

ISSN 2658-6533

НАУЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

RESEARCH RESULTS IN BIOMEDICINE

10(2) 2024

16+

Сайт журнала:
rrmedicine.ru

сетевой научный рецензируемый журнал
online scholarly peer-reviewed journal



НАУЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ БИМЕДИЦИНСКИХ 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 10, №2. 2024

СЕТЕВОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Издается с 2014 г.

ISSN 2658-6533



Volume 10, №2. 2024

ONLINE SCHOLARLY PEER-REVIEWED JOURNAL

First published online: 2014

ISSN 2658-6533

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

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

ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОЙ КОЛЛЕГИИ:

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

EDITORIAL TEAM:

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

EDITORIAL BOARD:

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

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

РЕДАКЦИЯ ЖУРНАЛА:

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

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

EDITORIAL BOARD:

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

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

ГЕНЕТИКА

GENETICS

Tatiana A. Stetskaya, Ksenia A. Kobzeva, Sergey M. Zaytsev, Irina V. Shilenok, Galina V. Komkova, Natalia V. Goryainova, Olga Yu. Bushueva <i>HSPD1</i> gene polymorphism is associated with an increased risk of ischemic stroke in smokers	175	Tatiana A. Stetskaya, Ksenia A. Kobzeva, Sergey M. Zaytsev, Irina V. Shilenok, Galina V. Komkova, Natalia V. Goryainova, Olga Yu. Bushueva <i>HSPD1</i> gene polymorphism is associated with an increased risk of ischemic stroke in smokers	175
К.Э. Ахиярова, Р.И. Хусаинова, Б.И. Ялаев, А.В.Тюрин Поиск молекулярно-генетических маркеров гипермобильности суставов	187	Karina E. Akhiiarova, Rita I. Khusainova, Bulat I. Yalaev, Anton V. Tyurin Search for molecular markers of joint hypermobility	187
А.В. Понасенко, А.В. Синицкая, М.В. Хуторная, М.Ю. Синицкий, М.А. Асанов, А.О. Поддубняк Полиморфные локусы генов матриксных металлопротеиназ ассоциированы с развитием ишемической болезни сердца с сопутствующим метаболическим синдромом	206	Anastasia V. Ponasenکو, Anna V. Sinitskaya, Maria V. Khutornaya, Maxim Yu. Sinitsky, Maxim A. Asanov, Alena O. Poddubnyak Polymorphism in the matrix metalloproteinase genes is associated with coronary artery disease risk with concomitant metabolic syndrome	206
Ю.Н. Решетникова, И.В. Пономаренко, В.И. Чурносков, М.С. Пономаренко, Е.А. Решетников Генетический вариант rs11568818 матриксной металлопротеиназы 7 ассоциирован с весом новорожденного у беременных с задержкой роста плода	222	Yuliya N. Reshetnikova, Irina V. Ponomarenko, Vladimir I. Churnosov, Marina S. Ponomarenko, Evgeny A. Reshetnikov Genetic variant rs11568818 of matrix metalloproteinase <i>MMP7</i> associated with newborn weight in pregnant women with fetal growth restriction	222

ФАРМАКОЛОГИЯ, КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

PHARMACOLOGY

Hozaifa K. Elsawah, Haitham M. Mokhimar, Mohamed M. Kandiel, Ayman S. Farid, AbuBakr M. El-Mahmoudy Potential protective effect of alpha lipoic acid against testicular oxidative stress and altered gene expression induced by gentamicin treatment	234	Hozaifa K. Elsawah, Haitham M. Mokhimar, Mohamed M. Kandiel, Ayman S. Farid, AbuBakr M. El-Mahmoudy Potential protective effect of alpha lipoic acid against testicular oxidative stress and altered gene expression induced by gentamicin treatment	234
Ali H. Salama <i>In vitro</i> activity of the novel antimicrobial peptide WR-286 in combination with vancomycin against methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	244	Ali H. Salama <i>In vitro</i> activity of the novel antimicrobial peptide WR-286 in combination with vancomycin against methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	244

В.Ю. Мишланов, А.Г. Чучалин, В.А. Черешнев, Е.В. Поляков Механизмы биологической эффективности ионных форм металлов переменной валентности в респираторной медицине	252	Vitaliy Ju. Mishlanov, Alexander G. Chuchalin, Valery A. Chereshev, Evgeniy V. Polyakov Mechanisms of biological effectiveness of ionic forms of metals of variable valence in respiratory medicine	252
--	------------	---	------------

КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

MEDICINE

С.С. Потанин, Д.С. Цапко, Е.Ю. Чибикина, А.М. Сайфулина, Т.А. Лепилкина Применение психотропных препаратов при онкологических заболеваниях (обзор)	270	Sergei S. Potanin, Darya S. Tsapko, Evgeniia Y. Chibikova, Alina M. Sayfulina, Taissia A. Lepilkina The use of psychotropic drugs in oncological diseases (review)	270
Ruba M. Ali, Svetlana V. Lomteva, Anzhela A. Aleksandrova, Karina Yu. Sagamonova, Artur S. Sagamonov, Manar N.A. Ammar, Tatiana P. Shkurat Differential expression of CYP19A1 and lncRNA-CTBP1-AS in the granulosa cells of women with polycystic ovary syndrome	292	Ruba M. Ali, Svetlana V. Lomteva, Anzhela A. Aleksandrova, Karina Yu. Sagamonova, Artur S. Sagamonov, Manar N.A. Ammar, Tatiana P. Shkurat Differential expression of CYP19A1 and lncRNA-CTBP1-AS in the granulosa cells of women with polycystic ovary syndrome	292
В.В. Ерема, А.А. Мамчур, Д.А. Каштанова, М.В. Иванов, А.М. Румянцева, А.А. Акопян, В.С. Юдин, В.В. Макаров, А.А. Кескинов, И.Д. Стражеско, О.Н. Ткачева, С.А. Краевой, С.М. Юдин Связь между когнитивным статусом долгожителей Центрального федерального округа Российской Федерации и социо- экономическими факторами: анализ ассоциаций	303	Veronika V. Erema, Alexandra A. Mamchur, Daria A. Kashtanova, Mikhail V. Ivanov, Antonina M. Rumyantseva, Anna A. Akopyan, Vladimir S. Yudin, Valentin V. Makarov, Anton A. Keskinov, Irina D. Strazhesko, Olga N. Tkacheva, Sergey A. Kraevoy, Sergey M. Yudin Relationship between the cognitive status of the long-living adults of the Central Federal District of the Russian Federation and socioeconomic factors: analysis of associations	303

ГЕНЕТИКА GENETICS



DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-2-0-1

УДК 575.174.015.3:616.831-005.4-056.83

HSPD1 gene polymorphism is associated with an increased risk of ischemic stroke in smokers

Tatiana A. Stetskaya¹ , Ksenia A. Kobzeva¹ , Sergey M. Zaytsev² ,
Irina V. Shilenok³ , Galina V. Komkova¹ , Natalia V. Goryainova¹ ,
Olga Yu. Bushueva¹

¹ Kursk State Medical University,

3 Karl Marx St., Kursk, 305004, Russia

² Pavlov First Saint Petersburg State Medical University,

6-8 Leo Tolstoy St., Saint Petersburg, 197022, Russia

³ Kursk City Clinical Emergency Hospital,

14 Pirogov St., Kursk, 305035, Russia

Corresponding author: Olga Y. Bushueva (olga.bushueva@inbox.ru)

Abstract

Background: Ischemic stroke (IS) is a leading cause of death and disability worldwide. Since the influence of vascular stressors prompts cross-reactivity with microbial and human HSPD1 (HSP60), which results in the degradation of vascular endothelium and intimal infiltration by mononuclear cells, HSP60 is viewed as a key player in the autoimmune theory of atherosclerosis. **The aim of the study:** The present pilot study investigated whether the tag SNP rs11682567 *HSPD1* is associated with the risk of IS. **Materials and methods:** DNA samples from 1176 unrelated Russian subjects (708 IS patients and 468 healthy controls) were genotyped for tagging SNP rs11682567 in the *HSPD1* gene using the MassArray-4 system. A log-additive regression model was used to interpret the associations between genotypes and IS risk. **Results:** We discovered that smoking, a major environmental endothelial stressor, dramatically modifies the link between rs11682567 and IS, with a relationship only being seen in smokers (risk allele G; OR = 2.11, 95% CI = 1.17-3.82; P = 0.0075). The functional annotation of this SNP revealed that risk allele G of rs11682567 impacts the expression and alternative splicing of genes that regulate brain ischemia-reperfusion injury, reactive oxygen species production, toll-like receptor 4 internalization, and pro-inflammatory properties. Moreover, allele G rs11682567 creates binding sites for transcription factors jointly involved in biological processes encompass neurogenesis, monocyte differentiation, fatty acid metabolism, cell signalling, and apoptosis. **Conclusion:** Thus, rs11682567 SNP in the *HSPD1* gene represents a novel genetic marker of ischemic stroke, whose significance for the pathogenesis of IS is mediated by smoking.

Keywords: ischemic stroke; heat shock; mitochondrial folding; *HSPD1*; HSP60; chaperones; atherosclerosis; autoimmune response; rs11682567; smoking

For citation: Stetskaya TA, Kobzeva KA, Zaytsev SM, et al. *HSPD1* gene polymorphism is associated with an increased risk of ischemic stroke in smokers. *Research Results in Biomedicine*. 2024;10(2):175-186. DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-2-0-1

Introduction. Ischemic stroke is a major global cause of death and disability [1]. A lot of studies have been done so far to investigate the genetic nature of stroke [2] and stroke-related phenotypes, like hypertension [3] and atherosclerosis [4]. Heat Shock Proteins (HSPs) are engaged in a number of cellular processes, including immunological response, inflammation, and apoptosis, that may have an effect on the outcomes of stroke [5]. Also, by stabilising proteins and assisting in protein re-folding and degradation, HSPs directly contribute to the protection of cells and tissues against the damaging effects of ischemia [6].

HSPD1, otherwise known as heat shock protein 60 (HSP60), is a chaperonin that is present in human mitochondria. It assists in protein folding and is required for preserving mitochondrial functionality, which is essential for cell survival [7]. A major risk factor for stroke is atherosclerosis, an inflammatory condition which was initially referred to an immunological response against HSP60 [8]. There is a

chance of cross-reactivity between human and microbial HSP60, which can cause endothelial damage and inflammation and possibly aid in the onset of atherosclerosis [4]. To our knowledge, no research has looked into the relationship between *HSPD1* SNPs and IS risk.

The aim of the study. To investigate whether SNP rs11682567 *HSPD1* is related with the risk of IS.

Materials and methods. The study enrolled 1176 unrelated Russians from Central Russia, including 708 patients with IS and 468 healthy people. The study protocol was approved by the Kursk State Medical University's Ethical Review Committee. Before being accepted into the study, each participant provided written informed consent and agreed to the inclusion criteria listed below: self-declared Russian ancestry and birthplace in Central Russia.

In Table 1, the study population's baseline characteristics are presented.

Table 1

Baseline characteristics of the studied groups

Baseline characteristics		IS patients (n=708)	Controls (n=468)	P-value
Age, Me [Q1; Q3]		63 [55; 70]	57 [54; 64]	<0.001
Gender	Males, N(%)	399 (56.4%)	168 (35.9%)	<0.001
	Females, N(%)	309 (43.6%)	300 (64.1%)	
Smoking	Yes, N (%)	365 (51.5%)	82 (17.5%)	<0.001
	No, N (%)	343 (48.5%)	386 (82.5%)	

Both the Regional Vascular Centre of Kursk Regional Clinical Hospital and the Neurology Clinics of Kursk Emergency Medicine Hospital participated in the study's patient recruitment [9-12]. In order to diagnose IS during the acute phase of stroke, the results of the neurological examination, brain computed tomography, and/or magnetic resonance imaging were used. The following conditions were used to exclude individuals from the IS study: traumatic brain injury; intracerebral haemorrhage; hemodynamic or dissection-related stroke; hepatic or renal failure; autoimmune, oncological, or other

disorders that can produce an abrupt cerebrovascular event. All of the IS patients had a history of hypertension and were taking medication to lower their blood pressure.

The control group consisted of healthy volunteers with normal blood pressure, not receiving antihypertensive therapy, without clinical signs of cardiovascular, cerebrovascular and other serious diseases. If a healthy individual's systolic blood pressure was less than 130 mm Hg and/or their diastolic blood pressure was less than 85 mm Hg on at least three different occasions, they would have qualified for

inclusion in the control group. When undergoing medical examinations at public institutions and industrial businesses in the Kursk region, control subjects were recruited from Kursk hospitals during particular periods [13, 14]. During the same time frame and from the same population, this cohort was recruited [15].

The selection of SNPs was based on the following criteria: the SNP needs to be tagging, with a minor allele frequency of at least 0.05 in the European population, and stand out for having a high regulatory potential. The bioinformatic tools SNPinfo Web Server (<https://snpinform.niehs.nih.gov/>) and LD TAG SNP Selection, which were used to identify SNPs based on the reference haplotypic structure of the Caucasian populations (CEU, TSI) of the project HapMap, determined that the rs11682567 *HSPD1* is a tagging SNP. This SNP is located in intron chr2:197490429 (GRCh38.p14) and characterized by the replacement T>G (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs11682567>).

The regulatory potential of rs11682567 was evaluated using a variety of bioinformatic tools [16]. The RegulomeDB online tool (<https://regulomedb.org/regulome-search/> (accessed November 20, 2022)) showed that rs11682567 is characterized by a regulatory coefficient of 5 (TF binding or DNase peak). This SNP is characterized by Enhancer histone marks and regulatory motifs, according to the HaploReg (v4.1) database (<http://archive.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php> (accessed on November 20, 2022)).

The NCBI source's data (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) indicates that this genetic variation is described by an average minor allele frequency of >0.05 in European populations. In light of the fact that SNP rs11682567 satisfies the prerequisites for study inclusion, it was chosen for our research.

Genetic Analysis. The Laboratory of Genomic Research at the Research Institute for Genetic and Molecular Epidemiology of Kursk State Medical University (Kursk, Russia) performed the DNA analysis. The conventional technique of phenol/chloroform extraction and

ethanol precipitation was used to extract genomic DNA from thawed blood samples. The MassARRAY-4 genetic analyzer (Agena Bioscience, San Diego, CA, USA) was used for genotyping.

The SNP primers were created through the use of the Agena Bioscience's Assay Design Suite software, and genotyping was accomplished by means of matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-TOF). The remaining dNTP and primers were removed by employing the SAP enzyme after a PCR reaction specific to the locus. Mass-modified dideoxy-nucleotide terminators of an oligonucleotide primer were then utilized to carry out single-base extension, which occurred upstream of the desired polymorphic site.

A PCR reaction was conducted on a spectral chip using a 5 µL reaction mixture that included 3 µL of PCR mix consisting of 80.6 µL of ddH₂O, 50.4 µL of 10x buffer, 40.3 µL of MgCl₂ (25 mmol/L), 10.1 µL of a mixture of dNTP (25 mmol/L), 100.8 µL of a mixture of PCR primers (0.5 mmol/L), and 20.16 µL of HotStartTaq polymerase (5 U/µL), as well as 2 µL of DNA (10 ng/µL). The reaction was carried out for 125 minutes in a CFX96 Bio-Rad thermal cycler, with the following program: denaturation at 95 °C for 2 minutes, followed by 44 cycles of denaturation at 95 °C for 30 seconds, annealing at 56 °C for 30 seconds, and elongation at 72 °C for 60 seconds. The samples were then incubated at 72 °C for 5 minutes.

The unreacted dNTPs present in the PCR samples were eliminated using the shrimp alkaline phosphatase (SAP) reaction, which involved the hydrolysis of dNTPs to nucleosides and phosphates by the alkaline phosphatase of shrimp. To achieve this, 2 µL of SAP mixture, consisting of 161.6 µL of ddH₂O, 18 µL of 10xTS buffer, and 31.7 µL of SAP enzyme, was added to each well, and the plate was loaded into the CFX96 Bio-Rad thermal cycler. The SAP reaction was carried out for 55 minutes, comprising 45 minutes at 37 °C, followed by 10 minutes at 85 °C.

To prepare for the third iPLEX reaction, an E-primer mix was created based on the molecular weight of the E-primers. The resulting mixture was evaluated using mass spectrometry to determine the intensity of the E-primer peaks, and the necessary quantities of E-primers were added to the mix to achieve the same signal intensity. 2 µL of iPLEX-mix (consisting of 65.4 µL of ddH₂O, 21.2 µL of iPLEX buffer, 21.2 µL of terminating mixture, 99.3 µL of E-primer mix, and 4.33 µL of iPLEX enzyme) was then added to each well. The plate was loaded into a CFX96 Bio-Rad thermal cycler and underwent denaturation at 94 °C for 30 seconds, followed by 40 cycles of denaturation at 94 °C for 5 seconds, annealing at 52 °C for 5 seconds, and elongation at 80 °C for 5 seconds. The reaction was then incubated at 72 °C for 3 minutes. After the iPLEX reaction was complete, 30 µL of water was added to all wells, and the plate was loaded into a mass spectrometer.

To prevent the formation of contaminant peaks resulting from the binding of small polar molecules and positively charged sodium and potassium cations to oligonucleotides, the amplicons underwent robotic desalination using SpectroCLEAN resin (Agena Bioscience).

The samples were loaded onto a spectral chip with an ionization matrix using the Nano-dispenser workstation in automatic mode. The samples formed crystals on the SpectroCHIP, which were then ionized by a high-energy laser, resulting in the ionization of DNA molecules. Subsequently, the ionized DNA samples were passed through a time-of-flight tube with an electric field. By detecting the time-of-flight of analytes, we could determine the genotype of the analytes. Finally, the results of mass spectrometric analysis for each SNP were reviewed using the TyperAnalyzer program from Agena Bioscience.

To ensure quality control, 95 randomly selected DNA samples were chosen for repeat genotyping on the same platform, without knowledge of the case-control status. The repeatability test revealed a 100% concordance rate.

- QTLbase Bioinformatic tool (<http://www.mulinlab.org/qtlbase/index.html>

(accessed February 24, 2023)) was used for analysis of expression quantitative trait loci (eQTLs) in brain, whole blood, and blood vessels. Additionally, for QTL analysis of the peripheral blood effect the eQTL online tool was used.

- STRING database's bioinformatic tools were utilised to analyse the main functional partners of *HSPD1* (<https://string-db.org/> (accessed February 24, 2023)). The STRING database was also used for analysis of biological processes and molecular functions reflecting interactions *HSPD1* with key functionally relevant proteins (accessed February 21, 2023).

- The effect of rs11682567 *HSPD1* on the binding of transcription factors (TFs) to DNA based on the presence of the reference/alternative alleles was assessed using the atSNP Function Prediction online tool (<http://atsnp.biostat.wisc.edu/search> (accessed February 21, 2023)). In accordance with a positional weight matrix-based calculation of the impact of SNPs on how well TFs interact with DNA, certain TFs were added.

- It was possible to assess the joint participation of TFs linked to the reference/SNP alleles in overrepresented biological processes directly associated with the pathogenesis of IS using the Gene Ontology web tool (<http://geneontology.org> (accessed February 24, 2023)).

- The Comparative Toxicogenomics Database (CTD) resource (<http://ctdbase.org> (accessed February 24, 2023)) was used for interpretation on environment-associated correlates of *HSPD1*. Based on information from globally published studies, CTD enables the analysis of particular interactions between genes and chemicals in vertebrates and invertebrates. One chemical and one gene or protein were the subjects of this tool's analysis of binary interactions.

- For a bioinformatic examination of the connections between rs11682567 *HSPD1* and stroke-related phenotypes, intermediate phenotypes (such as blood pressure, heart rate etc.), the Cerebrovascular Disease Knowledge Portal (CDKP) (<https://cd.hugeamp.org/> (accessed

February 24, 2023)) and Cardiovascular Disease Knowledge Portal (<https://cvd.hugeamp.org/>) (accessed February 24, 2023)) were used.

Results and discussion
Associations of rs11682567 HSPD1 with the Risk of Ischemic Stroke. Table 2 displays the genotype frequencies of rs11682567 *HSPD1* in the study groups.

Table 2

Results of the analysis of associations between rs11682567 *HSPD1* gene SNP and ischemic stroke risk

Genotypes	Controls (N=468)	IS patients (N=708)	OR (95% CI)	P
Entire group				
T/T	360 (76.9%)	511 (72.2%)	adj1.25 (0.95-1.65)	adj0.11
G/T	104 (22.2%)	184 (26%)		
G/G	4 (0.8%)	13 (1.8%)		
Maf (G)	0.120	0.148		
Nonsmokers				
T/T	292 (75.7%)	256 (74.6%)	1.07 (0.78-1.46)	0.68
G/T	90 (23.3%)	82 (23.9%)		
G/G	4 (1%)	5 (1.5%)		
Maf (G)	0.127	0.134		
Smokers				
T/T	68 (82.9%)	255 (69.9%)	2.11 (1.17-3.82)	0.0075
G/T	14 (17.1%)	102 (27.9%)		
G/G	0 (0%)	8 (2.2%)		
Maf (G)	0.085	0.162		

Note: ¹ – odds ratio and 95% confidence interval; P – P-level. Every computation was done in relation to the minor alleles. Differences that are statistically significant are highlighted in bold. adj – calculations, performed with adjustment for sex, age, smoking.

In each case and control groups, the genotype frequencies of all examined SNPs were distributed according to the Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$). The analysis of the total sample did not reveal associations between rs11682567 *HSPD1* and IS risk (Table 2).

Subsequent sub-group analysis showed that rs11682567 was associated with an increased risk of IS exclusively in smokers (risk allele G; OR = 2.11; 95% CI = 1.17–3.82; $P = 0.0075$).

Bioinformatics Analysis. The *HSPD1* gene is highly expressed in brain tissues, blood vessels, and whole blood. In brain tissues, gene expression levels of *HSPD1* (MeTPM) varies from 77.57 to 159.3; in blood vessels – from 122.4 to 131.0; in whole blood MeTPM=30.69.

QTL-effects. According to the QTLbase, the G allele rs11682567 is associated with

eQTL-mediated up-regulation of *HSPD1* expression in the brain-hippocampus ($\beta = 0.174$; FDR=0.002), as well as up-regulation of *ANKRD44* in Blood-T cell CD4+naive ($\beta = 0.02$; FDR=0.03) and *ANKRD44-IT1* in blood-T cells CD4+ naive ($\beta = 0.038$; FDR=0.02)/blood-neutrophils CD16+ ($\beta = 0.015$; FDR=0.036) (<http://www.mulin-lab.org/qltbase>).

Furthermore, using the eQTLGen resource, it was discovered that the G allele rs11682567 had an impact on the expression of the genes *AC013264.2*, *MARS2*, *RFTN2*, *COQ10B*, *SF3B1*, and *HSPE1* as well as an increase in the expression of the *PLCL1* gene in peripheral blood (Table 3).

Using the bioinformatics tool FIVEx, it was feasible to determine how the G rs11682567 allele affects the alternative splicing of the *HSPD1*, *ANKRD44*, *COQ10B*,

HSPE1, *MOB4*, *RFTN2*, and *SF3B1* genes in blood cells and brain tissues by cis-sQTL-mediated effects (<https://fivex.sph.umich.edu>).

Analysis of transcription factors. Risk allele G of rs11682567 creates binding sites for transcription factors BRCA1, COMP1, FOXO3, FOXO4, HMGA1, IRF7, MYC, RUNX2, SOX10, SOX17, SOX2, Sox6, SOX9, SRY. According to the Gene Ontology resource, these transcription factors are jointly involved in overrepresented biological processes, such as «glial cell fate commitment» (GO:0021781; FDR=0.005); «regulation of monocyte differentiation» (GO:0045655; FDR=0.01); «neuronal stem cell population maintenance» (GO:0097150; FDR=0.014); «negative regulation of fatty acid metabolic process» (GO:0045922; FDR=0.03); «negative regulation of neuron differentiation»

(GO:0045665; FDR=0.003); «oligodendrocyte differentiation» (GO:0048709; FDR=0.003); «cellular response to growth factor stimulus» (GO:0071363; FDR=0.02); «cellular response to cytokine stimulus» (GO:0071345; FDR=0.009); «negative regulation of apoptotic process» (GO:0043066; FDR=0.02). The etiopathogenesis of IS is greatly influenced by all of these biological processes. The fact that TFs that bind to the G allele also control «DNA methylation» (GO:0044030; FDR=0.016) and «chromatin organization» (GO:0006325; FDR=0.004) adds to the notion that rs11682567 *HSPD1* plays a substantial role in the mechanisms of epigenetic regulation. It is remarkable that no overrepresented GO was discovered when TFs that bind to the reference allele T rs11682567 were examined.

Table 3

Cis-eQTL-mediated effects of rs11682567 *HSPD1* in peripheral blood according to the resource eQTLGen (<https://www.eqtlgen.org/>)

SNP	Effect allele	Symbol	P-value	FDR	Z-score	N samples
rs11682567	G	<i>PLCL1</i>	4.44×10^{-149}	<0.0001	26.0043	31644
rs11682567	G	<i>AC013264.2</i>	1.24×10^{-71}	<0.0001	-17.8972	5502
rs11682567	G	<i>MARS2</i>	1.86×10^{-41}	<0.0001	-13.4873	31644
rs11682567	G	<i>RFTN2</i>	1.04×10^{-36}	<0.0001	-12.6552	31176
rs11682567	G	<i>COQ10B</i>	2.67×10^{-17}	<0.0001	-8.4598	31684
rs11682567	G	<i>SF3B1</i>	2.90×10^{-11}	<0.0001	-6.6516	31684
rs11682567	G	<i>HSPE1</i>	2.24×10^{-8}	0.0001	-5.5922	14263

Bioinformatic analysis of the associations of rs11682567 *HSPD1* with cerebral stroke and intermediate phenotypes. According to the bioinformatic resources Cerebrovascular Disease Knowledge Portal (CDKP) and Cardiovascular Disease Knowledge Portal (CVDKP), which integrate and evaluate the genetic association data from the greatest consortiums for the research of cardiovascular and cerebrovascular disorders, the risk allele G of rs11682567 *HSPD1* is associated with increasing in diastolic blood pressure (beta=0.007; P=0.0007), total cholesterol (beta=0.0033; P=0.033), coronary artery disease in subjects without diabetes (OR=1.09; P=0.043).

Protein-Protein Interactions. Using the STRING database, 10 proteins (proteins of the first shell of interactors) distinguished by the most pronounced interactions with *HSPD1* were discovered: *HSPE1*, *HSPA9*, *TLR4*, *TLR2*, *HSP90AA1*, *HSP90AB1*, *TST*, *GRPEL1*, *TRAP1*, *DHFR* (PPI enrichment p-value= 7.46×10^{-5}) (Figure).

It is interesting that the majority of *HSPD1*'s primary functional partners exhibit chaperone and co-chaperone activities, which are strongly associated with proteostasis (by regulation of protein import, misfolding and refolding of unfolded proteins under stress), inflammatory response (by NF-kappa-B activation), folate metabolism (Table 4).

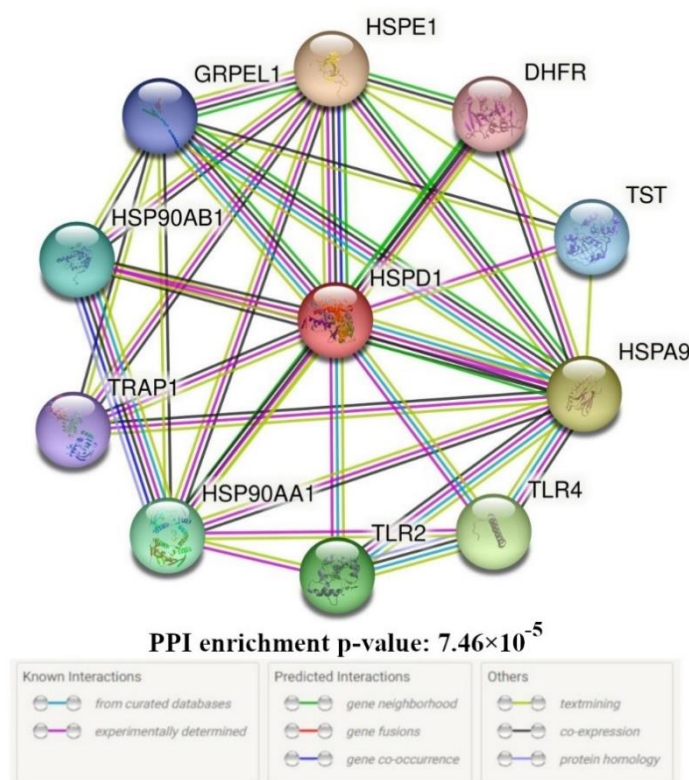


Fig. Predicted Functional Partners of *HSPD1* (<https://string-db.org/>)

HSPD1 and its primary functional partners jointly participate in biological processes which reflects biological processes crucial to the pathophysiology of IS, such as proteostasis, oxidative stress, inflammation, regulation of extracellular matrix, endothelial dysfunction, heat stress, apoptosis, neurogenesis, cell signaling (<https://string-db.org/cgi/network?taskId=bACSG8aUeF2I&sessionId=bjoEZTIHrwUn>).

The current study demonstrates for the first time that polymorphism rs11682567 in the gene encoding Heat Shock Protein Family D (Hsp60) Member 1 (*HSPD1*) is linked to the risk IS and is significantly modified by smoking. *HSPD1* is expressed in vessels, brain tissues and blood. This chaperonin is responsible for regulating mitochondrial protein homeostasis and mitochondrial function: it encourages unfolded polypeptides to fold normally in stressful conditions, avoids misfolding, and facilitates imported proteins fold properly [17]. Previous studies have demonstrated a substantial function for *HSPD1* in the emergence of

cardiovascular diseases. Patients with CVD showed elevated HSP60 levels [18]. Currently, HSP60 is seen as a major player in the autoimmune theory of atherosclerosis [8, 19]. The highly conserved microbial HSP60 antigen is a target of protective, advantageous adaptive immunity that all humans develop [20]. However, exposure to endothelial stressors, such as components of cigarette smoke, causes *HSP60* expression in vascular endothelial cells that do not typically express *HSP60*, which causes a (cross)reaction and destruction of these target cells by preexisting cellular and humoral immunity against HSP60, resulting in intimal infiltration by mononuclear cells [19]. HSP60 also has a sizable impact on the regulation of vascular smooth muscle cells because it activates the IKK/NF- κ B, ERK/MAPK, and TLR4 pathways, which promote vascular smooth muscle cell migration, thicken the intima, and are important in vascular wall remodeling [18, 21, 22, 23]. Thus, in total, exposure to vascular stressors triggers a "vicious circle" of an autoimmune response leading to the progression of atherosclerosis.

Table 4

Main functional characteristics of HSPD1 predicted functional partners (<https://string-db.org/>)

Protein	Functions	*						Score
		1	2	3	4	5	6	
HSPE1	10 kDa heat shock protein, mitochondrial; Co-chaperonin implicated in mitochondrial protein import and macromolecular assembly. May also prevent misfolding and promote the refolding of unfolded polypeptides generated under stress conditions in the mitochondrial matrix.	•	•	•	•		•	0.999
HSPA9	Stress-70 protein, mitochondrial; Chaperone protein which plays an important role in mitochondrial iron-sulfur cluster biogenesis. May be involved in the regulation of proliferation of cells and cellular ageing.	•		•	•	•	•	0.999
TLR4	Toll-like receptor 4; operates through MYD88, TIRAP, and TRAF6, triggering the release of cytokines and the inflammatory response. In complex with TLR6, promotes sterile inflammation in monocytes/macrophages in response to oxidized low-density lipoprotein.				•	•	•	0.999
TLR2	Toll-like receptor 2; activates NF-kappa-B, causes the release of cytokines, and triggers the inflammatory response by acting through MYD88 and TRAF6. In response to the lipid moiety of lipoproteins, may also cause immune cells to become active and promote apoptosis.				•	•	•	0.998
HSP90AA1	Molecular chaperone that engages with a range of client protein classes via its interaction with various co-chaperone proteins or complexes, that act as adapters, simultaneously able to interact with the specific client and the central chaperone itself. Plays a critical role in mitochondrial import.			•	•		•	0.998
HSP90AB1	Molecular chaperone that promotes the maturation, structural maintenance and proper regulation of specific target proteins involved for instance in cell cycle control and signal transduction.			•	•		•	0.990
TST	Together with MRPL18, acts as a mitochondrial import factor for the cytosolic 5S rRNA. Only the nascent unfolded cytoplasmic form is able to bind to the 5S rRNA.				•		•	0.989
GRPEL1	GrpE protein homolog 1, mitochondrial; Seems to control the nucleotide-dependent binding of mitochondrial HSP70 to substrate proteins.	•		•	•	•	•	0.987
TRAP1	A negative regulator of mitochondrial respiration able to modulate the balance between oxidative phosphorylation and aerobic glycolysis.			•	•		•	0.986
DHFR	Dihydrofolate reductase; Key enzyme in folate metabolism.	•		•	•		•	0.984

Note: Data obtained with STRING database; * - Proven interaction mechanisms: 1 – Neighborhood; 2 – Cooccurrence; 3 – Coexpression; 4 – Experiments; 5 – Databases; 6 – Textmining.

According to bioinformatics analysis utilising the STRING database, the key functional partners of HSPD1 are involved in a number of overrepresented biological processes associated with atherosclerosis, managing not just proteostasis but also oxidative stress, MyD88-dependent toll-like receptor signaling pathway, I-kappaB phosphorylation, production of pro-inflammatory cytokines, nitric-oxide synthase level, macrophage activation and proliferation, extracellular matrix organization, apoptosis, tumor necrosis factor production, neurogenesis. This provides more proof that HSPD1 plays a crucial part in the pathogenetic processes that specifically cause stroke.

We used bioinformatics analysis to support the discovered link because no analysis of correlations of rs11682567 HSPD1 with the development of IS has been conducted so far. First, a large number of genes are impacted by the risk allele G of rs11682567 HSPD1's effects on their level of expression and alternative splicing, including: *ANKRD44*, which can regulate NF-κB, an important pro-inflammatory signaling pathway [24]; *PLCL1*, which modulates VEGFR2 signalling to promote angiogenesis in the central nervous system and vascular endothelial cell inflammation [25]; *MARS2*, regulating ROS production [26]; *RFTN2*, driving toll-like receptor 4 internalisation [27]; *COQ10B*, regulating mitochondrial respiratory chain assembly [28], brain ischemia-reperfusion [29] and ROS level [30]; *SF3B1*, a major regulator of hypoxia [31]; *HSPE1*, a component in ischemia damage control [32]. Second, it was discovered that the risk allele G of rs11682567 creates binding sites for transcription factors that jointly regulate biological processes with a high pathogenetic significance for IS. These biological processes encompass neurogenesis, monocyte differentiation, fatty acid metabolism, cell signaling (response to growth factor stimulus, to cytokine stimulus), and apoptosis. Third, it was discovered that the risk allele G is associated with an increase in diastolic blood pressure, total cholesterol levels, which are modifiable risk factors for the IS, as well as coronary heart disease, which is pathogenetically related to IS.

Numerous studies have shown that smoking can significantly modify the association of genetic markers with the risk of multifactorial diseases [33], including stroke [9-12]. The effect of cigarette smoke on the up-regulation of HSP60 in humans has been demonstrated in a large number of studies [34, 35]. This discovery further justifies the significance of endothelial stressors in initiating HSPD1-dependent pro-atherosclerotic molecular pathways and helps to explain the strong risk effects of rs11682567 *HSPD1* we observed in smokers and their absence in nonsmokers.

In conclusion, our case-control study findings indicate that the *HSPD1* gene variant of rs11682567 contributes to IS susceptibility. Further research is required to confirm these findings and look into the potential molecular mechanisms underlying the associations between *HSPD1* gene variants and IS risk.

Conclusion. The present study reveals the novel genetic association between rs11682567 *HSPD1* and the risk of IS observed exclusively in smokers. These data provide the new insights of involvement of HSP60 in cardiovascular pathology. Further studies may help to uncover the details of its particular role in the stroke pathogenesis.

Financial support

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

Conflict of interests

The authors have no conflict of interest to declare.

References

1. GBD 2016 Neurology Collaborators. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. The Lancet Neurology. 2019;18(5):459-480. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30499-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30499-X)
2. Bushueva O, Barysheva E, Markov A, et al. DNA Hypomethylation of the MPO Gene in Peripheral Blood Leukocytes Is Associated with Cerebral Stroke in the Acute Phase. Journal of Molecular Neuroscience. 2021;71(9):1914-1932. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12031-021-01840-8>

3. Bushueva O, Solodilova M, Ivanov V, et al. Gender-specific protective effect of the -463G>A polymorphism of myeloperoxidase gene against the risk of essential hypertension in Russians. *Journal of the American Society of Hypertension*. 2015;9(11):902-906. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jash.2015.08.006>
4. Wick C. Heat Shock Protein 60: A Mediator of Atherosclerosis and Its Potential Therapeutic Role. In: Asea AAA, Kaur P, editors. *Chaperokine Activity of Heat Shock Proteins*. Cham: Springer International Publishing; 2019. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-02254-9_4
5. Hu C, Yang J, Qi Z, et al. Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *MedComm*. 2022;3(3):e161. DOI: <https://doi.org/10.1002/mco2.161>
6. Kim JY, Kim JW, Yenari MA. Heat shock protein signaling in brain ischemia and injury. *Neuroscience Letters*. 2020;715:134642. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134642>
7. Caruso Bavisotto C, Alberti G, Vitale AM, et al. Hsp60 Post-translational Modifications: Functional and Pathological Consequences. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2020;7:95. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00095>
8. Jakic B, Wick G, Cappellano G. Hsp60 in Atherosclerosis: Past, Present and Future. In: Asea AAA, Kaur P, editors. *Heat Shock Protein 60 in Human Diseases and Disorders*. Cham: Springer International Publishing; 2019. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-23154-5_13
9. Kobzeva KA, Shilenok IV, Belykh AE, et al. C9orf16 (BBLN) Gene, Encoding a Member of Hero Proteins, Is a Novel Marker in Ischemic Stroke Risk. *Research Results in Biomedicine*. 2022;8(3):278-292. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2022-8-3-0-2>
10. Belykh AE, Soldatov VO, Stetskaya TA, et al. Polymorphism of SERF2, the gene encoding a heat-resistant obscure (Hero) protein with chaperone activity, is a novel link in ischemic stroke. *IBRO Neuroscience Reports*. 2023;14:453-461. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2023.05.004>
11. Shilenok I, Kobzeva K, Stetskaya T, et al. SERPINE1 mRNA Binding Protein 1 Is Associated with Ischemic Stroke Risk: A Comprehensive Molecular-Genetic and Bioinformatics Analysis of SERBP1 SNPs. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(10):8716. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24108716>
12. Kobzeva KA, Soldatova MO, Stetskaya TA, et al. Association between HSPA8 Gene Variants and Ischemic Stroke: A Pilot Study Providing Additional Evidence for the Role of Heat Shock Proteins in Disease Pathogenesis. *Genes*. 2023;14(6):1171. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes14061171>
13. Bushueva OY, Bulgakova IV, Ivanov VP, et al. Association of Flavin Monooxygenase Gene E158K Polymorphism with Chronic Heart Disease Risk. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2015;159(6):776-778. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10517-015-3073-8>
14. Bushueva OYu. Single Nucleotide Polymorphisms in Genes Encoding Xenobiotic Metabolizing Enzymes Are Associated with Predisposition to Arterial Hypertension. *Research Results in Biomedicine*. 2020;6(4):447-456. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2020-6-4-0-1>
15. Polonikov A, Bocharova I, Azarova I, et al. The Impact of Genetic Polymorphisms in Glutamate-Cysteine Ligase, a Key Enzyme of Glutathione Biosynthesis, on Ischemic Stroke Risk and Brain Infarct Size. *Life*. 2022;12(4):602. DOI: <https://doi.org/10.3390/life12040602>
16. Polonikov AV, Klyosova EYu, Azarova IE. Bioinformatic tools and internet resources for functional annotation of polymorphic loci detected by genome wide association studies of multifactorial diseases (review). *Research Results in Biomedicine*. 2021;7(1):15-31. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2020-7-1-0-2>
17. Wachoski-Dark E, Zhao T, Khan A, et al. Mitochondrial Protein Homeostasis and Cardiomyopathy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(6):3353. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23063353>
18. Duan Y, Tang H, Mitchell-Silbaugh K, et al. Heat Shock Protein 60 in Cardiovascular Physiology and Diseases. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2020;7:73. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00073>
19. Grundtman C, Kreutmayer SB, Almanzar G, et al. Heat shock protein 60 and immune inflammatory responses in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2011;31(5):960-968. DOI: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.217877>
20. Saleki K, Alijanizade P, Moradi S, et al. Engineering a novel immunogenic chimera protein utilizing bacterial infections associated with atherosclerosis to induce a deviation in adaptive immune responses via Immunoinformatics approaches. *Infection, Genetics and Evolution*.

- 2022;102:105290. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105290>
21. Rodriguez A, Von Salzen D, Holguin BA, et al. Complex Destabilization in the Mitochondrial Chaperonin Hsp60 Leads to Disease. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2020;7:159. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00159>
22. Vila-Casahonda RG, Lozano-Aponte J, Guerrero-Beltrán CE. HSP60-Derived Peptide as an LPS/TLR4 Modulator: An in silico Approach. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2022;9:731376. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.731376>
23. Zhao Y, Zhang C, Wei X, et al. Heat shock protein 60 stimulates the migration of vascular smooth muscle cells via Toll-like receptor 4 and ERK MAPK activation. *Scientific Reports*. 2015;5:15352. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep15352>
24. Poppenberg KE, Jiang K, Tso MK, et al. Epigenetic landscapes suggest that genetic risk for intracranial aneurysm operates on the endothelium. *BMC Medical Genomics*. 2019;12:149. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12920-019-0591-7>
25. Kim S, Lee M, Choi YK. The Role of a Neurovascular Signaling Pathway Involving Hypoxia-Inducible Factor and Notch in the Function of the Central Nervous System. *Biomolecules and Therapeutics*. 2020;28(1):45-57. DOI: <https://doi.org/10.4062/biomolther.2019.119>
26. Mei X, Qi D, Zhang T, et al. Inhibiting MARSs reduces hyperhomocysteinemia-associated neural tube and congenital heart defects. *EMBO Molecular Medicine*. 2020;12(3):e9469. DOI: <https://doi.org/10.15252/emmm.201809469>
27. Yu H, Cheng W, Zhang X, et al. Integration analysis of methylation quantitative trait loci and GWAS identify three schizophrenia risk variants. *Neuropsychopharmacology*. 2020;45(7):1179-1187. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41386-020-0605-3>
28. Guerra RM, Pagliarini DJ. Coenzyme Q biochemistry and biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences*. 2023;48(5):463-476. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2022.12.006>
29. Yuan B, Zhao XD, Shen JD, et al. Activation of SIRT1 Alleviates Ferroptosis in the Early Brain Injury after Subarachnoid Hemorrhage. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2022;2022:9069825. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/9069825>
30. Wang Y, Hekimi S. The Complexity of Making Ubiquinone. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2019;30(12):929-943. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.08.009>
31. Hu Y, Lu H, Li H, et al. Molecular basis and clinical implications of HIFs in cardiovascular diseases. *Trends in Molecular Medicine*. 2022;28(11):916-938. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2022.09.004>
32. Liu F, Yang Y, Liu T, et al. Analysis of Differentially Expressed Long Noncoding RNA in Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Kidney and Blood Pressure Research*. 2020;45(5):686-701. DOI: <https://doi.org/10.1159/000508217>
33. Polonikov AV, Samgina TA, Nazarenko PM, et al. Alcohol Consumption and Cigarette Smoking are Important Modifiers of the Association Between Acute Pancreatitis and the PRSS1-PRSS2 Locus in Men. *Pancreas*. 2017;46(2):230-236. DOI: <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000729>
34. Henderson B, Csordas A, Backovic A, et al. Cigarette smoke is an endothelial stressor and leads to cell cycle arrest. *Atherosclerosis*. 2008;201(2):298-305. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.02.022>
35. Kreutmayer SB, Messner B, Knoflach M, et al. Dynamics of heat shock protein 60 in endothelial cells exposed to cigarette smoke extract. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2011;51(5):777-780. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.07.003>

Received 17 June 2023

Revised 2 September 2023

Accepted 27 November 2023

Information about the authors

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

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

Sergey M. Zaytsev, Anesthesiologist-resuscitator, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia, E-mail: zukunftarzt.serii@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4280-9241>.

