сна; хронотип; джетлаг (десинхроноз)

**Для цитирования:** Бароева МД, Попова ЛС, Датиева ФС, и др. Сравнительный анализ качества сна здоровых девушки и женщин в период гестации. Научные результаты биомедицинских исследований. 2022;8(2): 234-245. DOI: 0.18413/2658-6533-2022-8-2-0-8

## Comparative analysis of sleep quality in healthy girls and women during gestation

Madina D. Baroeva<sup>1,2</sup> , Larisa S. Popova<sup>1,2</sup> , Fatima S. Datieva<sup>2</sup> ,  
Larisa V. Tsallagova<sup>1,2</sup> , Elena K. Basaeva<sup>3</sup> 

<sup>1</sup> North Ossetian State Medical Academy,

40 Pushkinskaya St., Vladikavkaz, 362019, Russia

<sup>2</sup> Vladikavkaz Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences,

1 Vil'yamsa St., Mikhaylovskoye, 363110, Russia

<sup>3</sup> North Ossetian State University,

44-46 Vatutin St., Vladikavkaz, 362025, Russia

*Corresponding author: Madina D. Baroeva (vip.baroeva@mail.ru)*

### Abstract

**Background:** Sleep disorders during pregnancy pose a real threat to the mother and fetus due to a violation of the physiological course of the gestation process, the release of melatonin (central and peripheral). **The aim of the study:** Comparative evaluation of sleep and chronotype indicators in healthy pregnant and healthy non-pregnant women. **Materials and methods:** There was conducted a voluntary survey of 210 relatively healthy non-pregnant girls (medical students), the average age was  $20 \pm 3.5$  years, and 69 women with physiological pregnancy (the average age was  $29.69 \pm 5.03$  years) according to the Russian version of the Munich Chronotype Questionnaire in the conditions of Vladikavkaz without a block of subjective self-assessment of the chronotype. 100 people were randomly selected from a group of healthy girls –group 1; pregnant women were divided by trimesters: group 2 (I trimester, 10 women), group 3 (II trimester, 20 women), group 4 – (III trimester, 39 women). Integral indicators were calculated on weekends and working days: the middle and duration of sleep, wake-up time, "jetlag" (desynchronosis), and the chronotype was estimated. Statistical processing was carried out by methods of variational statistics IBM SPSS 23 and Statistica 10.0. **Results:** Physiological pregnancy is characterized by a statistically significant improvement in sleep indicators, a shift in the middle of sleep to the period of maximum melatonin concentration, a decrease in sleep deficit on working days, and a reduction in jet lag. The increase in sleep duration noted in pregnant women prevents a number of physical and mental health disorders associated with the secretion of melatonin and the restructuring of the NEIM system. In all trimesters of pregnancy, an intermediate chronotype (ImCht) was determined – a "medium" chronotype, in non-pregnant women – a slightly late chronotype (SLCht) – a "slightly late" chronotype, which also speaks in favor of greater sleep stability during the physiological course of pregnancy. **Conclusion:** The use of the Munich Chronotype Questionnaire (MCTQ) in pregnant women allowed us to determine the trends of physiological changes in normal sleep indicators.

**Keywords:** pregnant; sleep-wake cycle; sleep indicators; chronotype; jetlag (desynchronosis)

**For citation:** Baroeva MD, Popova LS, Datieva FS, et al. Comparative analysis of sleep quality in healthy girls and women during gestation. Research Results in Biomedicine. 2022;8(2): 234-245. Russian. DOI:10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-8

**Введение.** Беременность характеризуется спектром адаптационно-приспособительных реакций физиологических систем организма женщины и репродуктивной системы [1]. Механизм физиологических изменений определен динамикой колебаний НЭИМ-системы, влиянием на женский организм стероидных гормонов и кортикостероидов, в частности. Ведущую роль в системе «мать-плацента-плод» играют прогестерон и все три фракции эстрогенов (эстрон, эстриол, эстрадиол) [2, 3], которые влияя на ЦНС, меняют сомнологический статус [4, 5].

Большинство гормонов продолжает синтезироваться с сохранением циркадианного цикла, главную роль в его регуляции играет мелатонин (М) [6, 7]. Суточная секреция М в шишковидной железе участвует в сохранении гестации за счет нейтрализации образующихся при беременности свободных радикалов и стимуляции АОС в клетках и тканях в системе «мать–плацента–плод» [4]. Таким образом, снижается окислительный стресс в яичниках и плаценте беременной женщины через receptor-зависимые и независимые процессы [5].

Как иммуномодулятор М важен для имплантации, плацентации, морфофункционального развития плаценты и сохранения ее нейро-эндокринно-иммунной функции [8]. При гестации М циркадианно проникает через плаценту, влияя на развитие и синхронизацию супрахиазмального ядра гипоталамуса у плода; действуя в синергизме с окситоцином. Важную роль М оказывает в I триместре для физиологии развития и функционирования плаценты в более поздних сроках беременности [9, 10].

При беременности продуцируется и периферический М (яичники, матка, плацента) [11], который возрастает по мере роста срока гестации и оказывает пролонгированные эффекты циклической

продолжительностью до 24 ч [12]. Мелатонин участвует в нормальном протекании беременности с периода развития яйцеклетки до рождения ребенка, поддерживая оптимальный гомеостаз плаценты [12]. Адаптация большинства процессов матери и плода, от которых зависит синхронизация развития плодовых систем и физиологическая подготовка организма беременной к родам, определяется нормальной дневной активностью и полноценным ночным сном [13]. Суточная цикличность режима «снабодрствования» находится в тесной зависимости от индивидуального хронотипа беременной, сезонного и эколого-географического факторов, времени максимального синтеза М, что требует изучения в период гестации.

**Цель исследования.** Сравнительная оценка показателей сна и хронотипа у здоровых беременных и здоровых небеременных женщин.

**Материалы и методы исследования.** Исследование было одобрено Этическим комитетом ИБМИ ВНЦ РАН №7 от 20.02.19. После получения информированного согласия из группы здоровых девушек (210 человек) случайным образом выбрали 100 здоровых небеременных девушек (студенток-медиков), средний возраст –  $20 \pm 3,5$  лет, не имеющих нарушений репродуктивного здоровья, и 69 женщин с физиологической беременностью (средний возраст –  $29,69 \pm 5,03$  лет,  $M \pm SD$ ), не имеющих нарушений репродуктивного здоровья.

Опрос респондентов проводили весной (март-май 2019 года) в условиях женских консультаций № 1, 2 г. Владикавказа РСО-Алания и у обучающихся студенток ФГБОУ ВО СОГМА МЗ РФ ( $43^{\circ}01'00''$  с. ш.  $44^{\circ}41'00''$  в. д.).

Критериями включения в группу здоровых небеременных явились отсутствие любых соматических и инфекционных

заболеваний на момент опроса и отсутствие приема любых медикаментозных препаратов. Критериями включения в исследование беременных послужили: отсутствие в анамнезе соматических заболеваний и осложнений в период гестации, физиологическое течение гестации с профилактическим приемом поливитаминного комплекса (приказ № 572н от 01.11.2012). Из исследования были исключены женщины, имеющие нарушения сна, острые и хронические соматические заболевания, осложнения гестации (преэклампсия, невынашивание, анемия и др.).

Респонденты отвечали на вопросы русской версии Мюнхенского опросника (MCTQ) без блока субъективной самооценки хронотипа, отмечая показатели сна, по которым в рабочие и выходные дни рассчитывали интегральные показатели: середину и продолжительность сна, время пробуждения, «джетлаг» (десинхроноз) - по разности времени середины сна в выходные (ВД) и рабочие (РД) дни [14-17]. Джетлаг характеризует время циркадного смещения в РД и ВД.

Респондентов разделили на группы: 100 человек – 1 группа (здоровые небеременные); беременных разделили по триместрам: 2 группы (I триместр) – 10 женщин, 3 группа – (II триместр) – 20 женщин, 4 группа – (III триместр) – 39 женщин. Беременные в течение первых 2-х триместров работали в обычном режиме, в III триместре находились в декретном отпуске (ст. № 255, № 256 ТК РФ).

Статистическую обработку проводили описательными методами вариационной статистики IBM SPSS 23 и Statistica 10.0. Значения анкетных показателей представлены как среднее значение и среднеквадратичное отклонение ( $M \pm SD$ ). С помощью критерия Колмогорова-Смирнова оценивали нормальность выборки. Большинство рядов данных у беременных женщин не соответствует требованиям нормальности, поэтому для анализа данных использовали методы непараметрического анализа. Достоверность различий

изучаемых показателей между рабочими и выходными днями оценивали с помощью критерия Вилкоксона, между беременными и небеременными женщинами по критерию Манна-Уитни. Для оценки корреляций у небеременных женщин использован коэффициент Пирсона, т.к. основные показатели в их группе соответствуют признакам нормального распределения, а в группе здоровых беременных – использовали коэффициент Спирмена. Достоверными считали отличия при  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Показатели сна у респондентов отражены в таблице 1. В РД на фоне физиологической беременности отмечено более раннее время отхождения ко сну во 2-4 группах по отношению к 1 группе, что может быть объяснено седативным действием прогестерона на ЦНС [18]. Для засыпания требуется больше времени во 2-3-й группах. Утренний подъем смещается на более позднее время в 3-4 группах. В ВД во 2-й и 4 группах выявлен более ранний отход ко сну по отношению к здоровым небеременным девушкам (1 группа). Беременным 4 группы (III триместр) требуется больше времени для засыпания. В ВД отмечен более ранний подъем у беременных по сравнению с небеременными женщинами.

Для беременных одним из основных показателей физиологического течения гестации является продолжительность сна – время, когда происходит синхронизация процессов жизнедеятельности между организмами матери и плода. В условиях полноценного сна происходят активный рост плода и регенеративные процессы, позволяющие организму матери максимально адаптироваться к меняющимся условиям внешней и внутренней среды [19, 20]. Секреция мелатонина обладает свойством контролировать клеточные функции, вплоть до запуска нового эпизода его синтеза следующей ночью [12]. Существует тесная связь между продукцией мелатонина и сонливостью в течение суток, что свойственно периоду

беременности, независимо от времени суток. С другой стороны, беременность является предрасполагающим фактором к

появлению расстройств сна у здоровых женщин [21, 22].

### Показатели сна у небеременных и беременных женщин

Table 1

#### Sleep indicators in non-pregnant and pregnant women

Вопросы	Группы	1 (n=100)		2 (n=10)		3 (n=20)		4 (n=39)	
		Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
<i>Рабочие дни</i>									
Ложусь в постель в (ч:мин)	21:00-0:00	34	34	10	100	18	90	34	87,2
	0:00-1:40	61	61	-	-	2	10	5	12,8
	2:00-3:00	4	4	-	-	-	-	-	-
Требуется для засыпания (мин)	0-25	68	68	4	40	11	55	22	56,4
	30-59	32	32	6	60	9	45	17	43,6
Утром просыпаюсь в (ч:мин)	06:00-06:50	13	13	3	30	4	20	5	12,8
	7:00-7:50	67	67	6	60	6	30	18	46,2
	8:00-9:00	20	20	1	10	7	35	14	35,9
	9:05-10:00	-	-	-	-	3	15	2	5,1
<i>Выходные дни</i>									
Ложусь в постель в (ч:мин)	20:00-0:00	24	24	10	100	8	40	28	71,8
	0:00-1:50	59	59	-	-	12	60	10	25,6
	2:00-3:00	17	17	-	-	-	-	1	2,6
Требуется для засыпания (мин)	0-25	67	67	6	60	13	65	16	41
	30-59	32	32	4	40	7	35	23	59
	60-150	1	1	-	-	-	-	-	-
Утром просыпаюсь в (ч:мин)	06:00-06:50	1	1	-	-	-	-	-	-
	7:00-7:50	5	5	-	-	3	15	8	20,5
	8:00-9:00	11	11	6	60	10	50	17	43,6
	9:05-9:30	20	20	2	20	3	15	8	20,5
	10:00-14:00	63	63	2	20	4	20	6	15,4

Время засыпания (таблица 2) в РД у беременных сокращено почти в 2,5 раза, в ВД – почти в 4 раза. Время сна в РД у беременных во всех триместрах более чем на 1 час превысила сон здоровых девушек. В ВД время сна у беременных 3-й группы находится в пределах доверительного интервала небеременных девушек. В 1-м и 3-м триместрах (2 и 4 группы) отмечается наибольшее время сна. В весенний сезон года время сна напрямую зависит от рассвета и фотопериода [23]. Середина сна в РД наступает раньше в 1-м триместре ( $p<0,05$ ), в ВД - у беременных раньше ( $p<0,05$ ), чем у небеременных девушек.

Социальный «джетлаг» (десинхроноз) более выражен у небеременных девушек, чем у беременных (таблица 2). Отмечено статистически значимое снижение «джетлага» во 2-м и 3-м триместрах, по сравнению с 1-2 группами ( $p<0,05$ ). «Джетлаг» важен для понимания напряжения адаптационных резервов организма, т.к. он отражает смещение выброса кортизола и мелатонина в течение суток на более поздние часы. А мелатонин в более позднее время вырабатывается уже в меньшем количестве, смещение секреции кортизола отражается на метabolизме клеток и организма в целом.