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

Galina V. Komkova, Cand. Sci. (Biology), Associate Professor at the Department of Biology, Medical Genetics and Ecology, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, E-mail: komkovagv@kursksmu.net, ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-2756-4164>.

Natalia V. Goryainova, Cand. Sci. (Biology), Associate Professor at the Department of Biology,

Medical Genetics and Ecology, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, E-mail: goryainovanv@kursksmu.net, ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-4980-4292>.

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



DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-2-0-2

УДК 616.72-007.281

Поиск молекулярно-генетических маркеров гипермобильности суставов

К.Э. Ахиярова¹ , Р.И. Хусайнова² , Б.И. Ялаев² , А.В.Тюрин¹

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

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии»,
ул. Дмитрия Ульянова, д. 11, г. Москва, 117292, Российская Федерация
Автор для переписки: К.Э. Ахиярова (liciadusu@gmail.com)

Резюме

Актуальность: Гипермобильность суставов (ГМС) – состояние, которое может иметь как доброкачественный характер, так и сопровождаться болевым синдромом и ранним развитием остеоартрита. Для ранней верификации риска развития осложнений необходимо исследование молекулярного патогенеза различных вариантов ГМС. **Цель исследования:** Поиск ассоциаций полиморфных вариантов генов-кандидатов, участвующих в метаболизме соединительной ткани, с гипермобильностью суставов в изолированной и сочетанной с дисплазией соединительной ткани (ДСТ) вариантах. **Материалы и методы:** В исследовании приняли участие лица молодого ($21,86 \pm 0,22$ лет) возраста ($n=181$). Было проведено клиническое исследование на наличие ГМС (шкала Beighton) и ДСТ (модифицированная таблица Кадуриной Т.И.). Проведено молекулярно-генетическое исследование и поиск ассоциаций полиморфных вариантов генов рецептора витамина Д (*VDR*), люмикана (*LUM*), тенасцина (*TNXB*), фактора роста и дифференциации 5 (*GDF5*), ионного канала магния (*TRPM6*), костного морфогенетического белка 5 типа (*BMP5*) с ГМС в изолированной и сочетанной с ДСТ формах. Статистическая обработка данных проводилась с использованием точного критерия Фишера с поправкой Йетса для таблиц сопряженности 2×2 . Силу ассоциаций оценивали в значениях показателя соотношения шансов (Odds Ratio, OR, при $p < 0,05$), поправка на множественность – методом FDR (Бенджамини-Хохберга). Количественные данные оценивались попарно с использованием t-критерия Стьюдента, нормальность распределения по критерию Колмогорова-Смирнова. **Результаты:** Были выявлены ассоциации аллеля G и генотипа GG локуса rs3734444 и аллеля A локуса rs1470527 гена *BMP5* с наличием ГМС в изолированном состоянии (OR=3,70 и OR=5,10; OR=8,00). Выявлены ассоциации аллеля T и генотипа TT локуса rs11144134 гена *TRPM6* с ГМС в изолированной (OR=3,00 и OR=10,19) и в сочетанной с ДСТ формах (OR=3,17 и OR=11,28), генотип TT также ассоциировался с изолированной формой ДСТ (OR=3,74). Генотип GT локуса rs73611720 гена *GDF5* ассоциировался с изолированной ДСТ (OR=4,15). Для полиморфных вариантов rs11540149 (*VDR*), rs2268578, rs3759222 (*LUM*), rs3130342 (*TNXB*) не было обнаружено статистически значимых ассоциаций с ГМС. **Заключение:** Аллель G локуса rs3734444 гена *BMP5* является потенциально рисковым маркером ГМС в целом, аллель A локуса rs1470527 – изолированной ГМС, генотип GT локуса rs73611720 гена *GDF5* – маркером изолированной ДСТ, аллель T локуса rs11144134 гена *TRPM6* – маркером ГМС в сочетании с ДСТ.

Ключевые слова: гипермобильность суставов; дисплазия соединительной ткани; полиморфные варианты; *VDR*; *LUM*; *TNXB*; *GDF5*; *TRPM6*; *BMP5*

Для цитирования: Ахиярова КЭ, Хусаинова РИ, Ялаев БИ, и др. Поиск молекулярно-генетических маркеров гипермобильности суставов. Научные результаты биомедицинских исследований. 2024;10(2):187-205. DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-2-0-2

Search for molecular markers of joint hypermobility

Karina E. Akhiarova¹ , Rita I. Khusainova² , Bulat I. Yalaev² ,
Anton V. Tyurin¹ 

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

² National Medical Research Center for Endocrinology,
11 Dmitry Ulyanov St., Moscow, 117292, Russia

Corresponding author: Karina E. Akhiarova (liciadesu@gmail.com)

Abstract

Background: Joint hypermobility (JH) is a condition that can be either benign or accompanied by pain and early development of osteoarthritis. For early verification of the risk of complications, it is necessary to study the molecular pathogenesis of various JH variants. **The aim of the study:** The aim of this study was to search for candidate genes involved in connective tissue metabolism and causing joint hypermobility in a form isolated or combined with connective tissue dysplasia (CTD). **Materials and methods:** The study involved young ($21,86 \pm 0,22$ y.o.) people ($n=181$). A clinical study was conducted for the presence of signs of JH (Beighton scale) and CTD (tables Kadurina T.I.). Further, a molecular genetic study was carried out and the search for associations of polymorphic variants of genes (vitamin D receptor (*VDR*), lumican (*LUM*), tenascin (*TNXB*), growth/differentiation factor 5 (*GDF5*), magnesium ion channel *TRPM6*), bone morphogenetic protein type 5 (*BMP5*)) and JH, CTD in isolated and combined forms. Statistical data processing was carried out by comparing qualitative features using the χ^2 test, Fisher's exact test, and the χ^2 test with Yates' correction for contingency tables 2x2. The strength of associations was assessed in terms of the odds ratio (Odds Ratio, OR, at $p<0.05$), the correction for multiple comparisons was carried out using the FDR method (Benjamin-Hochberg). Quantitative data were evaluated in pairs using the Student's t-test, the normality of distribution according to the Kolmogorov-Smirnov test. **Results:** Associations of the G allele and the GG genotype of the rs3734444 locus of the *BMP5* gene with the presence of JH (OR=3.70 and OR=5.10), the A allele of the rs1470527 locus of the *BMP5* gene and the presence of JH+CTD (OR=8.00), the T allele and the TT genotype of the rs11144134 locus of the *TRPM6* gene with JH in isolated (OR=3.00 and OR=10.19) and in the forms combined with CTD (OR=3.17 and OR=11.28), the TT genotype was also associated with the isolated form of CTD (OR=3.74). The GT genotype of the rs73611720 locus of the *GDF5* gene was associated with isolated CTD (OR=4.15). No statistically significant associations were found for polymorphic variants rs11540149 (*VDR*), rs2268578 and rs3759222 (*LUM*), rs3130342 (*TNXB*). **Conclusion:** The G allele of locus rs3734444 of the *BMP5* gene is a potential risk marker for JH in general, the A allele of locus rs1470527 is an isolated JH, the GT genotype of locus rs73611720 of the *GDF5* gene is a marker for isolated CTD, the T allele of locus rs11144134 of the *TRPM6* gene is a marker for JH combined with CTD.

Keywords: joint hypermobility; connective tissue dysplasia; polymorphic variants; *VDR*; *LUM*; *TNXB*; *GDF5*; *TRPM6*; *BMP5*

For citation: Akhilarova KE, Khusainova RI, Yalaev BI, et al. Search for molecular markers of joint hypermobility. Research Results in Biomedicine. 2024;10(2):187-205. Russian. DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-2-0-2

Введение. Молекулярно-генетические механизмы развития гипермобильности суставов (ГМС) представляют интерес с позиции превентивной медицины, так как ГМС является одной из возможных причин развития таких заболеваний опорно-двигательного аппарата, как ранний остеоартрит [1], остеопороз [2], вывихи различной локализации [3], нарушение осанки [4] с формированием хронического болевого синдрома [5]. Этиология и патогенез ГМС окончательно не установлены. Значительный интерес представляет исследование молекулярно-генетических аспектов метаболизма соединительной ткани как причины гипермобильности.

На сегодняшний день для поиска молекулярно-генетических механизмов возникновения многофакторных заболеваний, в частности ГМС, все более актуальным становится ген-кандидатный подход. В качестве кандидатных генов можно рассматривать гены структурных белков и белков-регуляторов гомеостаза соединительной ткани. Одним из таких регуляторов является витамин D, так как он играет ключевую роль в клеточной дифференцировке и пролиферации [6]. Сообщается, что возможный вклад в развитие и деградацию соединительной ткани может вносить люмикан (ген *LUM*) – член суперсемейства протеогликанов класса II с малыми богатыми лейцином повторами, которые органиуют коллагеновые фибриллы во внеклеточном матриксе [7]. Также представляет интерес тенасцин (ген *TNXB*), который регулирует расстояние между фибриллами путем прямого связывания с отдельными коллагеновыми волокнами во внеклеточном матриксе или путем непрямого связывания через декорин, а также его участие в ремоделировании эластических волокон и регуляции экспрессии некоторых компонентов матрикса,

например, коллагена VI типа, протеогликанов и металлопротеаз [8]. Фактор роста и дифференцировки 5 (ген *GDF5*) играет важную роль во время формирования суставов. Это один из самых ранних генов, экспрессируемых в эмбриональной суставной интерзоне, дающий начало суставным тканям, включая суставной хрящ, синовиальную оболочку, мениски и связки [9]. Также в литературе описывается влияние костных морфогенетических белков на гомеостаз соединительной ткани, в частности, они участвуют в развитии синовиальных суставов и гомеостазе суставной ткани и поэтому ген *BMP* является потенциальным геном-кандидатом, вовлеченным в регенерацию тканей суставов [10]. Помимо вышеописанных генов на состояние соединительной ткани оказывает влияние уровень магния. Белок ионных каналов магния, кодируемый геном *TRPM6*, экспрессируется в эпителиальных клетках кишечника и почечных канальцах, что преимущественно опосредует всасывание Mg^{2+} в кишечнике и экскрецию Mg^{2+} почками. Также было обнаружено, что определенные полиморфные варианты гена *TRPM6* человека связаны с дефектом закрытия нервной трубки, а более низкие уровни Mg^{2+} в сыворотке тесно связаны с пороками развития скелета, несовершенным остеогенезом и задержкой роста эмбриона [11]. В связи с этим, вышеперечисленные кандидатные гены могут быть вовлечены в молекулярный патогенез ГМС и привлекательны для поиска генетических маркеров данного состояния.

Цель исследования. Поиск ассоциаций полиморфных вариантов генов-кандидатов метаболизма соединительной ткани (*VDR*; *LUM*; *TNXB*; *GDF5*; *TRPM6*; *BMP5*) с развитием ГМС в изолированной форме и в сочетании с ДСТ.

Материалы и методы исследования. В исследовании приняли участие 181 человек молодого возраста: средний возраст женщин (n=159) составил $21,71 \pm 0,23$,

для мужчин (n=22) $22,91 \pm 0,71$. Медико-биологические характеристики исследуемых групп представлены в таблице 1.

Таблица 1

Медико-биологическая характеристика исследуемых групп

Table 1

Medical and biological characteristics of the studied groups

Группа	Пол		Средний возраст	ИМТ (кг/м ²)
	Мужчин n	Женщин n		
ГМС+	6(0,05)	122(0,95)	$20,86 \pm 0,30$	$25,00 \pm 0,22$
ГМС-	15(0,29)	38(0,71)	$23,87 \pm 0,72$	$23,17 \pm 0,5$
p	0,00002		0,0003	0,004
ДСТ+	10(0,08)	120(0,92)	$21,54 \pm 0,33$	$20,47 \pm 0,3$
ДСТ-	12(0,24)	39(0,76)	$22,67 \pm 0,50$	$22,00 \pm 1,62$
p	0,007		0,29	0,03
ГМС+ ДСТ+	5(0,44)	110(0,96)	$21,32 \pm 0,24$	$20,24 \pm 0,33$
p	0,00007		0,0003	0,003
ГМС+ ДСТ-	1(0,07)	13(0,93)	$21,62 \pm 0,64$	$20,31 \pm 0,67$
p	0,20		0,220	0,010
ГМС-ДСТ-(Контроль)	11(0,29)	27(0,71)	$23,82 \pm 0,63$	$22,00 \pm 1,31$

Примечание: ГМС+ – наличие гипермобильности суставов, ДСТ+ – наличие дисплазии соединительной ткани, ГМС+ ДСТ+ сочетание ГМС+ДСТ, ИМТ – индекс массы тела.

Note: ГМС+ – presence of joint hypermobility, ДСТ+ – presence of connective tissue dysplasia, ГМС+ ДСТ+ combination of ГМС+ДСТ, ИМТ – body mass index.

Из исследования были исключены обследуемые в случае отказа от участия в исследовании, наличии травм скелета в анамнезе, моногенных форм дисплазии соединительной ткани, ассоциированных с ГМС (синдромы Элерса-Данло и Марфана, несовершенный остеогенез), системных заболеваний соединительной ткани, в том числе ревматоидного артрита, инфекционных заболеваний, сахарного диабета, а так же профессии, связанных с развитием «профессиональной» гипермобильности (танцоры, гимнасты, балерины). Исследование проводилось в несколько этапов. На первом этапе всем участникам было проведено клиническое обследование определялось наличие признаков ГМС и ДСТ. Наличие гипермобильности суставов и степень ее выраженности оценивали по шкале Beighton (1998). Данная шкала включает в себя 5 проб, максимальное количество баллов – 9 (4 пробы двусторонние пассивные и одна односторонняя активная). Проба счи-

талась положительной при 4 и более баллах. Фенотипические проявления ДСТ оценивались балльно-количественным методом по модифицированной таблице Кадуриной Т.И. (2015). Все пробы проводились двумя независимыми исследователями.

- 1) пассивное сгибание пястно-фалангового сустава 5-го пальца в обе стороны;
- 2) пассивное сгибание 1-го пальца в сторону предплечья при сгибании в лучезапястном суставе;
- 3) переразгибание локтевого сустава свыше 10° ;
- 4) переразгибание коленного сустава свыше 10° ;

5) наклон вперед при фиксированных коленных суставах, при этом ладони достигают пола.

Обследуемые были разделены на следующие группы сравнения: ГМС+/ГМС- (контроль), ДСТ+/ДСТ-(контроль); ГМС+ ДСТ+ и ГМС+ДСТ- попарно сравнивались с ГМС-ДСТ-(контроль). Далее было прове-

дено молекулярно-генетическое исследование. В исследование были включены гены, вовлеченные в метаболизм соединительной ткани, анализировались локусы, являющиеся структурными или регуляторными. Подбор осуществлялся с помощью баз данных [ensembl.org](https://www.ensembl.org/) (<https://www.ensembl.org/>) и dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=>). В качестве кандидатных генов исследуются: ген основного костного морфогенетического протеина (*BMP5*) – белка, способствующего образованию хряща *in vivo* [12]: локус rs1470527, являющийся интронным микросателлитом, оказывает регуляторный эффект на промотор *BMP5 in vitro* [13], а локус rs3734444 является синонимичным SNP и не влияет на аминокислотную последовательность, предполагается, что он изменяет сайты связывания фактора транскрипции CP2 и фактора энхансера миоцитов 2A. Кроме того, предполагается, что rs3734444 располагается в сайтах связывания экзонного сплайсинга, сайленсера и энхансера, которые играют важную роль в конститутивном и альтернативном сплайсинге [14]. Так же ген белка люмикана (*LUM*), отвечающего за пространственную организацию коллагеновых волокон и репарацию ткани [7], функциональные значения локусов rs2268578 и rs3759222 не описываются, но полиморфный вариант rs2268578 был ассоциирован с раком молочной железы [15], а находящийся в одной области с rs3759223 rs3759222, показал возможность влияния на связывание факторов транскрипции [16]. Фактор роста и дифференцировки 5 (*GDF5*), участвующий в формировании суставов [17], rs73611720 которого является сайтом связывания микроРНК, что ингибирует экспрессию белка путем прямого связывания с 3'-UTR областью мРНК-мишени [18]. Ген тенасцина (*TNXB*), регулирующего расстояние между фибриллами путем прямого связывания с отдельными коллагеновыми волокнами во внеклеточном матриксе [19] так же рассматривается как ген-кандидат, а локус rs3130342, идентифицированный в 50-й фланкирующей области *TNXB*, как возможный полиморфный вари-

ант, восприимчивый к SLE в японской популяции [20]. Ген рецептора витамина Д (*VDR*), участвующего в дифференцировке клеток соединительной ткани [21], локус rs11540149 которого ассоциирован с Витамин D-зависимым рахитом II типа с алопецией, являющийся также сайтом связывания микроРНК (www.targetscan.org); ген белка ионного канала магния (*TRPM6*), участвующего в остеогенной дифференцировке путем регуляции уровня кальция через изменение уровня сывороточного магния [22], его локусы rs11144134 и rs3824347 ассоциированы с метаболизмом магния [23]; о количественных признаках экспрессии данных локусов не сообщается, однако с локусом rs3824347 ассоциировалось отношение Mg^{2+} к креатинину в моче [24].

У обследуемых был произведен забор биоматериала – 10 мл. венозной крови. Выделение ДНК осуществлялось стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции. Проведено исследование полиморфных вариантов *VDR*, *LUM*, *TNXB*, *GDF5*, *TRPM6*, *BMP5* методом Real-time PCR с применением технологии Kasp[™] на аппаратной платформе QuantStudio. Характеристики исследованных локусов представлены в таблице 2.

Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией и было одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО БГМУ. Участники были проинформированы о целях исследования, получено информированное согласие на участие. Равновесие Харди-Вайнберга оценивалось с использованием пакета HaploView 4.2. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакетов Excel 2021, Statistica 13.0. Количественные признаки попарно сравнивались с использованием t-критерия Стьюдента, нормальность распределения по критерию Колмогорова-Смирнова. Качественные признаки оценивались с применением критерия χ^2 с поправкой Йетса для таблиц сопряженности 2x2. Сила ассоциаций оценивалась в значениях показателя соотношения шансов (Odds Ratio, OR, при $p < 0,05$), поправка на множественность сравнений проводилась методом Бенджамини-Хохберга (FDR).

Таблица 2

Характеристики исследуемых локусов генов *VDR*, *LUM*, *TNXB*, *GDF5*, *BMP5*, *TRPM6*

Table 2

Characteristics of the studied loci of the *VDR*, *LUM*, *TNXB*, *GDF5*, *BMP5*, *TRPM6* genes

№	Локус	Ген	Вариант обозначения	Локализация, функциональная значимость	H _{pred}	H _{obs}	HW _{pval}	MAF
1	rs11540149	<i>VDR</i>	c.*1865G>A	3'- регион гена, сайт связывания микроРНК	0,20	0,22	0,918	0,12
2	rs1470527	<i>BMP5</i>	g.55711211G>A	Интронный вариант	0,27	0,32	0,037	0,16
3	rs3734444	<i>BMP5</i>	c.111T>C	Экзон, синонимичная замена	0,36	0,36	1,00	0,23
4	rs2268578	<i>LUM</i>	g. 91501198A>G	Интронный вариант	0,15	0,13	0,41	0,08
5	rs3759222	<i>LUM</i>	g. 91506953T>G	2KB выше гена <i>LUM</i> (Upstream Variant)	0,37	0,39	0,57	0,24
6	rs3130342	<i>TNXB</i>	g.32080146A>C	5'-фланкирующая область гена	0,47	0,51	0,46	0,38
7	rs3824347	<i>TRPM6</i>	g.77566146A>G	Интронный вариант	0,20	0,23	0,29	0,12
8	rs11144134	<i>TRPM6</i>	g.100971988T>A	Интронный вариант	0,38	0,42	0,51	0,26
9	rs73611720	<i>GDF5</i>	c.*335A>C	3'- регион гена, сайт связывания микроРНК	0,50	0,59	0,04	0,47

Примечание: H_{pred} – ожидаемая гетерозиготность, H_{obs} – наблюдаемая гетерозиготность, HW_{pval} – показатель p для оценки соответствия равновесию Харди-Вайнберга (поддерживалось при уровне p>0,05), MAF – частота минорного аллеля.

Note: H_{pred} – expected heterozygosity, H_{obs} – observed heterozygosity, HW_{pval} – p value for assessing compliance with the Hardy-Weinberg equilibrium (maintained at p>0.05), MAF – minor allele frequency.

Результаты и их обсуждение. Клиническое обследование с использованием балльно-количественных методов оценки выявило ГМС у 128 (70,7 %), а ДСТ у 129 (71,3%) человек. Гипермобильность суставов в сочетании с ДСТ была обнаружена у 115 обследованных (63,5%). Полученные данные по частоте аллелей и генотипов представлены в таблице 3. При проведении сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов полиморфных локусов генов метаболизма соединительной ткани в исследуемых группах были выявлены ассоциации аллеля G и генотипа GG локуса rs3734444 гена *BMP5* с наличием ГМС (p=0,001; p*=0,014; OR=3,70; 95% CI 1,72-7,96; p=0,0004; p*=0,002; OR=5,10; 95% CI 2,08-12,29; соответственно), также

наблюдалась тенденция к преобладанию аллеля G и генотипа GG в группе с сочетанной патологией (p=0,011; p*=0,154) и (p=0,006; p*=0,09), однако данные ассоциации не сохранили своей статистической значимости после поправки на множественность сравнений (таблица 3). Таким образом, аллель G и генотип GG локуса rs3734444 гена *BMP5* вероятнее всего являются маркером изолированной формы ГМС. Также была обнаружена ассоциация аллеля A локуса rs1470527 гена *BMP5* и изолированной ГМС, достигнув статистической значимости (p=0,0006; p*=0,008; OR=8,00; 95 % CI 2,51-25,52). Таким образом, локус rs1470527 гена *BMP5* является маркером изолированной ГМС.

Таблица 3 (начало)

Распределение частот аллелей и генотипов генов *VDR*, *LUM*, *TNXB*, *GDF5*, *TRPM6*, *BMP5* в исследуемых группах и полученные ассоциации в исследуемых группах

Beginning of Table 3

Associations obtained in the studied groups and distribution of allele frequencies and genotypes of the *VDR*, *LUM*, *TNXB*, *GDF5*, *TRPM6*, *BMP5* genes in the studied groups

Популяция	n	Частоты аллелей		Частоты генотипов		
VDR rs11540149						
Выборки		G	A	GG	GA	AA
ГМС+	115	210(0,913)	20(0,087)	96(0,834)	18(0,157)	1(0,009)
ГМС -	28	51(0,911)	5(0,089)	24(0,857)	3(0,107)	1(0,036)
OR (95%CI)		1,03 (0,37-2,87)		0,84 (0,26-2,71)	1,55 (0,42-5,67)	0,24 (0,01-3,91)
p		1		1	0,573	0,354
ДСТ +	109	195(0,894)	23(0,106)	88(0,807)	19(0,174)	2(0,018)
ДСТ-	34	66(0,971)	2(0,029)	32(0,941)	2(0,059)	0(0,000)
OR (95%CI)		0,26 (0,06-1,12)		0,26 (0,06-1,18)	3,38 (0,74-15,32)	-
p		0,090		0,11	0,16	
ГМС+ДСТ+	104	188(0,904)	20(0,096)	85(0,817)	18(0,173)	1(0,010)
ГМС-ДСТ-	23	44(0,957)	2(0,043)	21(0,913)	2(0,087)	0(0,000)
OR (95%CI)		0,43 (0,10-1,90)		0,43 (0,09-1,97)	2,20 (0,47-10,21)	-
p		0,385		0,361	0,367	
ГМС+ДСТ-	11	22(1,000)	0(0,000)	11(1,000)	0(0,000)	0(0,000)
ГМС-ДСТ-	23	44(0,957)	2(0,043)	21(0,913)	2(0,087)	0(0,000)
OR (95%CI)		-		-	-	-
p						
BMP5 rs1470527						
Выборки		G	A	GG	GA	AA
ГМС+	116	137(0,591)	95(0,409)	39(0,336)	59(0,509)	18(0,155)
ГМС -	27	40(0,741)	14(0,259)	13(0,481)	14(0,519)	0(0,000)
OR (95%CI)		0,50 (0,26-0,98)		0,55 (0,23-1,27)	0,96 (0,42-2,22)	-
p		0,058		0,233	0,92	
ДСТ +	110	138(0,627)	82(0,373)	41(0,373)	56(0,509)	13(0,118)
ДСТ-	33	39(0,591)	27(0,409)	11(0,333)	17(0,515)	5(0,152)
OR (95%CI)		1,17 (0,66-2,04)		1,19 (0,52-2,70)	0,98 (0,45-2,13)	0,75 (0,25-2,29)
p		0,699		0,841	0,888	0,765
ГМС+ДСТ+	105	131(0,624)	79(0,376)	39(0,371)	53(0,505)	13(0,124)
ГМС-ДСТ-	22	33(0,750)	11(0,250)	11(0,500)	11(0,500)	0(0,000)
OR (95%CI)		0,55 (0,26-1,16)		0,59 (0,23-1,49)	1,02 (0,41-2,56)	-
p		0,156		0,377	0,841	
ГМС+ДСТ-	11	6(0,273)	16(0,727)	0(0,000)	6(0,545)	5(0,455)
ГМС-ДСТ-	22	33(0,750)	11(0,250)	11(0,500)	11(0,500)	0(0,000)
OR (95%CI)		8,00 (2,51-25,52)		-	1,2 (0,28-5,12)	-
p		0,0006 0,008*			0,887	
BMP5 rs3734444						
Выборки		A	G	AA	AG	GG
ГМС+	115	19(0,083)	211(0,917)	0(0,000)	19(0,165)	96(0,835)
ГМС -	28	14(0,250)	42(0,750)	0(0,000)	14(0,500)	14(0,500)

Таблица 3 (продолжение)

Распределение частот аллелей и генотипов генов *VDR*, *LUM*, *TNXB*, *GDF5*, *TRPM6*, *BMP5* в исследуемых группах и полученные ассоциации в исследуемых группах

Continuation of Table 3

Associations obtained in the studied groups and distribution of allele frequencies and genotypes of the *VDR*, *LUM*, *TNXB*, *GDF5*, *TRPM6*, *BMP5* genes in the studied groups

Популяция	n	Частоты аллелей		Частоты генотипов		
OR (95%CI)		3,70 (1,72-7,96)		-	0,20 (0,08-0,48)	5,10 (2,08-12,29)
p		0,001 0,014*			0,0004 0,002*	0,0004 0,002*
ДСТ +	109	22(0,101)	196(0,899)	0(0,000)	22(0,202)	87(0,798)
ДСТ-	34	11(0,162)	57(0,838)	0(0,000)	11(0,324)	23(0,676)
OR (95%CI)		0,58 (0,27-1,27)		-	0,53 (0,22-1,25)	1,89 (0,80-4,46)
p		0,249			0,216	0,216
ГМС+ДСТ+	104	19(0,091)	189(0,909)	0(0,000)	19(0,183)	85(0,817)
ГМС-ДСТ-	23	11(0,239)	35(0,761)	0(0,000)	11(0,478)	12(0,522)
OR (95%CI)		3,12 (1,37-7,14)		-	0,24 (0,09-0,63)	4,1 (1,57-10,68)
p		0,011 0,154*			0,006	0,006 0,09*
ГМС+ДСТ-	11	0(0,000)	22(1,000)	0(0,000)	0(0,000)	11(1,000)
ГМС-ДСТ-	23	11(0,239)	35(0,761)	0(0,000)	11(0,478)	12(0,522)
OR (95%CI)		-		-	-	-
p						
LUM rs2268578						
Выборки		C	T	CC	CT	TT
ГМС+	115	174(0,757)	56(0,243)	66(0,574)	42(0,365)	7(0,061)
ГМС -	28	48(0,857)	8(0,143)	20(0,714)	8(0,286)	0(0,000)
OR (95%CI)		0,52 (0,23-1,16)		0,54 (0,22-1,32)	1,46 (0,59-3,60)	-
p		0,15		0,252	0,545	
ДСТ +	109	166(0,761)	52(0,239)	64(0,587)	38(0,349)	7(0,064)
ДСТ-	34	56(0,824)	12(0,176)	22(0,647)	12(0,353)	0(0,000)
OR (95%CI)		0,47 (0,19-1,18)		0,78 (0,35-1,73)	0,98 (0,44-2,20)	-
p		0,152		0,671	0,862	
ГМС+ДСТ+	104	158(0,760)	50(0,240)	61(0,587)	36(0,346)	7(0,067)
ГМС-ДСТ-	23	40(0,870)	6(0,130)	17(0,739)	6(0,261)	0(0,000)
OR (95%CI)		0,47 (0,19-1,18)		0,50 (0,18-1,37)	1,5 (0,54-4,14)	-
p		0,152		0,261	0,590	
ГМС+ДСТ-	11	16(0,727)	6(0,273)	5(0,455)	6(0,545)	0(0,000)
ГМС-ДСТ-	23	40(0,870)	6(0,130)	17(0,739)	6(0,261)	0(0,000)
OR (95%CI)		0,4 (0,11-1,42)		0,29 (0,07-1,32)	3,4 (0,75-15,36)	-
p		0,182		0,138	0,138	
LUM rs3759222						
Выборки		A	C	AA	AC	CC
ГМС+	116	57(0,246)	175(0,754)	6(0,052)	45(0,388)	65(0,560)
ГМС -	28	12(0,214)	44(0,786)	0(0,000)	12(0,429)	16(0,571)
OR (95%CI)		1,19 (0,59-2,42)		-	0,98 (0,42-2,28)	0,96 (0,41-2,20)
p		0,751			0,830	0,92
ДСТ +	110	54(0,245)	166(0,755)	6(0,055)	42(0,382)	62(0,563)
ДСТ-	34	15(0,221)	53(0,779)	0(0,000)	15(0,441)	19(0,559)

Таблица 3 (продолжение)

Распределение частот аллелей и генотипов генов *VDR*, *LUM*, *TNXB*, *GDF5*, *TRPM6*, *BMP5* в исследуемых группах и полученные ассоциации в исследуемых группах

Continuation of Table 3

Associations obtained in the studied groups and distribution of allele frequencies and genotypes of the *VDR*, *LUM*, *TNXB*, *GDF5*, *TRPM6*, *BMP5* genes in the studied groups

Популяция	n	Частоты аллелей		Частоты генотипов		
OR (95%CI)		1,15 (0,60-2,20)		-	0,78 (0,36-1,70)	1,02 (0,47-2,21)
p		0,791			0,680	0,888
ГМС+ДСТ+	105	51(0,243)	159(0,757)	6(0,057)	39(0,371)	60(0,571)
ГМС-ДСТ-	23	9(0,196)	37(0,804)	0(0,000)	9(0,391)	14(0,609)
OR (95%CI)		1,32 (0,60-2,92)		-	0,92 (0,36-2,32)	0,86 (0,34-2,16)
p		0,624			1,000	0,920
ГМС+ДСТ-	11	6(0,273)	16(0,727)	0(0,000)	6(0,545)	5(0,455)
ГМС-ДСТ-	23	9(0,196)	37(0,804)	0(0,000)	9(0,391)	14(0,609)
OR (95%CI)		1,54 (0,47-5,06)		-	1,87 (0,44-0,798)	0,54 (0,13-2,29)
p		0,538			0,474	0,474
TNXB rs3130342						
Выборки		A	C	AA	AC	CC
ГМС+	114	203(0,890)	25(0,110)	90(0,789)	23(0,202)	1(0,009)
ГМС -	28	48(0,857)	8(0,143)	20(0,714)	8(0,286)	0(0,000)
OR (95%CI)		1,35 (0,57-3,19)		1,50 (0,59-3,82)	0,63 (0,25-1,62)	-
p		0,647		0,549	0,443	
ДСТ +	108	189(0,875)	27(0,125)	82(0,759)	25(0,232)	1(0,009)
ДСТ-	34	62(0,912)	6(0,088)	28(0,824)	6(0,176)	0(0,000)
OR (95%CI)		0,68 (0,27-1,72)		0,68 (0,25-1,81)	1,41 (0,52-3,78)	-
p		0,543		0,583	0,661	
ГМС+ДСТ+	103	182(0,883)	24(0,117)	80(0,776)	22(0,214)	1(0,010)
ГМС-ДСТ-	23	41(0,891)	5(0,109)	18(0,783)	5(0,217)	0(0,000)
OR (95%CI)		0,92 (0,33-2,57)		0,97 (0,32-2,89)	0,98 (0,33-2,93)	-
p		0,920		0,823	1	
ГМС+ДСТ-	11	21(0,955)	1(0,045)	10(0,909)	1(0,091)	0(0,000)
ГМС-ДСТ-	23	41(0,891)	5(0,109)	18(0,783)	5(0,217)	0(0,000)
OR (95%CI)		2,56 (0,28-23,36)		2,78 (0,28-27,21)	0,36 (0,04-3,53)	-
p		0,656		0,638	0,638	
TRPM6 rs3824347						
Выборки		C	T	CC	CT	TT
ГМС+	115	99(0,430)	131(0,570)	16(0,139)	67(0,583)	32(0,278)
ГМС -	28	34(0,607)	22(0,393)	9(0,322)	16(0,571)	3(0,107)
OR (95%CI)		0,49 (0,27-0,89)		0,34 (1,13-0,88)	1,05 (0,45-2,41)	3,65 (1,03-12,98)
p		0,026 0,42*		0,029	0,92	0,061
ДСТ +	109	96(0,440)	122(0,560)	16(0,147)	64(0,587)	29(0,266)
ДСТ-	34	37(0,544)	31(0,456)	9(0,256)	19(0,559)	6(0,175)
OR (95%CI)		0,66 (0,38-1,14)		0,48 (0,19-1,21)	1,12 (0,52-2,44)	1,69 (0,64-4,50)
p		0,173		0,186	0,920	0,41

Таблица 3 (продолжение)

Распределение частот аллелей и генотипов генов *VDR*, *LUM*, *TNXB*, *GDF5*, *TRPM6*, *BMP5* в исследуемых группах и полученные ассоциации в исследуемых группах

Continuation of Table 3

Associations obtained in the studied groups and distribution of allele frequencies and genotypes of the *VDR*, *LUM*, *TNXB*, *GDF5*, *TRPM6*, *BMP5* genes in the studied groups

Популяция	n	Частоты аллелей		Частоты генотипов		
ГМС+ДСТ+	104	90(0,433)	118(0,567)	15(0,144)	60(0,577)	29(0,279)
ГМС-ДСТ-	23	28(0,609)	18(0,391)	8(0,348)	12(0,522)	3(0,130)
OR (95%CI)		2,04 (1,06-3,92)		0,32 (0,11-0,87)	1,25 (0,50-3,09)	2,97 (0,82-10,81)
p		0,045 0,72*		0,034	0,806	0,145
ГМС+ДСТ-	11	9(0,409)	13(0,591)	1(0,091)	7(0,636)	3(0,273)
ГМС-ДСТ-	23	28(0,609)	18(0,391)	8(0,348)	12(0,522)	3(0,130)
OR (95%CI)		0,45 (0,16-1,25)		0,19 (0,02-1,74)	1,60 (0,37-7,02)	2,5 (0,41-15,10)
p		0,199		0,213	0,715	0,362
TRPM6 rs11144134						
Выборки		C	T	CC	CT	TT
ГМС+	116	49(0,211)	183(0,789)	6(0,052)	37(0,319)	73(0,629)
ГМС -	28	25(0,446)	31(0,554)	1(0,036)	23(0,821)	4(0,143)
OR (95%CI)		3,00 (1,63-5,56)		1,47 (0,17-12,75)	0,10 (0,04-0,29)	10,19 (3,31-31,32)
p		0,0006 0,0096*		1	0,00001 0,00015*	0,00001 0,00015*
ДСТ	110	48(0,218)	172(0,782)	5(0,046)	38(0,345)	67(0,609)
ДСТ-	34	26(0,382)	42(0,618)	2(0,059)	22(0,647)	10(0,294)
OR (95%CI)		2,22 (1,24-3,98)		0,76 (0,14-4,11)	0,29 (0,13-0,64)	3,74 (1,63-8,59)
p		0,010 0,140*		1	0,003	0,003 0,042*
ГМС+ДСТ+	105	44(0,210)	166(0,790)	5(0,048)	34(0,324)	66(0,629)
ГМС-ДСТ-	23	21(0,457)	25(0,543)	1(0,044)	19(0,826)	3(0,130)
OR (95%CI)		3,17 (1,62-6,18)		1,0 (0,11-8,98)	0,1 (0,03-0,31)	11,28 (3,15-40,43)
p		0,001 0,014*		1	0,00004	0,00004 0,00056*
ГМС+ДСТ-	11	5(0,227)	17(0,773)	1(0,091)	3(0,273)	7(0,636)
ГМС-ДСТ-	23	21(0,457)	25(0,543)	1(0,044)	19(0,826)	3(0,130)
OR (95%CI)		0,35 (0,11-1,11)		2,2 (0,12-38,84)	0,08 (0,01-0,44)	11,7 (2,08-65,60)
p		0,108		1	0,003	0,009 0,126*
GDF5 rs73611720						
Выборки		G	T	GG	GT	TT
ГМС+	114	37(0,162)	191(0,838)	0(0,000)	37(0,325)	77(0,675)
ГМС -	27	7(0,130)	47(0,870)	0(0,000)	7(0,259)	20(0,741)
OR (95%CI)		1,30 (0,55-3,10)		-	1,37 (0,53-3,53)	0,73 (0,28-1,88)
p		0,70			0,67	0,67
ДСТ +	108	76(0,352)	140(0,648)	0(0,000)	76(0,704)	32(0,299)
ДСТ -	33	12(0,182)	54(0,818)	0(0,000)	12(0,364)	21(0,636)

Таблица 3 (окончание)

Распределение частот аллелей и генотипов генов *VDR*, *LUM*, *TNXB*, *GDF5*, *TRPM6*, *BMP5* в исследуемых группах и полученные ассоциации в исследуемых группах

End of Table 3

Associations obtained in the studied groups and distribution of allele frequencies and genotypes of the *VDR*, *LUM*, *TNXB*, *GDF5*, *TRPM6*, *BMP5* genes in the studied groups

Популяция	n	Частоты аллелей		Частоты генотипов		
OR (95%CI)		2,44 (1,23-4,85)		-	4,15 (1,82-9,44)	0,24 (0,11-0,55)
p		0,013 0,18*			0,001 0,014*	0,001
ГМС+ДСТ+	103	32(0,155)	174(0,845)	0(0,000)	32(0,311)	71(0,689)
ГМС-ДСТ-	22	7(0,159)	37(0,841)	0(0,000)	7(0,318)	15(0,682)
OR (95%CI)		0,97 (0,40-2,37)		-	0,97 (0,36-2,60)	1,04 (0,38-2,79)
p		0,862			0,862	0,862
ГМС+ДСТ-	11	5(0,227)	17(0,773)	0(0,000)	5(0,455)	6(0,545)
ГМС-ДСТ-	22	7(0,159)	37(0,841)	0(0,000)	7(0,318)	15(0,682)
OR (95%CI)		1,55 (0,43-5,61)		-	1,79 (0,40-7,90)	0,56 (0,13-2,48)
p		0,736			0,702	0,702

Примечание: ГМС+ – наличие гипермобильности суставов, ДСТ+ – наличие дисплазии соединительной ткани, ГМС+ ДСТ+ сочетание ГМС+ДСТ, * – p-value после поправки Бенджамини-Хохберга

Note: ГМС+ – presence of joint hypermobility, ДСТ+ – presence of connective tissue dysplasia, ГМС+ ДСТ+ combination of ГМС+ДСТ, * – p-value after Benjamin-Hochberg correction

Наибольшее число ассоциаций было обнаружено для локуса rs11144134 гена *TRPM6*. В группе ГМС преобладал аллель Т и генотип ТТ ($p=0,0006$; $p^*=0,0096$; $OR=3,00$; 95 % CI 1,63-5,56), ($p=0,00001$; $p^*=0,00015$; $OR=10,19$; 95 % CI 3,31-31,32) по сравнению с группой контроля. Данная ассоциация сохраняется и в группе с сочетанной патологией для аллеля Т ($p=0,001$; $p^*=0,014$; $OR=3,17$; 95 % CI 1,62-6,18) и генотипа ТТ ($p=0,00004$; $p^*=0,00056$; $OR=11,28$; 95 % CI 3,15-40,43). В группе ДСТ сохраняется преобладание генотипа ТТ ($p=0,003$; $p^*=0,042$; $OR=3,74$; 95 % CI 1,63-8,59) и аллеля Т ($p=0,01$; $p^*=0,14$) по сравнению с контролем, но статистическая значимость для аллеля Т не сохранилась после поправки на множественность сравнений, а генотип ТТ, несмотря на тенденцию к преобладанию в группе с изолированной ГМС, также потерял статистическую значимость после введения поправки ($p=0,009$; $p^*=0,126$), что позволяет считать локус rs11144134 гена *TRPM6* маркером риска наличия сочетанной патологии.

Аллель Т локуса rs3824347 гена *TRPM6* встречался в 57 % в группе изолированной ГМС, в 56,7 % в группе с сочетанной патологией, выявляю тенденцию к большей частоте по сравнению с группой контроля (39,1 %), однако ассоциация не сохранила статистической значимости после поправки на множественность сравнений ($p=0,026$; $p^*=0,42$ и $p=0,045$; $p^*=0,72$; соответственно).

Частота аллеля G локуса rs73611720 гена *GDF5* была выше у лиц с ДСТ, однако различия не сохранили статистическую значимость после введения поправки на множественность сравнений ($p=0,013$; $p^*=0,182$). При этом частота генотипа GT была статистически значимо выше в группе с ДСТ ($p=0,001$; $p^*=0,014$; $OR=4,15$; 95% CI 1,82-9,44). Обращает на себя внимание отсутствие гомозиготных генотипов GG как в группах с ГМС и ДСТ, так и в группах контроля, при этом частота минорного аллеля в различных популяциях варьирует от 0,40 до 0,50. Локус rs73611720 гена *GDF5* является маркером изолированной ДСТ.

В ходе анализа было обнаружено неравновесие по сцеплению между локусами rs2268578 и rs3759222 гена *LUM* ($D' > 0.660$), которые сформировали один гаплотипический блок, однако срав-

нительный анализ не выявил ассоциаций как для данных маркеров, так и для полиморфных вариантов rs11540149 (*VDR*) и rs3130342 (*TNXB*). Все полученные результаты схематически представлены на рисунке.

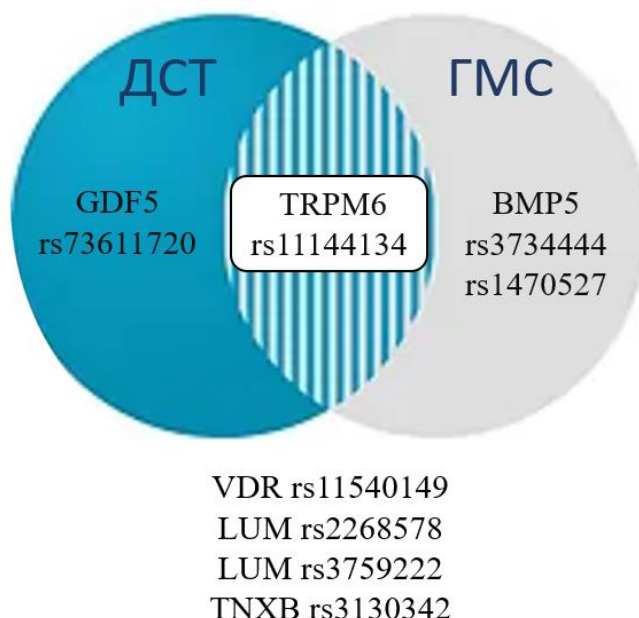


Рис. Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов *VDR*, *LUM*, *TNXB*, *GDF5*, *BMP5*, *TRPM6* с ГМС и ДСТ в изолированном или сочетанном состоянии. Локусы, ассоциированные с изолированными фенотипами, находятся внутри фигур, с комбинированными – на пересечении, при отсутствии ассоциаций – за контурами фигур.

Fig. Analysis of associations of polymorphic variants of the *VDR*, *LUM*, *TNXB*, *GDF5*, *BMP5*, *TRPM6* genes with JH and CTD in an isolated or combined state. The loci associated with isolated phenotypes are located inside the figures, with the combined ones, at the intersection, in the absence of associations, outside the contours of the figures.