Таблица 2

Основные характеристики сна у небеременных и беременных женщин Ме (25%; 75%)  
Table 2

## The main characteristics of sleep in non-pregnant and pregnant women Me (25%; 75%)

Характеристики сна	№	n	Рабочие дни	Выходные дни
Время засыпания (ВЗ)	1	100	58,8' (30'; 1 ч 30')	1 ч 20' (45'; 2 ч)*
	2	10	30' (15'; 30')	19,8 (15'; 30')
	3	20	23' (10'; 30')	17,4' (10'; 30')
	4	39	25,2' (19,8'± 30')	22,5' (15'; 30')*(0,009)
Время сна (ВС)	1	100	6 ч 52' (6 ч 10'; 7 ч 50')	8 ч 55,3' (7 ч 54'; 10 ч 2') *
	2	10	8 ч 15' (7 ч 50'; 8 ч 30')	9 ч 35' (9 ч 20'; 10 ч) *(0,007)
	3	20	8 ч 5' (7 ч 20'; 9 ч)	8 ч 50' (8 ч 15'; 9 ч)*(0,007)
	4	39	7 ч 35' (6 ч 30'; 9 ч 30')	8 ч 55' (7 ч 50'; 9 ч 30')*(0,002)
Продолжительность сна (ВЗ+ВС)	1	100	7 ч 46' (6 ч 30'; 8 ч)	9 ч 34' (8 ч 30'; 10 ч 51')*
	2	10	8 ч 45' (8 ч; 9 ч)	9 ч 50' (9 ч 35'; 10 ч 30')*(0,007)
	3	20	8 ч 43' (7 ч 42'; 9 ч 30')	9 ч 23' (8 ч 40'; 10 ч)*(0,03)
	4	39	8 ч 45' (7 ч 35'; 10 ч)	9 ч 30' (9 ч; 10 ч 25')*(0,0008)
Середина сна	1	100	3 ч 33' (3 ч 15'; 4 ч)	5 ч 18' (4 ч 30'; 6 ч)*
	2	10	2 ч 31' (2 ч 30'; 2 ч 58')	3 ч 48' (3 ч 54'; 4 ч 15')*(0,005)
	3	20	3 ч 25' (2 ч 42'; 4 ч 15')	4 ч 02' (3 ч 38'; 4 ч 52') *(0,00008)
	4	39	3 ч 15' (3 ч; 3 ч 45')	4 ч 15' (3 ч 43'; 4 ч 41') *(0,00002)
«Джетлаг» (десинхроноз)	1	210		1 ч 44' (1 ч; 2 ч 30')
	2	10		1 ч 8' (45'; 2 ч)
	3	20		35' (2'; 1 ч)
	4	39		53' (7'; 1 ч 15')
Середина сна ВД с коррекцией	1	210	4 ч 41'(3 ч 56'; 5 ч 23')	Xронотип [15]
	2	10	3 ч 32'(3 ч 22'; 3 ч 52')	slightly late
	3	20	3 ч 51'(3 ч 13'; 4 ч 30')	intermediate
	4	39	3 ч 48'(3 ч 43'; 4 ч 40')	intermediate

Примечание: \*p&lt;0,05 между рабочими и выходными днями по критерию Вилкоксона

Note: \*p- between working days and weekends according to the Wilcoxon criterion

Во всех группах средняя длительность (время) сна в ВД выше, чем в рабочие (таблица 2), поэтому для определения хронотипа проводили коррекцию времени сна в выходные дни (ССк) [23] по формуле:

$$CC_k = CC_{Bd} - (BC_{Bd} - BC_{cp})/2,$$

где СС<sub>k</sub> – середина сна корректируемая  
 СС<sub>Bd</sub> – середина сна в выходные дни  
 ВС<sub>Bd</sub> – время сна в выходные  
 ВС<sub>cp</sub> – время сна среднее за неделю

Математическая коррекция показателя «средней продолжительности сна в ВД» с учетом недосыпания в РД сдвигает хронотип ближе к полуночи (таблица 2), что учитывает социальный аспект рабочих и выходных дней. По этому показателю во всех триместрах

беременности был определен intermediate chronotype (ImCht) «средний» хронотип, у небеременных девушек - slightly late chronotype (SLCht) «слегка поздний» хронотип, что может говорить в пользу большей стабильности сна при физиологическом течении беременности. По данным литературы (2017) года самым распространенным и физиологичным является ImCht «средний» хронотип [23]. Слегка поздний хронотип здоровых небеременных девушек (SLCht) можно объяснить режимом дня, который предполагает активность в вечернее время суток, продиктованную изучением учебного материала. Т.к. максимальная концентрация мелатонина находится в промежутке от 2-х до 4-х часов утра, снижается к утренним часам [24], то, чем ближе середина сна человека к данному периоду, тем более физиологичен сон, что

мы и наблюдаем у беременных в ВД (таблица 2). Предполагается, что определение хронотипа по Мюнхенскому опроснику соответствует фазе максимальной концентрации мелатонина в крови [23, 25]. У здоровых небеременных женщин этот параметр сна сдвинут более чем на час к утренним часам, что указывает на наличие десинхроноза.

Корреляционный анализ по Пирсону и Спирмену представлен в таблице 3. У здоровых небеременных женщин

присутствуют взаимосвязи между всеми исследуемыми параметрами, тогда как при физиологической беременности они отсутствуют, за исключением корреляции «джетлага» и середины сна в III триместре беременности (4 группа). Данный факт может свидетельствовать о перестройке адаптивных реакций при беременности, смене взаимодействий между звеньями НЭИМ-системы, включении новых контуров регуляции, например, плаценты с ее нейро-эндокринной функцией.

Таблица 3

### Корреляция показателей сна по Пирсону (здоровые небеременные)/Спирмену (здоровые беременные) ( $R, p$ )

Table 3

#### Pearson correlation of sleep indicators (healthy non-pregnant)/Spearman (healthy pregnant women) ( $R, p$ )

Показатель	Группы	Время засыпания	Середина сна	«Джетлаг»
Рабочие дни				
Время сна	1	-0,516**	-0,640**	-0,390**
Время засыпания	1	-	0,479**	-0,352**
Середина сна	1 4 (Спирмен)			0,269** 0,468*
Выходные дни				
Время сна	1	-0,245*	-	-0,677**
Время засыпания	1		0,615**	-0,288**
Середина сна	1 4 (Спирмен)			0,288** 0,628*

Примечание: РД, ВД – рабочие и выходные дни; \* корреляция значима на уровне 0,05; \*\* корреляция значима на уровне 0,01.

Note: РД, ВД – working days and weekends; \* correlation is significant at the 0.05 level; \*\* correlation is significant at the level of 0.01.

В данном контексте возникает вопрос, который длительное время обсуждается в литературе – в реализации хронотипа преобладает генетическая, или социальная составляющая? В физиологической реализации хронотипа первична работа циркадных биологических часов организма, однако хронотип человека зависит еще от продолжительности светового дня (фотопериода), времени года и возраста. В нашем исследовании все респонденты проходили опрос в весенний сезон, когда величина фотопериода постепенно нарастает, по среднему возрасту они попадают в одну декаду. В литературе присутствует взаимосвязь между хронотипом и воздействием света

(время, проведенное на открытом воздухе по оценке MCTQ), но по данным опросника у наших респондентов достоверных отличий нет. Опираясь на результаты исследования, можно предположить, что вероятнее всего, в группе здоровых беременных происходит переход к генетически определённой составляющей, т.е. ближе к физиологическим биоритмам организма, тогда как у здоровых небеременных хронотип больше управляет социумом, ритмом жизни и обучения. Таким образом, можно полагать, что под действием факторов внешней среды возможно изменение (перестройка) хронотипа, а при гестации, несмотря на внешние воздействия, изменение

гормонального статуса приводит к физиологической модификации хронотипа.

Необходимо отметить, что, несмотря на компенсаторно-восстановительный сон в выходные дни, его продолжительность, вероятно, недостаточна для предотвращения недостатков, вызванных недосыпанием в течение недели [26, 27]. Тем не менее, данная продолжительность сна может способствовать устранению целого ряда нарушений физического и психического здоровья [28], связанных с секрецией мелатонина и перестройкой НЭИМ-системы. Любое снижение секреции мелатонина вочные часы при гестации может стать причиной развития таких осложнений, как преэклампсия, невынашивание беременности [29].

**Заключение.** Физиологическое развитие беременности с сохранением суточной цикличности процессов адаптации определяется зависимостью между характером перестройки организма матери и изменениями в репродуктивных органах под влиянием НЭИМ-системы.

Биоритмологический подход к оценке суточного цикла беременной позволяет повысить эффективность диагностики ранних осложнений гестации, связанных с нарушением синтеза мелатонина. Полученные результаты демонстрируют изменение характеристик сна при физиологической беременности и свидетельствуют о значимости анализа качества сна во время гестации. Это позволяет судить о характере адаптации в период гестации по триместрам и циркадной организации мелатонинового обмена (центрального и периферического).

Своевременная оценка показателей сна и их нарушений во время гестации может предупредить развитие осложнений периода беременности.

## Информация о финансировании

Финансирование исследования проводилось в рамках комплексной темы Г3 НИР ИБМИ ВНЦ РАН (2019-2021 гг.).

## Financial support

*The study was financed within the framework of the complex topic of the State Budget for Research and Development of the Institute for Biomedical Research, Vladikavkaz Scientific Center of the Russian Academy of Sciences (2019-2021).*

## Конфликт интересов

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

## Conflict of interests

*The authors have no conflict of interest to declare.*

## Список литературы

1. Zeng Z, Liu F, Li S. Metabolic adaptations in pregnancy: An overview. Annals of Nutrition and Metabolism. 2017;70(1):59-65. DOI: <https://doi.org/10.1159/000459633>
2. Кутузова ЛА, Верченко ИА, Куница ВН, и др. Особенности влияния прогестерона и эстрогенов на течение беременности и развитие плода. В: Халикова АР, редактор. Наука в XXI веке: инновационный потенциал развития. Материалы международной научно-практической конференции; 10 декабря 2019 г. Уфа: ФГБОУ ВО «УГАТУ»; 2019:183-190.
3. Довжикова ИВ, Андриевская ИА, Петрова КК. Рецепторы прогестерона: репродуктивная роль. Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2018;70:104-112. DOI: [https://doi.org/10.12737/article\\_5c1278d242a333.68376622](https://doi.org/10.12737/article_5c1278d242a333.68376622)
4. Голоков ВА, Шнайдер НА, Николаева ТЯ, и др. Нарушение сна и беременность (анализ литературы). Вестник Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Амосова. Серия: Медицинские науки. 2019;2(15):81-93. DOI: [https://doi.org/10.25587/SVFU.2019.2\(15\).31316](https://doi.org/10.25587/SVFU.2019.2(15).31316)
5. Сидоренко ВН, Аринчина НГ, Дунай ВИ, и др. Особенности нарушений сна у беременных женщин. Медицинский журнал. 2014;1:149-153.
6. Магомедова АЗ. Предоставление медикаментозного сна-отдыха с применением мелатонина беременным при патологическом прелиминарном периоде. Журнал акушерства и женских болезней. 2017;66:3-40.
7. Chakradeo PS, Keshavarzian A, Singh S, et al. Chronotype, social jet lag, sleep debt and food timing in inflammatory bowel disease. Sleep

- Medicine. 2018;52:188-195. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2018.08.002>
8. Чумак ЗВ, Шаповал НВ, Манасова ГС, и др. Мелатонин и его регулирующее влияние на гормональном, тканевом и клеточном уровнях. Медицинский журнал. 2017;2(60):58-62.
9. Голоков ВА, Шнайдер НА, Николаева ТЯ, и др. Мелатонин и беременность: нейрофизиология, влияние на патологические состояния матери и плода, участие в фетальном программировании (анализ литературы). Вестник Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Амосова. Серия: Медицинские науки. 2019;1(14):5-18. DOI: [https://doi.org/10.25587/SVFU.2019.1\(14\).27471](https://doi.org/10.25587/SVFU.2019.1(14).27471)
10. Hiroshi T, Akihisa T, Toshiaki T, et al. Melatonin and female reproduction. Journal of Obstetrics and Gynaecology Research. 2014;40(1):1-11. DOI: <https://doi.org/10.1111/jog.12177>
11. Абсатарова ЮС, Андреева ЕН, Шереметьева ЕВ, и др. Мелатонин в репродукции человека. Проблемы репродукции. 2016;22(1):8-11. DOI: <https://doi.org/10.17116/repro20162218-11>
12. Do Amaral FG, Andrade-Silva J, Kuwabara WMT, et al. New insights into the function of melatonin and its role in metabolic disturbances. Expert Review of Endocrinology and Metabolism. 2019;14(4):293-300. DOI: <https://doi.org/10.1080/17446651.2019.1631158>
13. Айламазян ЭК, Евсюкова ИИ, Кветной ИМ. Мелатонин: беременность и роды. Журнал акушерства и женских болезней. 2014;63(2):67-77. DOI: <https://doi.org/10.17816/JOWD63267-77>
14. Коломейчук СН, Теплова ЛИ. Качество и параметры сна у школьников. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Специ выпуск. 2017;117(11-2):92-96. DOI: <https://doi.org/10.17116/jnevro201711711292-96>
15. Roenneberg T, Wirz-Justice A, Merrow M. Life between Clocks: Daily Temporal Patterns of Human Chronotypes. Journal of Biological Rhythms. 2003;18(1):80-90. DOI: <https://doi.org/10.1177/0748730402239679>
16. Kantermann T, Eastman CI. Circadian phase, circadian period and chronotype are reproducible over months. Chronobiology International. 2018;35(2):280-288. DOI: <https://doi.org/10.1080/07420528.2017.1400979>
17. Vetter C, Winnebeck EC, Roenneberg T. Asking the Clock: How to Use Information from Questionnaires for Circadian Phenotyping. In: Brown SA, editor. Circadian Clocks. Methods in Molecular Biology. 2021;2130:79-85. Humana, New York, NY. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0381-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0381-9_6)
18. Кантимирова ЕА, Шнайдер НА, Петрова ММ, и др. Нарушения сна у женщин. Проблемы женского здоровья. 2014;9(4):57-62.
19. Селиванова КМ, Самородова ЕД. Физиолого-гигиеническая характеристика сна беременных женщин. В: Молодежь - практическому здравоохранению: Материалы XII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых-медиков; 18 мая 2018 г. Тверь: ГБОУ ВПО ТГМА Минздрава России; 2018:902-904.
20. Tuksanova DI, Gafurova MS. Analysis of women's sleep quality during pregnancy. Biologiya i integrativnaya meditsina. 2020;6(46):41-48.
21. Бурчаков ДИ, Тардов МВ. Расстройства сна во время беременности. Эффективная фармакотерапия. 2016;19:36-43.
22. Филинина АВ, Тетерлева МВ. Нарушения сна у беременных. В: Научное сообщество студентов XXI столетия. Естественные науки. Материалы студенческой международной научно-практической конференции; 24 мая 2021 г. Новосибирск: ООО «СибАК»; 2021:35-39.
23. Roenneberg T, Pilz LK, Zerbini G, et al. Chronotype and Social Jetlag: A (Self-) Critical Review. Biology. 2019;8(3):54. DOI: <https://doi.org/10.3390/biology8030054>
24. Pfeffer M, Rauch A, Korf HW, et al. The Endogenous Melatonin (MT) Signal Facilitates Reentrainment of the Circadian System to Light-Induced Phase Advances by Acting Upon MT2 Receptors. Chronobiology International. 2012;29(4):415-429. DOI: <https://doi.org/10.3109/07420528.2012.667859>
25. Kantermann T, Sung H, Burgess HJ. Comparing the Morningness-Eveningness Questionnaire and Munich ChronoType Questionnaire to the Dim Light Melatonin Onset. Journal of Biological Rhythms. 2015;30(5):449-453. DOI: <https://doi.org/10.1177/0748730415597520>
26. Depner CM, Melanson EL, Eckel RH, et al. Ad libitum Weekend Recovery Sleep Fails to Prevent Metabolic Dysregulation during a Repeating Pattern of Insufficient Sleep and

Weekend Recovery Sleep. Current Biology. 2019;29(6):957-967. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.01.069>

27. Воробьева ЯО, Коростовцева ЛС, Бочкарев МВ, и др. Особенности нарушений сна при беременности и возможности профилактики осложнений беременности [Электронный ресурс]. Вестник терапевта. 2020 [дата обращения 30.01.2022];1(44). URL: <https://journal.therapy.school/statyi/osobennosti-narushenij-sna-pri-beremennosti-i-vozmozhnosti-profilaktiki-oslozhnenij-beremennosti>

28. Akerstedt T, Ghilotti F, Grotta A, et al. Sleep duration and mortality - Does weekend sleep matter? Journal of Sleep Research. 2019;28(1):e12712. DOI: <https://doi.org/10.1111/jsr.12712>

29. Bouchlariotou S, Liakopoulos V, Giannopoulou M, et al. Melatonin secretion is impaired in women with preeclampsia and an abnormal circadian blood pressure rhythm. Renal Failure. 2014;36(7):1001-1007. DOI: <https://doi.org/10.3109/0886022X.2014.926216>