Известно, что исследуемый локус rs11540149 (с.*1865G>A) гена *VDR* является сайтом связывания для нескольких регуляторных микроРНК, например hsa-miR-150–5p, hsa-miR-629–3p, hsa-miR-532–3p и др. Hsa-miR1260a, hsa-miR-1260b, обладающие сродством к аллелю А, являются маркерами ускоренного старения остеобластов [25]. Предполагается, что однонуклеотидная замена с*1865G>А приводит к ухудшению связывания матричной РНК с короткими интерферирующими микроРНК, что и приводит к нарушению активности гена. Ранее нами обнаружена ассоциация аллеля А локуса rs11540149 с переломами у мужчин рус-

ской этнической принадлежности [26], в данной работе не было обнаружено статистически значимых ассоциаций с ГМС.

Ген *LUM* исследовался на модели хронических контрактур суставов у кроликов, где выяснилось, что экспрессия мРНК данного гена повышена в суставных капсулах коленных суставов с контрактурой, что позволяет предположить возможный вклад люмикана в развитие этой патологии [27]. Kelemen LE и соавт. (2008) в исследовании на базе клиники Мейо, в котором приняло участие 798 пациентов, обнаружили ассоциацию генотипа GG локуса rs2268578 гена *LUM* с раком молочной железы [15]. Далее

Couch FJ (2009) в той же клинике Мейо обнаружил тенденцию к ассоциации локуса rs2268578 с раком молочной железы, однако статистическая значимость не была достигнута [28]. Затем Ernest K Amankwah и соавт. (2011) осуществляли поиск ассоциаций некоторых локусов люмикана и декорина с серозно-эпителиальным раком яичников, но для аллеля rs2268578 ассоциаций не было обнаружено [29]. Также Park SH (2013) и соавт. проводили поиск ассоциации локуса rs3759222 гена *LUM* с миопией различной степени выраженности в корейской популяции и была обнаружена тенденция наличия генотипа CC и аллеля C как протективного фактора, однако статистической значимости не было достигнуто [30]. Далее He M и соавт. (2014) был проведен метаанализ, в который вошли восемь исследований (1425 случаев и 1271 контроль) среди азиатской популяции на предмет связи данного локуса с близорукостью, где данная теория была полностью отвергнута [31].

Kamatani Y (2008) обнаружили ассоциацию локуса rs3130342 аллеля G гена *TNXB* с системной красной волчанкой в исследовании 178 пациентов японской популяции [20]. Schalkwijk и соавт. (2001) описали отсутствие тенасцина В в сыворотке крови 5 пациентов с классическим подтипом синдрома Элерса-Данло (СЭД), включавшим, в том числе и ГМС. Мутации гена *TNXB* были выявлены у всех пациентов с дефицитом сывороточного тенасцина; у одного пациента была гомозиготная делеция, один был гетерозиготен по делеции, а у трех других были гомозиготные точковые делеции, что подтверждает причинную роль гена *TNXB* и рецессивный характер наследования [32]. Далее этой группой исследователей было проведено расширенное обследование 20 пациентов с СЭД. У всех обследованных были обнаружены значительно сниженные уровни тенасцина в сыворотке крови, и у 17 из них подтверждены гетерозиготные делеции в гене *TNXB* [33].

Ген *TRPM6*, помимо регуляции метаболизма магния, также отвечает за остеогенную дифференцировку [34]. Потеря Mg

2+ в организме способствует развитию таких широко распространенных заболеваний, как диабет 2 типа, метаболический синдром, остеопороз и различные типы иммунных, сердечно-сосудистых и неврологических нарушений [35]. Лукманова и соавт. (2019), проводя исследование с участием 250 молодых людей, обнаружили ассоциацию между снижением концентрации сывороточного магния и наличием ДСТ [36] Информация о локусе rs3824347 гена *TRPM6* ограничена.

Костные морфогенетические белки (ВМР) представляют собой многофункциональные факторы роста, принадлежащие к надсемейству трансформирующих факторов роста- β (TGF -бета) и выполняют двойную функцию. Микроокружение способствует адипогенной или остеогенной дифференцировке, способствуя либо адипогенезу, либо остеогенезу [37]. Sharma AC и соавт. (2017) в Индии (г. Лахнау) в исследовании с участием 499 пациентов с рентгенологически подтвержденным ОА коленного сустава и 458 пациентами группы контроля, обнаружили ассоциацию ОА и генотипами СТ и ТТ локуса rs1470527 гена *BMP5*, что не противоречит полученным нами данным [13]. В исследовании локуса rs3734444 Huang SP и соавт. (2012) описали ассоциации комбинации генотипов AA+AG с риском прогрессирования рака предстательной железы и смертностью от всех причин [14], а Liang W и соавт. (2014) в исследовании китайской ханьской популяции в выборке из 510 человек с ОА коленного сустава и 520 человек группы контроля не обнаружили значимых ассоциаций генотипов СТ и СС и наличием ОА [38], что не согласуется с полученными нами результатами.

В исследовании Meyer TE и соавт. (2010) аллель Т локуса rs11144134 гена *TRPM6* ассоциировался с более низким уровнем магния в сыворотке и более высокой минеральной плотностью костной ткани шейки бедра и поясничного отдела позвоночника [23], что не противоречит полученным нами данными. Так же Cheng WW и соавторы (2019) подтвердили ассоциацию rs11144134 в гене *TRPM6* с более

низкими уровнями Mg и более высокой минеральной плотностью костной ткани [39], но подробно ассоциации полиморфных вариантов и концентрация магния авторами описаны не были.

Tuunin A и соавт. (2021) в исследовании с участием 417 женщин обнаружили ассоциацию аллеля Т локуса rs73611720 гена *GDF5* с наличием остеоартрита в группах смешанной национальности и малых этнических групп [40], что согласуется с полученными нами данными. Вариант с аллелем Т по результатам биоинформатического прогнозирования имеет сродство к микроРНК miR-3929, miR-4419b, miR-4478, miR-485-5p, miR-6884-5p, в то время как к редкому варианту аллеля имеется сродство к miR-25-5p и hsa-miR-6087. miR-3929 регулирует активность эпидермального фактора роста *Cripto-1*, который, в свою очередь, имеет решающее значение для раннего эмбрионального развития, он связан с недифференцированным статусом эмбриональных стволовых клеток человека. miR-4478, miR-485-5p, miR-6884-5p сильно ассоциированы с пролиферацией клеток на различных уровнях специализации и влияют на их дифференцировку. Таким образом, полиморфизм сайта связывания микроРНК в гене *GDF5* может потенциально влиять на регуляцию созревания и рост клеток соединительной ткани [41, 42, 43].

Заключение. Аллель G локуса rs3734444 гена *BMP5* является потенциально рисковым маркером ГМС в целом, аллель А локуса rs1470527 – изолированной ГМС, генотип GT локуса rs73611720 гена *GDF5* – маркером изолированной ДСТ, аллель Т локуса rs11144134 гена *TRPM6* – маркером ГМС в сочетании с ДСТ.

Информация о финансировании

Грант в форме субсидий из бюджета Республики Башкортостан для государственной поддержки молодых ученых – аспирантов и кандидатов наук (шифр конкурса – НОЦ-ГМУ-2023).

Financial support

The work was financed by a grant in the form of subsidies from the budget of the Republic of

Bashkortostan for state support of young scientists – postgraduate students and candidates of sciences (competition code – REC-GMU-2023).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors have no conflict of interest to declare.

Список литературы

1. Shiue KY, Cleveland RJ, Schwartz TA, et al. Is the association between knee injury and knee osteoarthritis modified by the presence of general joint hypermobility? *Osteoarthritis and Cartilage Open*. 2020;2(2):100045. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ocarto.2020.100045>
2. Coussens M, Banica T, Lapauw B, et al. Bone parameters in hypermobile Ehlers-Danlos syndrome and hypermobility spectrum disorder: A comparative cross-sectional study. *Bone*. 2023;166:116583. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.BONE.2022.116583>
3. Eseonu KC, Payne K, Ap GD, et al. Chronic low back pain occurring in association with hypermobility spectrum disorder and ehlers-danlos syndrome. *International Journal of Spine Surgery*. 2021;15(3):449-457. DOI: <https://doi.org/10.14444/8067>
4. Steinberg N, Tenenbaum S, Zeev A, et al. Generalized joint hypermobility, scoliosis, patellofemoral pain, and physical abilities in young dancers. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2021;22:161. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12891-021-04023-z>
5. van Meulenbroek T, Huijnen IP, Engelbert RH, et al. Are chronic musculoskeletal pain and generalized joint hypermobility disabling contributors to physical functioning? *European Journal of Physical and Rehabilitation Medicine*. 2021;57(5):747-757. DOI: <https://doi.org/10.23736/s1973-9087.21.06455-8>
6. Zhang L, Yin X, Wang J, et al. Associations between VDR Gene Polymorphisms and Osteoporosis Risk and Bone Mineral Density in Postmenopausal Women: A systematic review and Meta-Analysis. *Scientific Reports*. 2018;8:981. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18670-7>
7. Karamanou K, Perrot G, Maquart FX, et al. Lumican as a multivalent effector in wound healing. *Advanced Drug Delivery Reviews*.

- 2018;129:344-351. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.02.011>
8. Rymen D, Ritelli M, Zoppi N, et al. Clinical and Molecular Characterization of Classical-Like Ehlers-Danlos Syndrome Due to a Novel *TNXB* Variant. *Genes (Basel)*. 2019;10(11):843. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes10110843>
9. Kania K, Colella F, Riemen AHK, et al. Regulation of *Gdf5* expression in joint remodeling, repair and osteoarthritis. *Scientific Reports*. 2020;10(1):157. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57011-8>
10. Mailhot G, Yang M, Mason-Savas A, et al. BMP-5 expression increases during chondrocyte differentiation in vivo and in vitro and promotes proliferation and cartilage matrix synthesis in primary chondrocyte cultures. *Journal of Cellular Physiology*. 2008;214(1):56-64. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.21164>
11. Saraç M, Önalın E, Bakal Ü, et al. Magnesium-permeable *TRPM6* polymorphisms in patients with meningocele. *SpringerPlus*. 2016;3(5):1703. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3395-7>
12. Snelling SJB, Hulley PA, Loughlin J. BMP5 activates multiple signaling pathways and promotes chondrogenic differentiation in the ATDC5 growth plate model. *Growth Factors*. 2010;28(4):268-279. DOI: <https://doi.org/10.3109/08977191003752296>
13. Sharma AC, Srivastava RN, Srivastava SR, et al. Evaluation of the association between a single-nucleotide polymorphism of bone morphogenetic proteins 5 gene and risk of knee osteoarthritis. *Journal of Postgraduate Medicine*. 2017;63(3):151-156. DOI: <https://doi.org/10.4103/jpgm.JPGM-450-16>
14. Huang SP, Bao BY, Hour TC, et al. Genetic variants in *CASP3*, *BMP5*, and *IRS2* genes may influence survival in prostate cancer patients receiving androgen-deprivation therapy. *PLoS ONE*. 2012;7(7):e41219. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041219>
15. Kelemen LE, Couch FJ, Ahmed S, et al. Genetic variation in stromal proteins decorin and lumican with breast cancer: investigations in two case-control studies. *Breast Cancer Research*. 2008;10:R98. DOI: <https://doi.org/10.1186/bcr2201>
16. Lin HJ, Wan L, Tsai Y, et al. The association between lumican gene polymorphisms and high myopia. *Eye*. 2010;24:1093-1101. DOI: <https://doi.org/10.1038/eye.2009.254>
17. Takahata Y, Hagino H, Kimura A, et al. Regulatory Mechanisms of *Prg4* and *Gdf5* Expression in Articular Cartilage and Functions in Osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(9):4672. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23094672>
18. Zhang X, Wang C, Zhao J, et al. miR-146a facilitates osteoarthritis by regulating cartilage homeostasis via targeting *Camk2d* and *Ppp3r2*. *Cell Death and Disease*. 2017;8(4):e2734. DOI: <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.146>
19. Santoreneos R, Vakulin C, Ellul M, et al. Recurrent pneumothorax in a case of tenascin-X deficient Ehlers-Danlos syndrome: Broadening the phenotypic spectrum. *American Journal of Medical Genetics*. 2022;188(5):1583-1588. DOI: <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.62674>
20. Kamatani Y, Matsuda K, Ohishi T, et al. Identification of a significant association of a single nucleotide polymorphism in *TNXB* with systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Journal of Human Genetics*. 2008;53(1):64-73. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10038-007-0219-1>
21. Bouillon R, Marcocci C, Carmeliet G, et al. Skeletal and Extraskelatal Actions of Vitamin D: Current Evidence and Outstanding Questions. *Endocrine Reviews*. 2019;40(4):1109-1151. DOI: <https://doi.org/10.1210/er.2018-00126>
22. Lainez S, Schlingmann KP, van der Wijst J, et al. New *TRPM6* missense mutations linked to hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *European Journal of Human Genetics*. 2014;22(4):497-504. DOI: <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.178>
23. Meyer TE, Verwoert GC, Hwang SJ, et al. Genome-wide association studies of serum magnesium, potassium, and sodium concentrations identify six Loci influencing serum magnesium levels. *PLoS Genetics*. 2010;6(8):e1001045. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001045>
24. Corre T, Arjona FJ, Hayward C, et al. Genome-Wide Meta-Analysis Unravels Interactions between Magnesium Homeostasis and Metabolic Phenotypes. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2018;29(1):335-348. DOI: <https://doi.org/10.1681/ASN.2017030267>
25. Chen YJ, Chang WA, Huang MS, et al. Identification of novel genes in aging osteoblasts using next-generation sequencing and bioinformatics. *Oncotarget*. 2017;8(69):113598-113613. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22748>
26. Ялаев БИ, Хусаинова РИ. Поиск ассоциаций полиморфизма сайта связывания

микроРНК гена VDR с остеопорозом. В: Чойн-зонова ЕЛ, редактор. Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины: Сборник материалов конгресса молодых ученых; 24–25 мая 2018 г. Томск: Национальный исследовательский Томский государственный университет; 2018:145-147.

27. Xiao D, Liang T, Zhuang Z, et al. Lumican promotes joint fibrosis through TGF- β signaling. *FEBS Open Bio*. 2020;10(11):2478-2488. DOI: <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12974>

28. Couch FJ, Wang X, McWilliams RR, et al. Association of breast cancer susceptibility variants with risk of pancreatic cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2009;18(11):3044-3048. DOI: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-0306>

29. Amankwah EK, Wang Q, Schildkraut JM, et al. Polymorphisms in stromal genes and susceptibility to serous epithelial ovarian cancer: a report from the Ovarian Cancer Association Consortium. *PLoS ONE*. 2011;6(5):e19642. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019642>

30. Park SH, Mok J, Joo CK. Absence of an association between lumican promoter variants and high myopia in the Korean population. *Ophthalmic Genetics*. 2013;34(1-2):43-47. DOI: <https://doi.org/10.3109/13816810.2012.736591>

31. He M, Wang W, Ragoonundun D, et al. Meta-analysis of the association between lumican gene polymorphisms and susceptibility to high Myopia. *PLoS ONE*. 2014;9(6):e98748. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098748>

32. Schalkwijk J, Zweers MC, Steijlen PM, et al. A recessive form of the Ehlers-Danlos syndrome caused by tenascin-X deficiency. *New England Journal of Medicine*. 2001;345(16):1167-1175. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa002939>

33. Zweers MC, Bristow J, Steijlen PM, et al. Haploinsufficiency of TNXB is associated with hypermobility type of Ehlers-Danlos syndrome. *American Journal of Human Genetics*. 2003;73(1):214-217. DOI: <https://doi.org/10.1086/376564>

34. Zhang Y, Xu J, Ruan YC, et al. Implant-derived magnesium induces local neuronal production of CGRP to improve bone-fracture healing in rats. *Nature Medicine*. 2016;22(10):1160-1169. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm.4162>

35. de Baaij JH, Hoenderop JG, Bindels RJ. Magnesium in man: implications for health and disease. *Physiological Reviews*. 2015;95(1):1-46.

DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2014>

36. Lukmanova LZ, Davletshin RA, Khushainova RI, et al. The level of microelements and heterogeneity of joint hypermobility as an endophenotype of undifferentiated connective tissue dysplasia. *Russian Open Medical Journal*. 2020;9(1):e0106. DOI: <https://doi.org/10.15275/rusomj.2020.0106>

37. Atashi F, Modarressi A, Pepper MS. The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. *Stem Cells and Development*. 2015;24(10):1150-1163. DOI: <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0484>

38. Liang W, Gao B, Xu G, et al. Association between single nucleotide polymorphisms of asporin (ASPN) and BMP5 with the risk of knee osteoarthritis in a Chinese Han population. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2014;70(3):1603-1608. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0102-6>

39. Cheng WW, Zhu Q, Zhang HY. Mineral Nutrition and the Risk of Chronic Diseases: A Mendelian Randomization Study. *Nutrients*. 2019;11(2):378. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu11020378>

40. Tyurin A, Shapovalova D, Gantseva H, et al. Association between miRNA Target Sites and Incidence of Primary Osteoarthritis in Women from Volga-Ural Region of Russia: A Case-Control Study. *Diagnostics*. 2021;11(7):1222. DOI: <https://doi.org/10.3390/diagnostics11071222>

41. Zhao Y, Ponnusamy M, Liu C, et al. MiR-485-5p modulates mitochondrial fission through targeting mitochondrial anchored protein ligase in cardiac hypertrophy. *Biochimica et biophysica acta. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2017;1863(11):2871-2881. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.07.034>

42. Wang Y, Li X, Wang S, et al. miR-3929 Inhibits Proliferation and Promotes Apoptosis by Downregulating Cripto-1 Expression in Cervical Cancer Cells. *Cytogenetic and Genome Research*. 2021;161(8-9):425-436. DOI: <https://doi.org/10.1159/000518521>

43. Lv H, Hou H, Lei H, et al. MicroRNA-6884-5p Regulates the Proliferation, Invasion, and EMT of Gastric Cancer Cells by Directly Targeting S100A16. *Oncology Research*. 2020;28(3):225-236. DOI: <https://doi.org/10.3727/096504019X15753718797664>

References

1. Shiue KY, Cleveland RJ, Schwartz TA, et al. Is the association between knee injury and knee osteoarthritis modified by the presence of general joint hypermobility? *Osteoarthritis and Cartilage Open*. 2020;2(2):100045. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ocarto.2020.100045>
2. Coussens M, Banica T, Lapauw B, et al. Bone parameters in hypermobile Ehlers-Danlos syndrome and hypermobility spectrum disorder: A comparative cross-sectional study. *Bone*. 2023;166:116583. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.BONE.2022.116583>
3. Eseonu KC, Payne K, Ap GD, et al. Chronic low back pain occurring in association with hypermobility spectrum disorder and ehlers-danlos syndrome. *International Journal of Spine Surgery*. 2021;15(3):449-457. DOI: <https://doi.org/10.14444/8067>
4. Steinberg N, Tenenbaum S, Zeev A, et al. Generalized joint hypermobility, scoliosis, patellofemoral pain, and physical abilities in young dancers. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2021;22:161. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12891-021-04023-z>
5. van Meulenbroek T, Huijnen IP, Engelbert RH, et al. Are chronic musculoskeletal pain and generalized joint hypermobility disabling contributors to physical functioning? *European Journal of Physical and Rehabilitation Medicine*. 2021;57(5):747-757. DOI: <https://doi.org/10.23736/s1973-9087.21.06455-8>
6. Zhang L, Yin X, Wang J, et al. Associations between VDR Gene Polymorphisms and Osteoporosis Risk and Bone Mineral Density in Postmenopausal Women: A systematic review and Meta-Analysis. *Scientific Reports*. 2018;8:981. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18670-7>
7. Karamanou K, Perrot G, Maquart FX, et al. Lumican as a multivalent effector in wound healing. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018;129:344-351. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.02.011>
8. Rymen D, Ritelli M, Zoppi N, et al. Clinical and Molecular Characterization of Classical-Like Ehlers-Danlos Syndrome Due to a Novel *TNXB* Variant. *Genes (Basel)*. 2019;10(11):843. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes10110843>
9. Kania K, Colella F, Riemen AHK, et al. Regulation of *Gdf5* expression in joint remodeling, repair and osteoarthritis. *Scientific Reports*. 2020;10(1):157. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57011-8>
10. Mailhot G, Yang M, Mason-Savas A, et al. BMP-5 expression increases during chondrocyte differentiation in vivo and in vitro and promotes proliferation and cartilage matrix synthesis in primary chondrocyte cultures. *Journal of Cellular Physiology*. 2008;214(1):56-64. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.21164>
11. Saraç M, Önal E, Bakal Ü, et al. Magnesium-permeable *TRPM6* polymorphisms in patients with meningocele. *SpringerPlus*. 2016;3(5):1703. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3395-7>
12. Snelling SJB, Hulley PA, Loughlin J. BMP5 activates multiple signaling pathways and promotes chondrogenic differentiation in the ATDC5 growth plate model. *Growth Factors*. 2010;28(4):268-279. DOI: <https://doi.org/10.3109/08977191003752296>
13. Sharma AC, Srivastava RN, Srivastava SR, et al. Evaluation of the association between a single-nucleotide polymorphism of bone morphogenetic proteins 5 gene and risk of knee osteoarthritis. *Journal of Postgraduate Medicine*. 2017;63(3):151-156. DOI: <https://doi.org/10.4103/jpgm.JPGM-450-16>
14. Huang SP, Bao BY, Hour TC, et al. Genetic variants in *CASP3*, *BMP5*, and *IRS2* genes may influence survival in prostate cancer patients receiving androgen-deprivation therapy. *PLoS ONE*. 2012;7(7):e41219. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041219>
15. Kelemen LE, Couch FJ, Ahmed S, et al. Genetic variation in stromal proteins decorin and lumican with breast cancer: investigations in two case-control studies. *Breast Cancer Research*. 2008;10:R98. DOI: <https://doi.org/10.1186/bcr2201>
16. Lin HJ, Wan L, Tsai Y. et al. The association between lumican gene polymorphisms and high myopia. *Eye*. 2010;24:1093-1101. DOI: <https://doi.org/10.1038/eye.2009.254>
17. Takahata Y, Hagino H, Kimura A, et al. Regulatory Mechanisms of *Prg4* and *Gdf5* Expression in Articular Cartilage and Functions in Osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(9):4672. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23094672>
18. Zhang X, Wang C, Zhao J, et al. miR-146a facilitates osteoarthritis by regulating cartilage homeostasis via targeting *Camk2d* and *Ppp3r2*. *Cell Death and Disease*. 2017;8(4):e2734. DOI: <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.146>
19. Santoreneos R, Vakulin C, Ellul M, et al. Recurrent pneumothorax in a case of tenascin-

X deficient Ehlers-Danlos syndrome: Broadening the phenotypic spectrum. *American Journal of Medical Genetics*. 2022;188(5):1583-1588. DOI: <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.62674>

20. Kamatani Y, Matsuda K, Ohishi T, et al. Identification of a significant association of a single nucleotide polymorphism in TNXB with systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Journal of Human Genetics*. 2008;53(1):64-73. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10038-007-0219-1>

21. Bouillon R, Marcocci C, Carmeliet G, et al. Skeletal and Extraskelatal Actions of Vitamin D: Current Evidence and Outstanding Questions. *Endocrine Reviews*. 2019;40(4):1109-1151. DOI: <https://doi.org/10.1210/er.2018-00126>

22. Lainez S, Schlingmann KP, van der Wijst J, et al. New TRPM6 missense mutations linked to hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *European Journal of Human Genetics*. 2014;22(4):497-504. DOI: <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.178>

23. Meyer TE, Verwoert GC, Hwang SJ, et al. Genome-wide association studies of serum magnesium, potassium, and sodium concentrations identify six Loci influencing serum magnesium levels. *PLoS Genetics*. 2010;6(8):e1001045. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001045>

24. Corre T, Arjona FJ, Hayward C, et al. Genome-Wide Meta-Analysis Unravels Interactions between Magnesium Homeostasis and Metabolic Phenotypes. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2018;29(1):335-348. DOI: <https://doi.org/10.1681/ASN.2017030267>

25. Chen YJ, Chang WA, Huang MS, et al. Identification of novel genes in aging osteoblasts using next-generation sequencing and bioinformatics. *Oncotarget*. 2017;8(69):113598-113613. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22748>

26. Yalaev BI, Khusainova RI. Search for associations of polymorphism of the microRNA-binding site of the VDR gene with osteoporosis. In: Choinzonova EL, editor. *Topical Issues of Fundamental and Clinical Medicine: Proceedings of the Congress of Young Scientists; May 24-25, 2018*. Tomsk: National Research Tomsk State University; 2018:145-147. Russian.

27. Xiao D, Liang T, Zhuang Z, et al. Lumican promotes joint fibrosis through TGF- β signaling. *FEBS Open Bio*. 2020;10(11):2478-2488. DOI: <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12974>

28. Couch FJ, Wang X, McWilliams RR, et al. Association of breast cancer susceptibility vari-

ants with risk of pancreatic cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2009;18(11):3044-3048. DOI: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-0306>

29. Amankwah EK, Wang Q, Schildkraut JM, et al. Polymorphisms in stromal genes and susceptibility to serous epithelial ovarian cancer: a report from the Ovarian Cancer Association Consortium. *PLoS ONE*. 2011;6(5):e19642. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019642>

30. Park SH, Mok J, Joo CK. Absence of an association between lumican promoter variants and high myopia in the Korean population. *Ophthalmic Genetics*. 2013;34(1-2):43-47. DOI: <https://doi.org/10.3109/13816810.2012.736591>

31. He M, Wang W, Ragoonundun D, et al. Meta-analysis of the association between lumican gene polymorphisms and susceptibility to high Myopia. *PLoS ONE*. 2014;9(6):e98748. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098748>

32. Schalkwijk J, Zweers MC, Steijlen PM, et al. A recessive form of the Ehlers-Danlos syndrome caused by tenascin-X deficiency. *New England Journal of Medicine*. 2001;345(16):1167-1175. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa002939>

33. Zweers MC, Bristow J, Steijlen PM, et al. Haploinsufficiency of TNXB is associated with hypermobility type of Ehlers-Danlos syndrome. *American Journal of Human Genetics*. 2003;73(1):214-217. DOI: <https://doi.org/10.1086/376564>

34. Zhang Y, Xu J, Ruan YC, et al. Implant-derived magnesium induces local neuronal production of CGRP to improve bone-fracture healing in rats. *Nature Medicine*. 2016;22(10):1160-1169. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm.4162>

35. de Baaij JH, Hoenderop JG, Bindels RJ. Magnesium in man: implications for health and disease. *Physiological Reviews*. 2015;95(1):1-46. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2014>

36. Lukmanova LZ, Davletshin RA, Khusainova RI, et al. The level of microelements and heterogeneity of joint hypermobility as an endophenotype of undifferentiated connective tissue dysplasia. *Russian Open Medical Journal*. 2020;9(1):e0106. DOI: <https://doi.org/10.15275/rusomj.2020.0106>

37. Atashi F, Modarressi A, Pepper MS. The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. *Stem Cells and Development*. 2015;24(10):1150-1163. DOI: <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0484>

38. Liang W, Gao B, Xu G, et al. Association between single nucleotide polymorphisms of asporin (ASPN) and BMP5 with the risk of knee osteoarthritis in a Chinese Han population. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2014;70(3):1603-1608. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0102-6>

39. Cheng WW, Zhu Q, Zhang HY. Mineral Nutrition and the Risk of Chronic Diseases: A Mendelian Randomization Study. *Nutrients*. 2019;11(2):378. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu11020378>

40. Tyurin A, Shapovalova D, Gantseva H, et al. Association between miRNA Target Sites and Incidence of Primary Osteoarthritis in Women from Volga-Ural Region of Russia: A Case-Control Study. *Diagnostics*. 2021;11(7):1222. DOI: <https://doi.org/10.3390/diagnostics11071222>

41. Zhao Y, Ponnusamy M, Liu C, et al. MiR-485-5p modulates mitochondrial fission through targeting mitochondrial anchored protein ligase in cardiac hypertrophy. *Biochimica et biophysica acta. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2017;1863(11):2871-2881. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.07.034>

42. Wang Y, Li X, Wang S, et al. miR-3929 Inhibits Proliferation and Promotes Apoptosis by Downregulating Cripto-1 Expression in Cervical Cancer Cells. *Cytogenetic and Genome Research*. 2021;161(8-9):425-436. DOI: <https://doi.org/10.1159/000518521>

43. Lv H, Hou H, Lei H, et al. MicroRNA-6884-5p Regulates the Proliferation, Invasion, and EMT of Gastric Cancer Cells by Directly Targeting S100A16. *Oncology Research*. 2020;28(3):225-236. DOI: <https://doi.org/10.3727/096504019X15753718797664>

Статья поступила в редакцию 5 ноября 2022 г.
Поступила после доработки 15 мая 2023 г.
Принята к печати 6 августа 2023 г.

Received 5 November 2022

Revised 15 May 2023

Accepted 6 August 2023

Информация об авторах

Карина Эриковна Ахиярова, аспирант по научной специальности – 3.1.18. Внутренние

болезни ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», г. Уфа, Российская Федерация, E-mail: liciadesu@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5965-2108>.

Рита Игоревна Хусаинова, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории геномной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: ritakh@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8643-850X>.

Буллат Илдусович Ялаев, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории геномной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: yalaev.bulat@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4337-1736>.

Антон Викторович Тюрин, кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой внутренних болезней ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», г. Уфа, Российская Федерация, E-mail: anton.bgm@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0841-3024>.

Information about the authors

Karina E. Akhiyarova, Post-graduate Student in Scientific Specialty – 3.1.18. Internal Diseases, Bashkir State Medical University, Ufa, Russia, E-mail: liciadesu@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5965-2108>.

Rita I. Khusainova, Doct. Sci. (Biology), Chief Researcher at the Laboratory of Genomic Medicine, National Medical Research Center for Endocrinology, Moscow, Russia, E-mail: ritakh@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8643-850X>.

Bulat I. Yalaev, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher at the Laboratory of Genomic Medicine, National Medical Research Center of Endocrinology, Moscow, Russia, E-mail: yalaev.bulat@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4337-1736>.

Anton V. Tyurin, Cand. Sci. (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Internal Medicine, Bashkir State Medical University, Ufa, Russia, E-mail: anton.bgm@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0841-3024>.



DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-2-0-3

УДК 616.1

Полиморфные локусы генов матриксных металлопротеиназ ассоциированы с развитием ишемической болезни сердца с сопутствующим метаболическим синдромом

А.В. Понасенко , А.В. Сеницкая , М.В. Хуторная , М.Ю. Сеницкий ,
М.А. Асанов , А.О. Поддубняк

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»,
Сосновый б-р, д. 6 г. Кемерово, 650002, Российская Федерация
Автор для переписки: А.В. Сеницкая (seroav1991@gmail.com)

Резюме

Актуальность: Метаболический синдром (МС) и его компоненты являются причиной развития и прогрессирования заболеваний сердечно-сосудистого континуума. На сегодняшний день связь ишемической болезни сердца и МС остается неоднозначной. Показана центральная роль матриксных металлопротеиназ в обмене белков соединительной ткани, ремоделирования клеточного матрикса, репарации тканей и других сложных биохимических процессах организма, что подразумевает вовлеченность их в патогенез заболеваний сердечно-сосудистого континуума. **Цель исследования:** Поиск ассоциаций полиморфных вариантов генов матриксных металлопротеиназ с развитием стабильной ишемической болезни сердца с сопутствующим метаболическим синдромом. **Материалы и методы:** В исследование включены пациенты со стабильной ишемической болезнью сердца ($n=170$), имеющие висцеральный тип ожирения в сочетании с двумя или более патологическими состояниями: повышенный уровень глюкозы в крови, повышенный уровень холестерина в крови, гипертония. Контрольная – условно-здоровые добровольцы ($n=182$). Генотипирование 5 сайтов 4 генов (*MMP1* (rs514921), *MMP3* (rs6796620, rs626750), *MMP9* (rs17576), *TIMP2* (rs2277698)) проведено методом ПЦР в режиме реального времени. Концентрацию ММП в сыворотке крови измеряли методом ИФА. Анализ межгенных взаимодействий был проведен при помощи программы MDR v.3.0.2. **Результаты:** Частота гетерозиготного генотипа С/Т полиморфизма rs626750 *MMP3* выше в группе контроля (37,90 %), чем в группе пациентов (23,20%), что говорит о его протективном эффекте в отношении развития ИБС с сопутствующим метаболическим синдромом ($ОШ=0,47$, 95%ДИ 0,29-0,75). Продemonстрировано увеличение риска развития ИБС с сопутствующим метаболическим синдромом в 2,6 раза при носительстве генотипа А/Г rs2277698 *TIMP2* по кодоминантной модели наследования. Ассоциаций с концентрацией ММП, а также их ингибиторов, в сыворотке крови и генотипами полиморфных вариантов *MMP1* (rs514921), *MMP3* (rs626750), *MMP9* (rs17576), *TIMP2* (rs2277698) не получено. Получена четырехлокусная модель межгенных взаимодействий (*MMP9* (rs17576) – *MMP3* (rs626750) – *MMP1* (rs514921) –

TIMP2 (rs2277698)), обладающая высокой чувствительностью и специфичностью, а также рисковым эффектом в отношении развития данного патологического состояния. **Заключение:** Исследование позволило выявить ассоциации полиморфных вариантов генов *MMP* и их ингибиторов с развитием ИБС с сопутствующим метаболическим синдромом.

Ключевые слова: ишемическая болезнь сердца; метаболический синдром; *MMP1*; *MMP3*; *MMP9*; *TIMP2*

Для цитирования: Понасенко АВ, Синицкая АВ, Хуторная МВ, и др. Полиморфные локусы генов матриксных металлопротеиназ ассоциированы с развитием ишемической болезни сердца с сопутствующим метаболическим синдромом. Научные результаты биомедицинских исследований. 2024;10(2):206-221. DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-2-0-3

Polymorphism in the matrix metalloproteinase genes is associated with coronary artery disease risk with concomitant metabolic syndrome

Anastasia V. Ponasenko , Anna V. Sinitskaya , Maria V. Khutornaya ,
Maxim Yu. Sinitsky , Maxim A. Asanov , Alena O. Poddubnyak 

Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases,
6 Sosnoviy Blvd, Kemerovo, 650002, Russia
Corresponding author: Anna V. Sinitskaya (cepoav1991@gmail.com)

Abstract

Background: Metabolic syndrome (MS) and its components are the reasons of the development and progression of cardiovascular diseases. Nowadays, the association between coronary artery disease and MS remains ambiguous. The central role of matrix metalloproteinases (MMP) in the metabolism of connective tissue proteins, cell matrix remodeling, tissue repair and other complex biochemical processes has been shown, which implies their involvement in the pathogenesis of cardiovascular diseases. **The aim of the study:** To study the associations of polymorphic variants in the MMP genes with the risk of stable coronary artery disease with concomitant metabolic syndrome. **Materials and methods:** 170 patients with stable coronary artery disease concomitant with a visceral type of obesity in combination with two or more pathological conditions (elevated serum blood glucose level, elevated serum blood cholesterol level, hypertension) were included in the case group. Conditionally healthy volunteers (n=182) were recruited in the control group. Genotyping of five polymorphic sites in the four genes *MMP1* (rs514921), *MMP3* (rs6796620 and rs626750), *MMP9* (rs17576) and *TIMP2* (rs2277698) was performed by real-time PCR. The serum blood level of MMP was measured by ELISA. Gene-gene interactions were analyzed using MDR v.3.0.2 software. **Results:** The frequency of heterozygous C/T genotype in the *MMP3* gene (rs626750) was higher in the control group (37.90%) compared to the case group (23.20%), which indicates its protective effect on the risk of coronary artery disease with concomitant metabolic syndrome (OR=0.47, 95%CI 0.29-0.75). 2.6-fold increased risk of coronary artery disease with concomitant metabolic syndrome was demonstrated for carriers of the A/G genotype in the *TIMP2* gene (rs2277698) according to the codominant inheritance model. We found no associations of polymorphic variants in the *MMP1* (rs514921), *MMP3* (rs626750), *MMP9* (rs17576) and *TIMP2* (rs2277698) genes with the serum blood level of MMP, as

well as their inhibitors. Four-loci model of gene-gene interactions (*MMP9* (rs17576) – *MMP3* (rs626750) – *MMP1* (rs514921) – *TIMP2* (rs2277698)) characterized by high sensitivity, specificity and risk effect to the coronary artery disease with concomitant metabolic syndrome development was discovered. **Conclusion:** This study revealed the association of polymorphic variants in the MMP genes and their inhibitors with the risk of coronary artery disease with concomitant metabolic syndrome. In addition, a four-locus model of intergenic interactions with high sensitivity and specificity was obtained.

Keywords: coronary artery disease; metabolic syndrome; *MMP1*; *MPP3*; *MPP9*; *TIMP2*

For citation: Ponassenko AV, Sinitskaya AV, Khutornaya MV, et al. Polymorphism in the matrix metalloproteinase genes is associated with coronary artery disease risk with concomitant metabolic syndrome. Research Results in Biomedicine. 2024;10(2):206-221. Russian. DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-2-0-3

Введение. Заболевания сердечно-сосудистой системы и их осложнения на протяжении многих лет сохраняют свои лидирующие позиции в структуре смертности лиц трудоспособного возраста, являясь одной из главных проблем здравоохранения. Метаболический синдром (МС) и его компоненты могут быть взаимосвязаны с возникновением и прогрессированием заболеваний сердечно-сосудистого континуума [1]. Показано, что риск развития ишемической болезни сердца (ИБС) у мужчин и женщин с МС составил в 2,54 и 1,54 раз, соответственно. Однако, связь ИБС и МС остается неоднозначной, особенно в области генетической составляющей [2].

Ранее установлена центральная роль матриксных металлопротеиназ (ММР) в обмене белков соединительной ткани, ремоделирования клеточного матрикса, репарации тканей и других сложных биохимических процессах организма, что подразумевает вовлеченность их в патогенез заболеваний сердечно-сосудистого континуума. Сложные механизмы регулирования при патологических процессах, возникающих на клеточном уровне при атеросклеротическом поражении сосудов на фоне, обусловленном метаболическим синдромом, дает предпосылки исследований в этом направлении при коморбидных состояниях.

Известно, что ММР – семейство цинкзависимых эндопептидаз, ответственных за ремоделирование тканей и деградацию белков внеклеточного матрикса (ВКМ) [3]. На сегодняшний день, семейство ММР

насчитывает 28 членов, 23 из которых синтезируются в тканях человека, а экспрессия 14 обнаруживается в венах и артериях [4]. Экспрессия ММР обнаруживается на различных типах клеток, так ММР-1 известная как интерстициальная коллагеназа в основном обнаруживается на лейкоцитах, фибробластах, а также эндотелиальных клетках, ММР-3 (стромелизин) – на сердечных фибробластах и макрофагах [3], ММР-9 секретируется достаточно большим количеством клеток, среди которых кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, нейтрофилы, макрофаги и фибробласты [5]. Практически все ММР ингибируется тканевыми, биологическими, а также синтетическими ингибиторами. Наиболее изученными являются тканевые ингибиторы металлопротеиназ (ТИМР), которые препятствуют деградации матрикса. Всего представлено 4 вида ТИМР, однако ТИМР-1 и ТИМР-2 наиболее представлены в исследованиях. Показано, что ТИМР -1 ингибирует ММР-1, ММР-3, ММР-7, ММР-9, а ТИМР-2 – ММР-2 [6]. Отмечена вовлеченность ММР в патогенез заболеваний сердечно-сосудистого континуума [7]. Так, показано, что концентрация ММР-9 имела положительную корреляционную связь с прогрессированием атеросклеротического поражения коронарных артерий [8]. Кроме того, выявлены более высокие концентрации ММР-1,-3,-9 у пациентов с острым инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST по сравнению с контрольной группой на протяжении всего госпитального периода [9]. Вместе с тем,

важным компонентом в изучении роли ММР в развитии неблагоприятных сердечно-сосудистых событий в подгруппах риска, является оценка вариабельности структуры генов, кодирующих данные белки. Исходя из описанной проблемы была сформулирована **цель исследования**, которая заключалась в поиске ассоциаций полиморфных вариантов генов матриксных металлопротеиназ с развитием стабильной ишемической болезни сердца с сопутствующим метаболическим синдромом.

Материалы и методы исследования. Исследование выполнено на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово и является ретроспективным, одноцентровым. Все участники исследования проходили лечение в кардиологическом и кардиохирургическом отделениях НИИ КПССЗ.

Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинкской Декларации. Получено одобрение Локального этического комитета на протокол исследования (протокол №13 от 05.08.2016 г.). Все обследуемые дали добровольное письменное согласие на участие в исследовании, в том числе и на молекулярно-генетическое тестирование. В рамках исследования сформировано две группы: основная – пациенты со стабильной ишемической болезнью сердца с сопутствующим МС (128 мужчин и 42 женщины) и контрольная – условно-здоровые добровольцы (110 мужчин и 72 женщины), средний возраст которых составил 59,85 (33-75) и 53,59 (30-75), соответственно. Критерии включения в основную группу: возраст моложе 75 лет, наличие стабильной стенокардии в анамнезе, подписанное информированное согласие на участие в исследовании, наличие висцерального типа ожирения в сочетании с двумя или более патологическими состояниями: повышенный уровень глюкозы в крови, повышенный уровень холестерина в крови, гипертония; не включались

пациенты, имеющие тяжелую сопутствующую патологию, и не подписавшие информированное согласие на участие. Диагноз ИБС установлен квалифицированными врачами-кардиологами НИИ КПССЗ на основании комплексного клинического и инструментального обследования пациентов, а также согласно Национальным рекомендациям Всероссийского научного общества кардиологов по диагностике и лечению стабильной стенокардии [10]. Для оценки функционального класса стенокардии применяли Канадскую классификацию, для характеристики хронической сердечной недостаточности использовали классификацию Нью-Йоркской ассоциации кардиологов (NYHA) [11]. Все участники исследования принадлежали к русскому этносу и проживали на территории Западной Сибири (Кемеровская область, РФ) не менее, чем в двух поколениях. В группу контроля включались участники без какой-либо сердечно-сосудистой патологии. Критерии исключения из исследования: тяжелая сопутствующая патология (онкологические, ревматические заболевания и др.), участники, не подписавшие информированное согласие на участие в исследовании.

Для выделения геномной ДНК стандартным методом фенол-хлороформной экстракции, использовали периферическую кровь, собранную из локтевой вены в пробирку, которая содержала К₃EDTA. Критериями для отбора полиморфных вариантов послужили: локализация в генах, кодирующих ММР, а также их ингибиторов, распространенность минорного аллеля полиморфного сайта в популяции по данным HarMap более 5%, наличие функциональных эффектов (связь эпигенетическими характеристиками и транскрипцией генов), согласно базе данных Harporeg v4.2 [12], а также связь с экспрессией генов. Для отбора SNP использовались базы данных dbSNP, SNPinfo и SNPnexus.

На основании данных научных публикаций, для нашего исследования отобрано 5 сайтов 4 генов (*MMP1* (rs514921), *MMP3* (rs6796620, rs626750), *MMP9* (rs17576), *TIMP2* (rs2277698)) (Табл. 1).

Таблица 1

Характеристика генов, включенных в исследование

Table 1

Characteristic of the studied polymorphisms

Ген	Название кодируемого белка	Полиморфный вариант	Частота минорного аллеля (MAF)
<i>MMP1</i>	Интерстициальная коллагеназа	rs514921	G=0,24
<i>MMP3</i>	Стромелизин-1	rs6796620	G=0,07
		rs626750	G=0,87
<i>MMP9</i>	Матриксная металлопротеиназа - 9	rs17576	G=0,35
<i>TIMP2</i>	Тканевый ингибитор металлопротеиназ 2	rs2277698	T=0,11

Примечание: MAF – частота минорного аллеля в Европейской популяции.

Note: MAF – frequency of the minor allele in the European population.

Генотипирование проводили методом аллель – специфической ПЦР с флуоресцентно-мечеными зондами (TaqMan), которые были синтезированы компанией ДНК-синтез (Москва, Россия), на приборе CFX96 Touch (1855195, Bio-Rad, США) с использованием мастер-микса БиоМастер HS-qPCR Lo-ROX (2×) (кат.номер MHR021-2040, Биоллабмикс).

Для контроля качества персонал, проводящий исследование, не был поставлен в известность о принадлежности каждого образца конкретному индивидууму, использовались контрольные образцы с известными генотипами и 10 % случайно выбранных образцов генотипировано повторно.

Концентрацию MMP-1 (кат. DY901B, R&D Systems, USA), MMP-3 (кат. DMP300, R&D Systems, USA), MMP-9 (кат. DMP900, R&D Systems, USA), TIMP-1 (кат. DTM100, R&D Systems, USA), TIMP-2 (кат. DTM200 R&D Systems, USA) определяли посредством иммуноферментного анализа согласно протоколу производителя на спектрофотометре Multiskan Sky (Thermo Scientific).