## References

1. Zeng Z, Liu F, Li S. Metabolic adaptations in pregnancy: An overview. Annals of Nutrition and Metabolism. 2017;70(1):59-65. DOI: <https://doi.org/10.1159/000459633>
2. Kutuzova LA, Verchenko IA, Kunitsa VN, et al. Features of the influence of progesterone and estrogens on the course of pregnancy and fetal development. In: Khalikova AR, editor. Science in the 21st century: innovative development potential. Materials of the international scientific-practical conference; 2019 Dec 10. Ufa: FGBOU VO "UGATU"; 2019:183-190. Russian.
3. Dovzhikova IV, Andrievskaya IA, Petrova KK. Progesterone receptors: a reproductive role. Bulletin Physiology and Pathology of Respiration. 2018;70:104-112. Russian. DOI: [https://doi.org/10.12737/article\\_5c1278d242a333.68376622](https://doi.org/10.12737/article_5c1278d242a333.68376622)
4. Golokov VA, Schnider NA, Nikolaeva TYa, et al. Sleep disorders and pregnancy (review of literature). Vestnik of North-Eastern federal university. Series "Medical sciences". 2019;2(15):81-93. Russian. DOI: [https://doi.org/10.25587/SVFU.2019.2\(15\).31316](https://doi.org/10.25587/SVFU.2019.2(15).31316)
5. Sidorenko VN, Arinchina NG, Danube VI, et al. Features of sleep disorders in pregnant women. Meditsinskiy zhurnal. 2014;1:149-153. Russian.
6. Magomedova AZ. Provision of medical sleep-rest with the use of melatonin to pregnant women with a pathological preliminary period. Journal of Obstetrics and Women's Diseases. 2017;66:3-40. Russian.
7. Chakradeo PS, Keshavarzian A, Singh S, et al. Chronotype, social jet lag, sleep debt and food timing in inflammatory bowel disease. Sleep Medicine. 2018;52:188-195. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2018.08.002>
8. Chumak ZV, Shapoval NV, Manasova GS, et al. Melatonin and its regulatory effect on the hormone, tissue and cellular levels. Meditsinskiy zhurnal. 2017;2(60):58-62. Russian.
9. Golokov VA, Schnider NA, Nikolaeva TYa, et al. Melatonin and pregnancy: neurophysiology, influence on the pathological conditions of the mother and fetus, participation in fetal programming (Analysis of literature). Vestnik of North-Eastern Federal University. Series "Medical sciences". 2019;1(14):5-18. Russian. DOI: [https://doi.org/10.25587/SVFU.2019.1\(14\).27471](https://doi.org/10.25587/SVFU.2019.1(14).27471)
10. Hiroshi T, Akihisa T, Toshiaki T, et al. Melatonin and female reproduction. Journal of Obstetrics and Gynaecology Research. 2014;40(1):1-11. DOI: <https://doi.org/10.1111/jog.12177>
11. Absatarova YuS, Andreeva EN, Sheremet'eva EV, et al. Melatonin in human reproduction. Russian Journal of Human Reproduction. 2016;22(1):8-11. Russian. DOI: <https://doi.org/10.17116/repro20162218-11>
12. Do Amaral FG, Andrade-Silva J, Kuwabara WMT, et al. New insights into the function of melatonin and its role in metabolic disturbances. Expert Review of Endocrinology and Metabolism. 2019;14(4):293-300. DOI: <https://doi.org/10.1080/17446651.2019.1631158>
13. Aylamazyan EK, Evsyukova II, Kvetnaya IM. Melatonin: pregnancy and labor. Journal of Obstetrics and Women's Diseases. 2014;63(2):67-77. Russian. DOI: <https://doi.org/10.17816/JOWD63267-77>
14. Kolomeichuk SN, Teplova LI. Sleep quality and its parameters in schoolchildren. Zhurnal Nevrologii i Psichiatrii imeni S.S. Korsakova. 2017;117(11-2):92-96. Russian. DOI: <https://doi.org/10.17116/jnevro201711711292-96>
15. Roenneberg T, Wirz-Justice A, Merrow M. Life between Clocks: Daily Temporal Patterns of Human Chronotypes. Journal of Biological Rhythms. 2006;21(2):119-129. DOI: <https://doi.org/10.1177/0732164005280010>

Rhythms. 2003;18(1):80-90. DOI:  
<https://doi.org/10.1177/0748730402239679>

16. Kantermann T, Eastman CI. Circadian phase, circadian period and chronotype are reproducible over months. Chronobiology International. 2018;35(2):280-288. DOI:  
<https://doi.org/10.1080/07420528.2017.1400979>

17. Vetter C, Winnebeck EC, Roenneberg T. Asking the Clock: How to Use Information from Questionnaires for Circadian Phenotyping. In: Brown SA, editor. Circadian Clocks. Methods in Molecular Biology. 2021;2130:79-85. Humana, New York, NY. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0381-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0381-9_6)

18. Kantimirova EA, Shnayder NA, Petrova MM, et al. Sleep disorders in women. Problems of women health. 2014;9(4):57-62. Russian.

19. Selivanova KM, Samorodova ED. Physiological and hygienic characteristics of sleep in pregnant women. In: Youth - practical health care: Materials of the XII International scientific-practical conference of students and young medical scientists; 2018 May 18. Tver: State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education TSMA of the Ministry of Health of Russia; 2018:902-904. Russian.

20. Tuksanova DI, Gafurova MS. Analysis of women's sleep quality during pregnancy. Biologiya i integrativnaya meditsina. 2020;6(46):41-48.

21. Burchakov DI, Tardov MV. Sleep disorders in pregnancy. Effektivnaya farmakoterapiya. 2016;19:36-43. Russian.

22. Filyanina AV, Teterleva MV. Sleep disorders in pregnant women. In: Scientific community of students of the XXI century. Natural Sciences. Materials of student international scientific-practical conference; 2021 May 24. Novosibirsk: OOO «SibAK»; 2021:35-39. Russian.

23. Roenneberg T, Pilz LK, Zerbini G, et al. Chronotype and Social Jetlag: A (Self-) Critical Review. Biology. 2019;8(3):54. DOI:  
<https://doi.org/10.3390/biology8030054>

24. Pfeffer M, Rauch A, Korf HW, et al. The Endogenous Melatonin (MT) Signal Facilitates Reentrainment of the Circadian System to Light-Induced Phase Advances by Acting Upon MT2 Receptors. Chronobiology International. 2012;29(4):415-429. DOI:  
<https://doi.org/10.3109/07420528.2012.667859>

25. Kantermann T, Sung H, Burgess HJ. Comparing the Morningness-Eveningness Questionnaire and Munich ChronoType

Questionnaire to the Dim Light Melatonin Onset. Journal of Biological Rhythms. 2015;30(5):449-453. DOI:  
<https://doi.org/10.1177/0748730415597520>

26. Depner CM, Melanson EL, Eckel RH, et al. Ad libitum Weekend Recovery Sleep Fails to Prevent Metabolic Dysregulation during a Repeating Pattern of Insufficient Sleep and Weekend Recovery Sleep. Current Biology. 2019;29(6):957-967. DOI:  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.01.069>

27. Vorobieva YaO, Korostovtseva LS, Bochkarev MV, et al. Features of sleep disorders during pregnancy and the possibility of preventing pregnancy complications [Internet]. Vestnik terapevta. 2020 [cited 2022 January 30];1(44). Russian. Available from:  
<https://journal.therapy.school/statyi/osobennosti-narushenij-sna-pri-beremennosti-i-vozmozhnosti-profilaktiki-oslozhnenij-beremennosti>

28. Akerstedt T, Ghilotti F, Grotta A, et al. Sleep duration and mortality - Does weekend sleep matter? Journal of Sleep Research. 2019;28(1):e12712. DOI:  
<https://doi.org/10.1111/jsr.12712>

29. Bouchlariotou S, Liakopoulos V, Giannopoulou M, et al. Melatonin secretion is impaired in women with preeclampsia and an abnormal circadian blood pressure rhythm. Renal Failure. 2014;36(7):1001-1007. DOI:  
<https://doi.org/10.3109/0886022X.2014.926216>

Статья поступила в редакцию 11 августа 2021 г.  
Поступила после доработки 13 января 2022 г.  
Принята к печати 10 февраля 2022 г.

Received 11 August 2021

Revised 13 January 2022

Accepted 10 February 2022

## Информация об авторах

**Мадина Давидовна Бароева**, аспирант по научной специальности 3.1.4 – Акушерство и гинекология ФГБОУ ВО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия», г. Владикавказ, младший научный сотрудник Института биомедицинских исследований – филиал ФГБУН ФНЦ «Владикавказский научный центр Российской академии наук», г. Владикавказ, Российская Федерация, E-mail: [vip.baroeva@mail.ru](mailto:vip.baroeva@mail.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3978-743X>.

**Лариса Суреновна Попова**, кандидат медицинских наук, доцент кафедры акушерства

и гинекологии №1 ФГБОУ ВО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия», г. Владикавказ, старший научный сотрудник Института биомедицинских исследований – филиал ФГБУН ФНЦ «Владикавказский научный центр Российской академии наук», г. Владикавказ, Российская Федерация, E-mail: larisa\_s\_popova@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3546-4385>.

**Фатима Сергеевна Датиева**, доктор медицинских наук, директор Института биомедицинских исследований – филиал ФГБУН ФНЦ «Владикавказский научный центр Российской академии наук», г. Владикавказ, Российская Федерация, E-mail: faaroo@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1636-9174>.

**Лариса Владимировна Цаллагова**, доктор медицинских наук, профессор кафедры акушерства и гинекологии №1 ФГБОУ ВО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия», г. Владикавказ, заведующий отделением отдела патологии матери и ребенка Института биомедицинских исследований – филиал ФГБУН ФНЦ «Владикавказский научный центр Российской академии наук», г. Владикавказ, Российская Федерация, E-mail: akusherstvo\_1@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0514-3038>.

**Елена Казбековна Басаева**, кандидат физико-математических наук, заведующий кафедрой прикладной математики и информатики Северо Осетинского государственного университета им. К.Л. Хетагурова, г. Владикавказ, Российская Федерация, E-mail: ek.basaeva@nosu.ru ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9198-7319>.

## Information about the authors

**Madina D. Baroeva**, Post-graduate Student in Scientific Specialty 3.1.4 – Obstetrics and Gynecology, North Ossetian State Medical Academy, Vladikavkaz, Junior Researcher at the Institute of Biomedical Research – Branch of the Vladikavkaz Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Vladikavkaz, Russia, E-mail: vip.baroeva@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3978-743X>.

**Larisa S. Popova**, Cand. Sci. (Medicine), Associate Professor at the Department of Obstetrics and Gynecology No. 1, North Ossetian State Medical Academy, Vladikavkaz, Senior Researcher, Institute of Biomedical Research – Branch of the Vladikavkaz Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Vladikavkaz, Russia, E-mail: larisa\_s\_popova@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3546-4385>.

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

**Larisa V. Tsallagova**, Doct. Sci. (Medicine), Professor at the Department of Obstetrics and Gynecology No. 1, North Ossetian State Medical Academy, Vladikavkaz, Head of the Department of Maternal and Child Pathology, Institute of Biomedical Research – Branch of the Vladikavkaz Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Vladikavkaz, Russia, E-mail: akusherstvo\_1@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0514-3038>.

**Elena K. Basaeva**, Cand. Sci. (Physics and Mathematics), Head of the Department of Applied Mathematics and Computer Science, North Ossetian State University, Vladikavkaz, Russia, E-mail: ek.basaeva@nosu.ru, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9198-7319>.



DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-9

УДК 613.98:612.311:612.392

# Характеристика питания у людей пожилого возраста с адентией: гериатрические и диетологические аспекты

В.А. Борозенцева<sup>1</sup> , В.Ю. Борозенцев<sup>1</sup> , К.И. Прощаев<sup>2</sup> ,  
А.Н. Ильницкий<sup>2</sup> , Т.В. Степанова<sup>3</sup> , Э.В. Фесенко<sup>2</sup> , Е.А. Воронина<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»,  
ул. Победы, д. 85, г. Белгород, 308015, Российской Федерации

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»,  
Ореховый бульвар, д. 28, г. Москва, 115682, Российской Федерации

<sup>3</sup> Автономная некоммерческая организация «Научно-исследовательский медицинский центр «Геронтология»,  
ул. 1-я Аэропортовая, д. 6, г. Москва, 125319, Российской Федерации

<sup>4</sup> Министерство социальной защиты населения Кузбасса,  
пр. Кузнецкий, д. 19А, г. Кемерово, 650991, Российской Федерации  
Автор для переписки: Э.В. Фесенко (*longtermcare.fmba@gmail.com*)

## Резюме

**Актуальность:** На сегодняшний день имеются данные о четкой взаимосвязи степени тяжести адентии как проявления синдрома возрастной полости рта и риском развития синдрома мальнутриции. В связи с этим представляется актуальным изучение характеристик питания людей с адентией до и после зубопротезирования. **Цель исследования:** Изучить основные характеристики питания людей пожилого возраста с адентией до и после зубопротезирования. **Материалы и методы:** В исследование было включено 198 человек пожилого возраста с синдромом возрастной полости рта в виде адентии. Возраст пациентов составил от 60-69 лет, средний возраст составил  $64,2 \pm 2,2$  года, мужчин было 93 чел., женщин – 105 чел. У всех пациентов оценивалась степень адентии. Для оценки характера адентии использовали классификацию Э. Кеннеди. Характеристика питания была дана по опроснику М.В. Королёвой (2020). Характеристики питания изучались до зубопротезирования и через 6 месяцев после его окончания.

**Результаты:** При синдроме возрастной полости рта, проявляющейся адентией, наблюдается закономерное снижение потребляемой белковой пищи (за счет продуктов животного и рыбного происхождения) и свежих овощей и фруктов. С нарастанием тяжести адентии увеличивается потребление соли и сахара. После проведения зубопротезирования диетологические характеристики питания меняются в положительную сторону: увеличивается количество потребления белковой пищи, свежих овощей и фруктов, нормализуются частотные и временные характеристики приема пищи. Однако сокращение потребления соли и сахара остаются на повышенном уровне, что может свидетельствовать о наличии иных, кроме адентии, изначальных нарушений в диетологических характеристиках питания пожилых людей. Это актуализирует

необходимость дальнейших исследований в области функций вкуса и аппетита у пожилых людей с синдромом возрастной полости рта. **Заключение:** Таким образом, синдром возрастной полости рта в виде адентии приводит к нарушению диетологических характеристик питания в виде снижения потребления белковой пищи, потребления свежих овощей и фруктов с одновременным увеличением потребления соли и сахара и кратности приема пищи для достижения насыщения. Восстановление функции ротовой полости у людей с адентией путем восстановления формы и функции зубных рядов улучшает, но не приводит к полной нормализации диетологических характеристик у пожилых людей с синдромом возрастной полости рта, что сохраняет риски для развития синдрома мальнутриции.

**Ключевые слова:** синдром возрастной полости рта; адентия; питание; пожилой возраст; синдром мальнутриции

**Для цитирования:** Борозенцева ВА, Борозенцев ВЮ, Прощаев КИ, и др. Характеристика питания у людей пожилого возраста с адентией: гериатрические и диетологические аспекты. Научные результаты биомедицинских исследований. 2022;8(2): 246-258. DOI:10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-9

## Characteristics of nutrition in elderly people with adentia: geriatric and dietary aspects

Vita A. Borozentseva<sup>1</sup> , Vladislav Yu. Borozentsev<sup>1</sup> , Kirill I. Prashchayeu<sup>2</sup> , Andrei N. Ilnitski<sup>2</sup> , Tat'yana V. Stepanova<sup>3</sup> , Elvira V. Fesenko<sup>2</sup> , Elena A. Voronina<sup>3,4</sup> 

<sup>1</sup> Belgorod State National Research University,  
85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia

<sup>2</sup> Federal Research and Clinical Center for Specialized Types of Medical Care  
and Medical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency,  
28 Orekhovy Blvd., Moscow, 115682, Russia

<sup>3</sup> Research Medical Center «Gerontology»,  
6 1 Aeroportovskaya St., Moscow, 125319, Russia

<sup>4</sup> Ministry of Social Protection of the Population of Kuzbass,  
19A Kuznetsky Ave., Kemerovo, 650991, Russia

Corresponding author: Elvira V. Fesenko ([longtermcare.fmba@gmail.com](mailto:longtermcare.fmba@gmail.com))

### Abstract

**Background:** To date, many evidence-based studies have provided data that give insight into the clear relationship between the severity of adentia as a manifestation of age-related oral syndrome and the risk of developing malnutrition syndrome. At the same time, clinical practice shows that restoring the integrity of the dentition does not reduce the risk of developing malnutrition syndrome to the same level as in people with preserved dentition. Therefore, it seems relevant to study the nutritional characteristics of people with adentia before and after prosthetic dentistry procedures. **The aim of the study:** To study the main nutrition characteristics in elderly people with adentia before and after prosthetic dentistry procedures. **Materials and methods:** The study included 198 elderly people with age-related oral cavity syndrome in the form of adentia. The age of patients ranged from 60 to 69 years, the average age was  $64.2 \pm 2.2$  years, including 93 men and 105 women. The degree of adentia was assessed in all patients. To assess the character of adentia, the classification of E. Kennedy was

used. Nutrition characteristics were given according to the questionnaire by M.V. Koroleva (2020). Nutrition characteristics were studied before prosthetic dentistry procedures and 6 months after its completion. **Results:** In senile mouth, manifested by adentia, there is a natural decrease in protein intake (due to animal and fish products) and fresh vegetables and fruits. With the increasing severity of adentia, the consumption of salt and sugar increases. After prosthetic dentistry procedures, the dietary characteristics of nutrition change in a positive direction: the amount of consumption of protein foods, fresh vegetables and fruits increases, the frequency and time characteristics of food intake normalize. However, the reduction in salt and sugar consumption remains at an elevated level, which may indicate the presence of other than adentia, initial disorders in the dietary characteristics of the elderly. This actualizes the need for further research in the field of taste and appetite functions in elderly people with senile mouth. **Conclusion:** Thus, senile mouth in the form of adentia leads to a violation of the dietary characteristics of nutrition in the form of a decrease in protein intake, consumption of fresh vegetables and fruits with a simultaneous increase in salt and sugar intake and the multiplicity of meals to achieve saturation. Restoring the function of the oral cavity in people with adentia by restoring the shape and function of the dentition improves, but does not lead to complete normalization of dietary characteristics in elderly people with age-related oral cavity syndrome, which preserves the risks for the development of malnutrition syndrome.

**Keywords:** senile mouth; adentia; nutrition; elderly age; malnutrition syndrome

**For citation:** Borozentseva VA, Borozentsev VYu, Prashchayeu KI, et al. Characteristics of nutrition in elderly people with adentia: geriatric and dietary aspects. Research Results in Biomedicine. 2022;8(2): 246-258. Russian. DOI:10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-9

**Введение.** Вопросы питания в пожилом возрасте являются актуальными как для геронтологии, так и для диетологии [1]. Более того, они тесно связаны со стоматологией, потому что потеря зубов закономерно и неминуемо влечет к нарушению выбора продуктов питания – человек подбирает те продукты, которые может потребить в условиях полной или частичной адентии [2, 3]. Таким образом питание пожилых людей является проблемой мультидисциплинарной. Основной целью исследований в области питания в геронтологии является синдром недостаточности питания (синдром мальнутриции) и саркопения в их взаимосвязи, изучение механизмов их прогнозирования, предупреждения, а также коррекции в случае их развития [5, 6]. На сегодняшний день во многих исследованиях с позиций доказательной медицины получены данные, которые дают понимание о четкой взаимосвязи степени тяжести адентии как проявления синдрома возрастной полости рта и риском развития синдрома мальнутриции [7, 8]. Также показано, что адекватное зубопротезирование приводит к снижению этого риска [9]. Вместе с

тем клиническая практика показывает, что восстановление целостности зубных рядов не снижает риск развития синдрома мальнутриции до уровня такого у людей с сохранными зубными рядами. Это свидетельствует о наличии других дополнительных факторов риска развития синдрома мальнутриции при синдроме возрастной полости рта. При этом причины, связанные с наличием других гериатрических синдромов, активно изучаются (например, когнитивные расстройства, синдром одиночества и пр.) [10, 11]. А вот причины диетологического характера остаются пока вне должного зрения исследователей. Поэтому представляется актуальным изучение характеристик питания людей с адентией до и после зубопротезирования.

**Цель исследования.** Изучить основные характеристики питания людей пожилого возраста с адентией до и после зубопротезирования.

**Материалы и методы исследования.** В исследование было включено 198 человек пожилого возраста с синдромом возрастной полости рта в виде адентии. Возраст пациентов составил от 60-69 лет,

средний возраст составил  $64,2 \pm 2,2$  года, мужчин было 93 чел., женщин – 105 чел. Пациенты позднего пожилого возраста в исследование не включались вследствие заранее отягощенного гериатрического и соматического статуса.

Критерии включения: наличие синдрома возрастной полости рта в виде адентии, отсутствие старческой астении и преастении, отсутствие выраженной соматической патологии с декомпенсацией в течение периода наблюдения, отсутствие онкологических и гематологических заболеваний, наличие когнитивного статуса, обеспечивающего продуктивный контакт с исследователем.

Критерии исключения: старческая астения или преастения, выраженная соматическая патология и ее декомпенсация в период наблюдения, дементный уровень когнитивных расстройств.

Ограничения исследования: вариант зубопротезирования не являлся предметом настоящего исследования.

У всех пациентов оценивалась степень адентии. Выраженность адентии определялась степенью утраты зубов. При этом выделяли утрату 1 зуба, 2-5 зубов, 6-10 зубов, 11-20 зубов, 21-35 зубов и полную адентию. Для оценки характера адентии использовали классификацию Э. Кеннеди, применение данной классификации регламентировано Национальным стандартом Российской Федерации, утв. приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 18 декабря 2008 г. N 465-ст. Первый класс адентии диагностировался у людей с частичной адентией с двусторонним концевым дефектом в виде отсутствия моляров с обеих сторон челюсти. Второй класс адентии представлял собой адентию у пациентов с односторонним концевым дефектом, когда у пациентов были утрачены жевательные зубы на одной из сторон челюсти. Третий класс адентии представлял собой односторонний вклю-

ченный дефект в виде отсутствия некоторых моляров или передних зубов. Четвертый класс диагностировался при включенном дефекте передних зубов - полностью отсутствовали зубы в зоне улыбки.

Характеристика питания была дана по опроснику М.В. Королёвой (2020) [12]. При этом изучались следующие характеристики питания: количество приемов пищи в сутки (раз), время между последним приемом пищи и наступлением сна (час), время между последним приемом пищи вечером и первым приемом пищи (час), количество потребляемых в сутки свежих овощей и фруктов (г), количество соли в сутки, добавляемой к пище (г), количество сахара в суточном рационе (чайные ложки), количество потребляемой белковой пищи в сутки (г), количество потребляемой жидкости в сутки (мл/кг). Характеристики питания изучались до зубопротезирования и через 6 месяцев после его окончания.

Результаты были математико-статистически обработаны. Использовалась параметрическая статистика (расчет средних величин, расчет относительных величин и их ошибок). Также применялись методы непараметрической статистики (корреляционный анализ). Достоверными считались различия при вероятности ошибки менее 5% ( $p < 0,05$ ). Обработка статистических данных произведена с помощью пакета прикладных программ STATA ver. 12.

**Результаты и их обсуждение.** На первом этапе исследования были изучены характеристики питания у пожилых людей с адентией до коррекции стоматологического статуса (таблица 1). Оказалось, что при выраженной потере зубов достоверно ( $p < 0,05$ ) увеличивалось количество приемов пищи в сутки. Так, если пожилые люди с потерей 11-20 зубов принимали пищу в среднем  $3,17 \pm 0,24$  раз в сутки, то при потере 21-35 зубов – уже  $4,02 \pm 0,21$  раз в сутки, а при полной адентии –  $4,12 \pm 0,15$  в сутки.

Таблица 1

**Характеристики питания у людей пожилого возраста с некорректированным стоматологическим статусом в зависимости от степени адентии**

Table 1

**Nutrition characteristics of elderly people with uncorrected dental status, depending on the degree of dentia**

Характеристики питания	Выраженность адентии (количество утраченных зубов)					
	1	2-5	6-10	11-20	21-35	Полная адентия
1. Количество приемов пищи в сутки (раз)	3,21 +0,08	3,15 +0,12	3,11 +0,16	3,17 +0,24	4,02 +0,21*	4,12 +0,15
2. Время между последним приемом пищи и наступлением сна (час)	3,10 +0,15	3,15 +0,12	3,14 +0,14	1,15 +0,10*	0,94 +0,22	0,95 +0,16
3. Время между последним приемом пищи вечером и первым приемом пищи (час)	10,09 +0,43	10,16 +0,30	10,00 +0,48	8,02 +0,31*	7,95 +0,34	7,96 +0,29
4. Количество потребляемых в сутки свежих овощей и фруктов (г)	415,2 +8,3	356,13 +6,1*	310,2 +5,3*	250,1 +6,2*	102,0 +8,3*	40,2 +4,2*
5. Количество соли в сутки, добавляемой к пище (г)	5,11 +0,17	7,13 +0,24*	7,26 +0,11	7,72 +0,09*	7,79 +0,21	7,66 +0,24
6. Количество сахара в суточном рационе (чайные ложки)	7,24 +0,15	8,11 +0,20*	8,89 +0,19*	12,82 +0,30*	14,52 +0,31*	14,31 +0,41
7. Количество потребляемой белковой пищи в сутки (г)	1,24 +0,09	1,21 +0,13	1,00 +0,12*	0,75 +0,24*	0,53 +0,18*	0,28 +0,16*
8. Количество потребляемой жидкости в сутки (мл/кг)	30,2 +1,3	31,6 +2,3	37,3 +1,2*	38,4 +1,1	43,1 +0,7*	43,0 +1,1

Примечание: \* $p<0,05$  по сравнению с предыдущей степенью утраты зубов.

Note: \* $p<0,05$  compared to the previous degree of tooth loss.

Выявлено, что начиная со степени адентии в 11-20 утраченных зубов достоверно ( $p<0,05$ ) уменьшалось время между последним приемом пищи и наступлением сна. Так, если у пожилых людей с потерей 6-10 зубов принимали пищу последний раз в среднем за  $3,14\pm0,14$  до сна, то при потере 11-20 зубов – уже за  $1,15\pm0,10$  часа до сна. Соответственно, это влияло на сокращение времени между последним приемом пищи вечером и первым приемом пищи утром с  $10,00\pm0,48$  часа до  $8,02\pm0,31$  часа ( $p<0,05$ ).

С нарастанием адентии прогрессивно снижалось количество потребляемых пожилыми людьми свежих овощей и фруктов. Так, если при утрате 1 зуба суточное потребление составило  $415,2\pm8,3$  г, то при утрате 2-5 зубов –  $356,13\pm6,1$  г, 6-10 зубов –  $310,2\pm5,3$  г, 11-20 зубов –  $250,1\pm6,2$  г, 21-35 зубов –  $102,0\pm8,3$  г, при полной адентии –  $40,2\pm4,2$  г ( $p<0,05$  при сравнении каждого значения с предыдущей степенью адентии).

Начиная со степени адентии на уровне 6-10 утраченных зубов прогрессивно снижалось количество потребляемой белковой пищи в сутки. Так, если при утрате 2-5 зубов суточное потребление белковой пищи составило  $1,21\pm0,13$  г/кг веса в сутки, то при утрате 6-10 зубов –  $1,00\pm0,12$ , 11-20 зубов –  $0,75\pm0,24$ , 21-35 зубов –  $0,53\pm0,18$ , при полной адентии –  $0,28\pm0,16$  г/кг веса ( $p<0,05$  при сравнении каждого значения с предыдущей степенью адентии).

Что касается потребления соли, были получены такие данные. Количество соли в сутки, добавляемой к пище, у пожилых людей с утратой одного зуба составило  $5,11\pm0,17$  г, а вот при потере 2-5 зубов достоверно ( $p<0,05$ ) больше – уже  $7,13\pm0,24$  г. И далее при нарастании степени адентии потребление соли находилось на этом повышенном уровне. Похожая закономерность была выявлена и в отношении потребляемого сахара. Так, если при утрате 1

зуба суточное потребление сахара составило  $7,24 \pm 0,15$  чайных ложек, то при утрате 2-5 зубов –  $8,11 \pm 0,20$ , 6-10 зубов –  $8,89 \pm 0,19$ , 11-20 зубов –  $12,82 \pm 0,30$ , 21-35 зубов –  $14,52 \pm 0,31$  чайных ложек ( $p < 0,05$  при сравнении каждого значения с предыдущей степенью адентии), и сохранялось таким же высоким при полной адентии –  $14,31 \pm 0,2$  чайных ложек. При этом количество потребляемой жидкости в сутки прогрессивно достоверно ( $p < 0,05$ ) возрастало с  $30,2 \pm 1,3$  до  $40,3 \pm 1,0$  мл/кг веса в сутки.

Также, в ходе исследования были рассмотрены далее характеристики питания у пожилых людей до коррекции стоматологического статуса в зависимости от варианта адентии (использовалась классификация Э. Кеннеди) (таблица 2). Оказалось, что при тяжелых вариантах адентии (IV класс, смешанная и полная адентия) достоверно ( $p < 0,05$ ) увеличивалось количество приемов пищи в сутки. Так, если пожилые люди при III классе адентии принимали пищу в среднем  $3,15 \pm 0,18$  раз в сутки, то при IV классе – уже  $4,16 \pm 0,23$  раз в сутки.