Статистический анализ данных проводили в программах GraphPad Prism 8 (GraphPad Software) и SNPstats (<https://www.snpstats.net/>) [13]. Нормальность распределения выборки оценивали критерием Шапиро-Уилка. Описание количественных признаков представлено в виде среднеарифметического значения и минимума, и максимума к нему. При анализе независимых количественных признаков между двумя группами использовали критерий Манна-Уитни. Сравнение между

тремя группами проводили при помощи критерия Краскела-Уолиса, поправку на множественные сравнения выполняли с использованием метода FDR. Различия в распределении аллельных вариантов в исследуемых группах осуществляли по критерию χ^2 . Ассоциации генотипов с риском развития заболевания проводили путем вычисления отношения шансов (ОШ) и доверительного интервала к нему (95%ДИ). Анализ межгенных взаимодействий был проведен при помощи программы MDR v.3.0.2 [14]. Регуляторный потенциал полиморфных локусов оценивали с помощью онлайн сервиса HaploReg (v.4.1) (<http://archive.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>). Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Тест на равновесие Харди-Вайнберга показал, что 4 (rs626750, rs514921, rs2277698, rs17576) полиморфных варианта из 5 соответствуют равновесному распределению, для локуса rs6796620 гена *MMP3* отмечено отклонение от ожидаемого распределения, обусловленное уменьшением наблюдаемой гетерозиготности по сравнению с ожидаемой частотой, в связи с чем данный локус был исключен из анализа ассоциаций (Табл. 2).

При сравнительном анализе выбранных полиморфных вариантов в группе пациентов с ИБС и контрольной группой, установлено, что с ИБС с сопутствующим метаболическим синдромом ассоциированы *MMP3* (rs626750) и *TIMP2* (rs2277698).

Таблица 2

Частота встречаемости аллелей и генотипов исследуемых генов у пациентов с ИБС и сопутствующим метаболическим синдромом и в контрольной группе

Table 2

The frequency of occurrence of genotypes of the studied genes in patients with coronary artery disease and concomitant metabolic syndrome and in the control group

Ген/ Поли-морфизм	Аллель /Генотип	Основная группа, (n=170)				Контрольная группа, (n=182)				ОШ (95% ДИ)	P-level
		Встречаемость, Абс. (%)	Ho	He	P _{hwe}	Встречаемость, Абс. (%)	Ho	He	P _{hwe}		
MMP1 rs514921	A	266 (78,70)	0,33	0,33	0,65	262 (72,38)	0,38	0,39	0,87	1,41 (0,99-1,99)	0,05
	G	72 (21,30)				100 (27,62)				1,00	0,12
	A/A	105 (62,10)				96 (53,00)				0,72 (0,46-1,13)	
	A/G	56 (33,10)				70 (38,70)				0,46 (0,18-1,14)	
	G/G	8 (4,70)				15 (8,30)					
MMP3 rs626750	C	281 (83,63)	0,23	0,27	0,052	269 (73,90)	0,37	0,38	0,81	1,80 (1,24-2,61)	0,0019
	T	55 (16,37)				95 (26,10)				1,00	0,0039
	C/C	121 (72,00)				100 (55,00)				0,47 (0,29-0,75)	
	C/T	39 (23,20)				69 (37,90)				0,49 (0,19-1,24)	
	T/T	8 (4,80)				13 (7,10)					
MMP3 rs6796620	G	176 (52,38)	0,38	0,49	0,0001	240 (65,93)	0,23	0,44	0,002	0,56 (0,41-0,77)	0,0003
	A	160 (47,62)				124 (34,07)				1,00	0,0001
	G/G	56 (33,30)				99 (54,40)				4,09 (2,31-7,22)	
	A/G	64 (38,10)				42 (23,10)				2,64 (1,51-4,62)	
	A/A	48 (28,60)				41 (22,50)					
MMP9 rs17576	A	201 (59,47)	0,44	0,48	0,72	219 (60,16)	0,46	0,47	0,30	0,97 (0,71-1,31)	0,85
	G	137 (40,53)				145 (39,84)				1,00	0,86
	A/A	63 (37,30)				67 (36,80)				0,94 (0,59-1,51)	
	A/G	75 (44,40)				85 (46,70)				1,11 (0,60-2,06)	
	G/G	31 (18,30)				30 (16,50)					
TIMP2 rs2277698	G	298 (88,16)	0,21	0,20	0,78	343 (94,75)	0,09	0,09	0,45	0,41 (0,23-0,72)	0,0022
	A	40 (11,84)				19 (5,25)				1,00	0,0056
	G/G	131 (77,50)				163 (90,10)				2,63 (1,42-4,90)	
	A/G	36 (21,30)				17 (9,40)				2,16 (0,19-23,97)	
	A/A	2 (1,20)				1 (0,60)					

Примечание: критерий χ^2 использован для оценки соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому, исходя из равновесия Харди-Вайнберга Ho и He – наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность.

Note: the χ^2 test was used to assess the compliance of the observed genotype distribution with the expected one, based on the Hardy-Weinberg equilibrium Ho and He – observed and expected heterozygosity.

Выявлено, что частота гетерозиготного генотипа С/Т полиморфизма rs626750 *MMP3* была выше в группе контроля (37,90 %), чем в группе пациентов (23,20%), что говорит о его протективном эффекте в отношении развития ИБС с сопутствующим метаболическим синдромом (ОШ=0,47, 95%ДИ 0,29-0,75). Кроме того, продемонстрировано увеличение риска развития ИБС с сопутствующим метаболическим синдромом в 2,6 раза при носительстве генотипа А/Г rs2277698 *TIMP2* по кодоминантной модели наследования (Табл. 2).

Согласно данным, полученным из базы HaploReg (v4.1), аллельные варианты rs626750 *MMP3* и rs2277698 *TIMP2*, для которых показаны ассоциации с изучаемым фенотипом, располагаются в регионах ДНК, связывающихся с гистонами, маркирующими энхансеры (модифицированный гистон H3K4me1) (в мезенхимальных клетках, клетках жировой ткани, предшественниках

фибробластов, клетках головного мозга).

Неотъемлемой частью ассоциативных исследований является изучение взаимодействий между генами с целью установления комбинаций полиморфных вариантов, имеющих наибольшую патогенетическую значимость. Так, с использованием программы MDR выявлена одна наиболее значимая модель взаимодействия, обладающая высокой точностью, чувствительностью и специфичностью (Табл. 3). В рамках построенной четырехлокусной модели межгенных взаимодействий выявлены следующие комбинации генотипов, которые ассоциированы с изучаемым фенотипом и обладают рисковым эффектом в отношении развития данного патологического состояния: А/А (rs514921) – А/Г (rs17576) – А/Г (rs2277698) – С/С (rs626750) (ОШ=3,48, 95%ДИ 2,17-5,57) и А/А (rs514921) – А/Г (rs17576) – Г/Г (rs2277698) – С/Т (rs626750) (ОШ=3,26, 95%ДИ 2,10-5,07).

Таблица 3

Модель межлокусного взаимодействия полиморфных вариантов генов матриксных металлопротеиназ

Table 3

Interlocus interaction of polymorphic variants of matrix metalloproteinase genes

Модель	Bal. Acc. Tr.	Bal. Acc. Test.	Se.	Sp.	Cons.	Pre.
<i>MMP9(rs17576)-MMP3(rs626750)-MMP1(rs514921)-TIMP2(rs2277698)</i>	0,64	0,54	0,71	0,58	10/10	0,61

Примечание: Tr.Bal.Асс. – тренировочная сбалансированная точность, Test.Bal.Асс. – тестируемая сбалансированная точность, Se. – чувствительность; Sp. – специфичность, Cons. – повторяемость результата, Pre. – точность модели.

Note: Tr.Bal.Acc. – training balanced accuracy, Test.Bal.Acc. – tested balanced accuracy, Se. – sensitivity; Sp. – specificity, Cons. – repeatability of the result, Pre. – accuracy of the model.

Кроме того, данная программа позволяет построить граф (Рис. 1), который иллюстрирует характер и силу межгенных взаимодействий между изучаемым фенотипом и полиморфными вариантами генов. Показано, что характер взаимодействий между ИБС с

сопутствующим метаболическим синдромом и локусами генов *MMP* умеренно антагонистический или аддитивный, при этом больший вклад в развитие патологии вносят полиморфные локусы rs626750 (2,42% энтропии) и rs2277698 (2,16% энтропии).

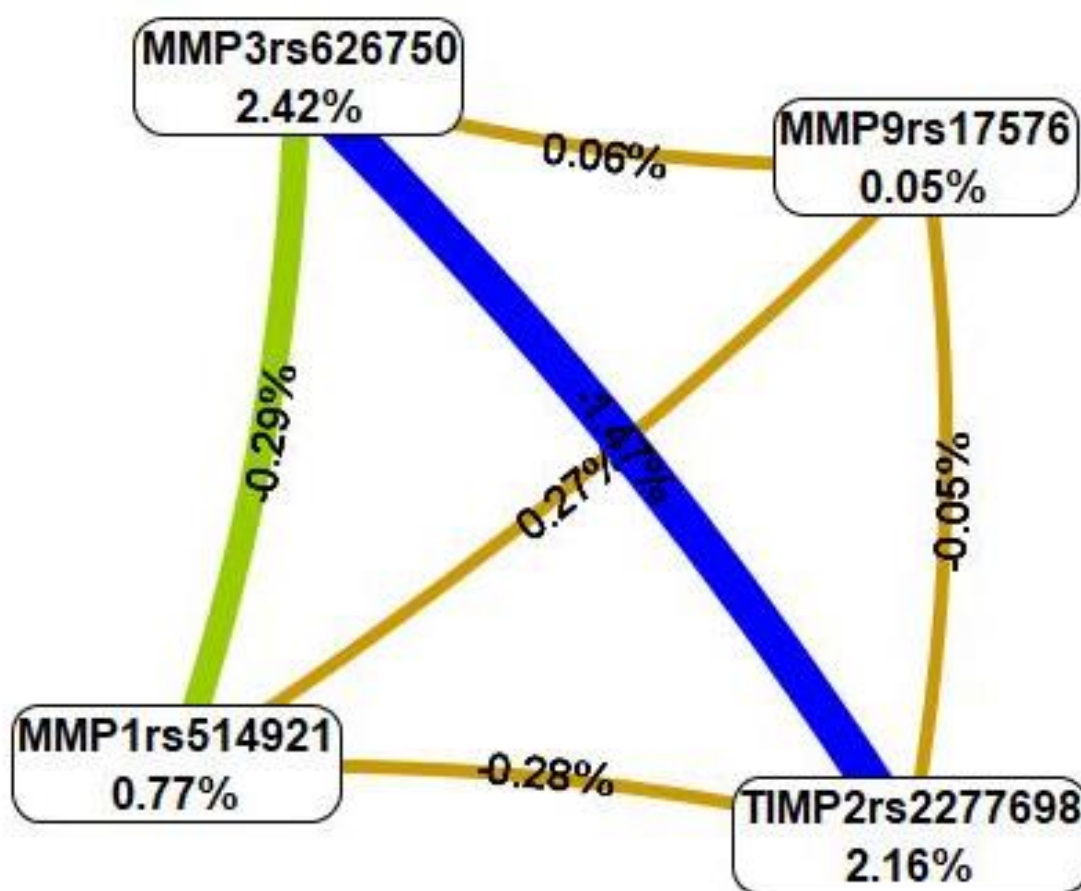


Рис. 1. Граф межгенных взаимодействий MMP при развитии ИБС с сопутствующим метаболическим синдромом. Примечание: характер взаимодействия между MMP при формировании фенотипа характеризуется цветом линии: синий – коричневый – аддитивное взаимодействие, зеленого – умеренный антагонизм. Сила и направленность взаимодействия выражены в % энтропии.

Fig. 1. Graph of MMP intergene interactions in the development of coronary artery disease with concomitant metabolic syndrome. Note: the nature of the interaction between MMPs during the formation of the phenotype is characterized by the color of the line: blue – brown – additive interaction, green – moderate antagonism. The strength and direction of the interaction are expressed in % entropy.

Предполагается, что концентрации циркулирующих молекул могут зависеть от генотипов полиморфных вариантов генов. Для подтверждения данной гипотезы мы провели оценку зависимости сывороточных уровней MMP-1, MMP-3, MMP-9 и TIMP-2 от генотипов выбранных поли-

морфных вариантов. Однако в данном случае ассоциаций с концентрацией MMP, а также их ингибиторов, в сыворотке крови и генотипами полиморфных вариантов MMP1 (rs514921), MMP3 (rs626750), MMP9 (rs17576), TIMP2 (rs2277698) не получено (Рис. 2).

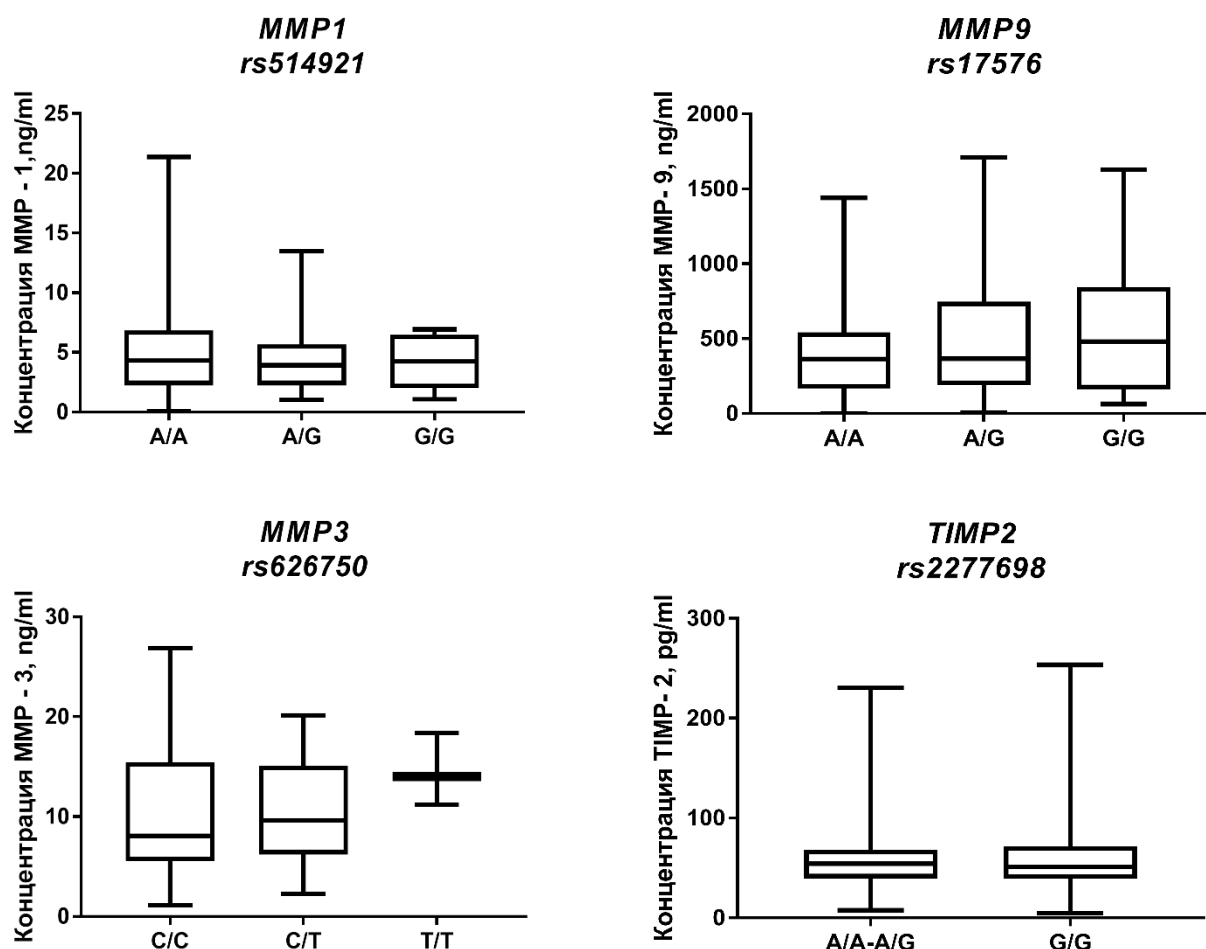


Рис. 2. Сывороточные уровни MMP и TIMP в зависимости от генотипов.
Fig. 2. Serum levels of MMP and TIMP depending on genotypes.

Обсуждение. В результате проведенного нами исследования установлены ассоциации полиморфных вариантов rs626750 (*MMP3*) и rs2277698 (*TIMP2*) с развитием ишемической болезни сердца с сопутствующим метаболическим синдромом, однако, не было выявлено зависимости сывороточных уровней MMP от генотипов.

Развитие заболеваний сердечно-сосудистого континуума сложный и многогранный процесс, в котором задействованы различные патофизиологические механизмы. Так, одним из направлений исследований является изучение вклада различных видов матриксных металлопротеиназ в патогенез данных заболеваний. Экспрессия MMP обнаруживается в низких концентрациях в плазме взрослого человека [15], однако, при развитии какого-либо патологического

процесса их уровень смещается в сторону увеличения [6], что дает возможность использования данных маркеров в клинической практике.

MMP1 – ген, кодирующий белок интерстициальной коллагеназы, которая способствует расщеплению коллагена I, II и III типов, и располагающийся на 11 хромосоме (chr11:102798499). Установлено, что MMP-1 экспрессируется фибробластами, хондриками, макрофагами, эндотелиальными клетками и остеобластами [3], что обуславливает ее вовлеченность в процесс разрыва бляшки, развитие острого коронарного синдрома, а также инфаркта миокарда. На сегодняшний день, для полиморфного варианта rs514921 гена *MMP1* не получено статистически значимых ассоциаций с предрасполо-

женностью к развитию ИБС, но установлена взаимосвязь с развитием аневризмы грудного отдела аорты [16, 17]. В нашем исследовании сравнительный анализ не показал взаимосвязи данного полиморфного варианта с развитием ИБС с сопутствующим метаболическим синдромом, а также не выявили статистической значимости данного полиморфизма с сывороточными уровнями циркулирующей MMP-1.

MMP3 – входит в кластер генов MMP и располагается на 11 хромосоме (11q22.3.) и кодирует фермент, который расщепляет фибронектин, ламинин, а также коллагены III, IV, IX и X типов [18]. Более того, показано, что MMP3 способна активировать другие MMP, такие как MMP-1 и является важным регулятором процессов ремоделирования [19]. Кроме того, неоднократно отмечено, что увеличение экспрессии MMP-3 может быть одной из причин разрыва атеросклеротической бляшки, что приводит к закупорке коронарных артерий [20]. По данным литературы, полиморфизм MMP3 влияет на концентрацию циркулирующего MMP-3, а также приводит к прогрессированию атеросклероза и накоплению коллагена во внеклеточном матриксе [21]. Для изучаемого нами аллельного варианта rs626750 в базе данных GWAS показана ассоциация аллеля G с развитием хронической обструктивной болезни легких [22, 23]. Наряду с этим, также Гончаровой и соавторами установлено, что полиморфизмы rs626750 (MMP3 / MMP12) и ассоциированы с ИБС и ИМ, что также согласуется с полученными нами данными [24].

Ген MMP9 располагается на хромосоме 20q12.2–13.1 и содержит 13 экзонов и 12 интронов. Полиморфный вариант rs17576 располагается в 6 экзоне, мутация приводит к замене аргенина на глутамин, что может приводить к изменению активности фермента [4]. Стоит отметить, что MMP9 является наиболее изученной молекулой из всего семейства MMP в контексте заболеваний сердечно-сосудистого континуума. Доступные литературные источники сообщают о достаточном количестве проведенных исследований, посвященных

изучению взаимосвязи полиморфных вариантов гена MMP9 и предрасположенности к развитию ИБС, однако, все они носят противоречивый характер [25, 26]. Так, показано увеличение концентрации MMP-9 в сыворотке пациентов с ИБС по сравнению с здоровыми добровольцами, кроме того, продемонстрированы более высокие уровни MMP-9 и MMP-3 у пациентов с многососудистым поражением [27]. С одной стороны, ряд исследований демонстрируют, что аллельный вариант rs17576 ассоциирован с развитием неблагоприятных сердечно-сосудистых событий [15, 28]. Однако, часть имеющихся исследований, свидетельствуют об отсутствии ассоциаций данного полиморфизма с предрасположенностью к развитию ИБС [29]. В проведенном нами исследовании мы не получили каких-либо ассоциативных связей между генотипами полиморфного варианта rs17576 и формированием подверженности к развитию ИБС.

Известно, что TIMP-2 является естественным эндогенным ингибитором MMP-2, в связи с чем многие физиологические и патофизиологические процессы напрямую зависят от их баланса [30]. Однонуклеотидные замены в гене TIMP2, который расположен на хромосоме 17q25, могут приводить к повышению или снижению активности TIMP-2 и впоследствии нарушая баланс между их активностью [31]. Кроме того, показано, что TIMP-2 способен вызывать остановку клеточного цикла [32]. На сегодняшний день данные о вкладе TIMP-2 в развитие патологии сердечно-сосудистой системы в большинстве случаев являются экспериментальными и сосредоточены в большей мере на патофизиологии атеросклероза. В исследовании на экспериментальных животных (мыши TIMP2 (-/-)) продемонстрировано снижение экспрессии MMP2 и увеличение антиангиогенных факторов, что в последствии привело к аномальному ремоделированию желудочков и тяжелой сердечной недостаточности [33]. Нами выявлено, что при носительстве генотипа A/G rs2277698 TIMP2 увеличивается риск развития ИБС с сопутствующим метаболическим синдромом в 2,6 раза. Для

полиморфизма rs2277698 показаны ассоциации с раком молочной железы [31] и риском развития ИБС и ИМ [24].

Настоящее исследование имеет некоторые ограничения. Так, в представленной работе изучена вариабельность всего 5 полиморфных вариантов 4 генов матриксных металлопротеиназ, а также не рассматривались иные фактора риска связанные с развитием данного патологического состояния. Все вышесказанное свидетельствует о необходимости проведения дальнейших исследований.

Заключение. Таким образом, проведенное исследование позволило выявить ассоциации полиморфных вариантов генов *MMP* и их ингибиторов (rs626750 *MMP3* и rs2277698 *TIMP2*) с развитием ИБС с сопутствующим метаболическим синдромом. Выявлена четырехлокусная модель взаимодействий генов *MMP9*, *MMP3*, *MMP1*, *TIMP2*, ассоциированная с изучаемым фенотипом.

Информация о финансировании

Исследование выполнено в рамках комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2022-0002.

Financial support

This research was supported by the Complex Program of Fundamental Research of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences within the framework of the fundamental research project of the Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases No. 0419-2022-0002.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors have no conflict of interest to declare.

Список литературы

1. Ротарь ОП, Колесова ЕП, Могучая ЕВ, и др. Генетические маркеры метаболического синдрома в российской популяции (по материалам исследования ЭССЕ-РФ). Артериальная

гипертензия. 2019;25(5):467-477. DOI: <https://doi.org/10.18705/1607-419X-2019-25-5-467-477>

2. Jing Z, Liu L, Shi Y, et al. Association of coronary artery disease and metabolic syndrome: usefulness of serum metabolomics approach. *Frontiers in Endocrinology*. 2021;12:692893. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.692893>

3. de Almeida LGN, Thode H, Eslambolchi Y, et al. Matrix Metalloproteinases: From Molecular Mechanisms to Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacological Reviews*. 2022;74(3):714-770. DOI: <https://doi.org/10.1124/pharmrev.121.000349>

4. Marino-Puertas L, Goulas T, Gomis-Ruth FX. Matrix metalloproteinases outside vertebrates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2017;1864(11A):2026-2035. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.04.003>

5. Гриценко ОВ, Чумакова ГА, Понасенко АВ, и др. Некоторые молекулярно-генетические факторы риска фиброза миокарда (обзор литературы). *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины*. 2022;37(3):56-64. DOI: <https://doi.org/10.29001/2073-8552-2022-37-3-56-64>

6. Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Castruita-De la Rosa C, et al. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(24):9739. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21249739>

7. Wang X, Khalil RA. Matrix metalloproteinases, vascular remodeling, and vascular disease. *Advances in Pharmacology*. 2018;81:241-330. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.08.002>

8. Zouridakis E, Avanzas P, Arroyo-Espliguero R, et al. Markers of Inflammation and Rapid Coronary Artery Disease Progression in Patients With Stable Angina Pectoris. *Circulation*. 2004;110(13):1747-1753. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000142664.18739.92>

9. Печерина ТБ, Кашталап ВВ, Груздева ОВ, и др. Динамика и корреляция уровней матриксных металлопротеиназ сыворотки крови и показателей гликемического статуса у больных с инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST и сахарным диабетом 2 типа. *Русский медицинский журнал. Медицинское обозрение*. 2019;3(6):17-22.

10. Российское кардиологическое общество (РКО). Стабильная ишемическая болезнь сердца. Клинические рекомендации 2020. Российский кардиологический журнал. 2020;25(11):4076. DOI: <https://doi.org/10.15829/291560-4071-2020-4076>
11. McDonagh T, Metra M. 2021 Рекомендации ESC по диагностике и лечению острой и хронической сердечной недостаточности. Российский кардиологический журнал. 2023;28(1):5168. DOI: <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2023-5168>
12. 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>
13. Solé X, Guinó E, Valls J, et al. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. Bioinformatics. 2006;22(15):1928-1929. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl268>
14. Ritchie MD, Hahn LW, Roodi N, et al. Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer. American Journal of Human Genetics. 2001;69(1):138-147. DOI: <https://doi.org/10.1086/321276>
15. Hassanzadeh-Makoui R, Razi B, Aslani S, et al. The association between Matrix Metalloproteinases-9 (MMP-9) gene family polymorphisms and risk of Coronary Artery Disease (CAD): a systematic review and meta-analysis. BMC Cardiovascular Disorders. 2020;20:232. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12872-020-01510-4>
16. Frąk W, Wojtasińska A, Lisińska W, et al. Pathophysiology of Cardiovascular Diseases: New Insights into Molecular Mechanisms of Atherosclerosis, Arterial Hypertension, and Coronary Artery Disease. Biomedicines. 2022;10(8):1938. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines10081938>
17. Quintao C, Yan L, Changhong D, et al. Genetic polymorphism of matrix metalloproteinase-1 and coronary artery disease susceptibility: a case-control study in a Han Chinese population. Genetic Testing and Molecular Biomarkers. 2014;18(12):826-831. DOI: <https://doi.org/10.1089/gtmb.2014.0222>
18. Kato K, Tokuda Y, Inagaki N, et al. Association of a matrix metalloproteinase 1 gene polymorphism with long-term outcome of thoracic aortic aneurysm. International Journal of Molecular Medicine. 2012;29(1):125-132. DOI: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2011.804>
19. Guizani I, Zidi W, Zayani Y, et al. Matrix metalloproteinase-3 predicts clinical cardiovascular outcomes in patients with coronary artery disease: a 5 years cohort study. Molecular Biology Reports. 2019;46(5):4699-4707. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04914-4>
20. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circulation Research. 2003;92(8):827-839. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D>
21. Pöllänen PJ, Lehtimäki T, Ilveskoski E, et al. Coronary artery calcification is related to functional polymorphism of matrix metalloproteinase 3: the Helsinki Sudden Death Study. Atherosclerosis. 2002;164(2):329-335. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(02\)00107-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(02)00107-7)
22. Guizani I, Zidi W, Zayani Y, et al. Matrix metalloproteinase 3 and 9 as genetic biomarkers for the occurrence of cardiovascular complications in coronary artery disease: a prospective cohort study. Molecular Biology Reports. 2022;49:9171-9179. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07742-1>
23. Cho MH, McDonald MLN, Zhou X, et al. Risk loci for chronic obstructive pulmonary disease: a genome-wide association study and meta-analysis. The Lancet Respiratory Medicine. 2014;2(3):214-225. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70002-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70002-5)
24. Goncharova IA, Koroleva YA, Sleptsov AA, et al. Genetic Structure of Susceptibility to Cardiovascular Continuum Comorbidity. Russian Journal of Genetics. 2022;58(10):1245-1256. DOI: <https://doi.org/10.1134/S1022795422100039>
25. Zhang FX, Sun DP, Guan N, et al. Association between -1562C>T polymorphism in the promoter region of matrix metalloproteinase-9 and coronary artery disease: a meta-analysis. Genetic Testing and Molecular Biomarkers. 2014;18(2):98-105. DOI: <https://doi.org/10.1089/gtmb.2013.0369>
26. Li YY, Yang XX, Zhou YH, et al. Matrix metalloproteinase-9 gene-1562C>T gene polymorphism and coronary artery disease in the Chinese Han population: a meta-analysis of 5468 subjects. Frontiers in Physiology. 2016;7:212. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00212>
27. Ben Braiek A, Chahed H, Dumont F, et al. Identification of biomarker panels as predictors of severity in coronary artery disease. Journal of Cellular and Molecular Medicine.

2021;25(3):1518-1530. DOI:
<https://doi.org/10.1111/jcmm.16244>

28. Sheikhvatan M, Boroumand MA, Behmanesh M, et al. Association of R279Q and C1562T polymorphisms of matrix metalloproteinase 9 gene and increased risk for myocardial infarction in patients with premature coronary artery disease. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2018;32(1):e22218. DOI:
<https://doi.org/10.1002/jcla.22218>

29. Opstad TB, Pettersen AAR, Weiss TW, et al. Genetic variation, gene-expression and circulating levels of matrix metalloproteinase-9 in patients with stable coronary artery disease. *Clinica Chimica Acta*. 2012;413(1-2):113-120. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.09.004>

30. Guo T, Hao H, Zhou L, et al. Association of SNPs in the TIMP-2 gene and large artery atherosclerotic stroke in southern Chinese Han population. *Oncotarget*. 2018;9(4):4698-4706. DOI:
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.23473>

31. Wang K, Wang G, Huang S, et al. Association between TIMP-2 gene polymorphism and breast cancer in Han Chinese women. *BMC Cancer*. 2019;19:446. DOI:
<https://doi.org/10.1186/s12885-019-5655-8>

32. de Freitas IA, de Alcantara Lima N, da Silva GBJr, et al. Novel biomarkers in the prognosis of patients with atherosclerotic coronary artery disease. *Revista Portuguesa de Cardiologia*. 2020;39(11):667-672. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.repce.2020.05.016>

33. Givvimani S, Kundu S, Narayanan N, et al. TIMP-2 mutant decreases MMP-2 activity and augments pressure overload induced LV dysfunction and heart failure. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2013;119(2):65-74. DOI:
<https://doi.org/10.3109/13813455.2012.755548>

References

1. Rotar OP, Kolesova EP, Moguchaya EV, et al. Genetic markers of the metabolic syndrome in the Russian population (based on the ESSE-RF study). *Arterial Hypertension*. 2019;25(5):467-477. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18705/1607-419X-2019-25-5-467-477>

2. Jing Z, Liu L, Shi Y, et al. Association of coronary artery disease and metabolic syndrome: usefulness of serum metabolomics approach. *Frontiers in Endocrinology*. 2021;12:692893. DOI:
<https://doi.org/10.3389/fendo.2021.692893>

3. de Almeida LGN, Thode H, Eslambolchi Y, et al. Matrix Metalloproteinases: From Molecular Mechanisms to Physiology, Pathophysiology,

and Pharmacology. *Pharmacological Reviews*. 2022;74(3):714-770. DOI:
<https://doi.org/10.1124/pharmrev.121.000349>

4. Marino-Puertas L, Goulas T, Gomis-Ruth FX. Matrix metalloproteinases outside vertebrates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2017;1864(11A):2026-2035. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.04.003>

5. Gritsenko OV, Chumakova GA, Ponassenko AV, et al. Some molecular genetic risk factors for myocardial fibrosis (Literature review). *The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2022;37(3):56-64. Russian. DOI:
<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2022-37-3-56-64>

6. Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Castruita-De la Rosa C, et al. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(24):9739. DOI:
<https://doi.org/10.3390/ijms21249739>

7. Wang X, Khalil RA. Matrix metalloproteinases, vascular remodeling, and vascular disease. *Advances in Pharmacology*. 2018;81:241-330. DOI:
<https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.08.002>

8. Zouridakis E, Avanzas P, Arroyo-Espliguero R, et al. Markers of Inflammation and Rapid Coronary Artery Disease Progression in Patients With Stable Angina Pectoris. *Circulation*. 2004;110(13):1747-1753. DOI:
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000142664.18739.92>

9. Pecherina TB, Kashtalap VV, Gruzdeva OV, et al. Dynamics and correlation of matrix metalloproteinases in serum and glycemic status indices in patients with ST-elevation myocardial infarction, and type 2 diabetes mellitus. *RMJ. Medical Review*. 2019;3(6):17-22. Russian.

10. Russian Society of Cardiology (RSC). 2020 Clinical practice guidelines for Stable coronary artery disease. *Russian Journal of Cardiology*. 2020;25(11):4076. Russian. DOI:
<https://doi.org/10.15829/291560-4071-2020-4076>

11. McDonagh T, Metra M. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Russian Journal of Cardiology*. 2023;28(1):5168. Russian. DOI:
<https://doi.org/10.15829/1560-4071-2023-5168>

12. 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>
- 13.Solé X, Guinó E, Valls J, et al. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006;22(15):1928-1929. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl268>
- 14.Ritchie MD, Hahn LW, Roodi N, et al. Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer. *American Journal of Human Genetics*. 2001;69(1):138-147. DOI: <https://doi.org/10.1086/321276>
- 15.Hassanzadeh-Makoui R, Razi B, Aslani S, et al. The association between Matrix Metalloproteinases-9 (MMP-9) gene family polymorphisms and risk of Coronary Artery Disease (CAD): a systematic review and meta-analysis. *BMC Cardiovascular Disorders*. 2020;20:232. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12872-020-01510-4>
- 16.Frak W, Wojtasińska A, Lisińska W, et al. Pathophysiology of Cardiovascular Diseases: New Insights into Molecular Mechanisms of Atherosclerosis, Arterial Hypertension, and Coronary Artery Disease. *Biomedicines*. 2022;10(8):1938. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines10081938>
- 17.Qintao C, Yan L, Changhong D, et al. Genetic polymorphism of matrix metalloproteinase-1 and coronary artery disease susceptibility: a case-control study in a Han Chinese population. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 2014;18(12):826-831. DOI: <https://doi.org/10.1089/gtmb.2014.0222>
- 18.Kato K, Tokuda Y, Inagaki N, et al. Association of a matrix metalloproteinase 1 gene polymorphism with long-term outcome of thoracic aortic aneurysm. *International Journal of Molecular Medicine*. 2012;29(1):125-132. DOI: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2011.804>
- 19.Guizani I, Zidi W, Zayani Y, et al. Matrix metalloproteinase-3 predicts clinical cardiovascular outcomes in patients with coronary artery disease: a 5 years cohort study. *Molecular Biology Reports*. 2019;46(5):4699-4707. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04914-4>
- 20.Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation Research*. 2003;92(8):827-839. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D>
- 21.Pöllänen PJ, Lehtimäki T, Ilveskoski E, et al. Coronary artery calcification is related to functional polymorphism of matrix metalloproteinase 3: the Helsinki Sudden Death Study. *Atherosclerosis*. 2002;164(2):329-335. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(02\)00107-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(02)00107-7)
- 22.Guizani I, Zidi W, Zayani Y, et al. Matrix metalloproteinase 3 and 9 as genetic biomarkers for the occurrence of cardiovascular complications in coronary artery disease: a prospective cohort study. *Molecular Biology Reports*. 2022;49:9171-9179. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07742-1>
- 23.Cho MH, McDonald MLN, Zhou X, et al. Risk loci for chronic obstructive pulmonary disease: a genome-wide association study and meta-analysis. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2014;2(3):214-225. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70002-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70002-5)
- 24.Goncharova IA, Koroleva YA, Sleptsov AA, et al. Genetic Structure of Susceptibility to Cardiovascular Continuum Comorbidity. *Russian Journal of Genetics*. 2022;58(10):1245-1256. DOI: <https://doi.org/10.1134/S1022795422100039>
- 25.Zhang FX, Sun DP, Guan N, et al. Association between- 1562C> T polymorphism in the promoter region of matrix metalloproteinase-9 and coronary artery disease: a meta-analysis. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 2014;18(2):98-105. DOI: <https://doi.org/10.1089/gtmb.2013.0369>
- 26.Li YY, Yang XX, Zhou YH, et al. Matrix metalloproteinase-9 gene-1562C> T gene polymorphism and coronary artery disease in the Chinese Han population: a meta-analysis of 5468 subjects. *Frontiers in Physiology*. 2016;7:212. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00212>
- 27.Ben Braiek A, Chahed H, Dumont F, et al. Identification of biomarker panels as predictors of severity in coronary artery disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2021;25(3):1518-1530. DOI: <https://doi.org/10.1111/jcmm.16244>
- 28.Sheikhvatan M, Boroumand MA, Behmanesh M, et al. Association of R279Q and C1562T polymorphisms of matrix metalloproteinase 9 gene and increased risk for myocardial infarction in patients with premature coronary artery disease. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2018;32(1):e22218. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcla.22218>
- 29.Opstad TB, Pettersen AAR, Weiss TW, et al. Genetic variation, gene-expression and circulating levels of matrix metalloproteinase-9 in patients with stable coronary artery disease. *Clinica Chimica Acta*. 2012;413(1-2):113-120. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.09.004>

30. Guo T, Hao H, Zhou L, et al. Association of SNPs in the TIMP-2 gene and large artery atherosclerotic stroke in southern Chinese Han population. *Oncotarget*. 2018;9(4):4698-4706. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23473>

31. Wang K, Wang G, Huang S, et al. Association between TIMP-2 gene polymorphism and breast cancer in Han Chinese women. *BMC Cancer*. 2019;19:446. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5655-8>

32. de Freitas IA, de Alcantara Lima N, da Silva GBJr, et al. Novel biomarkers in the prognosis of patients with atherosclerotic coronary artery disease. *Revista Portuguesa de Cardiologia*. 2020;39(11):667-672. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.repce.2020.05.016>

33. Givvimani S, Kundu S, Narayanan N, et al. TIMP-2 mutant decreases MMP-2 activity and augments pressure overload induced LV dysfunction and heart failure. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2013;119(2):65-74. DOI: <https://doi.org/10.3109/13813455.2012.755548>

Статья поступила в редакцию 21 марта 2023 г.
Поступила после доработки 7 июля 2023 г.
Принята к печати 4 августа 2023 г.

Received 21 March 2023
Revised 7 July 2023
Accepted 4 August 2023

Информация об авторах

Анастасия Валериевна Понасенко, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией геномной медицины отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Российская Федерация, E-mail: ponaav@kemcardio.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3002-2863>.

Анна Викторовна Синицкая, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Российская Федерация, E-mail: cepoav1991@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4467-8732>.

Мария Владимировна Хуторная, младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт

комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Российская Федерация, E-mail: masha_hut@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9714-4080>.

Максим Юрьевич Синицкий, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Российская Федерация, E-mail: maksinitsky@rambler.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4824-2418>.

Максим Айдарович Асанов, младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Российская Федерация, E-mail: asmaks988@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0747-2495>.

Алена Олеговна Поддубняк, лаборант-исследователь лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Российская Федерация, E-mail: alyona.poddubnyak@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7388-356X>.

Information about the authors

Anastasia V. Ponassenko, Cand. Sci. (Medicine), Head of the Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia, E-mail: ponaav@kemcardio.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3002-2863>.

Anna V. Sinitskaya, Cand. Sci. (Biology), Researcher at the Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia, E-mail: cepoav1991@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4467-8732>.

Maria V. Khutornaya, Junior Researcher at the Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia, E-mail: masha_hut@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9714-4080>.

Maxim Yu. Sinitsky, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher at the Laboratory of Genomic Medi-

cine, Department of Experimental Medicine, Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia, E-mail: max-sinitsky@rambler.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4824-2418>.

Maxim A. Asanov, Junior Researcher at the Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases,

Kemerovo, Russia, E-mail: as-maks988@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0747-2495>.

Alena O. Poddubnyak, Research Laboratory Assistant at the Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia, E-mail: alyona.poddubnyak@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7388-356X>.



DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-2-0-4

УДК 575.16

Генетический вариант rs11568818 матриксной металлопротеиназы 7 ассоциирован с весом новорожденного у беременных с задержкой роста плода

Ю.Н. Решетникова , И.В. Пономаренко , В.И. Чурносков ,
М.С. Пономаренко , Е.А. Решетников

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

Резюме

Актуальность: Задержка роста плода (ЗРП) является распространенным осложнением беременности, частота которого достигает 10% во всем мире. ЗРП является основной причиной мертворождений и неонатальной заболеваемости и смертности, а долгосрочные последствия ЗРП связаны с более частой встречаемостью сердечно-сосудистых и метаболических заболеваний во взрослом возрасте. **Цель исследования:** Изучить ассоциации полиморфизма генов матриксных металлопротеиназ с весом новорожденных у беременных с задержкой роста плода и оценить их функциональные эффекты. **Материалы и методы:** На выборке беременных с задержкой роста плода (n=98) проведено молекулярно-генетическое исследование пяти полиморфных локусов генов матриксных металлопротеиназ (rs1799750 MMP-1, rs243865 MMP-2, rs3025058 MMP-3, rs11568818 MMP-7, rs17577 MMP-9). **Результаты:** Установлены ассоциации полиморфизма rs11568818 гена MMP-7 с весом новорожденного у женщин с задержкой роста плода в рамках рецессивной модели ($\beta = 0,32 \pm 0,13$, $p = 0,016$ $p_{perm} = 0,022$). Данный полиморфный локус обладает важными функциональными эффектами. Он локализуется в регионе гиперчувствительности к ДНКазе и сайте модифицированных гистонов, маркирующих энхансеры и промоторы в мезенхимальных и гемопоэтических стволовых клетках, клетках остеобластов, адипоцитов, клеточной линии фибробластов легких, различных отделов головного мозга, легких и др., определяет чувствительность ДНК к четырем факторам транскрипции (Foxa, GR, PLZF, Pou5f1), связан с уровнем экспрессии мРНК гена MMP-7 в легких, печени, скелетной мускулатуре. **Заключение:** Полиморфизм rs11568818 гена MMP-7 ассоциирован с весом новорожденного у женщин с задержкой роста плода.

Ключевые слова: задержка роста плода; однонуклеотидный полиморфизм; матриксные металлопротеиназы; MMP-7; ассоциации; вес новорожденного

Для цитирования: Решетникова ЮН, Пономаренко ИВ, Чурносков ВИ, и др. Генетический вариант rs11568818 матриксной металлопротеиназы 7 ассоциирован с весом новорожденного у беременных с задержкой роста плода. Научные результаты биомедицинских исследований. 2024;10(2):222-233. DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-2-0-4

Genetic variant rs11568818 of matrix metalloproteinase *MMP7* associated with newborn weight in pregnant women with fetal growth restriction

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

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

Corresponding author: Evgeny A. Reshetnikov (reshetnikov@bsu.edu.ru)

Abstract

Background: Fetal growth restriction is a common complication of pregnancy that has been associated with a variety of adverse perinatal outcomes. The condition carries significant risks of neonatal mortality, major and minor morbidity, and long term health sequelae. **The aim of the study:** The aim of the study was to study the associations of matrix metalloproteinases gene polymorphism with newborn weight in pregnant women with fetal growth restriction and to evaluate their functional effects.

Materials and methods: 98 cases of women with fetal growth restriction were selected as the experimental group. All pregnant women were performed genotyping of 5 SNPs of genes of matrix metalloproteinase (rs1799750 *MMP-1*, rs243865 *MMP-2*, rs3025058 *MMP-3*, rs11568818 *MMP-7*, rs17577 *MMP-9*). **Results:** We found associations of the rs11568818 polymorphism of the *MMP-7* gene with newborn weight in women with fetal growth restriction within a recessive model ($\beta = 0.32 \pm 0.13$, $p = 0.016$, $p_{perm} = 0.022$). This polymorphic locus possesses important functional effects. It is localized in an evolutionarily conserved region, a binding site for regulatory proteins (TBP, CFOS, CJUN), a region of DNase hypersensitivity, and a site of modified histones marking enhancers and promoters in mesenchymal and hematopoietic stem cells, osteoblast cells, adipocytes, and fibroblast cell line lungs, various parts of the brain, lungs, etc., determines the sensitivity of DNA to four transcription factors (Foxa, GR, PLZF, Pou5f1), is associated with the level of mRNA expression of the *MMP-7* gene in the lungs, liver, and skeletal muscles. **Conclusion:** The rs11568818 polymorphism of the *MMP-7* gene is associated with a newborn weight.