### Характеристики питания при адентии у людей пожилого возраста с разными вариантами адентии (по Э. Кеннеди)

**Nutrition characteristics of dentition in elderly people with different variants of dentition (according to E. Kennedy)**

Характеристики питания	Класс адентии					
	I	II	III	IV	Смешанный	Полная адентия
1. Количество приемов пищи в сутки (раз)	$3,13 \pm 0,07$	$3,24 \pm 0,32$	$3,15 \pm 0,18$	$4,16 \pm 0,23^*$	$4,08 \pm 0,19$	$4,12 \pm 0,15$
2. Время между последним приемом пищи и наступлением сна (час)	$3,12 \pm 0,17$	$3,11 \pm 0,11$	$2,19 \pm 0,21^*$	$1,16 \pm 0,34^*$	$1,15 \pm 0,08$	$0,95 \pm 0,16^*$
3. Время между последним приемом пищи вечером и первым приемом пищи (час)	$10,11 \pm 0,38$	$10,15 \pm 0,28$	$8,76 \pm 0,32$	$8,01 \pm 0,11^*$	$7,92 \pm 0,17$	$7,96 \pm 0,29$
4. Количество потребляемых всутки свежих овощей и фруктов (г)	$382,4 \pm 7,0$	$372,15 \pm 6,2$	$158,4 \pm 6,1^*$	$156,2 \pm 6,8$	$80,0 \pm 7,6^*$	$40,2 \pm 4,2^*$
5. Количество соли в сутки, добавляемой к пищи (г)	$5,65 \pm 0,16$	$5,74 \pm 0,23$	$7,58 \pm 0,24^*$	$7,66 \pm 0,31$	$7,69 \pm 0,82$	$7,66 \pm 0,24$
6. Количество сахара в суточном рационе (чайные ложки)	$7,56 \pm 0,20$	$7,66 \pm 0,15$	$9,88 \pm 0,21^*$	$10,02 \pm 0,28$	$14,16 \pm 0,34^*$	$14,31 \pm 0,41$
7. Количество потребляемой белковой пищи в сутки (г)	$1,02 \pm 0,08$	$0,75 \pm 0,16^*$	$0,72 \pm 0,11$	$0,60 \pm 0,05^*$	$0,45 \pm 0,07^*$	$0,28 \pm 0,16^*$
8. Количество потребляемой жидкости в сутки (мл/кг)	$30,8 \pm 1,2$	$31,2 \pm 1,9$	$37,8 \pm 1,3^*$	$38,5 \pm 1,3$	$44,1 \pm 1,2^*$	$43,0 \pm 1,1$

Примечание: \* $p < 0,05$  по сравнению с предыдущим классом адентии.

Note: \* $p < 0,05$  compared to the previous dentition class.

Следует отметить, что начиная с III класса адентии достоверно ( $p < 0,05$ ) уменьшалось время между последним приемом пищи и наступлением сна. Так, если пожилые люди со II классом адентии принимали пищу последний раз в среднем за  $3,11 \pm 0,11$  часа до сна, то при потере 11-20 зубов – уже за  $2,19 \pm 0,21$  часа до сна. Соответственно, это влияло на сокращение времени между

последним приемом пищи вечером и первым приемом пищи утром с  $10,15 \pm 0,28$  часа до  $8,76 \pm 0,32$  часа ( $p < 0,05$ ).

С нарастанием адентии прогрессивно достоверно ( $p < 0,05$ ) снижалось количество потребляемых пожилыми людьми свежих овощей и фруктов. Так, если при I классе адентии суточное потребление составило  $382,4 \pm 7,0$  г, при II –  $372,15 \pm 6,2$  г, то при

III – 158,4±6,1 г, IV – 156,2 ±6,8 г, смешанном варианте – 80,0±7,6 г, при полной адентии – 40,2±4,2 г. Такая же закономерность прослеживалась и в отношении потребления белковой пищи. Например, если при I классе адентии суточное потребление белковой пищи составило 1,02±0,08 г/кг веса в сутки, то при IV – 0,60±0,05 г/кг веса ( $p<0,05$ ).

В отношении потребления соли, сахара и жидкости были получены данные, сходные с аналитикой потребления этих продуктов в зависимости от количества утраченных зубов: при нарастании класса

адентии потребление этих продуктов достоверно ( $p<0,05$ ) увеличивалось.

Был проведен подобный анализ и для людей с корrigированным стоматологическим статусом (таблица 3). Оказалось, что количество приемов пищи в сутки оставалось таким же, как и до зубопротезирования, то есть на уровне 3,11-3,53 раза в сутки. Исключение составили пациенты с полной адентией, у которых количество приемов пищи достоверно снизилось с 4,12±0,15 до 3,15±0,16, что соответствовало уровню показателя у других пациентов.

### Характеристики питания при адентии у людей пожилого возраста с корректированным стоматологическим статусом

Table 3

Nutritional characteristics of dentia in elderly people with corrected dental status

Характеристики питания	Выраженность адентии (количество утраченных зубов)					
	1	2-5	6-10	11-20	21-35	Полная адентия
1. Количество приемов пищи в сутки (раз)	3,15 ±0,05	3,24 ±0,31	3,18 ±0,17	3,53 ±0,38	3,11 ±0,14	3,15 ±0,16
2. Время между последним приемом пищи и наступлением сна (час)	3,12 ±0,21	3,24 ±0,11	3,17 ±0,16	1,99 ±0,11*	1,82 ±0,20	1,81 ±0,15
3. Время между последним приемом пищи вечером и первым приемом пищи (час)	10,11 ±0,34	9,85 ±0,32	10,01 ±0,36	9,01 ±0,24*	9,12 ±0,31	9,15 ±0,27
4. Количество потребляемых всутки свежих овощей и фруктов (г)	411,3 ±8,4	412,2 ±6,0	411,3 ±5,2	262,1 ±7,3*	202,2 ±5,2*	192,4 ±9,3
5. Количество соли в сутки, добавляемой к пище (г)	5,15 ±0,17	5,24 ±0,20	5,63 ±0,12	7,71 ±0,11*	7,54 ±0,13	7,55 ±0,31
6. Количество сахара в суточном рационе (чайные ложки)	7,56 ±0,22	7,23 ±0,24	7,65 ±0,48	12,11 ±0,29*	12,51 ±0,44	12,88 ±0,33
7. Количество потребляемой белковой пищи в сутки (г)	1,24 ±0,08	1,24 ±0,18	1,21 ±0,11	1,01 ±0,04	0,80 ±0,08*	0,78 ±0,06
8. Количество потребляемой жидкости в сутки (мл/кг)	31,4 ±1,4	31,3 ±2,1	31,2 ±1,4	31,3 ±1,2	37,2 ±0,5*	38,3 ±0,7

Примечание: \* $p<0,05$  по сравнению с предыдущей степенью утраты зубов

Note: \* $p<0,05$  compared to the previous dentia class.

Нами было отмечено, что при изначальной выраженной утрате зубов после зубопротезирования все равно при изначально выраженных степенях адентии сохранялось сокращение времени между последним приемом пищи и наступлением сна. Так, начиная со степени адентии в 11-20 утраченных зубов достоверно ( $p<0,05$ )

уменьшалось время между последним приемом пищи и наступлением сна. Так, если у пожилых людей с потерей 6-10 зубов принимали пищу последний раз в среднем за 3,17±0,16 до сна, то при потере 11-20 зубов – уже за 1,19±0,11 часа до сна. Соответственно, это влияло на сокращение времени между последним приемом пищи вечером и первым приемом пищи утром с 10,01±0,36

часа до  $9,01 \pm 0,24$  часа ( $p < 0,05$ ). Вместе с тем, показатели времени приема пищи были лучшими, чем до зубопротезирования. Например, если до зубопротезирования время между последним приемом пищи вечером и наступления сна составило  $0,95 \pm 0,16$  часа, то после –  $1,81 \pm 0,15$  часа ( $p < 0,05$ ).

Сохранялась ситуация, при которой люди с выраженным степенями адентии потребляли меньше овощей и фруктов. Так, если при утрате 1 зуба суточное потребление составило  $411,3 \pm 8,4$  г, 2-5 зубов –  $412,2 \pm 6,0$  г, 6-10 зубов –  $411,3 \pm 5,2$  г, то при утрате 11-20 зубов уже достоверно ( $p < 0,05$ ) меньше –  $264,1 \pm 7,3$  г, 21-35 зубов –  $202,0 \pm 5,2$  г, при полной адентии –  $192,2 \pm 9,3$ . Однако даже эти сниженные показатели потребления были выше, чем до зубопротезирования. Например, если при полной адентии до зубопротезирования люди потребляли в сутки в среднем только  $40,2 \pm 4,2$  г свежих овощей и фруктов, то после – уже  $192,4 \pm 9,3$  г ( $p < 0,05$ ). Аналогичная ситуация наблюдалась и в отношении потребления белковой пищи, однако все же она была лучше, чем до зубопротезирования.

Вместе с тем, сохранялось повышенное потребление сахара и соли при изначально тяжелых вариантах адентии. Что касается потребления соли, то были, в частности, получены такие данные. Количество соли в сутки, добавляемой к пище, у пожилых людей с утратой 6-10 зубов составило  $5,63 \pm 0,12$  г, а вот при потере 11-20 зубов достоверно ( $p < 0,05$ ) больше – уже  $7,71 \pm 0,11$  г. Такая же ситуация была в отношении потребления сахара. Так, если при утрате 6-10 зубов суточное потребление сахара составило  $7,64 \pm 0,48$  чайных ложек, то при утрате 11-20 зубов – уже  $11,11 \pm 0,29$  чайных ложек ( $p < 0,05$ ). При этом количество потребляемой жидкости при изначально выраженных вариантах адентии сохранялось на избыточных значениях.

Полученные результаты подтвердили полученные другими исследователями данные о том, что действительно при синдроме возрастной полости рта, проявляющейся адентией, наблюдается закономерное снижение потребляемой белковой пищи (за-

счет продуктов животного и рыбного происхождения) и свежих овощей и фруктов [13]. Это происходит за счет того, что люди пожилого возраста с адентией ограничивают потребление этих продуктов из-за нарушения функции жевания и измельчения пищи. Но в то же время нами были получены данные и о других особенностях питания. В частности, в нашем исследовании мы получили данные о том, что с нарастанием тяжести адентии увеличивается потребление соли и сахара. Увеличение потребление соли можно объяснить необходимостью усиливать вкусовые ощущение тех продуктов, которые человек с адентией может потребить, а увеличение потребление сахара – необходимостью достичь чувства насыщения и удовольствия. Для этого также используются и сахаросодержащие напитки, что приводит к увеличению количества потребляемой жидкости. Но также к увеличению количества потребляемой жидкости приводит и повышение потребления соли. Также необходимостью достижения чувства насыщения свидетельствует и сниженное время между последним приемом пищи вечером и сном и увеличение кратности питания при нарастании адентии. Это свидетельствует о недостаточном потреблении нутриентов пациентами с адентией. С другой стороны, это приводит к сокращению времени между последним приемом пищи вечером и первым приемом пищи утром, что является фактором, провоцирующим негативизацию соматического статуса. Тем более что сам по себе синдром мальнутриции ассоциирован с прогрессированием соматической патологии и процессами инфламмайдинга [14-17].

После проведения зубопротезирования диетологические характеристики питания меняются в положительную сторону: увеличивается количество потребления белковой пищи, свежих овощей и фруктов, нормализуются частотные и временные характеристики приема пищи. Однако сокращение потребления соли и сахара остаются на повышенном уровне, что может свидетельствовать о наличии иных, кроме адентии, изначальных нарушений в диетологических характеристиках питания пожилых

людей. Это может быть связано с извращением вкусовой рецепции вследствие ряда факторов, среди которых наиболее вероятными являются синдром сухости ротовой полости (об этом косвенно свидетельствует сохраняющееся повышенное потребление жидкости), влияние зубных протезов и/или имплантов [18, 19]. Это актуализирует необходимость дальнейших исследований в области функций вкуса и аппетита у пожилых людей с синдромом возрастной полости рта [20, 21, 22].

В систематическом обзоре описываются связи между недостаточным питанием и состоянием твердых и мягких тканей полости рта, гипосаливацией, ксеростомией и субъективным состоянием полости рта у пожилых людей. Были включены десять перекрестных исследований, которые продемонстрировали связь между недоеданием и плохим состоянием здоровья полости рта [23].

Результаты полученных исследований согласуются с данными зарубежных исследований. Так, авторы подчеркивают, что стоматологи и другие медицинские работники, работающие в области геронтостоматологии, должны быть осведомлены о потребностях пожилых людей в макро- и микроэлементах и включать определенные планы питания в раннем возрасте своих пациентов с их одобрения и сотрудничества, чтобы отсрочить потерю зубов и нарушение функции жевания. Авторы обсуждают основные аспекты порочного круга питания и состояния здоровья полости рта, а также приводят предложения о влиянии основных питательных веществ и потребностях независимых пожилых людей. На основе собранных научных данных для пищевой промышленности делаются предложения по улучшению качества и дозировки продуктов питания для этой категории лиц. [24].

Пожилое население, пользующееся зубными протезами, особенно уязвимо к нарушению питания. Поскольку реабилитация при протезировании зубов требует серии назначений, анализ рациона питания и консультации могут быть включены в планирование гериатрического лечения [25].

Еще в одном систематическом обзоре проведена оценка питания и здоровья полости рта у людей пожилого возраста. Были проведены метаанализы, сравнивающие лиц с недостаточностью питания/ риском мальнутриции и лиц с нормальным питанием по трем параметрам здоровья полости рта (беззубость, использование протеза и среднее количество имеющихся зубов). В систематический обзор было включено двадцать шесть исследований, из которых 23 были перекрестными. Было показано, что хорошо питающиеся субъекты имели значительно большее количество пар зубов / функциональных единиц зубов (FTU) по сравнению с лицами с недостаточностью питания/ риском мальнутриции. [26].

Исследователями в области геронтостоматологии подчеркивается необходимость дальнейшего изучения характера и статуса питания лиц пожилого и старческого возраста.

Полученные нами данные дополняют представления о вкладе нарушений вкуса и аппетита наряду с характеристиками стоматологического здоровья в формирование синдрома мальнутриции.

#### Выводы:

1. Синдром возрастной полости рта в виде адентии приводит к нарушению диетологических характеристик питания в виде снижения потребления белковой пищи, потребления свежих овощей и фруктов с одновременным увеличением потребления соли и сахара и кратности приема пищи для достижения насыщения.

2. Восстановление функции ротовой полости у людей с адентией путем восстановления формы и функции зубных рядов улучшает, но не приводит к полной нормализации диетологических характеристик у пожилых людей с синдромом возрастной полости рта, что сохраняет риски для развития синдрома мальнутриции.

3. Дополнительными факторами риска развития синдрома мальнутриции у людей с синдромом возрастной полости рта являются нарушения вкуса и аппетита, что актуализирует дальнейшие геронтологические и диетологические исследования в этом направлении.