Keywords: fetal growth restriction; single-nucleotide polymorphism; matrix metalloproteinase; *MMP-7*; associations; newborn weight

For citation: Reshetnikova YuN, Ponomarenko IV, Churnosov VI, et al. Genetic variant rs11568818 of matrix metalloproteinase *MMP7* associated with newborn weight in pregnant women with fetal growth restriction. Research Results in Biomedicine. 2024;10(2):222-233. Russian. DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-2-0-4

Введение. Антропометрические характеристики плода являются важным показателем исхода беременности и напрямую зависят от нормального процесса плацентации [1]. Нарушение развития плаценты будет приводить к плацентарной недостаточности и развитию таких осложнений беременности,

как задержка роста плода и преэклампсия [2, 3, 4]. Задержка роста плода (ЗРП) возникает, когда плод не достигает своего внутриутробного потенциала роста в результате нарушения функции плаценты, при этом его размер <10-го перцентиля для данного срока гестации [1]. ЗРП является распространенным

осложнением беременности с частотой встречаемости до 10% во всем мире [5]. Это состояние сопряжено со значительными рисками неонатальной заболеваемости и смертности, и является основной причиной мертворождений [5]. Долгосрочные последствия ЗРП для здоровья связаны с более частой встречаемостью сердечно-сосудистых и метаболических заболеваний во взрослом возрасте [6].

Патогенез ЗРП сложен и связан с влиянием различных факторов (материнских; плацентарных; внутриутробных) [7], последовательно приводящих к аномальной трансформации спиральных артерий, нарушению плацентации, развитию плацентарной недостаточности и ЗРП [8]. Тем не менее, конкретные механизмы, инициирующие или запускающие этот патологический процесс, ещё до конца не изучены [8].

В процессы инвазии вневорсинчатого трофобласта в стенку спиральных артерий вовлечены матриксные металлопротеиназы (ММП) – особая группа эндогенных протеолитических гидролаз, которые могут разрушать различные компоненты внеклеточного матрикса [9]. Данная группа ферментов играет решающую роль в пролиферации, миграции и дифференцировке клеток, восстановлении и remodelировании тканей, эмбриогенезе [10, 11]. Изменение плазменной концентрации и/или уровня экспрессии ММП могут приводить к снижению инвазивной способности клеток трофобласта, отложению коллагена, недостаточному remodelированию спиральных артерий, ишемии и гипоксии плаценты, и, как следствие, являться фактором риска развития ЗРП [12-18].

Молекулярно-генетические исследования по поиску ассоциаций полиморфизма генов матриксных металлопротеиназ с задержкой роста плода и/или весом новорожденного были проведены относительно давно и количество таких исследований ограничено [19, 20]. Актуальные работы по изучению роли полиморфизма генов ММП в развитии осложнений беременности посвящены в основном изучению преэклампсии в различных популяциях мира [21, 22, 23]. Недостаточность молекулярно-генетических исследований по оценке роли полиморфизма

генов ММП в формировании веса новорожденного диктует необходимость дальнейшего проведения таких работ.

Цель исследования. Изучить взаимосвязи полиморфизма генов матриксных металлопротеиназ с весом новорожденных у беременных с задержкой роста плода в популяции Центрально-Черноземного региона России.

Материалы и методы исследования. В это исследование были включены 98 беременных с синдромом задержки роста плода, проходившие обследование на базе Перинатального центра Белгородской областной клинической больницы (с 2008 по 2015 год). Все женщины предоставили информированное согласие на включение в исследование. Комитет по этике медицинского института НИУ БелГУ одобрил дизайн этого исследования. При формировании выборки использовались следующие критерии включения: место рождения и проживания – Центрально-Черноземный регион России; русская национальность; однополая беременность, закончившаяся живорождением. К критериям исключения относили: многоплодная беременность, врожденные пороки развития плода/новорожденного, врожденные аномалии матки. Диагностика ЗРП проводилась на основании ультразвуковой фетометрии (определение окружности живота плода, окружности головы, бипариетального диаметра и длины бедренной плечевой кости). Предполагаемый вес плода был рассчитан с использованием формулы Hadlock. ЗРП определяли как массу плода <10-го перцентиля средней массы нормального плода того же гестационного возраста.

Для молекулярно-генетического тестирования было отобрано 5 однонуклеотидных полиморфизма генов матриксных металлопротеиназ: rs1799750 *MMP-1*, rs243865 *MMP-2*, rs3025058 *MMP-3*, rs11568818 *MMP-7*, rs17577 *MMP-9*. Данные локусы являются функционально значимыми, т.к. связаны с эпигенетическими изменениями и транскрипцией в соответствующих генах (данные получены *in silico* с помощью онлайн ресурса Haploreg v.4.2, <https://pubs.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>).

Экстрагирование ДНК из венозной крови проводилось стандартным методом фенол-хлороформной экстракции. Генотипирование ДНК-образцов проводилось методом ПЦР-синтеза ДНК с использованием олигонуклеотидных праймеров и TagMan зондов методом дискриминации аллелей.

Ассоциации между SNP организма матери и весом новорожденного оценивались методом лог-линейного регрессионного анализа (использовался пакет программ gPLink) [24]. Так как распределение веса новорожденного не было нормальным (критерий Шапиро-Уилка), использовались его трансформированные значения. Направленность ассоциативной связи оценивалась при помощи коэффициента регрессии (β) и его ошибки (SE) (описывают изменение трансформированного показателя веса новорожденного на минорный аллель). Для оценки индивидуальных эффектов SNP использовались аллельная, аддитивная, доминантная и рецессивная генетические модели с коррекцией на ковариаты (возраст, ИМТ матери до беременности) и множественные сравнения (использовались адаптивные пермутационные процедуры с

расчетом показателя p_{perm}). В конечном итоге, показатель $p_{perm} < 0,05$ принимался за статистически значимый.

SNP, показавшие значимые ассоциации с весом новорожденного, оценивались на их связь с несинонимическими заменами (PolyPhen-2, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), эпигенетическими эффектами (HaploReg (v4.2), <https://pubs.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>), экспрессией и альтернативным сплайсингом генов (GTEx portal, <https://www.gtexportal.org/home/>).

Результаты и их обсуждение. Установлены ассоциации полиморфизма rs11568818 гена матричной металлопротеиназы 7 (MMP-7) с весом новорожденного у женщин с ЗРП в рамках рецессивной модели (Табл. 1). Выявлено, что минорный аллель С rs11568818 MMP-7 статистически достоверно связан с более высоким весом новорожденного ($\beta = 0,32 \pm 0,13$, $p = 0,016$, $p_{perm} = 0,022$). Соответственно, референсный аллель Т rs11568818 MMP-7 будет ассоциирован с более низкой массой тела новорожденного.

Таблица 1 (начало)

Ассоциации полиморфных локусов генов металлопротеиназ с весом новорожденного у беременных с задержкой роста плода

Beginning of Table 1

Association of metalloproteinase genes polymorphisms with newborn body weight in pregnant women with fetal growth restriction

Полиморфизм	Генотипы (генетические модели)	N	%	Вес новорожденного $\bar{X} \pm SD$, граммы
rs1799750 MMP-1	1G/1G	20	20,83	2683,44 $\pm$ 128,15
	1G/2G	44	45,83	2684,43 $\pm$ 147,83
	2G/2G	32	33,33	2712,50 $\pm$ 76,77
	Минорный аллель 2G (аллельная модель)	$\beta \pm SE = 0,06 \pm 0,08$, $p = 0,45$		
	1G/1G vs. 1G/2G vs. 2G/2G (аддитивная модель)	$\beta \pm SE = 0,05 \pm 0,08$, $p = 0,48$		
	1G/1G vs. 1G/2G + 2G/2G (доминантная модель)	$\beta \pm SE = 0,09 \pm 0,12$, $p = 0,46$		
	1G/1G + 1G/2G vs. 2G/2G (рецессивная модель)	$\beta \pm SE = 0,05 \pm 0,13$, $p = 0,69$		
rs243865 MMP-2	C/C	54	55,10	2681,20 $\pm$ 137,49
	C/T	35	35,71	2706,86 $\pm$ 119,40
	T/T	9	9,19	2684,44 $\pm$ 115,23
	Минорный аллель Т (аллельная модель)	$\beta \pm SE = 0,08 \pm 0,098$, $p = 0,34$		

Таблица 1 (окончание)

Ассоциации полиморфных локусов генов металлопротеиназ
с весом новорожденного у беременных с задержкой роста плода

End of Table 1

Association of metalloproteinase genes polymorphisms with newborn body weight in pregnant women with fetal growth restriction

Полиморфизм	Генотипы (генетические модели)	N	%	Вес новорожденного $\bar{X} \pm SD$, граммы
	C/C vs. C/T vs. T/T (аддитивная модель)	$\beta \pm SE = 0,08 \pm 0,08$, $p = 0,35$		
	C/C vs. C/T + T/T (доминантная модель)	$\beta \pm SE = 0,12 \pm 0,11$, $p = 0,28$		
	C/C + C/T vs. T/T (рецессивная модель)	$\beta \pm SE = 0,05 \pm 0,19$, $p = 0,79$		
rs3025058 MMP-3	6A/6A	29	29,59	2691,72 $\pm$ 120,51
	6A/5A	51	52,04	2688,14 $\pm$ 143,58
	5A/5A	18	18,37	2696,11 $\pm$ 99,71
	Минорный аллель 5A (аллельная модель)	$\beta \pm SE = -0,01 \pm 0,08$, $p = 0,89$		
	6A/6A vs. 6A/5A vs. 5A/5A (аддитивная модель)	$\beta \pm SE = -0,002 \pm 0,08$, $p = 0,98$		
	6A/6A vs. 6A/5A + 5A/5A (доминантная модель)	$\beta \pm SE = 0,06 \pm 0,12$, $p = 0,64$		
	6A/6A + 6A/5A vs. 5A/5A (рецессивная модель)	$\beta \pm SE = -0,08 \pm 0,14$, $p = 0,56$		
rs11568818 MMP-7	T/T	22	22,45	2698,18 $\pm$ 133,90
	T/C	54	55,10	2676,20 $\pm$ 141,32
	C/C	22	22,45	2718,64 $\pm$ 82,36
	Минорный аллель C (аллельная модель)	$\beta \pm SE = 0,05 \pm 0,08$, $p = 0,58$		
	T/T vs. T/C vs. C/C (аддитивная модель)	$\beta \pm SE = 0,05 \pm 0,09$, $p = 0,53$		
	T/T vs. T/C + C/C (доминантная модель)	$\beta \pm SE = -0,18 \pm 0,13$, $p = 0,18$		
	T/T + T/C vs. C/C (рецессивная модель)	$\beta \pm SE = 0,32 \pm 0,13$, $p = 0,016$		
rs17577 MMP-9	G/G	62	63,92	2678,31 $\pm$ 139,66
	G/A	32	32,99	2705,00 $\pm$ 108,51
	A/A	3	3,09	2740,00 $\pm$ 43,59
	Минорный аллель A (аллельная модель)	$\beta \pm SE = 0,03 \pm 0,10$, $p = 0,80$		
	G/G vs. G/A vs. A/A (аддитивная модель)	$\beta \pm SE = 0,04 \pm 0,10$, $p = 0,74$		
	G/G vs. G/A + A/A (доминантная модель)	$\beta \pm SE = 0,05 \pm 0,12$, $p = 0,65$		
	G/G + G/A vs. A/A (рецессивная модель)	$\beta \pm SE = -0,06 \pm 0,32$, $p = 0,85$		

Примечание: β – коэффициент линейной регрессии (показывает изменение трансформированного показателя веса новорожденного на минорный аллель), SE – ошибка коэффициента β ; p – уровень статистической значимости; показатели $p < 0,05$ выделены жирным; данные таблицы получены с помощью линейной регрессии с учетом ковариат (возраст женщины и ее индекс массы тела до беременности).

Note: β – linear regression coefficient reflecting the change of the transformed newborn weight index to a minor allele, SE – the error of the β coefficient; p – significance level; p values < 0.05 are shown in bold; the data were obtained by linear regression; results were obtained after adjustment for covariates – the age of the woman and her body mass index before pregnancy.

По данным онлайн ресурса HaploReg (v4.2) rs11568818 *MMP-7* расположен в эволюционно-консервативном регионе, сайте модификации гистонов, маркирующих промоторы и энхансеры в тканях и органах взрослого организма и плода (4-7 тканей), сайтах связывания с регуляторными белками (TBP, CFOS, CJUN), регионе гиперчувствительности к ДНКазе (всего 15 тканей, в том числе мезенхимальные и гемопоэтические стволовые клетки,) (Табл. 2). При этом, обращает внимание, что полиморфизм rs11568818 *MMP-7* локализован в сайте модификации гистонов, маркирующих энхансеры и промоторы, в тканях и органах взрослого организма и плода, связанных с весом и ростом новорожденного, а именно: мезенхимальные и гемопоэтические стволовые клетки, клетки остеобластов, адипоциты, различные отделы головного мозга, и др.

Также rs11568818 *MMP-7* локализован в области сайта связывания с четырьмя регуляторными мотивами ДНК (факторы транскрипции) Foxa, GR, PLZF, Pou5f1. Разница LOD scores аллелей Т и С для Foxa составляет 5,1, для фактора GR – 0,8, для PLZF – 1,4, для Pou5f1 – 3,2. Исходя из этого, аллель Т rs11568818 *MMP-7*, связанный с более низким весом новорожденного, повышает аффинность к ДНК-мотивам Foxa, PLZF, Pou5f1 и снижает аффинность к фактору GR.

Стоит отметить, что полиморфизм rs11568818 *MMP-7* находятся в неравновесии по сцеплению ($r^2 > 0,4$) с 5 полиморфными маркерами, отличающимися значимыми регуляторными эффектами: данные локусы находятся в области сайта связывания с различными факторами транскрипции (от 1 до 7 факторов) (Табл. 2). Помимо этого, rs1943779 *MMP-7* локализован в регионе гиперчувствительности к ДНКазе в тканях почек и в сайте модификации гистонов, маркирующих энхансеры в цельной крови.

С помощью онлайн-ресурса GTEx Portal установлено, что аллель Т rs11568818 *MMP-7* связан с более низким уровнем экспрессии гена *MMP-7* в различных органах и тканях: легкие ($\beta = -0,33$, $p = 2,4 \cdot 10^{-17}$, $pFDR \leq 0,05$), печень ($\beta = -0,48$, $p = 6,1 \cdot 10^{-9}$,

$pFDR \leq 0,05$), скелетная мускулатура ($\beta = -0,15$, $p = 2,2 \cdot 10^{-4}$, $pFDR \leq 0,05$).

В итоге, rs11568818 *MMP-7*, ассоциированный с весом новорожденного, обладает важными функциональными эффектами. Он локализован в эволюционно-консервативном регионе, сайте связывания с регуляторными белками (TBP, CFOS, CJUN), регионе гиперчувствительности к ДНКазе, и сайте модифицированных гистонов, маркирующих энхансеры и промоторы в мезенхимальных и гемопоэтических стволовых клетках, клетках остеобластов, адипоцитов, различных отделов головного мозга и др., определяет чувствительность ДНК к четырем факторам транскрипции (Foxa, GR, PLZF, Pou5f1), связан с уровнем экспрессии мРНК гена *MMP-7* в легких, печени, скелетной мускулатуре.

Ген *MMP-7* кодирует матриксную металлопротеиназу 7 (ММП-7), являющуюся одним из представителей большого семейства цинк (II)-зависимых белковых гидролаз, которые могут разрушать различные компоненты внеклеточного матрикса [9, 25]. ММП вырабатываются клетками плаценты и матки, включая фибробласты, эндотелиальные клетки, макрофаги, гладкие миоциты сосудов, лимфоциты, трофобласты и нейтрофилы [9, 25].

ММП-7, также известная как матрилизин-1, относится к группе желатиназ и в основном разрушает несколько типов коллагенов (III, IV, V, IX, X, XI), протеогликаны, фибронектин, эластин и казеин [9, 25]. В первом триместре ММП-7 экспрессируется в децидуальной оболочке и трофобласте, а также в НК-клетках матки и макрофагах, обеспечивая таким образом дальнейший рост и ремоделирование матки и плаценты [26]. Также в исследовании Reister с соавт. [27] было показано, что экспрессия ММП-7 была снижена в клетках вневорсинчатого трофобласта у женщин с ЗРП в сочетании с преэклампсией. При этом стоит отметить, что по результатам нашего исследования референсный аллель Т rs11568818 *MMP-7*, являющийся фактором риска рождения маловесных детей, также связан со снижением уровня экспрессии мРНК в легких, печени, скелетной мускулатуре (по данным GTEx Portal).

Таблица 2

Регуляторные эффекты rs11568818 *MMP-7* и сильно сцепленных с ними SNP ($r^2 > 0,40$) (получены из базы данных HaploReg (v4.2))

Table 2

Regulatory effects of rs11568818 *MMP-7* and SNPs in high LD ($r^2 \geq 0.40$)

Chr	SNP	Gene	Pos (hg38)	LD (r^2)	Ref	Alt	SiPhy cons	Promoter histone marks	Enhancer histone marks	DNase	Proteins bound	Motifs changed	dbSNP func annot
11	rs12285347	<i>MMP7</i>	102525876	0,92	T	C						HNFI, TCF4	intronic
11	rs11568818	<i>MMP7</i>	102530930	1	T	C	+	4 tissues	7 tissues	15 tissues	TBP, CFOS, CJUN	4 altered motifs	
11	rs17098318	<i>MMP7</i>	102532127	0,59	G	A						4 altered motifs	
11	rs17881620	<i>MMP7</i>	102532522	0,42	T	C						VDR	
11	rs1943779	<i>MMP7</i>	102536460	0,52	T	C			BLD	KID		7 altered motifs	
11	rs7934632	<i>MMP7</i>	102541348	0,43	G	A						CEBPB	

Примечание: Chr – хромосома; SNP – однонуклеотидный полиморфизм; Gene – ген; Pos (hg38) – позиция SNP по данным базы данных GRCh38; LD – неравновесие по сцеплению; r^2 – коэффициента корреляции Пирсона; Ref – референсный аллель; Alt – альтернативный аллель; SiPhy cons – расположение SNP в эволюционно консервативном регионе; знак «+» – расположение указанного SNP в данном регионе; Promoter histone marks – расположение SNP в сайте модифицированных гистонов в промоторных областях; Enhancer histone marks – расположение SNP в сайте модифицированных гистонов в областях энхансеров; DNase – расположение SNP в ДНКаза-гиперчувствительном сайте; Proteins bound – расположение SNP в сайте связывания с регуляторными белками; Motifs changed – расположение SNP в регионе регуляторных последовательностей (ДНК мотивов); dbSNP func annot – локализация/значение SNP; tissues – ткани; BLD – кровь; KID – почки; altered motifs – регуляторный мотив ДНК; жирным шрифтом выделен SNP, ассоциированный с весом новорожденного.

Note: Chr – chromosome; SNP – single nucleotide polymorphism; Pos (hg38) – SNP position according to the GRCh38 database; LD – linkage disequilibrium; r^2 – Pearson correlation coefficient; Ref – reference allele; Alt – alternative allele; SiPhy cons – location of SNP in an evolutionarily conservative region; sign "+" – the location of the specified SNP in this region; Promoter histone marks – the location of the SNP in the site of modified histones in the promoter regions; Enhancer histone marks – the location of the SNP in the site of modified histones in the enhancer regions; DNase – location of SNP in the DNase-hypersensitive site; Proteins bound – location of SNP in the binding site with regulatory proteins; Motifs changed – location of SNP in the region of regulatory sequences (DNA motifs); dbSNP func annot – localization/value of SNP; BLD – blood; KID – kidneys; altered motifs – regulatory DNA motif; the SNP associated with the weight of the newborn is highlighted in bold.

По данным ряда полногеномных и ассоциативных исследований аллель T rs11568818 *MMP-7* также является фактором риска ряда заболеваний, таких как рак предстательной железы [28, 29]; рак шейки матки [30].

Заключение. Таким образом, аллель T полиморфизма rs11568818 гена *MMP-7* является фактором риска рождения новорожденных с более низким весом. Данный полиморфный локус обладает важными функциональными эффектами. Он локализован в эволюционно-консервативном регионе, сайте связывания с регуляторными белками (TBP, CFOS, CJUN), регионе гиперчувствительности к ДНКазе, и сайте модифицированных гистонов, маркирующих энхансеры и промоторы в мезенхимальных и гемопоэтических стволовых клетках, клетках остеобластов, адипоцитов, клеточной линии фибробластов легких, различных отделов головного мозга, легких и др., определяет чувствительность ДНК к четырем факторам транскрипции (Foxa, GR, PLZF, Pou5f1), связан с уровнем экспрессии мРНК гена *MMP-7* в легких, печени, скелетной мускулатуре

Информация о финансировании

Исследование выполнено при поддержке гранта НИУ «БелГУ» 2023 г. «Молодые лидеры в науке».

Financial support

The study was supported by the grant of Belgorod State National Research University «Young Leaders in Science», 2023.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors have no conflict of interest to declare.

Список литературы

1. Martins JG, Biggio JR, Abuhamad A, et al. Society for Maternal-Fetal Medicine Consult Series #52: Diagnosis and management of fetal growth restriction: (Replaces Clinical Guideline Number 3, April 2012). American Journal of Obstetrics and Gynecology. 2020;223(4):B2-B17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.05.010>
2. Головченко ОВ. Молекулярно-генетические детерминанты преэклампсии. Научные результаты биомедицинских исследований. 2019;5(4):139-149. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2019-5-4-0-11>
3. Решетников ЕА. Поиск ассоциаций генов-кандидатов, дифференциально экспрессирующихся в плаценте, с риском развития плацентарной недостаточности с синдромом задержки роста плода. Научные результаты биомедицинских исследований. 2020;6(3):338-349. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2020-6-3-0-5>
4. Баев ТО, Панова ИА, Кузьменко ГН, и др. Состояние микроциркуляции у беременных женщин с гипертензивными расстройствами в III триместре беременности. Научные результаты биомедицинских исследований. 2023;9(1):113-128. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2023-9-1-0-8>
5. Pels A, Beune IM, van Wassenae-Leemhuis AG, et al. Early-onset fetal growth restriction: A systematic review on mortality and morbidity. Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica. 2020;99(2):153-166. DOI: <https://doi.org/10.1111/aogs.13702>
6. D'Agostin M, Di Sipio Morgia C, Vento G, et al. Long-term implications of fetal growth restriction. World Journal of Clinical Cases. 2023;11(3):2855-2863. DOI: <https://doi.org/10.12998/wjcc.v11.i13.2855>
7. Anil KC, Basel PL, Singh S. Low birth weight and its associated risk factors: Health facility-based case-control study. PLoS ONE. 2020;15(6):e0234907. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234907>
8. Burton GJ, Jauniaux E. Pathophysiology of placental-derived fetal growth restriction. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 2018;218(2):S745-S761. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.11.577>
9. Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Castruita-De la Rosa C, et al. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. International Journal of Molecular Sciences. 2020;21(24):9739. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21249739>
10. Chen J, Khalil RA. Matrix Metalloproteinases in Normal Pregnancy and Preeclampsia.

sia. Progress in Molecular Biology and Translational Science. 2017;148:87-165. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.04.001>

11. Laronha H, Caldeira J. Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. Cells. 2020;9(5):1076. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells9051076>

12. Hiden U, Ghaffari-Tabrizi N, Gauster M, et al. Membrane-type matrix metalloproteinase 1 regulates trophoblast functions and is reduced in fetal growth restriction. American Journal of Pathology. 2013;182(5):1563-71. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.01.011>

13. Zhu J, Zhong M, Pang ZJ, et al. Dysregulated expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors may participate in the pathogenesis of pre-eclampsia and fetal growth restriction. Early Human Development. 2014;90(10):657-664. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2014.08.007>

14. Su MT, Tsai PY, Tsai HL, et al. miR-346 and miR-582-3p-regulated EG-VEGF expression and trophoblast invasion via matrix metalloproteinases 2 and 9. BioFactors. 2017;43(2):210-219. DOI: <https://doi.org/10.1002/biof.1325>

15. Garcha D, Walker SP, MacDonald TM, et al. Circulating syndecan-1 is reduced in pregnancies with poor fetal growth and its secretion regulated by matrix metalloproteinases and the mitochondria. Scientific Reports. 2021;11(1):16595. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96077-1>

16. Şahin B, Soyer-Çalışkan C, Çelik S, et al. Midregional pro-adrenomedullin and matrix metalloproteinase-2 levels in intrauterine growth restriction and small gestational age pregnancies: biochemical diagnostic difference. Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine. 2021;34(12):1999-2005. DOI: <https://doi.org/10.1080/14767058.2020.1846707>

17. Pei J, Li Y, Min Z, et al. MiR-590-3p and its targets VEGF, PIGF, and MMP9 in early, middle, and late pregnancy: their longitudinal changes and correlations with risk of fetal growth restriction. Irish Journal of Medical Science. 2022;191(3):1251-1257. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11845-021-02664-6>

18. Laskowska M, Dymara-Konopka W, Szmít E, et al. Matrix metalloproteinase-3 in preeclamptic and normotensive pregnancies complicated by foetal growth restriction. Heliyon. 2023;9(7):e18105. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18105>

19. Gremlich S, Nguyen D, Reymondin D, et al. Fetal MMP2/MMP9 polymorphisms and intrauterine growth restriction risk. Journal of Reproductive Immunology. 2007;74(1-2):143-151. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jri.2007.02.001>

20. Edwards DRV, Romero R, Kusanovic JP, et al. Polymorphisms in maternal and fetal genes encoding for proteins involved in extracellular matrix metabolism alter the risk for small-for-gestational-age. Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine. 2011;24(2):362-380. DOI: <https://doi.org/10.3109/14767058.2010.497572>

21. Sakowicz A, Lisowska M, Biesiada L, et al. Association of Maternal and Fetal Single-Nucleotide Polymorphisms in Metalloproteinase (MMP1, MMP2, MMP3, and MMP9) Genes with Preeclampsia. Disease Markers. 2018;2018:1371425. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/1371425>

22. Gannoun MBA, Raguema N, Zitouni H, et al. MMP-2 and MMP-9 Polymorphisms and Preeclampsia Risk in Tunisian Arabs: A Case-Control Study. Journal of Clinical Medicine. 2021;10(12):2647. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm10122647>

23. Jia JP, Wu JH, Hu JR. Correlations of MMP-9 and PPAR γ gene polymorphisms with occurrence of preeclampsia. European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 2022;26(3):771-778. DOI: https://doi.org/10.26355/eurev_202202_27985

24. Пономаренко ИВ, Решетников ЕА, Полоников АВ, и др. Полиморфный локус rs314276 гена LIN28B ассоциирован с возрастом менархе у женщин Центрального Черноземья России. Акушерство и гинекология. 2019;2:98-104. DOI: <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2019.2.98-104>

25. Wang X, Khalil RA. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. Advances in Pharmacology. 2018;81:241-330. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.08.002>

26. Espino Y Sosa S, Flores-Pliego A, Espejel-Núñez A, et al. New Insights into the Role of Matrix Metalloproteinases in Preeclampsia. International Journal of Molecular Sciences. 2017;18(7):1448. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18071448>

27. Reister F, Kingdom JCP, Ruck P, et al. Altered protease expression by periarterial trophoblast cells in severe early-onset preeclampsia with IUGR. Journal of Perinatal Medicine.

2006;34(4):272-279.

DOI:

<https://doi.org/10.1515/JPM.2006.052>

28. Conti DV, Darst BF, Moss LC, et al. Publisher Correction: Trans-ancestry genome-wide association meta-analysis of prostate cancer identifies new susceptibility loci and informs genetic risk prediction. *Nature Genetics*. 2021;53(3):413. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00786-2>

29. Emami NC, Cavazos TB, Rashkin SR, et al. A Large-Scale Association Study Detects Novel Rare Variants, Risk Genes, Functional Elements, and Polygenic Architecture of Prostate Cancer Susceptibility. *Cancer Research*. 2021;81(7):1695-1703. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2635>

30. Das AP, Chopra M, Agarwal SM. Prioritization and Meta-analysis of regulatory SNPs identified IL6, TGFB1, TLR9 and MMP7 as significantly associated with cervical cancer. *Cytokine*. 2022;157:155954. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2022.155954>

References

1. Martins JG, Biggio JR, Abuhamad A, et al. Society for Maternal-Fetal Medicine Consult Series #52: Diagnosis and management of fetal growth restriction: (Replaces Clinical Guideline Number 3, April 2012). *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2020;223(4):B2-B17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.05.010>

2. Golovchenko OV. Molecular genetic determinants of pre-eclampsia. *Research Results in Biomedicine*. 2019;5(4):139-149. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2019-5-4-0-11>

3. Reshetnikov EA. Study of associations of candidate genes differentially expressing in the placenta with the development of placental insufficiency with fetal growth restriction. *Research Results in Biomedicine*. 2020;6(3):338-349. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2020-6-3-0-5>

4. Baev TO, Panova IA, Kuzmenko GN, et al. The state of microcirculation in pregnant women with hypertensive disorders in the third trimester of pregnancy. *Research Results in Biomedicine*. 2023;9(1):113-128. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2023-9-1-0-8>

5. Pels A, Beune IM, van Wassenaer-Leemhuis AG, et al. Early-onset fetal growth restriction: A systematic review on mortality and morbidity. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 2020;99(2):153-166. DOI: <https://doi.org/10.1111/aogs.13702>

6. D'Agostin M, Di Sipio Morgia C, Vento G, et al. Long-term implications of fetal growth restriction. *World Journal of Clinical Cases*. 2023;11(3):2855-2863. DOI: <https://doi.org/10.12998/wjcc.v11.i13.2855>

7. Anil KC, Basel PL, Singh S. Low birth weight and its associated risk factors: Health facility-based case-control study. *PLoS ONE*. 2020;15(6):e0234907. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234907>

8. Burton GJ, Jauniaux E. Pathophysiology of placental-derived fetal growth restriction. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2018;218(2):S745-S761. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.11.577>

9. Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Castruita-De la Rosa C, et al. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(24):9739. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21249739>

10. Chen J, Khalil RA. Matrix Metalloproteinases in Normal Pregnancy and Preeclampsia. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2017;148:87-165. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.04.001>

11. Laronha H, Caldeira J. Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. *Cells*. 2020;9(5):1076. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells9051076>

12. Hiden U, Ghaffari-Tabrizi N, Gauster M, et al. Membrane-type matrix metalloproteinase 1 regulates trophoblast functions and is reduced in fetal growth restriction. *American Journal of Pathology*. 2013;182(5):1563-71. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.01.011>

13. Zhu J, Zhong M, Pang ZJ, et al. Dysregulated expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors may participate in the pathogenesis of pre-eclampsia and fetal growth restriction. *Early Human Development*. 2014;90(10):657-664. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2014.08.007>

14. Su MT, Tsai PY, Tsai HL, et al. miR-346 and miR-582-3p-regulated EG-VEGF expression and trophoblast invasion via matrix metalloproteinases 2 and 9. *BioFactors*. 2017;43(2):210-219. DOI: <https://doi.org/10.1002/biof.1325>

15. Garcha D, Walker SP, MacDonald TM, et al. Circulating syndecan-1 is reduced in pregnancies with poor fetal growth and its secretion regulated by matrix metalloproteinases and the mitochondria. *Scientific Reports*. 2021;11(1):16595. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96077-1>

16. Şahin B, Soyer-Çalışkan C, Çelik S, et al. Midregional pro-adrenomedullin and matrix metalloproteinase-2 levels in intrauterine growth restriction and small gestational age pregnancies: biochemical diagnostic difference. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2021;34(12):1999-2005. DOI: <https://doi.org/10.1080/14767058.2020.1846707>
17. Pei J, Li Y, Min Z, et al. MiR-590-3p and its targets VEGF, PIGF, and MMP9 in early, middle, and late pregnancy: their longitudinal changes and correlations with risk of fetal growth restriction. *Irish Journal of Medical Science*. 2022;191(3):1251-1257. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11845-021-02664-6>
18. Laskowska M, Dymara-Konopka W, Szmit E, et al. Matrix metalloproteinase-3 in preeclamptic and normotensive pregnancies complicated by foetal growth restriction. *Heliyon*. 2023;9(7):e18105. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18105>
19. Gremlich S, Nguyen D, Reymondin D, et al. Fetal MMP2/MMP9 polymorphisms and intrauterine growth restriction risk. *Journal of Reproductive Immunology*. 2007;74(1-2):143-151. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jri.2007.02.001>
20. Edwards DRV, Romero R, Kusanovic JP, et al. Polymorphisms in maternal and fetal genes encoding for proteins involved in extracellular matrix metabolism alter the risk for small-for-gestational-age. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2011;24(2):362-380. DOI: <https://doi.org/10.3109/14767058.2010.497572>
21. Sakowicz A, Lisowska M, Biesiada L, et al. Association of Maternal and Fetal Single-Nucleotide Polymorphisms in Metalloproteinase (MMP1, MMP2, MMP3, and MMP9) Genes with Preeclampsia. *Disease Markers*. 2018;2018:1371425. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/1371425>
22. Gannoun MBA, Raguema N, Zitouni H, et al. MMP-2 and MMP-9 Polymorphisms and Preeclampsia Risk in Tunisian Arabs: A Case-Control Study. *Journal of Clinical Medicine*. 2021;10(12):2647. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm10122647>
23. Jia JP, Wu JH, Hu JR. Correlations of MMP-9 and PPAR γ gene polymorphisms with occurrence of preeclampsia. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2022;26(3):771-778. DOI: https://doi.org/10.26355/eurrev_202202_27985
24. Ponomarenko IV, Reshetnikov EA, Polonikov AV, et al. The polymorphic locus rs314276 of the LIN28B gene is associated with the age of menarche in women of the Central Black Earth Region of Russia. *Obstetrics and Gynecology*. 2019;2:98-104. Russian. DOI: <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2019.2.98-104>
25. Wang X, Khalil RA. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. *Advances in Pharmacology*. 2018;81:241-330. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.08.002>
26. Espino Y Sosa S, Flores-Pliego A, Espejel-Núñez A, et al. New Insights into the Role of Matrix Metalloproteinases in Preeclampsia. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(7):1448. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18071448>
27. Reister F, Kingdom JCP, Ruck P, et al. Altered protease expression by periarterial trophoblast cells in severe early-onset preeclampsia with IUGR. *Journal of Perinatal Medicine*. 2006;34(4):272-279. DOI: <https://doi.org/10.1515/JPM.2006.052>
28. Conti DV, Darst BF, Moss LC, et al. Publisher Correction: Trans-ancestry genome-wide association meta-analysis of prostate cancer identifies new susceptibility loci and informs genetic risk prediction. *Nature Genetics*. 2021;53(3):413. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00786-2>
29. Emami NC, Cavazos TB, Rashkin SR, et al. A Large-Scale Association Study Detects Novel Rare Variants, Risk Genes, Functional Elements, and Polygenic Architecture of Prostate Cancer Susceptibility. *Cancer Research*. 2021;81(7):1695-1703. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2635>
30. Das AP, Chopra M, Agarwal SM. Prioritization and Meta-analysis of regulatory SNPs identified IL6, TGFB1, TLR9 and MMP7 as significantly associated with cervical cancer. *Cytokine*. 2022;157:155954. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2022.155954>
- Статья поступила в редакцию 2 октября 2023 г.
Поступила после доработки 30 ноября 2023 г.
Принята к печати 2 декабря 2023 г.
- Received 2 October 2023
Revised 30 November 2023
Accepted 2 December 2023
- Информация об авторах**
Юлия Николаевна Решетникова, аспирант по научной специальности 1.5.7 – Генетика ФГАОУ ВО «Белгородский государственный

национальный исследовательский университет», г. Белгород, Российская Федерация, E-mail: resh_yul@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-6123-4086>.

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: ponomarenko_i@bsu.edu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5652-0166>.

Владимир Иванович Чурносков, аспирант по научной специальности 1.5.7 – Генетика ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Российская Федерация, E-mail: vchurnosov@yandex.kz, ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-8519-4594>.

Марина Сергеевна Пономаренко, аспирант по научной специальности 1.5.7 – Генетика ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Российская Федерация, E-mail: ponomarenkomc@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-0312-0829>.

Евгений Александрович Решетников, доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры медико-биологических дисциплин ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский

университет», г. Белгород, Российская Федерация, E-mail: reshetnikov@bsu.edu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5429-6666>.

Information about the authors

Yuliya N. Reshetnikova, Post-graduate Student in Scientific Specialty 1.5.7 – Genetics, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, E-mail: resh_yul@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-6123-4086>.

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

Vladimir I. Churnosov, Post-graduate Student in Scientific Specialty 1.5.7 – Genetics, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, E-mail: vchurnosov@yandex.kz, ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-8519-4594>.

Marina S. Ponomarenko, Post-graduate Student in Scientific Specialty 1.5.7 – Genetics, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, E-mail: ponomarenkomc@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-0312-0829>.

Evgeny A. Reshetnikov, Doct. Sci. (Biology), Associate Professor, Professor at the Department of Biomedical Disciplines, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, E-mail: reshetnikov@bsu.edu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5429-6666>.

ФАРМАКОЛОГИЯ, КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ
PHARMACOLOGY



DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-2-0-5

Potential protective effect of alpha lipoic acid against testicular oxidative stress and altered gene expression induced by gentamicin treatment

Hozaifa K. Elsawah , Haitham M. Mokhimar , Mohamed M. Kandiel ,
Ayman S. Farid , AbuBakr M. El-Mahmoudy

Benha University
Moshtohor, 13736, Benha, Arab Republic of Egypt
Corresponding author: Hozaifa K. Elsawah (hozaifa2005@gmail.com)

Abstract

Background: Gentamicin induces testicular damage in association with oxidative stress explained by different mechanisms, including gene expression suppression of some antioxidant enzymes. **The aim of the study:** To investigate the potential protective effects of α -lipoic acid against gentamicin-induced testicular oxidative stress in terms of altered gene expression. **Materials and methods:** A parallel experimental study was conducted including fifty adult male albino rats. The animals were grouped into five. The control group received intraperitoneal NaCl 0.9%, while the other groups received 36.5mg/kg/day intraperitoneal gentamicin. Group-1 received gentamicin only, group-2 received gentamicin + intraperitoneal α -lipoic acid 100mg/kg/day, group-3 received gentamicin + intraperitoneal α -lipoic acid 200mg/kg/day, and group-4 received gentamicin + oral vitamin E 100mg/kg/day. All treatments were given for 14 days. The animals were euthanized in two halves on the 15th and 60th days. Testes were immediately removed, frozen, and evaluated for oxidative stress biomarkers and gene expression of antioxidant enzymes. **Results:** Gentamicin increased malondialdehyde by mean difference $\pm$ standard error of 115.57 ± 2.18 , decreased total antioxidant capacity by -9.23 ± 0.27 , and decreased catalase and superoxide dismutase activities by -1.89 ± 0.45 and -11.77 ± 2.86 , respectively, compared to the control. Additionally, gentamicin downregulated gene expression of catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase. However, adding vitamin E or α -lipoic acid cured the oxidative stress and partially to completely upregulated the gene expression. **Conclusion:** Reversal of testicular oxidative and gene suppression associated with gentamicin could be achieved with α -lipoic acid co-treatment, which might be applied in human studies. **Keywords:** Alpha lipoic acid; Aminoglycosides; Antioxidant genes; Testis
Acknowledgements: to staff members of the Central Laboratory of the faculty for their help and support.

For citation: Elsawah HK, Mokhimar HM, Kandiel MM, et al. Potential protective effect of alpha lipoic acid against testicular oxidative stress and altered gene expression induced by gentamicin treatment. Research Results in Biomedicine. 2024;10(2):234-243. DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-2-0-5

Introduction. Gentamicin, a widely used antibiotic to treat many infectious diseases, is a bactericidal broad-spectrum aminoglycoside [1, 2, 3]. It has been demonstrated that gentamicin can cause cellular damage in certain vulnerable organs tissue such as the kidney, inner ear, and testis [4, 5, 6], which is influenced by the high hydrophilic nature of gentamicin that limits its volume of distribution and makes the molecule highly selective to specific organs [7]. Oxidative stress has been accused as one of the main mechanistic approaches to such damage [8]. Numerous mechanisms underlying gentamicin-induced oxidative stress have been reported with *in vitro* or *in vivo* evidence. One mechanism is mitochondrial pathway-dependent oxidative stress through increasing the production of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) from the respiratory chain [9]. Another mechanism is the peroxidation of phosphoinositide, a membrane lipid rich in arachidonic acid, by gentamicin-iron complex, accompanied by arachidonic acid release [10]. The released arachidonic acid also forms an arachidonic acid- Fe^{2+} -gentamicin ternary complex that reacts with molecular oxygen or lipid peroxides, leading to the propagation of arachidonic acid peroxidation [10]. Other mechanisms include reduced cellular concentrations of glutathione, glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase enzyme (SOD), and catalase enzyme [11]. The reduced cellular antioxidant enzymes have been investigated in the context of altering their gene expressions, and it has been reported that gentamicin reduced the gene expression of some antioxidant enzymes including SOD [11], catalase, and GPx [12]. On the other hand, gentamicin-induced cellular damage can be also explained by induced endoplasmic reticulum stress and hence apoptosis [13]. In the testicular tissues, germ cells are very rich in polyunsaturated fatty acid and thus become vulnerable to oxidative stress-related damage [14]. Additionally, endoplasmic reticulum stress is correlated with male infertility [15].

Gentamicin treatment was associated with reduced reproductive organs' weight, altered sperm parameters, disturbed sexual hormone levels, and abnormal histopathological findings, accompanied by induced testicular oxidative stress [16]. However, many attempts tried to mitigate these effects using different antioxidants including ginger [17], lycopene [6], carrot seed [18], melatonin [19], dandelion [20], α -lipoic acid [21], curcumin and propolis [22], omega-3-fatty acids [23], vitamin C and E [24], and selenium [25]. On the other hand, α -lipoic acid is a powerful exogenous antioxidant that serves as a coenzyme of the mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex and as a component of the mitochondrial glycine cleavage system [26]. It could prevent testicular oxidative stress induced by oxidant agents such as carbimazole [27]. Additionally, α -lipoic acid showed promising results in protecting testicular structure, preserving sperm parameters, and normalizing reproductive hormone levels when co-administered with gentamicin [21, 28]. Moreover, α -lipoic acid showed up-regulation of gene expression of antioxidant enzymes in diabetic rat kidneys in previous studies [29, 30]. It was hypothesized that the protective effect of α -lipoic acid against gentamicin-induced testicular damage is mediated by the antioxidant effects of α -lipoic acid including direct effect and antioxidant enzymes upregulation. However, the potential protective effect of alpha-lipoic against altered gene expression of antioxidant enzymes induced by gentamicin has been poorly studied.

The aim of the study. To evaluate the potential protection of α -lipoic acid against gentamicin-induced testicular oxidative stress.

Materials and Methods

Drug preparation

Gentamicin was obtained as Garamycin® 80 mg/2 ml ampoules manufactured by Schering-Plough Corporation, Egypt. α -lipoic acid was obtained as Thiotacid® 300 mg/ 10 ml ampoules manufactured by EVA Pharmaceutical Industries, Egypt. Both drugs were

given intraperitoneally with a 25-gauge needle. Vitamin E was obtained under the generic name of vitamin E 1000 mg®, Pharco Pharmaceuticals. The capsules were evacuated, diluted with sunflower oil to a final volume of 1 ml per rat, and administered orally using 18-gauge soft gavage tubes.

Drug dosing

The double average dose of gentamicin was used in this study which was calculated as the following: The therapeutic human dose of 5 mg/kg/day was converted to the equivalent dose for rats based on the body surface area ratio according to Paget and Barnes method to be 31.5 mg/kg daily [31]. The rat dose was then calculated as the average dose of 31.5 mg/kg/day (based on body surface area) and 5 mg/kg/day (based on body weight) to be 18.25 mg/kg/day. The double average dose is 36.5 mg/kg/day. Alpha lipoic acid was given in two different doses; 100 and 200 mg/kg/day [32, 33], while vitamin E was administered as 100 mg/kg/day [34]. All treatments were given for 14 days [35].

Animals

Sixty male Wistar rats aged 8 weeks and weighing 200 ± 20 g were obtained from the Animal House of the Faculty of Veterinary Medicine, Benha University. The rats were housed at normal room temperature (25 - 30°C), humidity (40-60%), and 12h/12h light/dark cycle before use in the experimental protocols. The animals were fed laboratory formula and tap water *ad libitum* [36].