## 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. Королева М, Ильницкий А. Клеточные хроноблокаторы и нутритивная поддержка гериатрических пациентов в системе профилактики возраст-ассоциированных заболеваний и синдромов. Врач. 2019;7:35-38. DOI: <https://doi.org/10.29296/25877305-2019-07-01>
2. Турушева АВ, Моисеева ИЕ. Недостаточность питания в пожилом и старческом возрасте. Российский семейный врач. 2019;23(1):5-15. DOI: <https://doi.org/10.17816/RFD201915-15>
3. Ghezzi EM, Niessen LC, Jones JA. Innovations in Geriatric Oral Health Care. Dental Clinics of North America. 2021;65(2):393-407. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cden.2020.12.002>
4. Takahashi M, Maeda K, Wakabayashi H. Prevalence of sarcopenia and association with oral health-related quality of life and oral health status in older dental clinic outpatients. Geriatrics and Gerontology International. 2018;18:915-921. DOI: <https://doi.org/10.1111/ggi.13279>
5. Ng TP, Nyunt MSZ, Gao Q, et al. Elderly Nutritional Indicators for Geriatric Malnutrition Assessment (ENIGMA): Development and validation of a nutritional prognostic index. Clinical Nutrition ESPEN. 2017;22:54-63. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2017.08.012>
6. Горелик СГ, Волков ДВ, Бочарова КА, и др. Программа для ЭВМ «Оптимизация питания пациентов с синдромом нарушения питания». Свидетельство государственной регистрации программы № 2016614483.
7. Besora-Moreno M, Llauradó E, Tarro L, Solà R. Social and Economic Factors and Malnutrition or the Risk of Malnutrition in the Elderly: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. Nutrients. 2020;12(3):737. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu12030737>
8. Paping LAJ, Schuller AA. The oral health of frail home-dwelling elderly in the general practice. Ned Tijdschr Tandheelkd. 2021;128(10):503-511. Dutch. DOI: <https://doi.org/10.5177/ntvt.2021.10.21083>
9. Борозенцева ВА, Борозенцев ВЮ, Почкина ЕП, и др. Синдром возрастной полости рта как компонент гериатрического статуса. Научные результаты биомедицинских исследований. 2021;7(3):296-307. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2021-7-3-0-8>
10. de Sire A, Ferrillo M, Lippi L, et al. Sarcopenic Dysphagia, Malnutrition, and Oral Frailty in Elderly: A Comprehensive Review. Nutrients. 2022;14(5):982. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu14050982>
11. Ильницкий АН, Крохмалёва ЕВ, Коршун ЕИ. Одиночество как новый гериатрический синдром: фокус на питание. Клиническая геронтология. 2018;5-6:28-31. DOI: <https://doi.org/10.26347/1607-2499201805-06008-013>
12. Ильницкий АН, Королева МВ, Шарова АА, и др. Питание и нутритивная поддержка людей в пожилом и старческом возрасте как фактор профилактики преждевременного старения и развития гериатрических синдромов (обзор литературы). Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики. 2019;3:114-132. DOI: <https://doi.org/10.24411/2312-2935-2019-10058>
13. Norman K, Haß U, Pirlisch M. Malnutrition in Older Adults-Recent Advances and Remaining Challenges. Nutrients. 2021;13(8):2764. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu13082764>
14. Azzolino D, Passarelli PC, De Angelis P, et al. Poor Oral Health as a Determinant of Malnutrition and Sarcopenia. Nutrients. 2019;11(12):2898. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu11122898>
15. Zhang W, Wu YY, Wu B. Does Oral Health Predict Functional Status in Late Life? Findings From a National Sample. Journal of Aging and Health. 2018;30(6):924-944. DOI: <https://doi.org/10.1177/0898264317698552>
16. Pinnamaneni SP, Kumar S, Abrol S, et al. Assessment of Knowledge, Attitude, and Practice about Oral Health in Patients with Cardiovascular Diseases - An Original Study. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences. 2021;13(Suppl 1):S344-S347. DOI: [https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS\\_733\\_20](https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_733_20)
17. Gao S, Tian J, Li Y, et al. Periodontitis and Number of Teeth in the Risk of Coronary Heart

Disease: An Updated Meta-Analysis. Medical Science Monitor. 2021;27:e930112-1-e930112-15. <https://doi.org/10.12659/MSM.930112>

18. Лебедев МВ, Захарова ИЮ, Керимова КИ. Ксеростомия (синдром сухого рта). Вестник Пензенского государственного университета. 2018;23:19-22.

19. Klimiuk A, Zalewska A, Knapp M, et al. Salivary Gland Dysfunction in Patients with Chronic Heart Failure Is Aggravated by Nitrosative Stress, as Well as Oxidation and Glycation of Proteins. Biomolecules. 2021;11(1):119. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom11010119>

20. Ueno H, Nakazato M. Mechanistic relationship between the vagal afferent pathway, central nervous system and peripheral organs in appetite regulation. Journal of Diabetes Investigation. 2016;7(6):812-818. DOI: <https://doi.org/10.1111/jdi.12492>

21. Kirsz K, Zieba DA. Ghrelin-mediated appetite regulation in the central nervous system. Peptides. 2011;32(11):2256-2264. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.04.010>

22. Dimitriadis GD, Maratou E, Kountouri A, et al. Regulation of Postabsorptive and Postprandial Glucose Metabolism by Insulin-Dependent and Insulin-Independent Mechanisms: An Integrative Approach. Nutrients. 2021;13(1):159. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu13010159>

23. Algra Y, Havercort E, Kok W, et al. The Association between Malnutrition and Oral Health in Older People: A Systematic Review. Nutrients 2021;13(10):3584. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu13103584>

24. Antoniadou M, Varzakas T. Breaking the vicious circle of diet, malnutrition and oral health for the independent elderly. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2021;61(19):3233-3255. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1793729>

25. Banerjee R, Chahande J, Banerjee S, et al. Evaluation of relationship between nutritional status and oral health related quality of life in complete denture wearers. Indian Journal of Dental Research. 2018;29:562-7. DOI: [https://doi.org/10.4103/ijdr.IJDR\\_285\\_17](https://doi.org/10.4103/ijdr.IJDR_285_17)

26. Tonazzzo MP, Amorim PSA, Muniz FWMG, et al. Relationship of nutritional status and oral health in elderly: Systematic review with meta-analysis. Clinical Nutrition. 2018;37(3):824-830. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.03.014>

## References

1. Koroleva M, Ilnitski A. Cell chrono blockers and nutritional support to geriatric patients in order to prevent age-associated diseases and syndromes. Vrach (The Doctor). 2019;7:35-38. Russian. DOI: <https://doi.org/10.29296/25877305-2019-07-01>
2. Turusheva AV, Moiseeva IE. Malnutrition in the elderly and old age. Russian family doctor. 2019;23(1):5-15. Russian. DOI: <https://doi.org/10.17816/RFD201915-15>
3. Ghezzi EM, Niessen LC, Jones JA. Innovations in Geriatric Oral Health Care. Dental Clinics of North America. 2021;65(2):393-407. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cden.2020.12.002>
4. Takahashi M, Maeda K, Wakabayashi H. Prevalence of sarcopenia and association with oral health-related quality of life and oral health status in older dental clinic outpatients. Geriatrics and Gerontology International. 2018;18:915-921. DOI: <https://doi.org/10.1111/ggi.13279>
5. Ng TP, Nyunt MSZ, Gao Q, et al. Elderly Nutritional Indicators for Geriatric Malnutrition Assessment (ENIGMA): Development and validation of a nutritional prognostic index. Clinical Nutrition ESPEN. 2017;22:54-63. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2017.08.012>
6. Gorelik SG, Volkov DV, Bocharova KA, et al. Computer Program «Optimization of Nutrition for Patients with Malnutrition Syndrome». Program State Registration License No. 2016614483. Russian.
7. Besora-Moreno M, Llauradó E, Tarro L, Solà R. Social and Economic Factors and Malnutrition or the Risk of Malnutrition in the Elderly: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. Nutrients. 2020;12(3):737. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu12030737>
8. Paping LAJ, Schuller AA. The oral health of frail home-dwelling elderly in the general practice. Ned Tijdschr Tandheelkd. 2021;128(10):503-511. Dutch. DOI: <https://doi.org/10.5177/ntvt.2021.10.21083>
9. Borozentseva VA, Borozentsev VYu, Pochitaeva IP, et al. Senile mouth as a component of geriatric status. Research Results in Biomedicine. 2021;7(3):296-307. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2021-7-3-0-8>
10. de Sire A, Ferrillo M, Lippi L, et al. Sarcopenic Dysphagia, Malnutrition, and Oral Frailty in Elderly: A Comprehensive Review. Nutrients. 2022;14(5):982. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu14050982>

- 11.Ilnitskiy AN, Krokhmaleva EV, Korshun EI. Loneliness as a new geriatric syndrome – focus is on nutrition. *Clinical gerontology*. 2018;5-6:28-31. Russian. DOI: <https://doi.org/10.26347/1607-2499201805-06008-013>
- 12.Ilnitski AN, Koroleva MV, Sharova AA, et al. Food and nutritional support people in elderly and senile age as a factor the prevention of premature aging and development of geriatric syndromes. Current problems of health care and medical statistics. 2019;3:114-132. Russian. DOI: <https://doi.org/10.24411/2312-2935-2019-10058>
- 13.Norman K, Haß U, Pirllich M. Malnutrition in Older Adults-Recent Advances and Remaining Challenges. *Nutrients*. 2021;13(8):2764. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu13082764>
- 14.Azzolino D, Passarelli PC, De Angelis P, et al. Poor Oral Health as a Determinant of Malnutrition and Sarcopenia. *Nutrients*. 2019;11(12):2898. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu11122898>
- 15.Zhang W, Wu YY, Wu B. Does Oral Health Predict Functional Status in Late Life? Findings From a National Sample. *Journal of Aging and Health*. 2018;30(6):924-944. DOI: <https://doi.org/10.1177/0898264317698552>
- 16.Pinnamaneni SP, Kumar S, Abrol S, et al. Assessment of Knowledge, Attitude, and Practice about Oral Health in Patients with Cardiovascular Diseases - An Original Study. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 2021;13(Suppl 1):S344-S347. DOI: [https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS\\_733\\_20](https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_733_20)
- 17.Gao S, Tian J, Li Y, et al. Periodontitis and Number of Teeth in the Risk of Coronary Heart Disease: An Updated Meta-Analysis. *Medical Science Monitor*. 2021;27:e930112-1-e930112-15. DOI: <https://doi.org/10.12659/MSM.930112>
- 18.Lebedev MV, Zaharova IYu, Kerimova KI. Xerostomia (dry mouth syndrome). *Vestnik Penzenskogo gosudarstvennogo universiteta*. 2018;23:19-22. Russian.
- 19.Klimiuk A, Zalewska A, Knapp M, et al. Salivary Gland Dysfunction in Patients with Chronic Heart Failure Is Aggravated by Nitrosative Stress, as Well as Oxidation and Glycation of Proteins. *Biomolecules*. 2021;11(1):119. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom11010119>
- 20.Ueno H, Nakazato M. Mechanistic relationship between the vagal afferent pathway, central nervous system and peripheral organs in appetite regulation. *Journal of Diabetes Investigation*. 2016;7(6):812-818. DOI: <https://doi.org/10.1111/jdi.12492>
- 21.Kirsz K, Zieba DA. Ghrelin-mediated appetite regulation in the central nervous system. *Peptides*. 2011;32(11):2256-2264. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.04.010>
- 22.Dimitriadis GD, Maratou E, Kountouri A, et al. Regulation of Postabsorptive and Postprandial Glucose Metabolism by Insulin-Dependent and Insulin-Independent Mechanisms: An Integrative Approach. *Nutrients*. 2021;13(1):159. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu13010159>
- 23.Algra Y, Havercort E, Kok W, et al. The Association between Malnutrition and Oral Health in Older People: A Systematic Review. *Nutrients*. 2021;13(10):3584. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu13103584>
- 24.Antoniadou M, Varzakas T. Breaking the vicious circle of diet, malnutrition and oral health for the independent elderly. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2021;61(19):3233-3255. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1793729>
- 25.Banerjee R, Chahande J, Banerjee S, et al. Evaluation of relationship between nutritional status and oral health related quality of life in complete denture wearers. *Indian Journal of Dental Research*. 2018;29:562-7. DOI: [https://doi.org/10.4103/ijdr.IJDR\\_285\\_17](https://doi.org/10.4103/ijdr.IJDR_285_17)
- 26.Tonazzio MP, Amorim PSA, Muniz FWMG, et al. Relationship of nutritional status and oral health in elderly: Systematic review with meta-analysis. *Clinical Nutrition*. 2018;37(3):824-830. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.03.014>

Статья поступила в редакцию 2 февраля 2022 г.  
Поступила после доработки 10 марта 2022 г.  
Принята к печати 16 марта 2022 г.

Received 2 February 2022

Revised 10 March 2022

Accepted 16 March 2022

## Информация об авторах

**Вита Алексеевна Борозенцева**, кандидат медицинских наук, заведующий стоматологическим отделением, врач стоматолог-терапевт, Межрегиональный центр стоматологических инноваций им. Б.В. Трифонова ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Российская Федерация, E-mail: [Vita\\_borozenceva@mail.ru](mailto:Vita_borozenceva@mail.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4465-4658>.

**Владислав Юрьевич Борозенцев**, аспирант по научной специальности 3.1.31 – Геронтология и гериатрия ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Российская Федерация, E-mail: v.borozenzew2016@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2003-5804>.

**Кирилл Иванович Прошаев**, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры терапии, гериатрии и антивозрастной медицины Академии постдипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: prashchayeu@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6534-1362>.

**Андрей Николаевич Ильницкий**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой терапии, гериатрии и антивозрастной медицины Академии постдипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: a-ilnitski@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1090-4850>.

**Татьяна Владимировна Степанова**, научный сотрудник АНО «Научно-исследовательский медицинский центр «Геронтология», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: md.stept@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9704-5376>.

**Эльвира Витальевна Фесенко**, кандидат медицинских наук, доцент кафедры терапии, гериатрии и антивозрастной медицины Академии постдипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: longtermcare.fmba@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2187-5060>.

**Елена Анатольевна Воронина**, кандидат медицинских наук, министр социальной защиты населения Кузбасса, Министерство социальной защиты населения Кузбасса, г. Кемерово, научный сотрудник АНО «Научно-исследовательский медицинский центр «Геронтология», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: depart@dsznko.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8915-533X>.

## Information about the authors

**Vita A. Borozentseva**, Cand. Sci. (Medicine), Head of the Dental Department, Dentist-Therapist, Trifonov Interregional Center for Dental Innovations, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, E-mail: Vita\_borozenceva@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4465-4658>.

**Vladislav Yu. Borozentsev**, Post-graduate Student in Scientific Specialty 3.1.31 – Gerontology and Geriatrics, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, E-mail: v.borozenzew2016@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2003-5804>.

**Kirill I. Prashchayeu**, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Professor at the Department of Therapy, Geriatrics and Anti-Aging Medicine, Academy of Postgraduate Education, Federal Research and Clinical Center for Specialized Types of Medical Care and Medical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russia, E-mail: prashchayeu@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6534-1362>.

**Andrei N. Ilnitski**, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Head of the Department of Therapy, Geriatrics and Anti-Aging Medicine, Academy of Postgraduate Education, Federal Research and Clinical Center for Specialized Types of Medical Care and Medical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russia, E-mail: a-ilnitski@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1090-4850>.

**Tat'yana V. Stepanova**, Researcher, Research Medical Center «Gerontology», Moscow, Russia, E-mail: md.stept@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9704-5376>.

**Elvira V. Fesenko**, Cand. Sci. (Medicine), Associate Professor at the Department of Therapy, Geriatrics and Anti-Aging Medicine, Academy of Postgraduate Education, Federal Research and Clinical Center for Specialized Types of Medical Care and Medical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russia, E-mail: longtermcare.fmba@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2187-5060>.

**Elena A. Voronina**, Cand. Sci. (Medicine), Minister of Social Protection of the Population of Kuzbass, Ministry of Social Protection of the Population of Kuzbass, Kemerovo, Researcher, Research Medical Center «Gerontology», Moscow, Russia, E-mail: depart@dsznko.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8915-533X>.



DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-10

УДК 616.001.084.053.9:612.67:612.7:055.2

# Особенности постуральных нарушений и связей с системой комплемента крови при синдроме падений у пожилых

Т.С. Гурко<sup>1</sup> , Н.М. Агарков<sup>2</sup> , И.В. Лев<sup>1</sup> , Е.Н. Коровин<sup>3</sup> , Х.Ф. Леон<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова»,

Бескудниковский бульвар, д. 59а, г. Москва, 127486, Российская Федерация,

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Юго-Западный государственный университет»,

ул. 50 лет Октября, д. 94, г. Курск, 305040, Российская Федерация

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный технический университет»,

ул. 20-летия Октября, д. 84, г. Воронеж, 394006, Российская Федерация

Автор для переписки: Н.М. Агарков (vitalaxen@mail.ru)

## Резюме

**Актуальность:** Естественное, как и преждевременное старение, сопровождается постуральными нарушениями, которые усугубляются у пациентов с офтальмологической патологией и приводят к возникновению синдрома падений, но остаются недостаточно изученным и у пациентов с закрытоугольной глаукомой и с изменением системы комплемента крови. **Цель исследования:** Изучение постуральных нарушений и связей с системой комплемента крови при синдроме падений у пожилых с закрытоугольной глаукомой.