Study design

A parallel experimental study was conducted at the Departments of Pharmacology and Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Benha University. The study was approved by the ethics committee of the faculty with an ethical approval number of BUFVTM-080422. After two weeks of acclimatization to the diet and house conditions, ten rats with abnormal testicle size were excluded based on ultrasound screening. Fifty rats were randomly assigned to five groups of ten. Rats in group 1 received gentamicin once daily with 36.5 mg/kg. Rats in groups 2, 3, and 4 received the same gentamicin dose plus 100 mg/kg α -lipoic acid (group 2), 200 mg/kg α -lipoic acid

/day (group 3), and 100 mg/kg vitamin E (group 4). Group 5 served as a control and received an intraperitoneal 0.5 ml NaCl 0.9% once daily. All treatments were administered from day one to day fourteen. Half of the animals in each group were euthanized under anesthesia using isoflurane anesthesia [37] on the 15th day, while the second half was euthanized on the 60th day of the treatment.

Testis sampling

Immediately after euthanasia, one testis from each animal was dissected, weighed, and divided into two parts. To assay testicular oxidative stress biomarkers, the first part of the testis was homogenized with a phosphate buffer solution at pH 7.4 and centrifuged at 1500 xg for 5 minutes at 4 °C [38]. The supernatant was removed and kept at -20 °C till used in the analysis of oxidative stress biomarkers. The second part of the testis was immediately kept at -80 °C to quantify testicular gene expression of antioxidant enzymes.

Oxidative stress assessment

The separated testicular homogenate was used to assay the oxidative stress parameters including malondialdehyde (MDA) concentration, SOD and Catalase activities, and total antioxidant capacity (TAC) by using commercial kits from Biodiagnostic, Dokki, Giza, (Catalog No. TA2513 for TAC, Catalog No. TA2529 for MDA, Catalog No. TA2521 for SOD, Catalog No. TA2517 for catalase). All procedures were carried out according to the manufacturer's instructions [39], in the Central Laboratory of the faculty.

Gene expression assessment

Total RNA was extracted from the frozen samples using RNeasy® Mini kit (Qiagen) by adding easy red TRIzol solution to the tissue and following the manufacturer's protocol. Single-stranded complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1000 ng of total RNA according to the manufacturer's protocol of high-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems®). The RNA quantity was determined using SPECTROstar Nano (BMG LABTECH®). Real-time polymerase chain reactions (RT-PCR) were conducted for each gene of catalase, SOD, and GPx enzymes. Each PCR reaction consisted of 1.5 μ l of

1 µg/µl cDNA, 10 µl SYBR Green PCR Master Mix (QuantiTect SYBR® Green RT-PCR Kit, Qiagen), 1 µM of each forward and reverse primer for each gene [40] (Table 1), and nuclease-free water to a final volume of 20 µl. Reactions were then analyzed on an Applied Biosystem® 7500 Fast RT-PCR Detection system under the following conditions: 95°C for 10 minutes (holding stage) and 40 cycles of 95°C for 15

seconds (denaturation stage) followed by 60°C for 1 minute (annealing and extension stage). Changes in gene expression were calculated from the obtained cycle threshold (Ct) values provided by real-time PCR instrumentation using the comparative CT method to a reference (housekeeping) gene (β-actin). Gene expression is expressed as relative mRNA expression of catalase, SOD, and GPx to β-actin mRNA.

Table 1

Forward and reverse sequences of primers used in gene expression testing

Primer	Forward sequence	Reverse sequence
B-actin	AGAAGAGCTATGAGCTGCCTGACG	CTTCTGCATCCTGTCAGCGATGC
Catalase	ACACTTTGACAGAGAGCGGA	TTTCACTGCAAACCCACGAG
GPx	GACCGACCCCAAGTACATCA	GCAGGGCTTCTATATCGGGT
SOD	GCGTCATTCACTTCGAGCAG	GGTCTCCAACATGCCTCTCT

Note: GPx – glutathione peroxidase; SOD – superoxide dismutase.

Statistical methods

Values are expressed as mean ± standard error (SE), and for effect size as mean difference (MD) ± SE. A one-way analysis of variance (ANOVA) test was conducted among the study groups at 0.05 level of significance followed by, for a significant F-statistic value, post hoc Tukey's test at a Bonferroni adjusted level of significance. Correlations between enzyme activities and gene expression were assessed by Pearson correlation test using correlation coefficient Rho (r) to indicate correlation direction and magnitude at 0.05 level of significance. Regression-based adjusted R squared (R²) was used to show how much enzyme activity variation could be explained by its gene expression, and regression coefficient (beta) was used to quantify the relationship. Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) v.26 software was used for the required analysis [41].

Results

Oxidative stress biomarkers

As shown in Table 2, on day 15, rats treated with gentamicin showed higher MDA concentration than the control group (MD ± SE = 115.57 ± 2.18). Despite the reduction in MDA concentration amongst testes cotreated with 100 mg/Kg α-lipoic acid compared to gentamicin alone (MD ± SE = -94.29 ± 2.18), it was still higher than the control group ((MD

± SE = 21.29 ± 2.18). However, co-treatment with gentamicin plus 200 mg/Kg α-lipoic acid normalized MDA concentration compared to the control group (MD ± SE = -2.05 ± 2.18). Additionally, the group cotreated with gentamicin plus vitamin E could normalize MDA concentration compared to the control group (MD ± SE = -5.03 ± 2.18). TAC was reduced with gentamicin treatment compared to the control group (MD ± SE = -9.23 ± 0.27). However, adding 100 or 200 mg/kg α-lipoic acid, or vitamin E to gentamicin treatment could restore TAC compared to the control (MD ± SE = -0.57 ± 0.27, 0.28 ± 0.27, 0.002 ± 0.27, respectively). Catalase and SOD enzyme activities were also reduced in rats treated with gentamicin compared to the control group (MD ± SE = -1.89 ± 0.45 and -11.77 ± 2.86, respectively). However, coadministration of 100 mg/Kg α-lipoic acid with gentamicin could normalize the enzyme activities as compared to the control (MD ± SE = 0.19 ± 0.45, 2.23 ± 2.86, respectively). Moreover, coadministration of either 200 mg/Kg α-lipoic acid or vitamin E normalized catalase and increased SOD enzyme activities compared to the control (MD ± SE = 1.14 ± 0.45, 20.23 ± 2.86, respectively for 200 mg α-lipoic acid; MD ± SE = 0.07 ± 0.45, 13.23 ± 2.86, respectively for vitamin E). On day sixty, no statistically significant differences were observed among the study groups.

Table 2

Effect of gentamicin with/without alpha-lipoic acid or vitamin E on oxidative stress biomarkers in rats' testis

Day	Group	MDA (nmol/0.1g.tissue)		TAC (mM/L)		SOD (U/ml tissue)		Catalase (U/g tissue)	
		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
15	Control	46.61	0.64 ^a	16.90	0.22 ^a	320.0	2.90 ^a	4.34	0.19 ^a
	1	162.19	0.80 ^b	7.67	0.14 ^b	308.2	0.71 ^b	2.46	0.02 ^b
	2	67.90	2.55 ^c	16.33	0.20 ^a	323.2	0.71 ^a	4.52	0.24 ^a
	3	44.56	1.99 ^a	17.18	0.21 ^a	340.2	3.24 ^d	5.47	0.64 ^a
	4	41.58	0.55 ^a	16.90	0.18 ^a	333.2	0.71 ^d	4.41	0.06 ^a
60	Control	65.07	0.81	15.46	0.18	537.86	18.47 ^a	7.18	1.32
	1	54.09	3.49	15.81	0.28	479.83	43.85	7.01	1.12
	2	56.31	2.31	13.82	0.94	439.72	37.23	7.08	1.00
	3	52.40	3.28	15.42	0.11	424.29	16.13	6.01	1.05
	4	52.68	4.11	15.14	0.54	413.76	8.62	6.94	1.23

Note: MDA – malondialdehyde; SE – standard error; SOD – superoxide dismutase; TAC – total antioxidant capacity; group 1 refers to gentamicin alone; group 2 refers to gentamicin + 100mg/kg α -lipoic acid; group 3 refers to gentamicin + 200 mg/kg α -lipoic acid; group 4 refers to gentamicin + vitamin E. Values bearing different superscript letters in the same column differ significantly between groups.

Gene expression

As shown in Table 3, on day 15, relative catalase and SOD gene expression was reduced among rats treated with gentamicin compared to the control rats ($MD \pm SE = -0.84 \pm 0.09$ and -0.66 ± 0.07 , respectively). However, co-treatment with 100 mg/kg α -lipoic acid provided a partial increase in the catalase and SOD gene expression compared to gentamicin alone ($MD \pm SE = 0.43 \pm 0.09$ and 0.26 ± 0.07 , respectively), but less than the control ($MD \pm SE = -0.41 \pm 0.09$ and -0.42 ± 0.07 , respectively). Additionally, co-treatment with 200 mg/kg α -lipoic acid fortified the increase in the catalase and SOD gene expression compared to the control ($MD \pm SE = 0.29 \pm 0.09$ and 0.46 ± 0.07 , respectively). On the other hand, co-treatment with vitamin E partially up-regulated catalase and SOD gene expression compared to treatment with gentamicin alone and the control group, which approximated α -lipoic acid 100 mg/kg effect ($p = 0.204$ and 0.326). Relative GPx gene expression was also reduced with gentamicin treatment compared to the control ($MD \pm SE = -0.49 \pm 0.06$) that was mitigated with 100 mg/kg α -lipoic acid ($MD \pm SE = -0.23 \pm 0.06$) or normalized with

200 mg/kg α -lipoic acid ($MD \pm SE = 0.003 \pm 0.06$) compared to gentamicin alone. On the other hand, co-treatment with vitamin E partially upregulated GPx gene expression compared to treatment with gentamicin alone and the control group, which approximated α -lipoic acid 100 mg/kg effect ($p = 0.992$). On day sixty, the difference among the groups in the relative genes' expression was not significant.

Relationship between oxidative stress and gene expression

Catalase enzyme activity was significantly correlated with catalase gene expression ($r = 0.69$, $p < 0.001$). The univariate regression model of catalase enzyme activity showed that $R^2 = 0.457$, catalase gene expression beta = 1.905, and $p < 0.001$, concluding that about 46% of the reduced catalase activity could be explained by the suppressed gene expression. SOD enzyme activity was significantly correlated with SOD gene expression ($r = 0.535$, $p = 0.006$). The univariate regression model of SOD enzyme activity showed that $R^2 = 0.275$, SOD gene expression beta = 15.759, and $p = 0.004$, concluding that about 28% of the reduced SOD activity could be explained by the suppressed gene expression.

Table 3

Gene expression of antioxidant enzymes obtained from rats' testis treated with gentamicin with/without alpha-lipoic acid or vitamin E

Day	Group	Cat. gene expression (Fold change)		SOD gene expression (Fold change)		GPx gene expression (Fold change)	
		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
15	Control	1.18	0.07 ^a	1.28	0.08 ^a	1.11	0.07 ^a
	1	0.34	0.02 ^b	0.63	0.04 ^b	0.62	0.03 ^b
	2	0.77	0.05 ^d	0.86	0.03 ^c	0.85	0.03 ^c
	3	1.46	0.11 ^c	1.74	0.06 ^d	1.12	0.04 ^a
	4	0.97	0.04 ^{ad}	1.01	0.05 ^c	0.88 [`]	0.05 ^c
60	Control	0.98	0.13	1.11	0.09	0.97	0.12
	1	0.92	0.09	1.20	0.07	0.92	0.08
	2	1.05	0.14	1.16	0.10	1.02	0.09
	3	0.91	0.10	1.17	0.09	0.99	0.11
	4	1.12	0.08	1.04	0.12	0.94	0.13

Note: Cat. – Catalase; GPx – glutathione peroxidase; SOD – superoxide dismutase; group 1 refers to gentamicin alone; group2 refers to gentamicin + 100mg/kg α -lipoic acid; group 3 refers to gentamicin + 200 mg/kg α -lipoic acid; group 4 refers to gentamicin + vitamin E. Values bearing different superscript letters in the same column differ significantly between groups.

Discussion. The complexity of gentamicin-induced testicular oxidative stress promotes investigating one of the underlying potential mechanisms which is gene expression. The oxidative stress is not only limited to testicular tissue, but also extends to renal tubules [42], and vestibular tissues [43]. Testicular oxidative stress as a mechanism of gentamicin-induced gonadotoxicity has been studied and demonstrated in rat animal models [16]. Suppression of antioxidant enzymes gene expression as a mechanism of gentamicin-induced testicular oxidative stress has also been reported in a recent study [11]. Furthermore, gene expression downregulation associated with gentamicin treatment in other organs such as the kidney has been also reported [12]. The present study found an increased testicular MDA and a decreased TAC and decreased catalase and SOD enzyme activities in association with decreased gene expression of catalase, SOD, and GPx enzymes among animals treated with gentamicin compared to control, indicating testicular oxidative. In agreement with our findings, a study treated rats with 3 doses of gentamicin for 10 days and found a dose-dependent reduction in testicular catalase and SOD enzyme activities and an increase in lipid peroxidation [44]. Consistently, a 6-day

treatment course with 100 mg/kg gentamicin increased testicular MDA and reduced antioxidant enzyme activities including catalase and glutathione reductase [19]. Another study reported a reduction in testicular catalase and SOD enzyme activities after treating rats with 5 mg/kg gentamicin for 10 days [45]. One more study reported a dose-dependent reduction in catalase and SOD enzyme activities on day 1 after treating animals with 3 and 5 mg/kg gentamicin for 10 days, which was restored on day 35 [46].

Alteration of testicular gene expression of antioxidant enzymes concerning gentamicin treatment was studied to a lesser extent. A study administered 100 mg/kg gentamicin for 6 days to rats and found testicular gene expression suppression of SOD by about 75% compared to control, but not catalase gene expression [11], which agreed with the current findings in SOD expression only. Another study examined the effect of 100 mg/kg gentamicin for 12 days on renal gene expression of SOD and GPx enzymes and reported great suppression of the two enzymes to about 90% [12], which is consistent with the present study results.

We added α -lipoic acid in two doses to gentamicin during the gentamicin-treatment

course and recorded a dose-dependent recovery from oxidative stress and restoration of gene expression compared to gentamicin alone. Consistently, α -lipoic acid as a protective agent against gentamicin-related gonadotoxicity was recently investigated. It was reported that 600 mg/kg α -lipoic acid protected against 80mg/kg gentamicin adverse effects when co-administered for 4 weeks [21]. However, to the best of our knowledge, the potential protective effect of α -lipoic acid against gentamicin-induced oxidative stress and altered gene expression has not been studied. Noteworthy, α -lipoic acid protected against gentamicin-induced nephrotoxicity [47] and ototoxicity [48], and the associated oxidative stress among animals treated with gentamicin and alpha lipoic 50-200 mg/kg. Upregulation of antioxidant enzymes gene expression by α -lipoic acid in diabetic rat kidneys has been reported in a study that treated rats with 10 mg/kg α -lipoic acid for 4 weeks. The relative mRNA expression of catalase and SOD to β -actin in diabetic rats was increased compared to normal rats [29]. Similarly, another study reported upregulation of relative gene expression of SOD, GPx, and catalase among α -lipoic acid-treated diabetic rat kidneys [30]. The gene expression upregulation by α -lipoic acid was proposed to be mediated by O-GlcNAc (O-linked β -N-acetylglucosamine)-dependent mechanism [29], besides its direct antioxidant activity through the oxidized and reduced forms [49]. It also has indirect antioxidant activity through metal chelation of Mn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , and Zn^{2+} [50] via electrophilic mechanisms, and LA-induced heme-oxygenase-1 (HO-1) expression and cellular protection [51].

In the present study, rats cotreated with vitamin E showed that the gentamicin-induced testicular oxidative stress was ameliorated, and the gene expression of antioxidant enzymes was partially upregulated which approximated the protective action of α -lipoic acid. Consistently, rats treated with 80 mg/kg gentamicin + vitamin E 50 mg/kg for 8 days showed a reduced renal MDA and an increased GSH concentration [52]. In another study, 100 mg/kg of vitamin E could partially restore GSH concentration in liver cells among rats treated with

gentamicin [53]. The possible underlying mechanism is that vitamin E has a direct free radical scavenger action by donating its phenolic hydrogen atom to lipid peroxy radical forming lipid hydroperoxide and α -tocopheroxyl radical [54]. The latter reacts with lipid peroxy radical, lipid alkoxy radical, or carbon-centered lipid radical forming inactive nonradical product, or reacts with another α -tocopheroxyl radical forming nonradical dimer [54]. On the other hand, vitamin E was reported to upregulate, but not completely restore, catalase and SOD gene expression in mice liver cells that were treated with an oxidative stress inducer [55].

Conclusion. Gentamicin downregulates gene expression of catalase, SOD, and GPx enzymes, supplying an explanation of gentamicin-induced testicular oxidative stress in rat testicular tissue. Adding α -lipoic acid or vitamin E to gentamicin treatment provides significant protection against oxidative stress that could be applied in human studies.

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. Odabasi IO, Bulbul A. Neonatal sepsis. The Medical Bulletin of Sisli Etfal Hospital. 2020;54(2):142-158. DOI: <https://doi.org/10.14744/SEMB.2020.00236>
2. Ross JDC, Brittain C, Cole M, et al. Gentamicin compared with ceftriaxone for the treatment of gonorrhoea (G-ToG): a randomised non-inferiority trial. The Lancet. 2019;393(10190):2511-2520. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32817-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32817-4)
3. Chaves BJ, Tadi P. Gentamicin. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2023.
4. Laurell G. Pharmacological intervention in the field of ototoxicity. HNO. 2019;67(6):434-439. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00106-019-0663-1>
5. Mousavinasab SR, Akhoundi-Meybodi Z, Mahmoudi L, et al. A randomized double-

blinded placebo-controlled clinical trial on protective effects of pentoxifylline on gentamicin nephrotoxicity in infectious patients. *Clinical and Experimental Nephrology*. 2021;25(8):844-853. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10157-021-02032-9>

6. Aly HAA. Testicular toxicity of gentamicin in adult rats: Ameliorative effect of lycopene. *Human and Experimental Toxicology*. 2019;38(11):1302-1313. DOI: <https://doi.org/10.1177/0960327119864160>

7. Gyselynck A-M, Forrey A, Cutler R. Pharmacokinetics of gentamicin: distribution and plasma and renal clearance. *Journal of Infectious Diseases*. 1971;124(Suppl.1):S70-S76. DOI: https://doi.org/10.1093/infdis/124.Supplement_1.S70

8. Yarijani ZM, Najafi H, Shackebaei D, et al. Amelioration of renal and hepatic function, oxidative stress, inflammation and histopathologic damages by *Malva sylvestris* extract in gentamicin induced renal toxicity. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2019;112:108635. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108635>

9. Morales AI, Demaille D, Prieto M, et al. Metformin prevents experimental gentamicin-induced nephropathy by a mitochondria-dependent pathway. *Kidney International*. 2010;77(10):861-869. DOI: <https://doi.org/10.1038/ki.2010.11>

10. Lesniak W, Pecoraro VL, Schacht J. Ternary complexes of gentamicin with iron and lipid catalyze formation of reactive oxygen species. *Chemical Research in Toxicology*. 2005;18(2):357-364. DOI: <https://doi.org/10.1021/tx0496946>

11. Karaman M, Budak H, Çiftci M. Amoxicillin and gentamicin antibiotics treatment adversely influence the fertility and morphology through decreasing the *Dazl* gene expression level and increasing the oxidative stress. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2019;125(5):447-455. DOI: <https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1482354>

12. Babaenezhad E, Nouryazdan N, Nasri M, et al. Cinnamic acid ameliorate gentamicin-induced liver dysfunctions and nephrotoxicity in rats through induction of antioxidant activities. *Heliyon*. 2021;7(7):e07465. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07465>

13. El-Azeem A, Nashwa I, Abdel-Sattar SA, et al. Nicorandil ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity through Nrf2/HO-1, p38 MAPK/NF- κ B p65/NO and miR-7/CHOP pathways. *Azhar International Journal of Pharmaceutical and Medical Sciences*.

2022;3(1):156-171. DOI: <https://doi.org/10.21608/AIJPMs.2022.156529.1162>

14. Lenzi A, Gandini L, Lombardo F, et al. Polyunsaturated fatty acids of germ cell membranes, glutathione and glutathione-dependent enzyme-PHGPx: from basic to clinic. *Contraception*. 2002;65(4):301-304. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0010-7824\(02\)00276-7](https://doi.org/10.1016/S0010-7824(02)00276-7)

15. Karna KK, Shin YS, Choi BR, et al. The role of endoplasmic reticulum stress response in male reproductive physiology and pathology: a review. *World Journal of Men's Health*. 2020;38(4):484-494. DOI: <https://doi.org/10.5534/wjmh.190038>

16. Elsayah HK, Kandiel MM, Amin AA, et al. Gentamicin and amikacin adversely affect male infertility indicated by pharmacological, andrological and pathological evidence. *International Journal of Basic and Clinical Pharmacology*. 2020;9(2):218-225. DOI: <http://dx.doi.org/10.18203/2319-2003.ijbcp20200167>

17. Zahedi A, Fathiazad F, Khaki A, et al. Protective effect of ginger on gentamicin-induced apoptosis in testis of rats. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2012;2(2):197-200. DOI: <https://doi.org/10.5681/apb.2012.030>

18. Nouri M, Khaki A, Fathiazar F, et al. The protective effects of carrot seed extract on spermatogenesis and cauda epididymal sperm reserves in gentamicin treated rats. *Yakhteh Medical Journal*. 2009;11(3):327-333.

19. Kim SH, Lee IC, Baek HS, et al. Melatonin prevents gentamicin-induced testicular toxicity and oxidative stress in rats. *Andrologia*. 2014;46(9):1032-1040. DOI: <https://doi.org/10.1111/and.12191>

20. Ömür AD, Kandemir FM, Yildirim BA. Protective effect of dandelion (*Taraxacum officinale*) extract against gentamicin-induced reproductive damage in male rats. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2016;22(6):929-936.

21. Yahya K, Hassan AH, Nadhem H. Evaluation the Effect of Gentamicin on Fertility of Male Rats & Probable Protective Role of Lipoic Acid. *Indian Journal of Public Health Research and Development*. 2019;10(6):1230. DOI: <https://doi.org/10.5958/0976-5506.2019.01461.X>

22. Fetouh FA, Azab AES. Ameliorating effects of curcumin and propolis against the reproductive toxicity of gentamicin in adult male guinea pigs: Quantitative analysis and

morphological study. *American Journal of Life Sciences*. 2014;2(3):138-149. DOI: <https://doi.org/10.11648/j.ajls.20140203.13>

23. Azza SA, Ola AH, Amal R, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids confer protection against gentamicin-induced testicular injury: Novel insights into possible mechanisms. *Journal of Physiology and Pathophysiology*. 2019;10(2):17-33. DOI: <https://doi.org/10.5897/JPAP2019.0126>

24. Bukhari AS, Illahi M, Haque AU. Protective Effects of Vitamin C and E in Gentamicin induced Testicular Toxicity in Albino Mice. *International Journal of Pathology*. 2019;17(4):144-150.

25. Hamoud AE. Possible role of selenium nano-particles on gentamicin-induced toxicity in rat testis: morphological and morphometric study. *Egyptian Journal of Histology*. 2019;42(4):861-873. DOI: <https://doi.org/10.21608/ejh.2019.9926.1093>

26. Bilska A, Wlodek L. Lipoic acid-the drug of the future. *Pharmacological Reports*. 2005;57(5):570-577.

27. Prathima P, Venkaiah K, Pavani R, et al. α -lipoic acid inhibits oxidative stress in testis and attenuates testicular toxicity in rats exposed to carbimazole during embryonic period. *Toxicology Reports*. 2017;4:373-381. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.06.009>

28. Elsawah H, Mokhimar HM, Kandiel MM, et al. The ameliorative effect of α -lipoic acid on testicular dysfunction induced by gentamicin. *Benha Veterinary Medical Journal*. 2022;42(2):104-108. DOI: <https://doi.org/10.21608/bvmj.2022.139979.1525>

29. Arambašić J, Mihailović M, Uskoković A, et al. Alpha-lipoic acid upregulates antioxidant enzyme gene expression and enzymatic activity in diabetic rat kidneys through an O-GlcNAc-dependent mechanism. *European Journal of Nutrition*. 2013;52(5):1461-1473. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00394-012-0452-z>

30. Jamor P, Ahmadvand H, Ashoory H, et al. Effect of alpha-lipoic acid on antioxidant gene expression and kidney injury in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Nephropathology*. 2019;8(1):6-6. DOI: <https://doi.org/10.15171/jnp.2019.06>

31. Paget GE, Barnes JM. Toxicity tests. Evaluation of drug activities: pharmacometrics: ASPET; 1964.

32. Garrett NE, Malcangio M, Dewhurst M, et al. α -Lipoic acid corrects neuropeptide

deficits in diabetic rats via induction of trophic support. *Neuroscience Letters*. 1997;222(3):191-194. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(97\)13383-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(97)13383-3)

33. Takaoka M, Kobayashi Y, Yuba M, et al. Effects of α -lipoic acid on deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2001;424(2):121-129. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)01120-7](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)01120-7)

34. Upaganlawar A, Gandhi C, Balaraman R. Effect of green tea and vitamin E combination in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2009;64:75-80. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11130-008-0105-9>

35. Gupta K, Hooton TM, Naber KG, et al. International Clinical Practice Guidelines for the Treatment of Acute Uncomplicated Cystitis and Pyelonephritis in Women: A 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Infectious Diseases*. 2011;52(5):e103-e120. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciq257>

36. Gonder JC, Laber K. A renewed look at laboratory rodent housing and management. *ILAR Journal*. 2007;48(1):29-36. DOI: <https://doi.org/10.1093/ilar.48.1.29>

37. Nakatsu N, Igarashi Y, Aoshi T, et al. Isoflurane is a suitable alternative to ether for anesthetizing rats prior to euthanasia for gene expression analysis. *Journal of Toxicological Sciences*. 2017;42(4):491-497. DOI: <https://doi.org/10.2131/jts.42.491>

38. Shaughnessy P. Age dependent differences in testicular inactivation of FSH and in inhibition of FSH binding to rat testis. *Biology of Reproduction*. 1979;20(5):1009-1014. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod20.5.1009>

39. Aebi H. [13] Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 1984;105:121-126. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)

40. Wang Z, Zhao D, Chen L, et al. Glycine increases glyoxalase-1 function by promoting nuclear factor erythroid 2-related factor 2 translocation into the nucleus of kidney cells of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Diabetes Investigation*. 2019;10(5):1189-1198. DOI: <https://doi.org/10.1111/jdi.13032>

41. Bryman A, Cramer D. Quantitative data analysis with SPSS 14, 15 & 16: A guide for social scientists. Routledge/Taylor & Francis Group; 2009.

42. Abdel-Raheem IT, El-Sherbiny GA, Taye A. Green tea ameliorates renal oxidative damage induced by gentamicin in rats. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;23(1):21-28.

43. Ojano-Dirain CP, Antonelli PJ, Le Prell CG. Mitochondria-targeted antioxidant MitoQ reduces gentamicin-induced ototoxicity. *Otology and Neurotology*. 2014;35(3):533-539. DOI: <https://doi.org/10.1097/MAO.0000000000000192>

44. Aly HAA, Hassan MH. Potential testicular toxicity of gentamicin in adult rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018;497(1):362-367. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.085>

45. Akondi RB, Annapurna A. Protective effects of rutin and naringin on gentamycin induced testicular oxidative stress. *European Journal of General Medicine*. 2011;8(1):57-64.

46. Narayana K. An aminoglycoside antibiotic gentamycin induces oxidative stress, reduces antioxidant reserve and impairs spermatogenesis in rats. *Journal of Toxicological Sciences*. 2008;33(1):85-96. DOI: <https://doi.org/10.2131/jts.33.85>

47. Tahira A, Saleem U, Mahmood S, et al. Evaluation of protective and curative role of α -lipoic acid and selenium in gentamicin-induced nephrotoxicity in rabbits. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;25(1):103-110.

48. Kaplan HM, Şingirik E, Erdoğan KE, et al. Protective effect of alpha-linolenic acid on gentamicin-induced ototoxicity in mice. *Somatosensory and Motor Research*. 2017;34(3):145-150. DOI: <https://doi.org/10.1080/08990220.2017.1356283>

49. Bhatti F, Mankhey RW, Asico L, et al. Mechanisms of antioxidant and pro-oxidant effects of α -lipoic acid in the diabetic and nondiabetic kidney. *Kidney International*. 2005;67(4):1371-1380. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00214.x>

50. Ou P, Tritschler HJ, Wolff SP. Thiocctic (lipoic) acid: a therapeutic metal-chelating antioxidant? *Biochemical Pharmacology*. 1995;50(1):123-126. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00116-H](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00116-H)

51. Rochette L, Ghibu S, Richard C, et al. Direct and indirect antioxidant properties of α -lipoic acid and therapeutic potential. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2013;57(1):114-125. DOI: <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200608>

52. Patel Manali B, Deshpande S, Shah G. Evaluation of efficacy of vitamin E and N-acetyl cysteine in gentamicin-induced nephrotoxicity in

rats. *Renal Failure*. 2011;33(3):341-347. DOI: <https://doi.org/10.3109/0886022X.2011.560987>

53. Kadkhodae M, Khastar H, Faghihi M, et al. Effects of co-supplementation of vitamins E and C on gentamicin-induced nephrotoxicity in rat. *Experimental Physiology*. 2005;90(4):571-576. DOI: <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2004.029728>

54. Yamauchi R. Vitamin E: mechanism of its antioxidant activity. *Food Science and Technology International*. 1997;3(4):301-309. DOI: <https://doi.org/10.3136/fsti9596t9798.3.301>

55. Badgujar PC, Chandratre GA, Pawar NN, et al. Fipronil induced oxidative stress involves alterations in SOD 1 and catalase gene expression in male mice liver: Protection by vitamins E and C. *Environmental Toxicology*. 2016;31(9):1147-1158. DOI: <https://doi.org/10.1002/tox.22125>

Received 27 June 2023

Revised 12 August 2023

Accepted 28 August 2023

Information about the authors

Hozaifa K. Elsawah, PharmD, MSc, Researcher at the Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Benha University, Benha, Arab Republic of Egypt, E-mail: hozaifa2005@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2965-9944>.

Haitham M. Mokhimar, MSc, Researcher at the Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Benha University, Benha, Arab Republic of Egypt, E-mail: hittham-mohamed@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8364-0051>.

Mohamed M. Kandiel, PhD, Professor at the Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Benha University, Benha, Arab Republic of Egypt, E-mail: mohamed.kandiel@fvmt.bu.edu.eg, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5112-5768>.

Ayman S. Farid, PhD, Professor at the Department of Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Benha University, Benha, Arab Republic of Egypt, E-mail: ayman.samir@fvmt.bu.edu.eg, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7844-7967>.

AbuBakr M. El-Mahmoudy, PhD, Head of the Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Benha University, Benha, Arab Republic of Egypt, E-mail: a.elmahmoudy@fvmt.bu.edu.eg, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5855-7421>.



DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-2-0-6

In vitro activity of the novel antimicrobial peptide WR-286 in combination with vancomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Ali H. Salama 

Middle East University,

Airport St., Amman, 11831, Jordan

Corresponding author: Ali H. Salama (asalama@meu.edu.jo)

Abstract

Background: Multidrug resistance bacteria are a serious problem for health specialists and all the people in the world. The main reasons for this problem are the misuse of antibiotics and the limited number of antibiotics as compared to different human diseases. The important antibiotic-resistant bacteria include Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Antimicrobial peptides (AMPs) are regarded as promising antimicrobial agents because they satisfy the requirements for the creation of innovative antimicrobial drugs. **The aim of the study:** To design a novel antimicrobial peptide and study its effect against MRSA when we combined it with vancomycin. **Materials and methods:** To produce the hexapeptide WR-286, 1-(2, 6-difluorobenzyl)-1H-1, 2, 3-triazole-4-carboxylic acid, tryptophan (W), and arginine (R) were rationally combined. Different bacterial strains were used to test WR-286's antibacterial properties. Investigations of WR-286's hemolytic activity toward human erythrocytes were also conducted. Finally, utilizing the checkerboard approach and the fractional inhibitory index, synergistic tests with vancomycin were carried out. **Results:** With MIC values as low as 35 μ M, WR-286 demonstrated strong antibacterial activity against MRSA. The toxicity of WR-286 to human red blood cells was very low. Additionally, the peptide and vancomycin's activity were improved by the synergistic experiments. **Conclusion:** According to the current investigation, WR-286 has little hemolytic activity and displays promising antibacterial activity against MRSA. Additionally, when coupled with vancomycin, the peptide has synergistic effect. The novel AMPs described in this work are promising potential candidates for antimicrobial drug development.

Keywords: antimicrobial peptide; WR-286; minimum inhibitory concentration; MRSA; vancomycin; antibiotic resistance

For citation: Salama AH. *In vitro* activity of the novel antimicrobial peptide WR-286 in combination with vancomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Research Results in Biomedicine. 2024;10(2):244-251. DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-2-0-6

Introduction. *Staphylococcus aureus* is a type of bacteria that is commonly found on the skin and in the nose of healthy people. However, it can cause serious medical problems if it enters the body through a cut or

wound [1]. This is called methicillin-resistant *staphylococcus aureus* (MRSA). In 2013, more than 65,000 cases of MRSA were reported in the United States. Many healthcare workers develop MRSA infections on the job [2].

Fortunately, there are steps we can take to lower the risk of transmission to the general public. MRSA is resistant to many common antibiotics, making it difficult to treat. People with MRSA infections are at an increased risk for developing life-threatening conditions such as bloodstream infection, sepsis and cancer [3]. Additionally, MRSA can spread easily among people in hospitals and other healthcare facilities. This is because healthcare workers and other patients who are sicker than average frequently contact things with which they have been infected. Unfortunately, many of these people don't recognize that they have MRSA infections when they return home. This allows the bacteria to spread further and cause more severe health issues among susceptible individuals [4].

Therefore, to overcome this problem and due to the increasing resistance of MRSA, various studies have been conducted, one of which is the combination of vancomycin with antimicrobial peptides (AMPs) [5, 6].

Due to their many benefits, including their broad-spectrum and quick killing mechanism against a wide variety of bacteria, AMPs are regarded as a great alternative to conventional antibiotics. They also show potential against germs that are multi-drug resistant. Furthermore, because of their extensive structural variety and non-specific interactions with bacterial components, they have a low likelihood of causing microbial resistance [7].

Vancomycin is a drug used to treat various infections. It is a member of the teicoplanin family, which includes other antibiotics such as gentamicin and daptomycin [8]. Vancomycin is effective against a variety of bacteria, including those that are resistant to other antibiotics like MRSA. But vancomycin has many side effects like nephrotoxicity and ototoxicity that limit their use [9].

In this study we designed a novel antimicrobial peptide and combined it with vancomycin and evaluated the activity of this combination against MRSA.

Materials and method

Peptide design and synthesis

WR-286 was rationally designed by incorporating alternating subunits of both argi-

nine (R) and tryptophan (W) to create an ultra-short hexapeptide. The peptide was further conjugated with 1-(2, 6-difluorobenzyl)-1H-1, 2, 3-triazole-4-carboxylic acid. WR-286 was synthesized using conventional solid-phase Fmoc chemistry (GL Biochem, Shanghai, China). WR-286 was synthesized following standard Fmoc solid-phase protocols on Wang resin. Peptide elongation was effected using standard HBTU coupling chemistry in dimethylformamide (DMF) solvent with a fourfold molar excess of diisopropyl ethylamine (DIEA) in N-methyl-2-pyrrolidone (NMP) and a threefold molar excess of each Fmoc-protected amino acid or 1-(2, 6-difluorobenzyl)-1H-1, 2, 3-triazole-4-carboxylic acid. WR-286 was cleaved from the resin, using 95% trifluoroacetic acid (TFA), 2.5% triisopropylsilane, and 2.5% thioanisole (3 h, room temperature), and precipitated using cold (-20 °C) diethyl ether. The synthesized peptide's purity was determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). The identification of WR-286 was confirmed by mass analysis and through the employment of electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) [10, 11, 12].

Determination of the Active Peptides by Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) and Minimum Bactericidal Concentrations (MBCs)

The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) criteria were followed to assess the MIC and MBC of the active peptides using sterile 96-well polypropylene microtiter plates. In a nutshell, the MHB was taken out of the stock media of frozen glycerol and used as the growth medium for organisms. Before use, bacterial cells were diluted to 10^6 CFU/ml in the same medium after being cultured overnight in Muller Hinton Broth. As final concentrations, several dilutions with concentrations between 0.5 and 100 μ M were created. Then, 50 μ L of the peptide concentration and 50 μ L of diluted bacterial solution were added into each well of 96-well microtiter plates. At 37 °C, the plate was incubated for 18 hours. Next, using an ELISA plate reader to measure OD at 570 nm to assess the rate of bacterial growth, MIC was calculated (as the lowest concentration of antimicrobial drugs which is needed to

inhibit the growth of the bacteria). Each plate included a positive control column (50 µl of bacterial suspension plus 50 µl MHB without any antimicrobial agents) and a negative control column (100 µl of MHB in each well) to ensure the activity of bacteria and the sterility of MHB respectively and repeated three times [13, 14, 15].

For MBC determination, 10 µl each of clear negative wells and turbid positive control wells were taken, seeded on sterile labeled agar with nutrient medium, and incubated for 24 hours at 37°C.

The lowest concentration that led to having < 0.1% viable cells (killing 99.9 %) was referred to as the MBC value.

MIC Determination of Peptide-Vancomycin Combination

According to the broth microdilution checkerboard technique, MICs of peptide-vancomycin combination against standard bacterial strains of *S. aureus* and MRSA. However, in this assay, each microtiter well contained a mixture of WR-268 peptide and vancomycin in different concentrations. 25 µl of each peptide concentration and 25 µl of vancomycin (from 0.25 to 200 µM) were added to six wells of a sterile flat-bottomed 96 well-plate that contained 50 µl of the diluted bacterial suspension. MICs determination made in triplicate [16, 17, 18].

Determination of Synergism using Fractional Inhibitory Concentration

The fractional inhibitory concentration (FIC) is the summation of the inhibitory concentration values of each component resulted in the antimicrobial combination divided by the inhibitory concentration alone [19-22].

The FIC indices were interpreted as follows:

≤ 0.5: synergistic activity, 0.5-1: additive activity, 1-4 indifferent, >4: antagonistic. Interpretation and assessment of the FIC index and antimicrobial activity of peptides-antibiotics combinations were conducted according to the broth microdilution checkerboard technique

Erythrocyte Hemolytic Assay

Determination of the ability of the designed peptide to cause hemolysis to human

erythrocyte, hemolytic assays was performed. Two ml of human blood was placed into a 50-ml centrifuge tube, centrifuged at 3000 xg for 5 min. The supernatant was discarded and the cell pellet was suspended in 48 ml of PBS and centrifuged at 3000 xg for 5 min; this step was repeated three times. Finally, the cell pellet was re-suspended in a sterile tube containing 50 ml PBS to reach a final concentration of 4% RBC and PBS containing different concentrations of the peptides. Then 1 ml of each concentration was added to 1 ml of erythrocyte suspension [23].

Controls were prepared by the addition of 5 µl of Triton X-100 to 1 ml of RBC suspension (positive control). The blank (negative control) was prepared by adding 1 ml of RBC suspension with PBS. The suspension was incubated for 60 min at 37 °C. Tubes were gently vortexed and 1 ml of each sample was aspirated and placed into sterilized Eppendorf tubes and then centrifuged for 5 min at 3000 xg. From each supernatant 100 µl. Was placed into a well of a 96-well plate. Absorbance was measured at λ= 570 nm with the aid of the Absorbance Microplate Reader. The percentage of hemolysis was calculated according to the following equation [24].

$$\% \text{ Hemolysis} = \frac{(A - A_0)}{(A_X - A_0)} \times 100$$

Where A: is OD 450 with the peptide solution,

A₀: is OD 450 of the blank.

And A_X: is OD 450 of control (0.1% Triton X-100).

Results

The synthesis of WR-286 peptide

As displayed in Fig. 1, the peptide was designed using three subunits of arginine and three units of tryptophan in combination with 1-(2, 6-difluorobenzyl)-1H-1, 2, 3-triazole-4-carboxylic acid. Tryptophan was integrated as hydrophobic moiety, and because of its membrane interface interaction. It exhibits a strong preference when compared to the other hydrophobic amino acids. 1-(2, 6-difluorobenzyl)-1H-1, 2, 3-triazole-4-carboxylic acid was used due its hydrophobicity nature and having some antimicrobial effect.

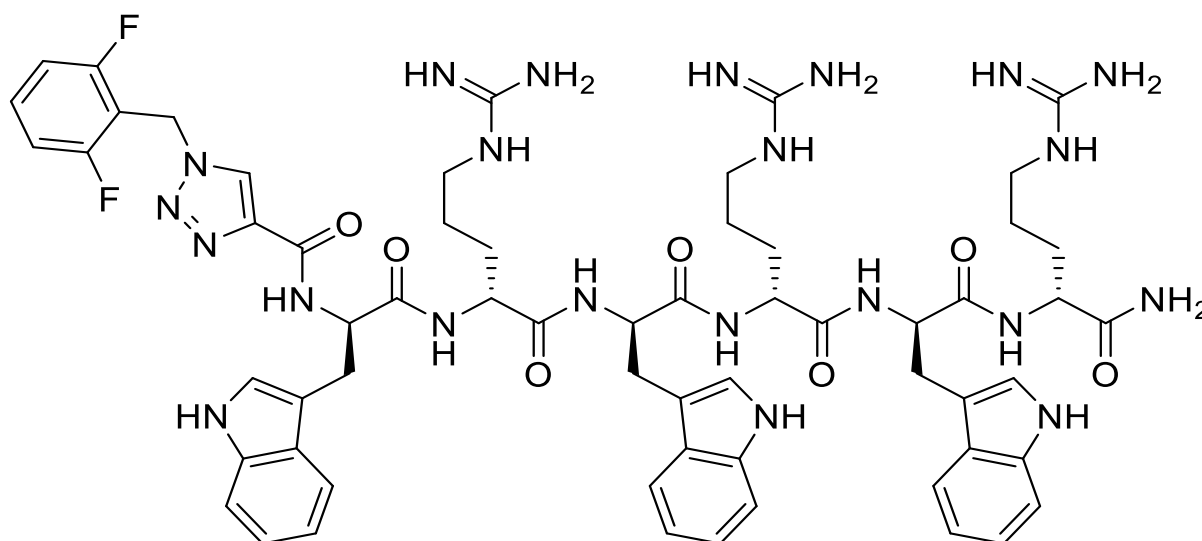


Fig. 1. The structure of WR-286 peptide

Bacterial Susceptibility Assay of the WR-286 peptide and vancomycin

The peptide and vancomycin were tested against control and resistance strain of *S. aureus* (ATCC 29215) and MRSA (ATCC BAA-41). The results showed that the peptide has a good activity against both strains with MIC

value 25 and 35 μM against *S. aureus* (ATCC 29215) and MRSA (ATCC BAA-41) respectively with bactericidal mode of action =. The Vancomycin has MIC value of 0.5 μM against controlled strain and 2 μM against MRSA. The results of MIC and MBC were shown in Table 1.

Table 1

The MIC and MBC value for WR-286 and vancomycin

Antibacterial agent	<i>S. aureus</i> (ATCC 29215) MIC/ MBC (μM)	MRSA (ATCC BAA-41) MIC/ MBC (μM)
WR-286	25/25	35/35
Vancomycin	0.5/0.5	2/2

Study the synergistic effect of the peptide combination with vancomycin

WR-286 and Vancomycin synergistic effects were evaluated utilizing the checkerboard method technique. Table 2 displays the synergy values for WR-286 and Vancomycin as calculated by the FIC index.

Hemolytic activity of WR-286 peptide

Up to a concentration of 100 μL , WR-286 has no hemolytic action against human erythrocytes. The results of hemolytic assay were shown in Table 3.