**Материалы и методы:** Исследование проводилось среди 62 пациентов пожилого возраста с синдромом падений и закрытоугольной глаукомой (основная группа) и у 49 пациентов 60-74 лет с отсутствием падений и закрытоугольной глаукомы и других болезней глаза. Постуральные нарушения изучались с применением теста Sensori Organization Test на компьютерном стабилометрическом комплексе в 6 функциональных пробах (COND 1-6) и с оценкой соматосенсорной системы, зрительного анализатора и использования зрительной информации в обеспечении постурального баланса. Компоненты системы комплемента крови исследованы иммуноферментным анализом.

Изучение корреляционных связей проведено корреляционным методом по программе «Statistica 10.0». **Результаты:** Негативные изменения постурального баланса у пожилых с синдромом падений и закрытоугольной глаукомой выявлены во всех 6 функциональных пробах, но наиболее выраженное ухудшение отмечено в функциональных пробах COND 2, COND 4 и COND 6. Показано снижение участия зрительного анализатора, соматосенсорной системы и предпочтения использования зрительной информации в контроле постурального баланса.

Постуральные нарушения у пациентов с синдромом падений и закрытоугольной глаукомой в большей степени ассоциированы с C3, C3a и C5a компонентами системы комплемента крови и особенно в функциональных пробах COND 4, COND 6. **Заключение:** Закрытоугольная глаукома приводит к ухудшению постурального баланса с проявлением синдрома падений, который ассоциируется с системой комплемента крови.

**Ключевые слова:** постуральные нарушения; закрытоугольная глаукома; синдром падений; пожилые; система комплемента крови

**Для цитирования:** Гурко ТС, Агарков НМ, Лев ИВ, и др. Особенности постуральных нарушений и связей с системой комплемента крови при синдроме падений у пожилых. Научные результаты биомедицинских исследований. 2022;8(2): 259-267. DOI:10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-10

## Peculiarities of postural disorders and connections with the blood compliment system in the case of falls syndrome in the elderly

Tatyana S. Gurko<sup>1</sup> , Nikolay M. Agarkov<sup>2</sup> , Inna V. Lev<sup>1</sup> ,  
Evgeniy N. Korovin<sup>3</sup> , German F. Leon<sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Fyodorov Eye Microsurgery State Institution,  
59a Beskudnikovsky Blvd., Moscow, 127486, Russia,

<sup>2</sup> Southwest State University,  
94 50 let Oktyabrya St., Kursk, 305040, Russia

<sup>3</sup> Voronezh State Technical University,  
84 20-letiya Oktyabrya St., Voronezh, 394006, Russia

Corresponding author: Nikolay M. Agarkov (vitalaxen@mail.ru)

### Abstract

**Background:** Natural and premature aging is accompanied by postural disorders, which are aggravated in patients with ophthalmic pathology and lead to the occurrence of the falls syndrome, but remain insufficiently studied in patients with angle-closure glaucoma with a change in the blood compliment system. **The aim of the study:** To study postural disorders and connections with the blood compliment system with angle-closure glaucoma. **Materials and methods:** The study was conducted in 62 elderly patients with falls syndrome and angle-closure glaucoma (main group) and 49 60-74-year-old patients with no falls and angle-closure glaucoma and other eye diseases. Postural disorders were studied using the Sensori Organization Test on a computer stabilometric complex in 6 functional tests (COND 1-6) and with an assessment of the somatosensory system, visual analyzer and the use of visual information in ensuring postural balance. The components of the blood compliment system were examined by enzyme immunoassay. The study of correlations was checked by the correlation method using the program "Statistica 10.0". **Results:** Negative changes in postural balance in the elderly with falls syndrome and angle-closure glaucoma were detected in all 6 functional tests, but the most pronounced deterioration was noted in functional tests COND 2, COND 4 and COND 6. There was a decrease in the participation of the visual analyzer, somatosensory system and preference for using visual information in control of postural balance. Postural disturbances in patients with falls syndrome and angle-closure glaucoma are more associated with C3 C3a and C5a components of the blood compliment system and especially in functional tests COND 4, COND 6. **Conclusion:** Angle-closure glaucoma leads to impaired postural balance with fall syndrome associated with the blood compliment system.

**Keywords:** postural disorders; angle-closure glaucoma; fall syndrome; elderly; blood compliment system

**For citation:** Gurko TS, Agarkov NM, Lev IV, et al. Peculiarities of postural disorders and connections with the blood complement system in the case of falls syndrome in the elderly. Research Results in Biomedicine. 2022;8(2): 259-267. Russian. DOI:10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-10

**Введение.** Постуральные нарушения у пожилых играют важную роль в возникновении гериатрического синдрома падений и во многом определяют его распространенность [1, 2, 3]. Наличие зрительного дефицита в пожилом возрасте вследствие различной офтальмологической патологии и практически полная потеря зрения при закрытоугольной глаукоме ухудшают постуральный баланс таких пациентов, патологические изменения которого обусловлены снижением функционирования сенсорных систем в том числе зрительной системы и деятельности опорно–двигательного аппарата, приводящего к нарушению постурального контроля у людей старших возрастных категорий и формированию постуральной нестабильности, крайним проявлением которой является синдром падений [4, 5].

Однако в гериатрической практике постуральные нарушения и связанный с этим синдром падений у пациентов 60–74 лет, страдающих закрытоугольной глаукомой, практически не изучены. Сообщается в немногочисленных публикациях об ухудшении параметров постурального баланса при снижении остроты зрения без дифференциации офтальмологических заболеваний [6–10]. При этом при оценке постуральных нарушений у пациентов со зрительным дефицитом рассматривается состояние мышечного аппарата [11], но неизученным остаются корреляционные связи с системой комплемента крови. В связи со сказанным выше актуальным является анализ количественных показателей постурального баланса и изменений системы комплемента крови при синдроме падений у пожилых пациентов с закрытоугольной глаукомой.

**Цель исследования.** Изучение постуральных нарушений и связей с системой комплемента крови при синдроме падений у пожилых с закрытоугольной глаукомой.

**Материалы и методы исследования.** Настоящее исследование включало 62 пациента пожилого возраста с синдромом

падений и закрытоугольной глаукомой, составивших основную группу, с верифицированным диагнозом на основе комплексного офтальмологического обследования в Тамбовском филиале МНТК «Микрохирургия глаза имени академика С.Н. Фёдорова». Диагноз закрытоугольной глаукомы устанавливался в соответствии с «Национальным руководством по глаукоме» [12]. Контрольная группа представлена 49 пациентами в возрасте 60–74 лет с отсутствием падений и закрытоугольной глаукомы и другой офтальмологической патологией.

Статический постуральный баланс пациентов определялся на компьютерном стабилометрическом комплексе «Smart Equitest Balance Manager» (USA). При оценке постуральных нарушений у пациентов сравниваемых групп в идентичных условиях применялись 6 функциональных проб (Conditions) теста Sensori Organization Test (SOT). Первая функциональная проба (COND 1) предусматривала оценку статического постурального баланса в спокойном стоянии с открытыми глазами, а COND 2 – при спокойном стоянии с закрытыми глазами, COND3 – стояние с открытыми глазами при воздействии пространства, COND 4 – стояние с открытыми глазами при воздействии поверхности опоры, COND 5 – во время стояния с закрытыми глазами при воздействии опорной поверхности и COND 6 – при стоянии с открытыми глазами и дестабилизирующем воздействии пространства и опорной поверхности. Постуральная статическая стабильность в названных пробах оценивалась от 0 до 100 баллов. Кроме того, определялось участие соматосенсорной системы (RAT-SOM), равное отношению средней величины трёх COND 2 к средней величине трёх COND 1; участие зрительного анализатора (RAT-VIS) – отношение трёх проб COND 4 к трём пробам COND 1; предпочтение использования зрительной информации в постуральном контроле (RAT-PREF) – отношение суммы

средних COND 3 и COND 6 к сумме COND 2 и COND 5, умноженное во всех случаях на 100%. Величина постурального баланса, равная 100 баллам или 100% расценивалась как идеальное равновесие и устойчивость.

Среди компонентов системы комплемента изучались C3, C3a, C4, C5, C5a в сыворотке крови натощак посредством иммуноферментного анализа, а затем посредством корреляционного метода и программы «Statistica 10.0» оценивались связи перечисленных компонентов системы комплемента с показателями функциональных проб COND 1-6 и сенсорными системами. При построении корреляционных моделей использовались только статистически значимые величины коэффициентов корреляции при  $P \leq 0,05$ .

При выполнении исследования соблюдались этические нормы и принципы, пропагандированные Хельсинской декларацией.

**Результаты и их обсуждение.** Изучение статического постурального баланса пациентов пожилого возраста, страдающих закрытоугольной глаукомой, с применением различных функциональных проб (COND 1-6) теста SOT выявило по сравнению с пациентами аналогичной возрастной группы, не имеющей закрытоугольной глаукомы и другой офтальмологической патологии статистически значимые различия во всех случаях (таблица 1). В наибольшей степени статические постуральные нарушения среди обследованных пациентов с закрытоугольной глаукомой наблюдались при выполнении функциональных проб теста SOT в COND 6 (стояние с открытыми глазами при полном дестабилизирующем пространственном воздействии и опорной поверхности) и COND 4 – дестабилизирующее воздействие опорной поверхности при стоянии с открытыми глазами.

**Статический постуральный баланс пожилых пациентов с синдромом падений и закрытоугольной глаукомой по данным теста Sensory Organization Test (SOT) ( $M \pm m$ , %)**

**Statistical postural balance of elderly patients with angle-closure glaucoma according to Sensory Organization Test (SOT) ( $M \pm m$ , %)**

Показатели SOT	Пациенты пожилого возраста с глаукомой	Пациенты пожилого возраста без глаукомы	P
COND 1	82,8±2,1	93,8±1,9	<0,01
COND 2	61,6±1,8	87,5±2,4	<0,001
COND 3	74,3±2,1	85,3±2,5	<0,001
COND 4	52,5±1,7	79,6±2,3	<0,001
COND 5	56,2±1,5	64,7±1,8	<0,001
COND 6	50,8±1,2	61,4±1,4	<0,001
RAT-SOM	74,5±1,8	93,3±2,6	<0,001
RAT-VIS	63,4±1,4	84,9±2,3	<0,001
RAT-PREF	106,5±2,3	96,5±1,8	<0,01

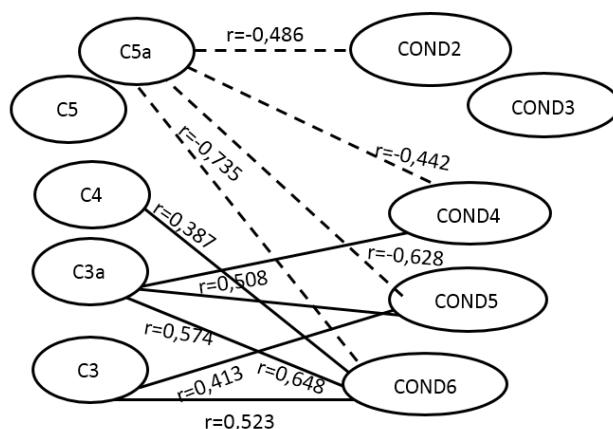
Однако у пациентов 60-74 лет в вышеуказанных функциональных пробах теста SOT постуральные нарушения статистически значимо менее выражены. Особо выраженные различия отмечались при выполнении функциональной пробы COND 4. Существенно со статистически значимым различием среди сравниваемых групп отмечались статические постуральные нарушения при проведении функциональных проб

COND 2 и COND 5 ( $p < 0,001$ ). Несмотря на статистически значимую разницу степени постурального баланса в основной и контрольной группах в других функциональных пробах (COND 1, COND 3), постуральные нарушения в среднем различались менее значительно, чем ранее рассмотренные.

Определение степени участия сенсорных систем в поддержании статического

баланса у пациентов 60–74 лет с закрытоугольной глаукомой и без этого офтальмологического заболевания также выявило статистически значимые различия. Особенno существенно у пациентов 60–74 лет основной группы снижена степень участия зрительного анализатора в контроле постурального баланса. По сравнению с группой возрастного контроля наблюдалось также у пациентов с закрытоугольной глаукомой снижение участия соматосенсорной информации в статическом постуральном контроле. Особый интерес среди пациентов с рассматриваемой патологией представляет естественно оценка степени предпочтения зрительной информации в поддержании постурального баланса (RAT – PREF). Его средняя величина статистически значимо выше, чем при отсутствии у пациентов зрительного дефицита.

Анализ корреляционных связей между изменением содержания в сыворотке крови компонентов системы комплемента и нарушениями постурального баланса пациентов 60–74 лет в исследованных функциональных пробах в основной и контрольной группах выявил различные соотношения и степень сопряжённости (рисунок 1). Так, среди пациентов пожилого возраста с закрытоугольной глаукомой с результатами выполнения функциональных проб COND 1–6 и содержанием в сыворотке крови компонентов системы комплемента установлено 10 корреляционных связей против 3 связей у пациентов такого же возраста, не имеющих закрытоугольную глаукому, что указывает на повышение ассоциации рассматриваемых показателей вследствие развития обсуждаемой офтальмологической патологии.

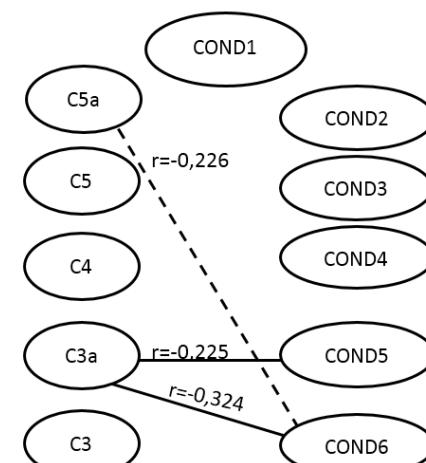


A

Рис. 1. Корреляционные статистически значимые связи между постуральным балансом в функциональных пробах COND 1–6 и содержанием компонентов системы комплемента крови у пациентов основной (А) и контрольной (Б) групп.

Fig. 1. Correlation of statistically significant relationships between the postural balance in functional tests COND 1–6 and the content of components of the blood complement system in patients of the main (A) and control (B) groups.

При названном заболевании у пациентов максимальная сопряжённость, характеризующаяся достоверной обратной связью, выявлена для изменения уровня компоненты С5а системы комплемента, представленная 4 корреляционными связями, одна из которых соответствует сильной обратной связи с



Б

функциональной пробой COND 6, когда  $r=-0,735$ . Три другие обратные связи ( $p<0,001$ ) соответствуют умеренной корреляции и выявлены для COND 2 ( $r=0,486$ ), COND 4 ( $r=-0,442$ ) и COND 5 ( $r=-0,628$ ).