Table 2

The results of the synergistic effect of the combination of WR-286 and vancomycin

Bacteria strain	Vancomycin MIC (μM)	Vancomycin synergistic MIC (μM)	WR-286 MIC (μM)	WR-286 synergistic MIC (μM)	FIC INDEX	Action
<i>S. aureus</i> (ATCC 29215)	0.5	0.00125	25	5	0.21	Synergistic
MRSA (ATCC BAA-41)	2	0.05	35	8	0.25	Synergistic

Table 3

The hemolytic activity of the WR-286

Concentration (μM)	Hemolysis (%)
0	0
5	0
10	0
20	0
40	0
60	0
80	0
100	0

Discussion. Antibiotic resistance occurs when microorganisms become unaffected by antimicrobial agents. Accordingly, the drug becomes ineffective and infections persist in the body, increasing the risk of spread to others. In 2014, the World Health Organisation (WHO) published a new report on the problem of bacterial resistance, which now exists in all regions of the world and has the potential to affect anyone, no matter who they are [25, 26].

The effective treatment and prevention of an increasing range of infections are seriously threatened by antimicrobial resistance (AMR) caused by bacteria, parasites, viruses, and fungi. Using effective antimicrobial agents increases the success rate of major surgeries and chemotherapy otherwise, they would be compromised [27]. Also, the AMR exerts major negative feedbacks to global public health that needs actions across society and all government sectors. From an economic point of view, patients with resistant infections need a high cost for treatment in comparison with other patients [28]. According to a recent WHO report on the onset of bacterial resistance, the most type of bacteria causing the major types of resistant nosocomial infections is *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* is the strain that develops MRSA by interspecies transfer of the *mecA* gene from an ancestral *Staphylococcus* species to *S. aureus* mediated by a special staphylococcal mobile genetic element [29].

MRSA is a Gram-positive bacterium that causes a wide range of very dangerous human diseases. Nosocomial infections caused by MRSA strains have become a major problem internationally as MRSA, by causing invasive infection, leads to an increase in mortality of up to 20%.

It causes inflammation in many tissues, septicemia, and even life-threatening infections. The risk of MRSA infections comes not only from the emergence of MDR but also from the ability of bacteria to develop strong biofilms structures [30].

MRSA strains are responsible for many critical hospital and community-acquired infections. According to the National Nosocomial Infections Surveillance System, the incidence of MRSA infection is rising and 60% of intensive care unit admissions were accounted for MRSA infection. Treating these infections is more challenging with the traditional antibiotic. MRSA exhibits resistance to a wide range of antibiotics, including second- and third-line drugs. Recently, it has been suggested that a combined synergistic approach will delay or eliminate the development of drug resistance, reduce the doses of individual drugs and hence reduce side effects.

Many studies assessed the outcomes of Host Defense Peptides (HDPs) or new synthesized AMPs and conventional antibiotics in combinations against various multidrug-resistant bacteria (MDRB) [31]. These studies reported synergistic activities or an antibacterial activity improvement using many combinations. As AMPs are considered as membrane targeting agents that distort bacterial cell membranes via pore formation mechanisms and lead to an increase in the permeability of cell membrane, this consequently would lead to an increase of antibiotics entry into the cell to accomplish the damage process more efficiently and rapidly. The WR-286 peptide was synthesised using three units of the amino acid arginine to provide sufficient electrostatic attraction with the negative head groups of the phospholipids of the bacterial cell membrane.

Our results are consistent with previous studies showing that membrane disruption depends on the cationic residue and, therefore, the positive charge should depend on arginine rather than lysine or ornithine, especially if the peptide consists of less than three residues [32].

This phenomenon explains the role of arginine's guanidine moiety that is responsible for increasing the binding of the cationic moiety in AMPs to the membrane surface via forming a complex with the phosphate groups belonging to the membrane phospholipid bilayer. Tryptophan was used to render the peptide hydrophobicity, which plays a significant role in enhancing peptide-membrane interaction compared to other hydrophobic amino acids. It has been reported that a high propensity for membrane insertion happens as a consequence of the specific affinity between the indole group of tryptophan and carbonyl moieties of phospholipids and hence membrane disruption [33].

As shown in our study, the results of the MIC and MBC indicate that our peptide showed a good activity against MRSA with MIC value of 35 μ M with bactericidal mode of action. In addition, WR-286 has no haemolytic activity against erythrocytes, the low haemolytic activity is due to the increase in cationic charge to approximately +3, which helps to minimise haemolytic toxicity against erythrocytes. Accordingly, mass charge plays a major role in creating a sufficient electrostatic attraction and hence targeting the negative head groups of the bacteria cell membrane with very negligible toxic effects toward human erythrocytes. Several studies have reported that combining AMPs with antibiotics will provide enhanced microbiocidal activity for both the peptide and the antibiotic [34]. In this study we compared WR-286 with vancomycin to see the activity of this combination against MRSA. Vancomycin does not work intracellularly but functions by inhibiting cell wall synthesis by binding to the D-Ala-D-Ala terminal of the growing peptide chain during cell wall synthesis, resulting in inhibition of the trans peptidase, which prevents further elongation and cross-linking of the peptidoglycan matrix. It

displayed a synergistic effect against Gram-positive bacteria. This could be explained by the fact that vancomycin acts against the cell wall, facilitating the penetration of peptides to their target sites in the cell membrane, which ultimately leads to rapid cell lysis and a decrease in the effective concentrations required to inhibit bacterial growth exhibited by the peptide and vancomycin [35]. According to the synergistic mode of action exhibited when combining WR-286 with vancomycin, this dramatic decrease in peptide concentrations needed to kill bacteria efficiently while displaying negligible cytotoxic effects could offer a great strategy for AMP development into effective therapeutics with the current challenge faced globally by the lack and discovery of new safe and effective antibiotics [36].

Conclusion. A new conjugated ultra-short antimicrobial peptide with high activities against MRSA and low hemolytic activities is designed, and its antimicrobial characteristics are reported. When paired with vancomycin, the peptide showed synergistic effects, making it a strong option for future antimicrobial research.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Conflict of interests

The author has no conflict of interest to declare.

References

1. Ahmed A, Siman-Tov G, Hall G, et al. Human antimicrobial peptides as therapeutics for viral infections. *Viruses*. 2019;11(8):704. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11080704>
2. Ahn M, Gunasekaran P, Rajasekaran G, et al. Pyrazole derived ultra-short antimicrobial peptidomimetics with potent anti-biofilm activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017;125:551-564. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.09.071>
3. Avci FG, Akbulut BS, Ozkirimli E. Membrane active peptides and their biophysical characterization. *Biomolecules*. 2018;8(3):77. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom8030077>

4. Baeriswyl S, Gan BH, Siriwardena TN, et al. X-ray crystal structures of short antimicrobial peptides as *Pseudomonas aeruginosa* Lectin B complexes. *ACS Chemical Biology*. 2019;14(4):758-766. DOI: <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00047>
5. Bakka TA, Strøm MB, Andersen JH, et al. Methyl propiolate and 3-butyne: Starting points for synthesis of amphiphilic 1, 2, 3-triazole peptidomimetics for antimicrobial evaluation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2017;25(20):5380-5395. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.07.060>
6. Bártová V, Bárta J, Jarošová M. Antifungal and antimicrobial proteins and peptides of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019;103(14):5533-5547. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09887-9>
7. Bassetti M, Canelutti A, Peghin M. Patient specific risk stratification for antimicrobial resistance and possible treatment strategies in gram-negative bacterial infections. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2017;15(1):55-65. DOI: <https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1251840>
8. Bassetti M, Giacobbe DR. A look at the clinical, economic, and societal impact of antimicrobial resistance in 2020. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2020;21(17):2067-2071. DOI: <https://doi.org/10.1080/14656566.2020.1802427>
9. Floch V, Loisel S, Guenin E, et al. Cation substitution in cationic phosphonolipids: a new concept to improve transfection activity and decrease cellular toxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2020;43(24):4617-4628. DOI: <https://doi.org/10.1021/jm000006z>
10. Han X, Zheng J, Lin F, et al. Interactions between surface-immobilized antimicrobial peptides and model bacterial cell membranes. *Langmuir*. 2018;34(1):512-520. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b03411>
11. Haug BE, Camilio KA, Eliassen LT, et al. Discovery of a 9-mer cationic peptide (LTX-315) as a potential first in class oncolytic peptide. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2016;59(7):2918-2927. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b02025>
12. Hazam PK, Goyal R, Ramakrishnan V. Peptide based antimicrobials: design strategies and therapeutic potential. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2019;142:10-22. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2018.08.006>
13. Kang SJ, Park SJ, Mishig-Ochir T, et al. Antimicrobial peptides: therapeutic potentials. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2014;12(12):1477-1486. DOI: <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.976613>
14. Kern AD, Oliveira MA, Coffino P, et al. Structure of mammalian ornithine decarboxylase at 1.6 Å resolution: stereochemical implications of PLP-dependent amino acid decarboxylases. *Structure*. 1999;7(5):567-581. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80073-2](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80073-2)
15. Kiprono GK. Medication Related Problems Among Patients On Antibiotic Therapy In The Medical Wards At Kenyatta National Hospital--University Of Nairobi. University of Nairobi; 2019.
16. Kumar P, Kizhakkedathu JN, Straus SK. Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. *Biomolecules*. 2018;8(1):4. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom8010004>
17. Lau QY, Ng FM, Cheong JWD, et al. Discovery of an ultra-short linear antibacterial tetrapeptide with anti-MRSA activity from a structure-activity relationship study. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015;105:138-144. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.10.015>
18. Lavery G, McLaughlin M, Shaw C, et al. Antimicrobial activity of short, synthetic cationic lipopeptides. *Chemical Biology and Drug Design*. 2010;75(6):563-569. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2010.00973.x>
19. Lee AS, de Lencastre H, Garau J, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Disease Primers*. 2018;4:18033. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>
20. Lewies A, Du Plessis LH, Wentzel JF. Antimicrobial peptides: the Achilles' heel of antibiotic resistance? Probiotics and Antimicrobial Proteins. 2019;11(2):370-381. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9465-0>
21. Li Y, Xiang Q, Zhang Q, et al. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*. 2012;37(2):207-215. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.07.001>
22. Mylonakis E, Podsiadlowski L, Muhammed M, et al. Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*.

- 2016;371(1695):20150290. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0290>
23. Nuti R, Goud NS, Saraswati AP, et al. Antimicrobial peptides: a promising therapeutic strategy in tackling antimicrobial resistance. *Current Medicinal Chemistry*. 2017;24(38):4303-4314. DOI: <https://doi.org/10.2174/0929867324666170815102441>
24. Oddo A, Hansen PR. Hemolytic activity of antimicrobial peptides. In: Hansen PR, editor. *Antimicrobial Peptides*. Springer; 2017. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-6737-7_32
25. Pandey BK, Srivastava S, Singh M, et al. Inducing toxicity by introducing a leucine-zipper-like motif in frog antimicrobial peptide, magainin 2. *Biochemical Journal*. 2011;436(3):609-620. DOI: <https://doi.org/10.1042/BJ20110056>
26. Pasupuleti M, Schmidtchen A, Malmsten M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2012;32(2):143-171. DOI: <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.594423>
27. Patel S, Preuss CV, Bernice F. Vancomycin in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2020.
28. Pletzer D, Hancock REW. Antibiofilm peptides: potential as broad-spectrum agents. *Journal of Bacteriology*. 2016;198(19):2572-2578. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.00017-16>
29. Rajchakit U, Sarojini V. Recent developments in antimicrobial-peptide-conjugated gold nanoparticles. *Bioconjugate Chemistry*. 2017;28(11):2673-2686. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00368>
30. Rodríguez-Bano J, Navarro MD, Romero L, et al. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(3):1089-1094. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.42.3.1089-1094.2004>
31. Rodriguez LMDL, Hemar Y, Cornish J, et al. Structure–mechanical property correlations of hydrogel forming β -sheet peptides. *Chemical Society Reviews*. 2016;45(17):4797-4824. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5CS00941C>
32. Rončević T, Vukičević D, Ilić N, et al. Antibacterial activity affected by the conformational flexibility in glycine–lysine based α -helical antimicrobial peptides. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2018;61(7):2924-2936. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01831>
33. Rosenthal VD, Maki DG, Jamulitrat S, et al. International nosocomial infection control consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008, issued June 2009. *American Journal of Infection Control*. 2010;38(2):95-104.e2. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2009.12.004>
34. Roudi R, Syn NL, Roudbary M. Antimicrobial peptides as biologic and immunotherapeutic agents against cancer: a comprehensive overview. *Frontiers in Immunology*. 2017;8:1320. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01320>
35. Svendsen JSM, Grant TM, Rennison D, et al. Very short and stable lactoferricin-derived antimicrobial peptides: design principles and potential uses. *Accounts of Chemical Research*. 2019;52(3):749-759. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00624>
36. Takemori N, Ooi HK, Imai G, et al. Possible mechanisms of action of clarithromycin and its clinical application as a repurposing drug for treating multiple myeloma. *Ecancermedicalscience*. 2020;14:1088. DOI: <https://doi.org/10.3332/ecancer.2020.1088>

Received 23 January 2023

Revised 20 February 2023

Accepted 15 May 2023

Information about the author

Ali H. Salama, PhD, Deputy Dean for Quality Assurance, Lecturer at the Faculty of Pharmacy, Middle East University, Amman, Jordan, E-mail: asalama@meu.edu.jo, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2141-5857>.



DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-2-0-7

УДК 615.038:616.24-001

Механизмы биологической эффективности ионных форм металлов переменной валентности в респираторной медицине

В.Ю. Мишланов¹ , А.Г. Чучалин² , В.А. Черешнев³ , Е.В. Поляков⁴

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера», ул. Петропавловская, д. 26, г. Пермь, 614990, Российская Федерация

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова», ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997, Российская Федерация

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук, ул. Первомайская, д. 106, г. Екатеринбург, 620078, Российская Федерация

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химии твердого тела Уральского отделения Российской академии наук, ул. Первомайская, д. 91, г. Екатеринбург, 620990, Российская Федерация
Автор для переписки: В.Ю. Мишланов (permmed@hotmail.com)

Резюме

Актуальность: Вопросы разработки новых лекарственных препаратов, содержащих металлы переменной валентности, нуждаются в систематизации наших знаний, проведении экспериментальных и клинических исследований. **Цель исследования:** Изучение механизмов эффективности минерального комплекса, содержащего металлы переменной валентности, в лечении респираторных заболеваний, проведение доклинических испытаний и клинической апробации нового ингаляционного минерального раствора. **Материалы и методы:** Способность ионов церия (III) проявлять восстановительные свойства продемонстрирована путем проведения химических реакций хлорида и сульфата церия (III) с перманганатом калия в присутствии едкого натрия или серной кислоты (соответственно). Доклинические исследования острой токсичности проведены на лабораторных мышах и крысах с соблюдением правил биоэтики в соответствии с общепринятыми этическими нормами обращения с животными, на основе стандартных операционных процедур университета, которые соответствуют правилам, принятым Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей (Страсбург, 1986). Клиническая апробация двух форм минерального комплекса для ингаляций (1. раствор для ингаляций с применением небулайзера – Ренериум; 2. интраназальный спрей) проведена на 6 группах волонтеров с соблюдением прав человека и принципов проведения медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта, декларированных на 18-й Генеральной Ассамблее Всемирной Медицинской Ассоциации (Хельсинки, Финляндия), добровольного информированного согласия, утвержденного локальным этическим комитетом. **Результаты:** Минеральный препарат для ингаляционной терапии больных острыми респираторными заболеваниями не проявляет острой токсичности

в доклинических исследованиях на лабораторных животных. Механизм действия препарата, наиболее вероятно, связан с регуляцией окислительно-восстановительных реакций на уровне мембраны клетки, митохондрий и ядра клетки, что проявляется противовоспалительной и регенераторной активностью в области слизистой оболочки дыхательных путей и альвеолярного аппарата. Обе формы препарата хорошо переносятся. Отмечена выраженная клиническая эффективность препарата Ренериум в форме ингаляций через компрессорный ингалятор в случае курсового 5-и дневного лечения по 5 мл один раз в день. **Заключение:** Экспериментальные и клинические данные продемонстрировали выраженные противовоспалительные и регенераторные свойства нового минерального комплекса на основе церия (III), механизм которых обусловлен регуляцией окислительно-восстановительных реакций.

Ключевые слова: металлы переменной валентности; ионы церия; окислительно-восстановительные реакции; доклинические исследования; клиническая апробация

Благодарности: Авторы благодарят проф., д.фарм.н. Вдовину Галину Петровну за проведение и описание результатов доклинических исследований с участием лабораторных животных, а также ООО «Ренериум» за изготовление препаратов «Ренериум» и «Ренериум А», предоставление необходимых реактивов и лаборатории для выполнения части химических экспериментальных исследований.

Для цитирования: Мишланов ВЮ, Чучалин АГ, Черешнев ВА, и др. Механизмы биологической эффективности ионных форм металлов переменной валентности в респираторной медицине. Научные результаты биомедицинских исследований. 2024;10(2):252-269. DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-2-0-7

Mechanisms of biological effectiveness of ionic forms of metals of variable valence in respiratory medicine

Vitaliy Ju. Mishlanov¹ , Alexander G. Chuchalin² , Valery A. Chereshnev³ ,
Evgeniy V. Polyakov⁴ 

¹ E.A. Vagner Perm State Medical University,
26 Petropavlovskaya St., Perm, 614990, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University,
1 Ostrovityanov St., Moscow, 117997, Russia

³ Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
106 Pervomaiskaya St., Yekaterinburg, 620078, Russia

⁴ Institute of Solid State Chemistry, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
96 Pervomaiskaya St., Yekaterinburg, 620990, Russia

Corresponding author: Vitaliy Ju. Mishlanov (permmed@hotmail.com)

Abstract

Background: The task to develop new drugs containing metals of variable valence requires systematization of our knowledge, experimental and clinical studies. **The aim of the study:** To investigate the mechanisms of the effectiveness of the mineral complex containing metals of variable valence in the treatment of respiratory diseases, to conduct preclinical trials and clinical testing of a new inhalation mineral solution. **Materials and methods:** The ability of cerium (III) ions to exhibit reducing properties was demonstrated by carrying out chemical reactions of cerium (III) chloride and sulfate

with potassium permanganate in the presence of sodium hydroxide or sulfuric acid (respectively). Preclinical studies of acute toxicity were carried out on laboratory mice and rats in accordance with the rules of bioethics and with generally accepted ethical standards for the treatment of animals, based on the standard operating procedures of the university, which comply with the rules adopted by the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for research and other scientific purposes (Strasbourg, 1986). Clinical testing of two forms of the mineral complex for inhalation (1. Inhalation solution for nebulizer – Renerium; 2. intranasal spray) was carried out on 6 groups of volunteers in compliance with human rights and the principles of conducting medical research involving a person as a subject, declared on the 18th General Assembly of the World Medical Association (Helsinki, Finland), voluntary informed consent, approved by the local ethical committee. **Results:** Mineral preparation for inhalation therapy of patients with acute respiratory diseases does not show acute toxicity in preclinical studies on laboratory animals. The mechanism of action of the drug is most likely associated with the regulation of redox reactions at the level of the cell membrane, mitochondria and cell nucleus, which is manifested by anti-inflammatory and regenerative activity in the mucous membrane of the respiratory tract and alveolar apparatus. Both forms of the drug are well tolerated. A pronounced clinical efficacy of the drug Renerium in the form of inhalation through a compressor inhaler was noted in the case of a 5-day course of treatment, 5 ml once a day. **Conclusion:** Experimental and clinical data have demonstrated pronounced anti-inflammatory and regenerative properties of a new mineral complex based on cerium (III), the mechanism of which is due to the regulation of redox reactions.

Keywords: metals of variable valency; cerium ions; redox reactions; preclinical studies; clinical testing

Acknowledgements: The authors would like to thank Professor, Doct. Sci. (Pharmacy) Galina P. Vdovina for conducting and describing the results of preclinical studies involving laboratory animals, as well as Renerium LLC for the manufacture of Renerium and Renerium A preparations, providing the necessary reagents and a laboratory for performing part of the chemical experimental studies.

For citation: Mishlanov VJu, Chuchalin AG, Chereshev VA, et al. Mechanisms of biological effectiveness of ionic forms of metals of variable valence in respiratory medicine. Research Results in Biomedicine. 2024;10(2):252-269. Russian. DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-2-0-7

Введение. Острые респираторные заболевания стабильно лидируют среди причин временной утраты трудоспособности [1]. По данным Роспотребнадзора ежегодно в России регистрируется более 52 млн. случаев острых респираторных заболеваний [2]. Особую актуальность данная проблема приобретает в период эпидемий и пандемии. В 2020 году количество дней временной утраты трудоспособности по причине заболеваний органов дыхания в России составило 123 881 555. Значительный вклад респираторных заболеваний отмечается и в структуре смертности населения, прежде всего, за счет хронической обструктивной болезни легких и пневмонии [3], что указывает на особую значимость разработки методов эффективной терапии. Повреждение эпителия различных уровней дыхательных

путей имеет большое значение в развитии симптомов заболевания и нарушения вентилиционной функции, но общие вопросы этой проблемы остаются недостаточно изученными, рассматриваются в основном с позиции воспаления или врожденной цилиарной дисфункции [4, 5, 6]. Рекомендации в отношении повреждения эпителиальных структур состоят в регуляции реологических свойств мокроты и применении ингаляционных либо системных глюкокортикоидов [7, 8]. Препараты, обладающие антиоксидантными свойствами, нашли применение только при интерстициальных заболеваниях легких, в области решения проблем пересадки легких, но не имеют четких рекомендаций для лечения повреждения эпителия дыхательных путей в случае ин-

фекционной патологии и многих других состояниях [9, 10, 11]. Недостаточно изучены остаются вопросы регуляции функций мембраны эпителиальных клеток, митохондриальной дисфункции, пролиферативной активности, включая скорость регенерации при вирусных и других острых респираторных заболеваниях [12]. Для решения ряда перечисленных проблем предложены минеральные комплексы, в том числе, содержащие металлы переменной валентности, способные оказывать влияние на содержание продуктов перекисидации и накопление АТФ в клетках. В отдельных клинических наблюдениях получены впечатляющие результаты редуцирования симптомов острого респираторного заболевания при ингаляционном применении препарата Ренериум, содержащего ионы церия, марганца, цинка и серебра. Механизм действия указанного комплекса недостаточно обсуждался в научной литературе, и требует дальнейшего изучения.

Цель исследования. Изучение механизмов эффективности минерального комплекса, содержащего металлы переменной валентности, в лечении респираторных заболеваний, проведении доклинических испытаний и клинической апробации нового ингаляционного минерального раствора.

Материал и методы исследования

Лабораторные методы изучения химических реакций

Исследовали окисление хлорида церия (III) и сульфата церия (III). В качестве окислителя использовали раствор KMnO_4 (1 мг/100 мл). Исследования выполнены на базе ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера (кафедра пропедевтики внутренних болезней №1) и ООО «Ренериум». Реакцию проводили путем смешивания растворов при комнатной температуре.

Раствор хлорида церия (III) готовили путем растворения химически чистого CeCl_3 семиводного, производство ООО "Химкрафт", в дистиллированной воде или в 0,9% растворе хлорида натрия, готовили концентрацию 1 мг/л.

Раствор сульфата церия (III) готовили путем растворения химически чистого

$\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3$ восьмиводного, производство ООО "Химкрафт", в дистиллированной воде или в 0,9% растворе хлорида натрия, готовили концентрацию 1 мг/л.

Дополнительно использовали растворы 1Н NaOH и 1Н H_2SO_4 производства ООО «АО РЕАХИМ».

Исследования с участием лабораторных животных выполнены на базе вивария ЦНИЛ ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России. Изучение острой токсичности выполнено на лабораторных белых мышах и белых крысах обоих полов. Общее количество животных составило 18 мышей и 18 крыс.

Использовали модель острого бронхита, сформированную у крыс путем ингаляции 1% раствора формалина [13]. В исследовании приняли участие 18 животных обоих полов. Камера для ингаляций представляла собой эксикатор, объемом 5 литров, имеющий трубки для поступающего воздуха и отведения воздуха из камеры. К трубке поступающей воздушной смеси подключали небулайзерный компрессорный ингалятор с испытуемым раствором. Ингаляцию проводили в течение 20 минут, используя 5 мл раствора исследуемого или контрольного раствора. Животные были разделены на две равные по количеству группы случайным образом. Контрольная группа получала только однократную ингаляцию 1% раствора формалина. Группа наблюдения после ингаляции 1% раствора формалина получала ежедневные ингаляции исследуемого раствора, содержащего ионы церия (0,35-0,50 мкг/л), марганца (10-20 мкг/л), цинка (5-7 мкг/л) и серебра (0,15-0,20 мкг/л) в 0,9% растворе NaCl. Лечебные ингаляции начинались в день формирования модели острого бронхита и выполнялись 1 раз в день на протяжении 5 дней. На 6-й день эксперимента животных взвешивали, проводили другие контрольные исследования и подвергали эвтаназии путем их помещения в камеру, содержащую пары этилового эфира для наркоза.

Исследования на здоровых и больных проводились на основании полученного по-

ложительного решения Этического комитета ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России на проведение клинических испытаний нового лекарственного препарата (Протокол № 12 от 23.12.2021 г.). Исследования зарегистрировано в Министерстве здравоохранения Российской Федерации № 123062200020-2, выполнялись на базе ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России и ГАУЗ ПК ГКБ №4 г. Перми.

План клинической апробации включал: 1) определение безопасности препарата на здоровых волонтерах (48 человек); 2) клиническую апробацию эффективности в форме сравнительного исследования с включением 101 пациента с острыми вирусными респираторными заболеваниями, внебольничной пневмонией, бронхиальной астмой, хронической обструктивной болезнью легких и хроническим деформирующим бронхитом с единичными цилиндрическими бронхоэктазами. Условием проведения клинической апробации было подписанное информированное согласие.

Клиническую апробацию выполняли на добровольцах в следующих клинических группах:

1. Группа практически здоровых лиц в возрасте 19-61 лет, м 5, ж 16, получавших интраназальный спрей Ренериум А по 1 дозе 2 раза в день на протяжении 5 дней.

2. Группа практически здоровых лиц в возрасте 19-61 лет, м 11, ж 16, получавших ингаляции препарата Ренериум через компрессорный небулайзерный ингалятор в объеме 5 мл на 1 ингаляцию 1 раз в день на протяжении 5 дней.

3. Группа больных ОРВИ без идентификации возбудителя в форме ринита, фарингита, бронхита в возрасте 22-64 лет, м – 12, ж – 21, получавших интраназальный спрей Ренериум А по 1 дозе 2 раза в день на протяжении 5 дней.

4. Группа больных ОРВИ без идентификации возбудителя в форме ринита, фарингита, бронхита в возрасте 21-67 лет, м – 9, ж – 11, получавших симптоматическое лечение назальными деконгестантами,

а также интраназальный спрей 0,9% раствора хлорида натрия (контрольная группа).

5. Группа больных, перенесших коронавирусную инфекцию в форме пневмонии с формированием постковидного синдрома при наличии умеренно выраженной гипоксической дыхательной недостаточности (SpO_2 88-95%) и нарушении толерантности к физической нагрузке. Возраст 23-59 лет, м – 9, ж – 12. Больные получали ингаляции препарата Ренериум через компрессорный небулайзерный ингалятор в объеме 5 мл на 1 ингаляцию 1 раз в день на протяжении 5 дней на фоне стандартной терапии.

6. Группа больных, перенесших коронавирусную инфекцию в форме пневмонии с формированием постковидного синдрома при наличии умеренно выраженной гипоксической дыхательной недостаточности (SpO_2 88-95%) и нарушении толерантности к физической нагрузке. Возраст 19-63 лет, м – 11, ж – 16. Больные получали стандартную терапию ингаляционными глюкокортикоидами в комбинации с бета2-агонистами в средних терапевтических дозах, а также ингаляции 0,9% раствора хлорида натрия по 5 мл через компрессорный небулайзерный ингалятор 1 раз в день на протяжении не менее 5 дней (контрольная группа).

Применяли сравнительный, параллельный, рандомизированный, ослепленный дизайн клинического исследования.

Группа практически здоровых лиц, получавших ингаляционный препарат Ренериум, была представлена студентами ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России, а также взрослыми здоровыми волонтерами 2-го зрелого возраста различных профессий. Всего обследовано 48 человек, из них 16 мужчин и 32 женщины в возрасте 19-61 лет. Все участники исследования подписали информированное согласие.

Критерии включения соответствовали наличию заболевания и подписанию добровольного информированного согласия на участие в исследовании, обозначенного для

группы исследования. Критерии исключения: тяжелое течение острого респираторного заболевания, наличие острой дыхательной недостаточности, лихорадка выше 37,1 °С, клинические симптомы сердечной, почечной, печеночной недостаточности, синдромы цитолиза и холестаза, кахексии, психических или поведенческих нарушений, алкогольной или наркотической зависимости, нарушений сердечного ритма, хроническая болезнь почек, сахарный диабет, заболевания центральной нервной системы, эндокринных желез, иммунодефицитные состояния, когнитивные нарушения, наличие другой клинически значимой соматической патологии или мотивированный отказ от участия в исследовании, а также детский или старческий возраст.

Оценивали выраженность одышки по шкале Борга, интенсивность кашля по визуально-аналоговой шкале, толерантность к физической нагрузке на основании визуально-аналоговой шкалы, принимая за

10 баллов – способность переносить чрезмерные физические нагрузки, 0 – неспособность одеться и выйти из дома.

Оценка динамики симптомов проводилась на основе шкал Ликерта (Табл. 1, 2). Все больные, перенесшие коронавирусную инфекцию, обследованы в условиях стационара пульмонологического отделения ГАУЗ ПК ГКБ № 4 согласно Временным клиническим рекомендациям: профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (Covid-19). Версия 15 (22.02.2022) и Временным методическим рекомендациям: Медицинская реабилитация при новой коронавирусной инфекции (Covid-19). Версия 2 (31.07.2020). [14, 15].

Дополнительно 10 пациентов основной группы и 11 из группы сравнения (группа 6, получавших ингаляции 0,9% раствора хлорида натрия) использовали smart-часы Amazfit U Bip Pro с функциями оценки сатурации кислорода, ЧСС, дистанции пройденного пути, количества шагов, продолжительности и фазы ночного сна.

Таблица 1

Шкала оценки эффективности препарата Ренериум – спрей для носа

Table 1

Evaluation scale for the effectiveness of the drug Renerium – nasal spray

№ п/п	Симптомы	Оценка										
		-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5
1	Уменьшение насморка											
2	Уменьшение заложенности носа											
3	Уменьшение зуда в носу											
4	Уменьшение чихания											
5	Нос стал дышать свободно											
6	Появились необычные ощущения в носу											
7	Боль в горле стала меньше											
8	Исчезли затруднения при глотании											
9	Появились неприятные ощущения в горле											
10	Исчезла потребность в применении других препаратов для лечения носа, глотки и/или гортани											

Примечание: Описание ответа: -5 – Совершенно не верно; -4 – Не верно; -3 – Не верно; -2 – Не верно; -1 – Кажется, не верно; 0 – не изменилось; 1 – Кажется, что верно; 2 – Верно; 3 – Верно; 4 – Верно; 5 – Совершенно верно.

Note: Description of answer: -5 – Completely incorrect; -4 – Incorrect; -3 – Incorrect; -2 – Incorrect; -1 – Doesn't seem right; 0 – has not changed; 1 – Seems to be true; 2 – True; 3 – True; 4 – True; 5 – Absolutely true.

Таблица 2

**Шкала оценки динамики симптомов респираторного заболевания
под влиянием ингаляционного препарата Ренериум**

Table 2

**Scale for assessing the dynamics of symptoms of a respiratory disease under the influence
of the inhalation drug Renerium**

Оценка эффективности препарата Ренериум (небулайзер)

ФИО пациента _____ История болезни № _____

Даты лечения: с _____ по _____

Отвечая на вопросы анкеты, укажите, насколько вы согласны (положительная шкала) или не согласны (отрицательная шкала) с утверждением. Если выраженность симптома не изменилась укажите «0», если симптом отсутствовал, пропустите вопрос.

№ п/п	Симптомы	Оценка										
		-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5
	Применение препарата сопровождалось:											
1	Уменьшение одышки											
2	Уменьшение кашля											
3	Уменьшение отделяемой мокроты											
4	Уменьшение чувства заложенности в груди											
5	Уменьшение чувства сдавления в груди											
6	Уменьшение хрипов в груди											
7	Уменьшение приступов одышки											
8	Увеличение вашей физической активности											
9	Уменьшение насморка											
10	Уменьшение чувства заложенности носа											
11	Уменьшение зуда в носу или в носоглотке											
12	Нос стал дышать свободно											
13	Появились необычные ощущения в носу											
14	Боль в горле стала меньше											
15	Исчезли затруднения при глотании											
16	Появились неприятные ощущения в горле											
17	Исчезла потребность в применении других препаратов для лечения носа, глотки и/или гортани											
18	Снизилась или нормализовалась температура тела											

Примечание: Описание ответа: -5 – Совершенно не верно; -4 – Не верно; -3 – Не верно; -2 – Не верно; -1 – Кажется, не верно; 0 – не изменилось; 1 – Кажется, что верно; 2 – Верно; 3 – Верно; 4 – Верно; 5 – Совершенно верно.

Note: Description of answer: -5 – Completely incorrect; -4 – Incorrect; -3 – Incorrect; -2 – Incorrect; -1 – Doesn't seem right; 0 – has not changed; 1 – Seems to be true; 2 – True; 3 – True; 4 – True; 5 – Absolutely true.

Исследуемые минеральные комплексы

Препарат Ренериум изготовлен ООО «Ренериум» в гепариновых флаконах по 5 мл прозрачной бесцветной жидкости, содержит раствор ионов церия (0,35-0,50 мкг/л), марганца (10-20 мкг/л), цинка (5-7 мкг/л) и серебра (0,15-0,20 мкг/л) в 0,9% растворе NaCl. Раствор стерильный, предназначен для ингаляций по 5 мл 1 раз в день. Курс лечения состоит из 5 ингаляций.

Интраназальный спрей (средство гигиены для ухода за полостью носа) имеет

состав, близкий к ингаляционной форме с добавлением гидрокарбоната натрия (пищевой соды), сульфата магния (20-30 мкг/л), минимального количества эфирных масел можжевельника и отличается меньшим содержанием хлорида натрия. Жидкость бесцветная, прозрачная с легким запахом можжевельника, выпускается во флаконах-спрей по 10,0 мл или в пластиковых флаконах с капельницей по 10, 25 и 50 мл.

Препарат применялся в форме спрея в каждую половину носа не менее 2 раз в

день (пациент мог самостоятельно регулировать количество раз применения препарата в зависимости от выраженности симптомов острого заболевания верхних дыхательных путей). Максимальная доза составила 5 мл препарата в сутки.

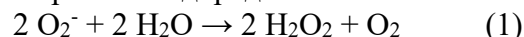
Для изучения роли каждого компонента препарата и их взаимодействия были изготовлены опытные партии моно- и двухкомпонентных препаратов, которые приготовлены в виде прозрачных бесцветных растворов по 10 мл во флаконах назального спрея. Клинические наблюдения выполнены на участниках научного коллектива, имеющих клинические симптомы нетяжелого острого респираторного вирусного заболевания с поражением верхних дыхательных путей без идентификации вируса на основании их добровольного согласия. Препарат вводили в обе половины полости носа по 1-2 дозы в каждый носовой ход многократно на протяжении суток так, чтобы суточная доза приближалась к 10 мл препарата.

Использовали раствор, содержащий CeCl_3 (доза ионов Ce^{3+} 0,5 мкг/л), назальный спрей; ZnSO_4 (доза ионов Zn^{2+} 5 мкг/л, назальный спрей), а также комбинированный препарата, содержащий раствор CeCl_3 и ZnSO_4 в указанных дозировках.

Статистическая обработка результатов клинической апробации проводилась с применением программного пакета Statistica 10.0. Частота выявления и динамики симптомов оценивалась относительной величиной в % к общему числу пациентов в группе. При обработке шкал Ликерта использовали подсчет среднеарифметического значения баллов. Сравнительный анализ проводили с использованием критерия Манна-Уитни.

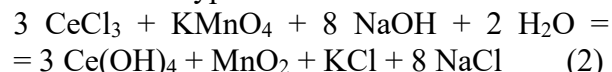
Результаты. Лабораторные методы изучения химических реакций выполнены с целью определения характера взаимодействий микроэлементов переменной валентности в системе. Известно, что увеличение степени валентности элемента называется окислением, а снижение – восстановлением, что соответствует понятию окислительно-восстановительных реакций двух и

более химических элементов, один из которых является окислителем, а другой восстановителем. В условиях воспалительной реакции и патологии слизистой оболочки респираторного тракта возникают реакции перекисного окисления, где одним из основных окислителей является супероксидный радикал O_2^- . При взаимодействии с водой супероксидный радикал способен образовать перекись водорода:

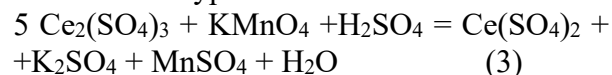


В реакции перекисного окисления принимают участие и другие окислители, активность которых объясняется наличием неспаренного электрона на внешнем электронном уровне электронной оболочки атома кислорода: гидроксильный радикал ($\text{HO}^\bullet$); гидроксид-ион (HO^-); триплетный кислород ($\text{O}_2^{2\bullet}$); пероксид-ион (O_2^{2-}) и оксид азота ($\text{NO}^\bullet$).

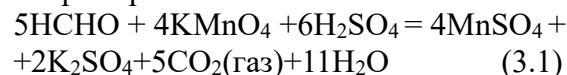
100 мл раствора KMnO_4 в качестве окислителя смешивали с исследуемыми растворами в стеклянном стакане. Установлено, что при смешивании растворов KMnO_4 с CeCl_3 , в присутствии 1Н NaOH , наблюдается химическая реакция, сопровождаемая изменением розового цвета раствора перманганата калия на бурый с выпадением осадка коричневого цвета. Реакция описывается уравнением:



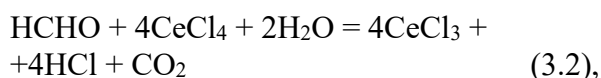
При смешивании растворов KMnO_4 с $\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3$, в присутствии 1Н H_2SO_4 , прозрачный малиновый раствор перманганата калия заметно светлеет, сохраняя розовый оттенок без выпадения осадка. Реакция описывается уравнением:



Одновременно с этим в присутствии раствора формалина (HCHO) в качестве субстрата, протекает реакция окислителей с молекулами формалина в кислой среде, например:



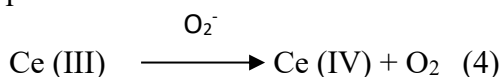
Ионы Ce^{4+} также способны окислять молекулы формалина:



и в нейтральной среде эта реакция сопровождается подкислением раствора (HCl).

Описанные реакции делают возможным прямое окисление формалина или другого субстрата на внешней поверхности клеточной мембраны. При этом следует учитывать, что для полного окисления продуктов интоксикации необходимо предположить механизм постоянного восстановления окислителя. Такой механизм возможен, например, при реализации колебательной реакции окисления Ce (III).

Представленные результаты подтверждают возможность окисления соли церия (III) с образованием гидроксида церия (IV), образующего осадок (вместе с осадком MnO_2). Во втором случае окисления соли церия (III) до сульфата церия (IV) сопровождалось изменением цвета раствора. В биологических объектах, на поверхности воспаленной слизистой оболочки бронхов и поврежденного эпителия с участием супероксид-аниона, а также других окислителей реакция приобретает вид, описываемый уравнением:



Изменение валентности ионов церия (III) на (IV) подтверждает восстановительные (антиокислительные) свойства ионов церия (III), и указывает на возможность клинического применения минеральных комплексов, содержащих ионы церия (III) в лечении воспалительных заболеваний респираторного тракта с поражением эпителиальных клеток.

Исследование острой токсичности с участием лабораторных животных на протяжении 14 дней не выявили, каких-либо изменений со стороны органов дыхания, так и со стороны внутренних органов мышей и крыс, включенных в эксперименты при превышении терапевтической дозы минерального комплекса Ренериум в 20 раз.

Результаты оценки эффективности терапевтической дозы препарата Ренериум в модели острого бронхита у крыс, вызванного ингаляцией 1% раствора формалина, показали активную регенерацию эпителия, уменьшение инфильтрации стенки бронхов и бронхиол, восстановление структуры базальной мембраны. (6-й день после начала терапии) по сравнению с группой животных с острым бронхитом, не получавших лечение (Рис. 1, 2).

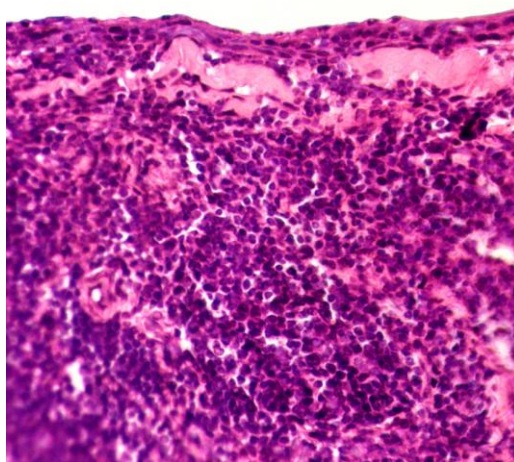


Рис. 1. Структура стенки среднего калибра бронха после ингаляции 1% раствора формалина. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение x 400 раз.

Fig. 1. Structure of the wall of a medium-caliber bronchus after inhalation of a 1% formaldehyde solution. Hematoxylin-eosin staining. Magnification x 400 times.

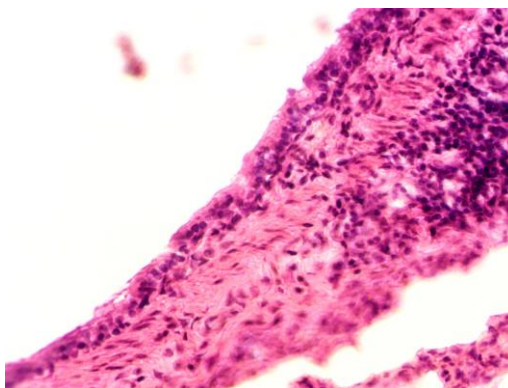


Рис. 2. Структура стенки среднего калибра бронха после ингаляции Препарата Ренериум.
Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение x 400 раз.

Fig. 2. Structure of the wall of the medium-caliber bronchus after inhalation of the drug Renerium.
Hematoxylin-eosin staining. Magnification x 400 times.

Клиническая апробация

Группа 1 (практически здоровые лица). На момент обследования пациенты отрицали наличие острого респираторного заболевания, а также хронических болезней. Тем не менее, при интерактивном опросе у части обследованных выявлены единичные респираторные симптомы в виде кашля, а также легкие ограничения физической активности (среди лиц второго зрелого возраста). В процессе терапии препаратом интраназальный спрей Ренериум А статистически значимых изменений симптомов не установлено. В контрольной группе практически здоровых лиц, из

21 человека, только в 2-х случаях было отмечено появление небольших светлых выделений из носа на фоне применения препарата.

Группа 2 (практически здоровые лица). В процессе ингаляционной терапии статистически значимых изменений симптомов не установлено, но в одном случае отмечено появление слабоинтенсивного кашля с небольшим количеством мокроты белого цвета (не более 5 мл в сутки).

Результаты оценки респираторных симптомов в группе практически здоровых лиц под влиянием ингаляционного препарата Ренериум представлены в таблице 3.

Таблица 3

Динамика показателей в процессе реабилитационной программы. Здоровые (n=27)

Table 3

Dynamics of indicators in the course of the rehabilitation program. Healthy (n=27)

Шкалы оценки	До лечения	После лечения
Шкала Борга	0,0±0,00	0,0±0,00
ВАШ оценки кашля	0,0±0,31	0,2±0,49
ВАШ оценки толерантности к физической нагрузке	9,3±0,64	9,2±0,65

Примечание: * – достоверные различия в группе.

Note: * – significant differences in the group.

Группа 3 (пациенты с острым респираторным заболеванием, получавшие интраназальный спрей Ренериум А). Оценка

динамики симптомов заболевания в форме ответов на вопросы шкалы Ликерта представлены в таблицах 4, 4а.