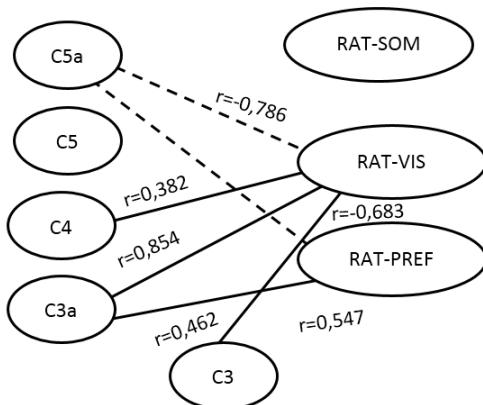
Высокая сопряжённость присуща также С3а-компоненте системы комплемента

с COND 6 ( $r=0,648$ ), COND 5 ( $r=0,574$ ) и COND 4 ( $r=0,581$ ), но имеющие в отличие от ранее рассмотренной C5a-компоненты, прямые умеренные связи ( $p<0,001$ ). C3-компонента системы комплемента у больных с закрытоугольной глаукомой связана с COND 6 ( $r=0,523$ ) и COND 5 ( $r=0,413$ ). C4-компонента имеет одну корреляцию с выполнением функциональной пробы COND 6.

Среди пациентов контрольной группы наибольшая интеграция свойственна C3-компоненте системы комплемента, причём корреляционная связь с COND 6 является умеренной ( $r=0,324$ ). Слабая прямая связь этой компоненты установлена с функциональной пробой COND 5 ( $r=0,285$ ). Обратная слабая корреляционная связь выявлена в контрольной группе между C5a-компонентой и COND 6.

Изучение сопряжённости сенсорных систем и анализаторов с компонентами системы комплемента у пациентов 60-74 лет с

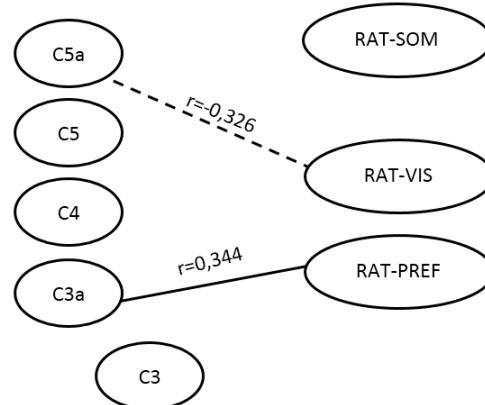
закрытоугольной глаукомой и без неё выявило различную степень ассоциаций (рисунок 2). Наибольшая сопряжённость между анализируемыми параметрами установлена для основной группы, в которой зарегистрировано 6 статистически значимых связей. Помимо корреляционные связи имеют с C5a-компонентой и C3a-компонентой системы комплемента с RAT-PREF и со зрительным анализатором. Имеют обратную зависимость с RAT-VTS ( $r=-0,786$ ) и с участием зрительной информации ( $r=-0,683$ ) в поддержании статического постурального баланса. Напротив, C3a-компоненты системы комплемента находится в прямой сильной связи со зрительным анализатором ( $r=0,845$ ) и умеренной связи со значением зрительной информации ( $r=0,547$ ). Со зрительным анализатором (RAT-VIS) коррелируют также C4-компонента и C3-компонента системы комплемента. Во всех случаях связи статистически значимы.



A

Рис. 2. Корреляционные статистически значимые связи между постуральным балансом, связанным с участием сенсорных систем, и содержанием компонентов системы комплемента крови у пациентов основной (А) и контрольной (Б) групп.

Примечание: RAT-SOM – соматосенсорная система, RAT-VIS – зрительный анализатор, RAT-PREF – зрительная информация.



Б

Fig. 2. Correlation statistically significant relationships between the postural balances associated with the participation of sensory systems and the content of components of the blood complement system in patients of the main (A) and control (B) groups.  
Note: RAT-SOM – somatosensory system, RAT-VIS – visual analyzer, RAT-PREF – visual information.

В контрольной группе пациентов обнаружено всего 2 статистически значимые корреляции – между C5a-компонентой со зрительным анализатором ( $r=0,326$ ) и с

участием зрительной информации в поддержании постурального статического баланса с C3a-компонентой системы комплемента крови ( $r=0,344$ ).

Интегративные связи между сенсорной системой, зрительным анализатором и вестибулярным аппаратом, по данным ранее выполненных исследований [11, 13] обеспечивают адекватный контроль постурального баланса у человека, в том числе в старших возрастных группах. Нами показано, что у пожилых пациентов с закрытоугольной глаукомой имеются нарушения статического постурального баланса по всем изученным показателям компьютерного стабилометрического обследования. При этом наиболее выраженное ухудшение постурального контроля выявлено в функциональной пробе COND4 и COND 2. Возникновение синдрома падений и постуральных нарушений в пожилом возрасте существенно возрастает при сниженной остроте зрения [11]. Авторы полагают, что наличие зрительного дефицита является невосполнимым и ведет обязательно к снижению эффективности постурального баланса, стабильности вертикальной позы и возникновению синдрома падений.

Среди трех сенсорных систем значение зрительной системы считается определяющим в снижении постуральной устойчивости [6, 7]. Патология зрительной системы повышает вероятность возникновения постуральных нарушений на 50% или выше [6], а снижение зрения увеличивает постуральную неустойчивость и частоту синдрома падений. Как известно, у людей поле зрения делится на центральное и периферическое, обнаруживающие объекты соответственно в направлении взгляда и наличие окружающих объектов в латеральных областях. У молодых мужчин и женщин установлено ухудшение таких показателей постурального баланса – длина шага и скорость при выполнении теста функциональной досягаемости с открытыми и закрытыми глазами [6]. Кроме того, известно, что у пациентов старческого возраста с нарушением зрения имелась не только низкая скорость ходьбы, но и более короткое время стояния на одной ноге, чем у лиц без нарушения зрения [7]. Так, указанные показатели постуральных нарушений составили соответственно у пациентов с нарушением и без

нарушения зрения  $1,5 \pm 0,4$  м/с против  $1,7 \pm 0,4$  м/с ( $p < 0,01$ ) и  $17,6 \pm 19,6$  против  $27,6 \pm 21,3$  ( $p < 0,01$ ). Однако о корреляционных связях постурального баланса у пожилых пациентов с закрытоугольной глаукомой с системой комплемента крови в научных публикациях не сообщается, но, как показано нами, такие ассоциации более выражены и имеются в большем количестве у пациентов с закрытоугольной глаукомой, чем при ее отсутствии, что свидетельствует о патологической связи компонентов системы комплемента крови с формированием постуральной неустойчивости при даннойoftальмопатологии с синдромом падений.

**Заключение.** Нарушения постурального баланса, выступающие причиной синдрома падений у пациентов пожилого возраста с закрытоугольной глаукомой, в наибольшей степени выражены в функциональных пробах COND 6, COND 4 и COND 2 Sensory Organization Test. Ухудшение постурального контроля в основной группе установлено также по участию зрительного анализатора и предпочтению использования зрительной информации в постуральном контроле. Показана тесная сопряженность содержания компонентов системы комплемента крови – С3α и С5α с ухудшением постурального баланса в функциональных пробах COND 4, COND 5, COND 6, зрительной системой и значением зрительной информации в его обеспечении, что следует учитывать в гериатрической практике.

### 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. Мороз ТП, Дёмин АВ. Особенности проявления синдрома падения у женщин пожилого возраста при стабилометрическом исследовании. Вестник Северного (Арктического) федерального университета. 2016;2:25-30. DOI: <https://doi.org/10.17238/issn2308-3174.2016.2.25>
2. Овчинников ЮД, Стародубец АИ. Изучение биомеханики движения у лиц пожилого возраста. Адаптивная физическая культура. 2017;71(3):23-24.
3. Hill KD, Suttanon P, Lin SI, et al. What works in falls prevention in Asia: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. BMC Geriatrics. 2018;18(1):3. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12877-017-0683-1>
4. Лаптева ЕС, Цуцунава МР, Подопригора ГМ, и др. Перспективы профилактики падений в пожилом и старческом возрасте. Успехи геронтологии. 2019;32(3):469-476.
5. Bhangu J, King-Kallimanis BL, Donoghue OA, et al. Falls, non-accidental falls and syncope in community-dwelling adults aged 50 years and older: Implications for cardiovascular assessment. PLoS ONE. 2017;12(7):e0180997. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180997>
6. Kim SH. Risk factors for severe injury following indoor and outdoor falls in geriatric patients. Archives of Gerontology and Geriatrics. 2016;62:75-82. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.archger.2015.10.003>
7. Miyata K, Igarashi N, Honjo M, et al. Aqueous autotoxin and TGF- $\beta$ s are promising diagnostic biomarkers for distinguishing open-angle glaucoma subtypes. Scientific Reports. 2021;11(1):1408. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81048-3>
8. Zhang Z, Wang H, Li M, et al. Physiological function of myocilin and its role in the pathogenesis of glaucoma in the trabecular meshwork (Review). International Journal of Molecular Medicine. 2019;43(2):671-681. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81048-3>
9. Sozzi S, Nardone A, Schieppati M. Vision Does Not Necessarily Stabilize the Head in Space During Continuous Postural Perturbations. Frontiers in Neurology. 2019;10:748. DOI: <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00748>
10. Michnik R, Jurkojc J, Wodarski P, et al. The influence of frequency of visual disorders on stabilographic parameters. Acta of Bioengineering and Biomechanics. 2016;18(1):25-33. DOI: <https://doi.org/10.5277/ABB-00201-2014-04>

11. Мельников АА, Николаев РЮ, Викулов АД. Роль зрительной информации в сохранении устойчивости позы после максимальной нагрузки на мышцы верхних и нижних конечностей. Физиология человека. 2016;42(4):43-50. DOI: <https://doi.org/10.7868/S0131164616030115>

12. Егоров ЕА, Еричев ВП. Глаукома: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013.

13. Гудков АБ, Дёмин АВ, Грибанов АВ, и др. Возрастные особенности компонентов постурального контроля у женщин 55-64 лет. Экология человека. 2016;23(11):35-41. DOI: <https://doi.org/10.33396/1728-0869-2016-11-35-41>

### References

1. Moroz TP, Demin AV. Features of the manifestation of the fall syndrome in elderly women during a stabilometric study. Vestnik of Northern (Arctic) Federal University. 2016;2:25-30. Russian. DOI: <https://doi.org/10.17238/issn2308-3174.2016.2.25>
2. Ovchinnikov YuD, Starodubets AI. The study of biomechanics of movement in elderly people. Adaptivnaya fizicheskaya kul'tura. 2017;71(3):23-24. Russian
3. Hill KD, Suttanon P, Lin SI, et al. What works in falls prevention in Asia: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. BMC Geriatrics. 2018;18(1):3. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12877-017-0683-1>
4. Lapteva EC, Tsutsunava MR, Podoprigora GM, et al. Falls in the elderly and senior age prevention perspectives. Advances in Gerontology. 2019;32(3):469-476. Russian
5. Bhangu J, King-Kallimanis BL, Donoghue OA, et al. Falls, non-accidental falls and syncope in community-dwelling adults aged 50 years and older: Implications for cardiovascular assessment. PLoS ONE. 2017;12(7):e0180997. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180997>
6. Kim SH. Risk factors for severe injury following indoor and outdoor falls in geriatric patients. Archives of Gerontology and Geriatrics. 2016;62:75-82. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.archger.2015.10.003>
7. Miyata K, Igarashi N, Honjo M, et al. Aqueous autotoxin and TGF- $\beta$ s are promising diagnostic biomarkers for distinguishing open-angle glaucoma subtypes. Scientific Reports. 2021;11(1):1408. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81048-3>

8. Zhang Z, Wang H, Li M, et al. Physiological function of myocilin and its role in the pathogenesis of glaucoma in the trabecular meshwork (Review). International Journal of Molecular Medicine. 2019;43(2):671-681. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81048-3>
9. Sozzi S, Nardone A, Schieppati M. Vision Does Not Necessarily Stabilize the Head in Space During Continuous Postural Perturbations. Frontiers in Neurology. 2019;10:748. DOI: <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00748>
10. Michnik R, Jurkojc J, Wodarski P, et al. The influence of frequency of visual disorders on stabilographic parameters. Acta of Bioengineering and Biomechanics. 2016;18(1):25-33. DOI: <https://doi.org/10.5277/ABB-00201-2014-04>
11. Melnikov AA, Nikolaev RY, Vikulov AD. The Role of Visual Information in Maintaining the Postural Stability after the Maximum Exercises on the Upper and Lower Extremities Muscles. Human Physiology. 2016;42(4):43-50. Russian. DOI: <https://doi.org/10.7868/S0131164616030115>
12. Egorov EA, Erichev VP. Glaucoma: national guide. M.: GEOTAR-Media; 2013. Russian.
13. Gudkov AB, Dyomin AV, Gribanov AV, et al. Age characteristics of postural control components in women 55-64 years old. Ekologiya cheloveka (Human Ecology). 2016;23(11):35-41. Russian. DOI: <https://doi.org/10.33396/1728-0869-2016-11-35>

Статья поступила в редакцию 23 сентября 2021 г.  
Поступила после доработки 25 января 2022 г.  
Принята к печати 8 февраля 2022 г.

Received 23 September 2021  
Revised 25 January 2022  
Accepted 8 February 2022

## Информация об авторах

**Татьяна Станиславовна Гурко**, врач-офтальмолог высшей категории, Тамбовский филиал ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова», г. Тамбов, Российская Федерация, E-mail: mntk@mntk-tambov.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0202-7795>.

**Николай Михайлович Агарков**, доктор медицинских наук, профессор кафедры биомедицинской инженерии, ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», г. Курск,

Российская Федерация, E-mail: vitalaxen@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4821-3692>.

**Инна Валерьевна Лев**, кандидат медицинских наук, заведующий первым хирургическим отделением, Тамбовский филиал ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова», г. Тамбов, Российская Федерация, E-mail: michina.inna@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3436-4059>.

**Евгений Николаевич Коровин**, доктор технических наук, заведующий кафедрой системного анализа и управления в медицинских системах, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный технический университет», г. Воронеж, Российская Федерация, E-mail: korovin@saums.vorstu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9984-987X>.

**Херман Флоресмило Леон**, магистр ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», г. Курск, Российская Федерация, E-mail: shukrullo2000@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9498-4586>.

## Information about the authors

**Tatyana S. Gorko**, Ophthalmologist of the Highest Category, Tambov Branch of the Fyodorov Eye Microsurgery State Institution, Tambov, Russia, E-mail: mntk@mntk-tambov.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0202-7795>.

**Nikolay M. Agarkov**, Doct. Sci. (Medicine), Professor at the Department of Biomedical Engineering, South-Western State University, Kursk, Russia, E-mail: vitalaxen@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4821-3692>.

**Inna V. Lev**, Cand. Sci. (Medicine), Head of the First Surgical Department, Tambov Branch of the Fyodorov Eye Microsurgery State Institution, Tambov, Russia, E-mail: michina.inna@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3436-4059>.

**Evgeniy N. Korovin**, Doct. Sci. (Technical), Head of the Department of System Analysis and Management in Medical Systems, Voronezh State Technical University, Voronezh, Russia, E-mail: korovin@saums.vorstu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9984-987X>.

**German F. Leon**, Master, South-Western State University, Kursk, Russia, E-mail: shukrullo2000@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9498-4586>.