Таблица 4

Оценка эффективности препарата Ренериум – спрей для носа

Table 4

Evaluation of the effectiveness of the drug Renerium – nasal spray

Номер вопроса	М	δ	Me	10%	90%
1	2,3	1,35	2,0	0	4
2	2,5	1,74	3,0	0	5
3	0,6	0,94	0,0	0	2
4	0,9	2,33	0,0	0	5
5	1,5	1,73	0,0	0	5
7	0,0	2,04	0,0	-5	5
8	0,0	0,0	0,0	0	0
10	1,9	2,10	1,0	0	5

Таблица 4а

Оценка нежелательного действия препарата Ренериум – спрей для носа

Table 4a

Evaluation of adverse effects of the drug Renerium – nasal spray

Номер вопроса	М	δ	Me	10%	90%
6	-1,7	2,44	0,0	-5	0
9	-1,8	2,49	0,0	-5	0

Результаты соответствовали утверждениям об уменьшении заложенности носа, насморка, уменьшении количества применяемых лекарственных препаратов для облегчения носового дыхания и ощущению свободы носового дыхания. При этом у большинства пациентов не возникало необычных ощущений в носу или в горле, а имеющиеся указанные побочные действия у 1 человека носили слабовыраженный характер (2 балла по 5-бальной шкале). Большинство пациентов пожелали повторно применить Ренериум А – спрей средство

гигиены для ухода за полостью носа и рта, если вновь возникнут проявления острого респираторного заболевания. Вместе с тем, эффективность препарата была умеренной у большинства больных и только 4 пациента дали 5-бальные оценки эффективности из 5 возможных баллов (20% пациентов).

Группа 4 (группа контроля – пациенты с острым респираторным заболеванием, получавшие традиционную терапию). Результаты клинической эффективности представлены в таблицах 5 и 5а.

Таблица 5

Оценка динамики симптомов в контрольной группе

Table 5

Assessment of the dynamics of symptoms in the control group

Номер вопроса	М	δ	Me	10%	90%
1	0,6	1,23	0,1	0	2
2	0,5	1,11	0,0	0	1
3	0,3	1,55	0,0	0	2
4	0,3	1,13	0,0	0	2
5	0,5	1,96	0,0	0	5
7	0,2	0,98	0,0	-5	2
8	0,0	0,2	0,0	-4	1
10	0,1	0,57	1,0	0	2

Таблица 5a

Оценка нежелательных эффектов в контрольной группе

Table 5a

Evaluation of adverse effects in the control group

Номер вопроса	М	δ	Me	10%	90%
6	-1,1	2,54	-0,1	-4	1
9	-1,2	2,33	0,0	-4	0

Результаты эффективности лечения в контрольной группе были сомнительными.

Группа 5. Основная группа больных имела проявления новой коронавирусной инфекции Covid-19 в форме пневмонии с визуальной оценкой КТ-картины грудной клетки 1-3 степени распространенности поражения в период максимальной выраженности симптомов заболевания. Имели место симптомы «матового стекла», а также единичные фокусы консолидации легочной ткани у отдельных пациентов. В период обследования больные находились на этапе

реабилитации, имели нормальную температуру тела, дыхательную недостаточность, проявляющуюся различной степенью снижения сатурации кислорода в тканях при выполнении физической нагрузки в виде ходьбы по коридору, по лестнице. Клинические симптомы поражения верхних дыхательных путей на момент проведения реабилитационной программы были не выражены и наблюдались у отдельных больных. Динамика симптомов заболевания представлена в таблице 6.

Таблица 6

Динамика показателей в процессе реабилитационной программы больных острыми респираторными вирусными заболеваниями

Table 6

Dynamics of indicators in the course of the rehabilitation program for patients with acute respiratory viral diseases

Шкалы оценки	Больные, перенесшие острые вирусные респираторные инфекции, включая больных после Covid-19. (Основная группа, n=21)		Больные, перенесшие острые вирусные респираторные инфекции, включая больных после Covid-19. (Группа сравнения, n=21)	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Шкала Борга	7,4±1,88	4,3±1,49*	6,9±1,44	6,4±0,78
ВАШ оценки кашля	6,2±1,14	2,4±0,11*	5,4±1,59	5,0±1,19
ВАШ оценки толерантности к физической нагрузке	3,3±1,43	7,5±1,69*	4,3±1,62	5,5±1,98*
SpO ₂	90,2±1,12	93,9±1,24*	91,2±0,98	92,1±1,74

Примечание: * – достоверные различия в группе.

Note: * – significant differences in the group.

Новый ионный ингаляционный препарат уменьшал выраженность одышки и кашля, восстанавливал толерантность к физической нагрузке. Отмечены случаи прекращения кровохарканья у больных новой коронавирусной инфекцией Covid-19.

Динамика дополнительных параметров здоровья больных, полученных методом удаленного мониторинга с использованием смарт-часов Amazfit U Bip Pro, представлена в таблице 7.

Таблица 7

Динамика объективных показателей удаленного мониторинга

Table 7

Dynamics of objective indicators of remote monitoring

Параметры наблюдения	Основная группа (n=10)		Группа сравнения (n=11)	
	До лечения	После	До лечения	После
частота пульса (в мин.)	102,9±10,4	81,4±7,5*	105,2±11,1	94,0±10,9
максимальная частота пульса за 24 часа (в мин.)	132,7±18,3	97,7±5,9*	131,8±14,5	111,8±10,8
SpO ₂ (%)	92,1±1,0	95,6±1,3*	91,8±1,6	93,9±1,7
продолжительность ночного сна (часы)	4,2±1,3	6,8±1,5*	3,8±2,2	4,5±2,7
количество пройденных шагов за 24 часа (шаги)	387,8±138,5	701,8±119,1*	370,1±197,4	528,7±143,5*

Примечание: * – p<0,05 между основной и контрольной группами.

Note: * – p<0.05 between the main and control groups.

Представленные результаты объективного удаленного мониторинга демонстрируют существенное улучшение параметров здоровья у больных острыми респираторными заболеваниями, получавших препарат Ренериум в ингаляциях на этапе реабилитации.

Динамика рентгенологической картины органов грудной клетки по данным компьютерной томографии прослежена у 16 больных. Отмечается уменьшение объема поражения легочной ткани за счет теней по типу «матового стекла» и ретикулярных изменений. В случаях преобладания

интерстициального фиброза, очагов консолидации существенной положительной динамики не выявлено. Наиболее выраженные положительные результаты лечения наблюдались у больных, имевших поражение легочной ткани 1-2 степени по данным КТ-исследования, при неубедительных результатах лечения больных, имевших 3 степень распространенности поражения легких после Covid-19.

Результаты применения шкалы Ликерта в группе больных, получавших ингаляции препарата Ренериум, представлены в таблицах 8 и 8а.

Таблица 8

Оценка эффективности ингаляционного препарата Ренериум

Table 8

Evaluation of the effectiveness of the inhalation drug Renerium

Номер вопроса	М	δ	Ме	10%	90%
1	3,9	1,35	2,0	2	5
2	3,6	1,31	2,0	2	4
3	4,5	1,12	2,0	0	5
4	4,9	0,28	5,0	4	5
5	1,5	1,73	0,0	0	5
6	2,4	2,58	2,0	1	5
7	2,1	2,32	2,0	1	5
8	4,7	0,39	4,0	3	5
9	2,9	1,33	2,0	1	4
10	3,1	2,41	3,0	1	5
11	0,5	0,98	0,0	0	3
12	2,5	1,27	2,0	1	5
14	0,1	2,87	0,0	0	5
15	0,2	2,54	0,0	0	5
17	4,2	2,22	4,0	0	5
18	4,7	0,79	5,0	4	5

Таблица 8а

Оценка нежелательного действия ингаляционного препарата

Table 8a

Evaluation of the undesirable effect of an inhalation drug

Номер вопроса	М	δ	Me	10%	90%
13	-2,9	2,12	-1,0	-5	0
6	-4,1	2,44	-2,0	-5	0

Результаты субъективной оценки эффективности и безопасности ингаляционного препарата Ренериум у больных острыми респираторными вирусными заболеваниями, внебольничной пневмонией, бронхиальной астмой, ХОБЛ и хроническим деформирующим бронхитом показали хорошую переносимость и отсутствие серьезных нежелательных действий, выявлены единичные случаи (3) неприятных ощущений в носоглотке. Клиническая эффективность характеризовалась: уменьшением чувства заложенности в груди, увеличение физической активности, уменьшением объема отделяемой мокроты, снижением интенсивности кашля и одышки, потребности в применении других препаратов для уменьшения симптомов респираторного заболевания, другими положительными сдвигами клинической картины заболевания.

Группа 6. Результаты лечения больных контрольной группы продемонстрировали низкую эффективность 5-и дневного курса ингаляционных глюкокортикоидов в сочетании с ингаляциями 0,9% раствора хлорида натрия при острых воспалительных заболеваниях органов дыхания.

Эффективность и безопасность отдельных компонентов препарата Ренериум

Препарат Ренериум имеет природное происхождение. Основными компонентами, определяющими эффективность препарата, являются ионы Ce^{3+} , Zn^{2+} , Mn^{7+} и Ag^+ . Для изучения роли каждого компонента препарата и их взаимодействия были изготовлены опытные партии моно- и двухкомпонентных препаратов, которые приготовлены в виде прозрачных бесцветных растворов по 10 мл во флаконах назального спрея. Клинические наблюдения выполнены на участниках научного коллектива,

имеющих клинические симптомы нетяжелого острого респираторного вирусного заболевания с поражением верхних дыхательных путей без идентификации вируса, на основании их добровольного согласия. Препарат вводили в обе половины полости носа по 1-2 дозы в каждый носовой ход многократно на протяжении суток так, чтобы суточная доза приближалась к 10 мл препарата.

Результаты применения моносолевых препаратов в форме назального спрея (препарат CeCl_3 (доза ионов Ce^{3+} 0,5 мкг/л), назальный спрей; ZnSO_4 (доза ионов Zn^{2+} 5 мкг/л, назальный спрей), а также комбинированного препарата, содержащего CeCl_3 и ZnSO_4 , наглядно показали, что клинический эффект пропорционален количеству компонентов солевого раствора, слабо выражен при использовании монокомпонентных препаратов, практически в 2,5-3 раза выше в случае применения комбинации солей церия и цинка. При сравнении с данными, представленными в табл. 4 и 4а с применением комплексного препарата, содержащего ионы церия, цинка, марганца и серебра, отмечается преимущество многокомпонентного препарата. Появление легких необычных ощущений в носу или неприятных ощущений в горле отмечено у единичных пациентов без различий между группами больных.

Обсуждение. Комплекс проведенных доклинических исследований и клинической апробации препарата Ренериум в форме ингаляций с помощью небулайзера и назальной формы убедительно продемонстрировали его противовоспалительные и регенераторные свойства в отношении респираторного эпителия. Клиническая эффективность показала влияние только минерального комплекса, но не отдельных его

компонентов. Полученные результаты можно объяснить взаимодействием компонентов минерального комплекса друг с другом, а также с компонентами слизистой оболочки и секрета дыхательных путей. Как известно, ионы церия (III) проявляют восстановительные свойства в присутствии окислителя и в паре $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ [16]. В том числе, способны к элиминации супероксид аниона и других окислителей. Регуляция процессов пероксидации может происходить в области клеточной мембраны, что влияет на состояние рецепторного поля клетки, на уровне митохондрий, где избыток кислородных радикалов подавляет синтез АТФ, и в области ядра клетки, где кислородные радикалы могут быть причиной ошибок редупликации ДНК [17, 18, 19].

Проведенные нами простые химические реакции с участием ионов церия подтверждают восстановительные свойства ионов церия (III). Предложенная гипотеза также соответствует полученным клиническим данным. Тем не менее, «быстрый» клинический эффект ингаляционной формы препарата, возможно, более выраженный, чем при использовании других антиоксидантов. Прямых сравнительных исследований не проводилось, но теоретическое обоснование такого эффекта заключается в случае реализации реакции Белоусова-Жаботинского (автоколебательных окислительно-восстановительных реакций) в системе химических элементов. Первый этап реакции катализируется ионами церия (III) с образованием ионов церия (IV) который затем может взаимодействовать с некоторыми субстратами (в наших исследованиях использован раствор формалина 1%), а также короткоцепочечными жирными кислотами, например, бромалоновой кислотой ($\text{CHBr}(\text{COOH})_2$), как это было показано в классических трудах А.М. Жаботинского [20]. Реакция может тормозиться накоплением ионов церия (IV) и требует его элиминации путем взаимодействия с другими субстратами или образованием оксида. Предположение о возникновении автоколебательных химических процессов с уча-

стием ионов церия допускает высвобождение электронов, необходимых для работы электрон транспортной системы внутренней митохондриальной мембраны, и накопления АТФ в клетке.

Предложенные минеральные комплексы для лечения респираторных заболеваний отличаются отсутствием острой токсичности и хорошей переносимостью с редкими нежелательными явлениями в виде необычных ощущений в носу или в горле, а также неинтенсивного кашля с небольшим количеством мокроты, которые по частоте возникновения не отличались от применения 0,9% раствора хлорида натрия, и наблюдались в 3-х случаях из 101, включая практически здоровых лиц, получавших исследуемые формы препарата Ренериум.

Заключение. Результаты комплексного, экспериментального и клинического, исследования продемонстрировали выраженные противовоспалительные и регенераторные свойства нового минерального комплекса в составе ионов церия (III), марганца, цинка и серебра, механизм которых обусловлен регуляцией окислительно-восстановительных реакций.

Информация о финансировании

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ *p_НОЦ_Пермский край* № 20-415-596008.

Financial support

*This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research *r_REC Perm Territory* No. 20-415-596008.*

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors have no conflict of interest to declare.

Список литературы

1. Ларина ВН, Захарова МИ, Беневская ВФ, и др. Острые респираторные вирусные инфекции и грипп: этиология, диагностика и алгоритм лечения. РМЖ. Медицинское обозрение. 2019;9(1):18-23.

2. ТАСС [Электронный ресурс]: заявление эксперта, заместителя директора по научной работе ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, член-корреспондента РАН А. Горелова 6 марта 2021, 15:35. [дата обращения 25.08.2023]. URL: <https://tass.ru/obschestvo/10849793>

3. Здравоохранение в России [Электронный ресурс]. 2021: Стат.сб./Росстат. М; 2021 [дата обращения 25.08.2023]. URL: <https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/Zdravoohran-2021.pdf>

4. Hiemstra PS, McCray PB, Bals R. The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease. *European Respiratory Journal*. 2015;45:1150-1162. DOI: <https://doi.org/10.1183/09031936.00141514>

5. Kia'i N, Bajaj T. Histology, Respiratory Epithelium [Электронный ресурс]. 2019 [дата обращения 25.08.2023]. URL: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:209245293>

6. Adivitiya, Kaushik MS, Chakraborty S, et al. Mucociliary Respiratory Epithelium Integrity in Molecular Defense and Susceptibility to Pulmonary Viral Infections. *Biology* 2021;10(2):95. DOI: <https://doi.org/10.3390/biology10020095>

7. Janahi IA, Rehman A, Baloch NUA. Corticosteroids and Their Use in Respiratory Disorders. *Corticosteroids*. London: InTech Open; 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.72147>

8. Клячкина ИЛ, Белоцерковская ЮГ, Романовских АГ. Мукорегуляторы в программе лечения острой респираторной вирусной инфекции. *Русский медицинский журнал*. 2018;3(1):14-18.

9. Estornut C, Milara J, Bayarri MA, et al. Targeting Oxidative Stress as a Therapeutic Approach for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;12:794997. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.794997>

10. Fois AG, Paliogiannis P, Sotgia S, et al. Evaluation of oxidative stress biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis and therapeutic applications: a systematic review. *Respiratory Research*. 2018;19:51. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0754-7>

11. Локшина ЭЭ. Новые возможности применения комплексного витаминного препарата на основе бета-каротина для профилактики и в комплексной терапии вирусных инфекций у детей. *Педиатрия*. 2012;91(1):122-127.

12. Zamani Rarani F, Zamani Rarani M, Hamblin MR, et al. Comprehensive overview of COVID-19-related respiratory failure: focus on

cellular interactions. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 2022;27:63. DOI: <https://doi.org/10.1186/s11658-022-00363-3>

13. Кательникова АЕ, Крышень КЛ, Макарова МН, и др. Изучение специфической фармакологической активности комплекса гликозилированных полипептидов, выделенного из морских ежей вида *Strongylocentrotus droebachiensis* на модели острого бронхита, индуцированного формалином у крыс. *Биофармацевтический журнал*. 2016;8(6):56-63.

14. Временные методические рекомендации: Медицинская реабилитация при новой коронавирусной инфекции (Covid-19). Версия 2 (31.07.2020) [Электронный ресурс]. 2020 [дата обращения 25.08.2023]. URL: https://edu.rosminzdrav.ru/fileadmin/user_upload/specialists/COVID-19/dop-materials/VMR_medreabilitacija_COVID_versija2.pdf

15. Временные методические рекомендации: профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (Covid-19). Версия 15 (22.02.2022) [Электронный ресурс]. 2022 [дата обращения 25.08.2023]. URL: <http://nasci.ru/?id=69768>

16. Buchanan CA, Herrera D, Balasubramanian M, et al. Unveiling the Cerium(III)/(IV) Structures and Charge-Transfer Mechanism in Sulfuric Acid. *JACS Au*. 2022;2(12):2742-2757. DOI: <https://doi.org/10.1021/jacsau.2c00484>

17. Read AD, Bentley RET, Archer SL, et al. Mitochondrial iron-sulfur clusters: Structure, function, and an emerging role in vascular biology. *Redox Biology*. 2021;47:102164. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102164>

18. Perera L, Freudenthal BD, Beard WA, et al. Revealing the role of the product metal in DNA polymerase β catalysis. *Nucleic Acids Research*. 2017;45(5):2736-2745. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1363>

19. Ghosh M, Swain KK, Singh PK. Thioflavin-T-Incorporated Cerium-ATP Coordination Polymer Nanoparticles: A Promising System for Detection of Uranyl Ion (UO_2^{2+}) in Aqueous Medium. *Langmuir*. 2023;39(20):7017-7028. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.3c00228>

20. Филд Р, Бургер М, редакторы. Колесания и бегущие волны в химических системах. Москва: Мир; 1988.

References

1. Larina VN, Zakharova MI, Benevskaya VF, et al. Acute respiratory viral infections and influenza: etiology, diagnosis and treatment algorithm. *RMJ. Medical Review*. 2019;9(1):18-23. Russian.

2. TASS [Internet]: Statement by A. Gorelov, expert, deputy director for research at the Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, March 6 2021, 15:35 [cited 2023 Aug 25]. Russian. Available from: <https://tass.ru/obschestvo/10849793>
 3. Health care in Russia [Internet]. 2021: Stat.sb./Rosstat. M; 2021 [cited 2023 Aug 25]. Russian. Available from: <https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/Zdravooхран-2021.pdf>
 4. Hiemstra PS, McCray PB, Bals R. The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease. *European Respiratory Journal*. 2015;45:1150-1162. DOI: <https://doi.org/10.1183/09031936.00141514>
 5. Kia'i N, Bajaj T. Histology, Respiratory Epithelium [Internet]. 2019 [cited 2023 Aug 25]. Available from: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:209245293>
 6. Adivitiya, Kaushik MS, Chakraborty S, et al. Mucociliary Respiratory Epithelium Integrity in Molecular Defense and Susceptibility to Pulmonary Viral Infections. *Biology* 2021;10(2):95. DOI: <https://doi.org/10.3390/biology10020095>
 7. Janahi IA, Rehman A, Baloch NUA. Corticosteroids and Their Use in Respiratory Disorders. *Corticosteroids*. London: InTech Open; 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.72147>
 8. Klyachkina IL, Belotserkovskaya YuG, Romanovskikh AG. Mucoregulators in the treatment of acute respiratory viral infection. *Russian Medical Journal*. 2018;3(1):14-18. Russian.
 9. Estornut C, Milara J, Bayarri MA, et al. Targeting Oxidative Stress as a Therapeutic Approach for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;12:794997. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.794997>
 10. Fois AG, Paliogiannis P, Sotgia S, et al. Evaluation of oxidative stress biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis and therapeutic applications: a systematic review. *Respiratory Research*. 2018;19:51. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0754-7>
 11. Lokshina EE. New possibilities for using a complex vitamin preparation based on beta-carotene for the prevention and complex therapy of viral infections in children. *Pediatrics*. 2012;91(1):122-127. Russian.
 12. Zamani Rarani F, Zamani Rarani M, Hamblin MR, et al. Comprehensive overview of COVID-19-related respiratory failure: focus on cellular interactions. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 2022;27:63. DOI: <https://doi.org/10.1186/s11658-022-00363-3>
 13. Katelnikova AE, Kryshen KL, Makarova MN, et al. Study of the specific pharmacological activity of a complex of glycosylated polypeptides isolated from sea urchins of the species *Strongylocentrotus droebachiensis* in a formalin-induced acute bronchitis model in rats. *Biopharmaceutical Journal*. 2016;8(6):56-63. Russian.
 14. Temporary guidelines: Medical rehabilitation for new coronavirus infection (Covid-19). Version 2 (07.31.2020) [Internet]. 2020 [cited 2023 Aug 25]. Russian. Available from: https://edu.rosminzdrav.ru/fileadmin/user_upload/specialists/COVID-19/dop-materials/VMR_medreabilitacija_COVID_versija2.pdf
 15. Temporary guidelines: prevention, diagnosis and treatment of new coronavirus infection (Covid-19). Version 15 (02.22.2022) [Internet]. 2022 [cited 2023 Aug 25]. Russian. Available from: <http://nasci.ru/?id=69768>
 16. Buchanan CA, Herrera D, Balasubramanian M, et al. Unveiling the Cerium(III)/(IV) Structures and Charge-Transfer Mechanism in Sulfuric Acid. *JACS Au*. 2022;2(12):2742-2757. DOI: <https://doi.org/10.1021/jacsau.2c00484>
 17. Read AD, Bentley RET, Archer SL, et al. Mitochondrial iron-sulfur clusters: Structure, function, and an emerging role in vascular biology. *Redox Biology*. 2021;47:102164. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102164>
 18. Perera L, Freudenthal BD, Beard WA, et al. Revealing the role of the product metal in DNA polymerase β catalysis. *Nucleic Acids Research*. 2017;45(5):2736-2745. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1363>
 19. Ghosh M, Swain KK, Singh PK. Thioflavin-T-Incorporated Cerium-ATP Coordination Polymer Nanoparticles: A Promising System for Detection of Uranyl Ion (UO_2^{2+}) in Aqueous Medium. *Langmuir*. 2023;39(20):7017-7028. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.3c00228>
 20. Field R, Burger M, editors. *Oscillations and traveling waves in chemical systems*. Moscow: Mir; 1988. Russian.
- Статья поступила в редакцию 25 августа 2023 г.
Поступила после доработки 11 октября 2023 г.
Принята к печати 20 октября 2023 г.
- Received 25 August 2023
Revised 11 October 2023
Accepted 20 October 2023

Информация об авторах

Виталий Юрьевич Мишланов, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент Российской академии наук, заведующий кафедрой пропедевтики внутренних болезней №1 ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера», г. Пермь, Российская Федерация, E-mail: permmed@hotmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8428-6020>.

Александр Григорьевич Чучалин, доктор медицинских наук, профессор, академик Российской академии наук, заведующий кафедрой госпитальной терапии ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: chuchalin@inbox.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6808-5528>.

Валерий Александрович Черешнев, доктор медицинских наук, профессор, академик Российской академии наук, главный научный сотрудник ФГБУН Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Российская Федерация, E-mail: v.chereshnev@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4329-147X>.

Евгений Валентинович Поляков, доктор химических наук, профессор, заместитель директора по науке, заведующий лабораторией физико-химических методов анализа ФГБУН Институт химии твердого тела Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург,

Российская Федерация, E-mail: polyakov@ihim.uran.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7432-994X>.

Information about the authors

Vitaliy Ju. Mishlanov, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Propaedeutics of Internal Diseases No. 1, E.A. Vagner Perm State Medical University, Perm, Russia, E-mail: permmed@hotmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8428-6020>.

Alexander G. Chuchalin, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Hospital Therapy, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia, E-mail: chuchalin@inbox.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6808-5528>.

Valery A. Chereshnev, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Chief Researcher, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia, E-mail: v.chereshnev@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4329-147X>.

Evgeniy V. Polyakov, Doct. Sci. (Chemistry), Professor, Deputy Director for Science, Head of the Laboratory of Physical and Chemical Analysis Methods, Institute of Solid State Chemistry, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia, E-mail: polyakov@ihim.uran.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7432-994X>.

КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА MEDICINE



DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-2-0-8

УДК 615.214.2

Применение психотропных препаратов при онкологических заболеваниях (обзор)

С.С. Потанин¹ , Д.С. Цапко² , Е.Ю. Чибикова³ , А.М. Сайфулина⁴ ,
Т.А. Лепилкина¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научный центр психического здоровья»,

Каширское шоссе, д. 34, г. Москва, 115522, Российская Федерация

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет
имени И.М. Сеченова»,

ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, 119991, г. Москва, Российская Федерация

³ Общество с ограниченной ответственностью «Нейрология»,
ул. Ново-Садовая, д. 139, г. Самара, 443068, Российская Федерация

⁴ Общество с ограниченной ответственностью «Майндсет»,
2-й Троицкий пер., д. 5, г. Москва, 129090, Российская Федерация

Автор для переписки: С.С. Потанин (potanin_ss@mail.ru)

Резюме

Актуальность: По меньшей мере 25-30% пациентов с онкологическими заболеваниями страдают психическими расстройствами, в связи с чем психотропные препараты уже достаточно давно и успешно используются в онкологии. Психофармакологические препараты также применяются в качестве основного или вспомогательного средства для лечения симптомов, связанных с самим онкологическим заболеванием и с побочными эффектами терапии (нарушения сна, потеря аппетита, боль, тошнота, усталость и др.). Использование психотропных препаратов дает возможность точно воздействовать на симптомы, которые негативно влияют на качество жизни пациентов. Вместе с тем, при назначении психотропных препаратов существуют проблемы лекарственных взаимодействий и побочных эффектов. **Цель исследования:** Целью исследования являлся анализ применения психофармакотерапии в онкологической практике для лечения коморбидных психических расстройств и симптомов, связанных с онкологическими заболеваниями. Также был проведен анализ побочных эффектов и лекарственных взаимодействий психофармакологических и онкологических препаратов. **Материалы и методы:** Произведен поиск в базах данных eLibrary, PubMed и Google Scholar, по ключевым словам «психоонкология», «психофармакотерапия» («psychooncology», «psychopharmacotherapy»). Из полученных результатов были выбраны ревью, метаанализы и рекомендации по терапии, которые наиболее полно отражают актуальные научные данные по данной теме. **Результаты:** Результаты исследования показали, что у онкологических пациентов наиболее часто встреча-

ются различные типы тревожных расстройств и депрессивные реакции, которые успешно корректируются психофармакологическим вмешательством. Кроме того, назначение антидепрессантов и антипсихотиков может быть успешным в корректировке части симптомов, связанных как с самим течением онкологического процесса, так и с побочными эффектами основного лечения (анорексия, боль, тошнота и т.д.). Однако необходимо тщательно оценивать риски лекарственных взаимодействий при назначении любых психотропных препаратов. Например, назначение сильных ингибиторов цитохрома CYP2D6 может привести к снижению концентрации активного метаболита тамоксифена, а сочетание антидепрессантов и трамадола может повысить риск серотонинового синдрома. **Заключение:** Применение психотропных препаратов при терапии онкологических заболеваний может существенно улучшить качество жизни пациентов. При этом необходимо тщательно учитывать возможные побочные эффекты и лекарственные взаимодействия.

Ключевые слова: психоонкология; психофармакотерапия; симптомы, связанные с онкологическими заболеваниями; паллиативная помощь; качество жизни; онкология

Для цитирования: Потанин СС, Цапко ДС, Чибикова ЕЮ, и др. Применение психотропных препаратов при онкологических заболеваниях (обзор). Научные результаты биомедицинских исследований. 2024;10(2):270-291. DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-2-0-8

The use of psychotropic drugs in oncological diseases (review)

Sergei S. Potanin¹ , Darya S. Tsapko² , Evgeniia Y. Chibikova³ ,
Alina M. Sayfulina⁴ , Taissia A. Lepilkina¹ 

¹ Mental Health Research Center,

34 Kashirskoye Hgw., Moscow 115522, Russia

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University,

8-2 Trubetskaya St., Moscow, 119991, Russia

³ Neurologia,

139 Novo-Sadovaya St., Samara, 443068, Russia

⁴ Mindset,

5 2nd Troitskiy Ln., Moscow, 129090, Russia

Corresponding author: Sergey S. Potanin (potanin_ss@mail.ru)

Abstract

Background: It is estimated that at least 25-30% of cancer patients experience mental disorders. Due to the high prevalence of these disorders among this patient population, psychotropic drugs have been successfully utilized in oncology for an extended period of time. The use of psychotropic drugs enables targeted symptom management to improve the quality of life of cancer patients. However, it is essential to carefully evaluate the risks of drug interactions and potential side effects when prescribing any psychotropic medication. **The aim of the study:** The aim of this study was to analyze the utilization of psychopharmacotherapy in oncology practice for treating comorbid mental disorders and symptoms related to oncological diseases. An evaluation of the side effects and drug interactions of psychopharmacological and oncological drugs was conducted. **Materials and methods:** The eLibrary, PubMed, and Google Scholar databases were searched using the keywords “psychooncology” and “psychopharmacotherapy”. Reviews, meta-analyses, and therapy recommendations were selected from the obtained results, which provided the most comprehensive coverage of the current

scientific data on this topic. **Results:** Anxiety disorders and depressive reactions are prevalent in cancer patients and can be successfully treated with psychopharmacological intervention. Additionally, symptoms associated with the oncological process or side effects of treatment such as anorexia, pain, and nausea can be alleviated through the use of antidepressants and antipsychotics. However, it is crucial to carefully evaluate the risks of drug interactions when prescribing any psychotropic drugs. For instance, strong cytochrome CYP2D6 inhibitors can lead to a decrease in the concentration of the active metabolite tamoxifen, while the combination of antidepressants and tramadol increases the risk of serotonin syndrome. **Conclusion:** The application of psychotropic drugs in the treatment of cancer can greatly enhance the patients' quality of life. However, potential side effects and drug interactions must be carefully evaluated.

Keywords: psychooncology; psychopharmacotherapy; symptoms associated with oncological diseases; palliative care; quality of life; oncology

For citation: Potanin SS, Tsapko DS, Chibikova EY, et al. The use of psychotropic drugs in oncological diseases (review). Research Results in Biomedicine. 2024;10(2):270-291. Russian. DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-2-0-8

Введение. Комплексное лечение онкологических заболеваний должно включать не только специализированную противоопухолевую терапию, но и психофармакотерапию в случае наличия показаний. По меньшей мере, 25-30% пациентов с онкологическими заболеваниями соответствуют критериям психического расстройства. Наиболее распространенными психическими расстройствами являются депрессия, расстройства адаптации, тревога, нарушения сна и делирий (Рис. 1) [1, 2]. По результатам мета-анализа, треть онкологических пациентов как на этапе диагностики, так и в отделении неотложной помощи при госпитализации, страдали психическими расстройствами и нуждались в специализированном психофармакологическом лечении [3, 4]. Другое крупное когортное исследование, в котором приняли участие 7298 пациентов с онкологическими заболеваниями, показало, что примерно 15,6% пациентов соответствовали критериям психического расстройства (тревога, депрессия и/или чрезмерное употребление алкоголя) в сравнении с 1,4% здоровых добровольцев в контрольной группе. Психотропные препараты были назначены в течение 6 месяцев после впервые диагностированного онкологического заболевания 14,6% пациентам [5]. В 2020 г. были опубликованы результаты популяционного когортного исследования пациентов, которым впервые был выставлен

диагноз онкологического заболевания. Из 142 270 пациентов 46% имели симптомы депрессии согласно Эдмонтонской системе оценки симптомов. Было выявлено, что такие факторы, как молодой возраст, более высокое бремя сопутствующих заболеваний, получение системной терапии в рамках лечения, а также рак ротоглотки и дыхательных путей способствуют более частому возникновению депрессивной симптоматики [6]. Назначение психотропных препаратов может начинаться вскоре после постановки диагноза, предположительно, по причине страха в отношении исходов болезни, однако в большинстве случаев оно имеет тенденцию к увеличению ближе к терминальной стадии заболевания. В одном ретроспективном исследовании "случай – контроль", включавшем в общей сложности 113 887 онкологических пациентов, были получены данные, что использование психотропных препаратов (антипсихотиков, антидепрессантов и бензодиазепинов) было значительно выше в последние 3 месяца жизни по сравнению с первыми 3 месяцами после постановки диагноза. Частое назначение антидепрессантов может отражать более высокий уровень психологического стресса на терминальной стадии онкологического заболевания, в то время как увеличение применения антипсихотиков на терминальных стадиях, вероятно, связано с развитием органического поражения головного мозга [7].

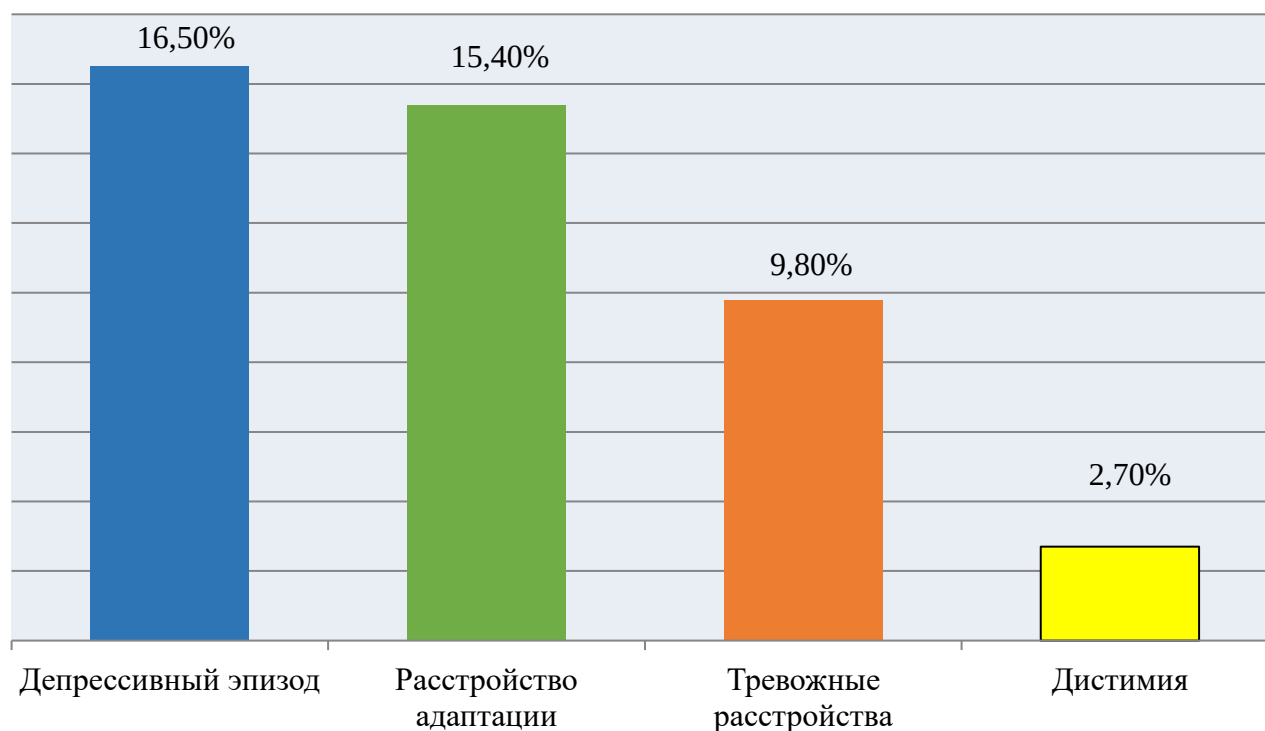


Рис. 1. Распределение психических расстройств среди пациентов с онкологией
Fig. 1. Distribution of mental disorders among patients with oncology

В связи с широкой распространенностью психических расстройств у данной группы пациентов психотропные препараты уже долгое время успешно используются в онкологии как для комплексного лечения психических расстройств, так и для вспомогательного лечения симптомов, связанных непосредственно с онкологическими заболеваниями (например, боль, приливы, усталость). Относительно безопасный профиль и минимальный риск серьезных побочных эффектов еще больше способствуют широкому использованию данных препаратов. Популяционное исследование, проведенное в США, показало, что более половины пожилых пациентов с раком мочевого пузыря получали психотропные препараты в течение 2 лет после постановки диагноза. Чаще всего назначались стимуляторы/модуляторы ГАМК, а также селективные ингибиторы обратного захвата серотонина [8]. В другом исследовании, проведенном японскими учеными, было показано, что наиболее часто применялись психотропные препараты при раке легкого, реже – при раке предстательной

железы: 62,6% и 35,1% соответственно [9].

В связи с высокой значимостью данной проблемы, изучение и систематизация литературных данных, касающихся применения психотропных средств в онкологии, представляется актуальным.

Цель исследования. Обобщение современных знаний об использовании психотропных препаратов в онкологии (антидепрессантов, антипсихотиков, анксиолитиков и гипнотиков) с целью лечения коморбидных психических расстройств и устранения симптомов, связанных с онкологическими заболеваниями.

Материалы и методы исследования. Для решения поставленных задач был проведен поиск по базам данных eLibrary, PubMed и Google Scholar по ключевым словам «психоонкология», «психофармакотерапия» («psychooncology», «psychopharmacotherapy»). Результатом первичного поиска стали 622 статьи, из которых были отобраны 93 публикации, наиболее полно, по мнению авторов, отражающих актуальные научные данные, касающиеся рассматриваемой темы (Рис. 2).

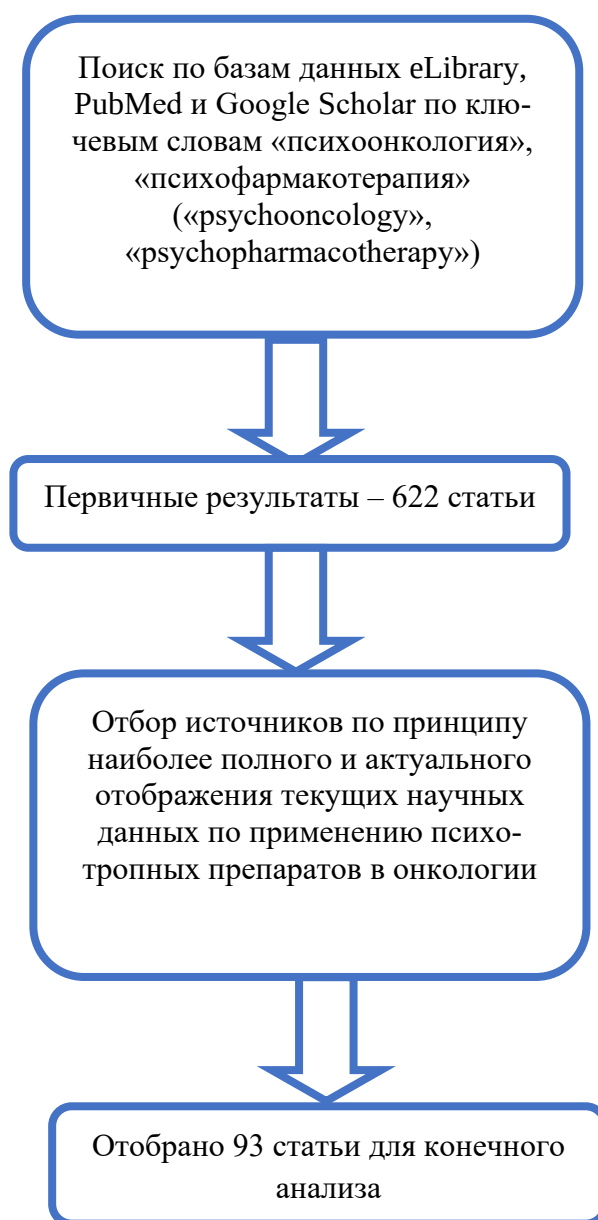


Рис. 2. Отбор литературных источников
Fig. 2. Selection of science sources

Результаты и их обсуждение

Антидепрессанты. За последние несколько десятилетий, главным образом в результате появления новых классов антидепрессантов с лучшей переносимостью и меньшим количеством побочных эффектов, использование этой группы препаратов у онкологических пациентов стало более распространено. Во-первых, было показано, что антидепрессанты эффективны в лечении депрессии, тревожных и обусловлен-

ных стрессом расстройств у онкологических пациентов [10, 11]. Во-вторых, антидепрессанты также используются в качестве вспомогательного средства для лечения симптомов, не связанных с онкологическими заболеваниями, таких как приливы, невропатическая боль, тошнота, рвота, усталость и другие [12]. Эффективность антидепрессантов при онкологических заболеваниях была установлена во многих рандомизированных контролируемых исследо-

ваниях [13-16]. Из всех классов антидепрессантов наиболее часто в клинической практике используются селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (СИОЗС) из-за относительно простого режима дозирования и оптимального соотношения потенциальной пользы и риска возникновения побочных эффектов. Также было установлено, что СИОЗС обладают противовоспалительными свойствами в отношении микроглии, основных клеток центральной нервной системы, которые регулируют и реагируют на воспалительные факторы [17]. Поскольку воспалительные механизмы вовлечены в биологию и физиологию онкологических заболеваний, СИОЗС являются рациональным вариантом лечения депрессии в таких клинических ситуациях. СИОЗС могут улучшать иммунитет онкологических пациентов и обладают противоопухолевыми свойствами, включая апоптотические свойства *in vitro* в клетках гепатоцеллюлярной карциномы [18].

Применение антидепрессантов в лечении коморбидных психических расстройств. Депрессия является одним из наиболее распространенных расстройств у онкологических пациентов. Исследования подтвердили увеличение частоты назначения антидепрессантов онкологическим пациентам с целью устранения симптомов депрессии [7, 11]. По данным систематического обзора и мета-анализа, было установлено, что антидепрессанты, независимо от их класса (например, СИОЗС или трициклические антидепрессанты), более эффективны, чем плацебо, при лечении депрессивных симптомов [19]. Тем не менее, антидепрессанты, как правило, следует назначать только при тяжелых проявлениях депрессии, при легких формах оптимальной является психотерапевтическая поддержка [20]. Стресс, расстройства, обусловленные стрессом, и расстройства адаптации также широко распространены у онкологических пациентов [1, 21]. Исследования показали, что примерно 12–25% онкологических пациентов страдают посттравматическим стрессовым расстройством (ПТСР), в то

время как 20% пациентов страдают расстройствами адаптации [22, 23]. По данным литературы, антидепрессанты, особенно СИОЗС, являются первой линией терапии как для лечения ПТСР, так и для расстройств адаптации, однако конкретных данных в отношении онкологических пациентов представлено не было [24]. При тревожных расстройствах (например, фобиях, тяжелой и стойкой тревоге ожидания, социальной тревоге), СИОЗС, СИОЗСиН и мirtазапин являются препаратами выбора у онкологических пациентов [25, 26]. Нарушение циркадных ритмов у онкологических пациентов может быть проявлением депрессии, тревожных расстройств, а также осложнением химиотерапии [27]. В данном случае помимо классических снотворных средств, могут быть назначены антидепрессанты с седативным эффектом (например, мirtазапин и тразодон).

Применение антидепрессантов в отношении симптомов, связанных с онкологическими заболеваниями. Клиническая практика, подкрепленная научными данными, показала, что антидепрессанты можно использовать для улучшения симптомов, связанных с онкологическими заболеваниями, таких как потеря аппетита, анорексия, нарушения сна, боль, приливы, которые заметно влияют на качество жизни. В первую очередь антидепрессанты используются в качестве аугментации при терапии боли у онкологических пациентов [28, 29, 30]. Трициклические антидепрессанты и СИОЗСиН (в первую очередь дулоксетин) эффективны при лечении невропатической боли у онкологических пациентов, получающих химиотерапию [31, 32]. Некоторые химиотерапевтические препараты могут вызывать приливы жара, которые негативно сказываются на качестве жизни пациентов. Было показано, что антидепрессанты, особенно СИОЗС и СИОЗСиН, эффективны для лечения приливов [33]. Наибольшую эффективность среди них показали флуоксетин [34], сертралин [35], эсциталопрам дулоксетин [36] и венлафаксин [37] (Таблица). Однако при использовании этих препаратов требуется осторожность из-за потенциального ингибирующего действия

на фермент системы цитохромов CYP2D6 [34, 36]. Антигистаминергические свойства миртазапина могут быть направлены на борьбу с тошнотой, анорексией/кахексией и тяжелой потерей веса [38]. Исследование

II фазы подтвердило его благотворное влияние на аппетит, нарушения сна, беспокойство, боль, а также качество жизни и депрессию у онкологических пациентов [39].

Таблица

Сравнение эффективности антидепрессантов при терапии приливов у пациентов с онкологическим заболеванием

Table

Comparison of the effectiveness of antidepressants in the treatment of hot flushes in patients with cancer

Антидепрессант, доза (мг/сут.)	Тип клинического исследования	Количество участников	Результаты в группе контроля (эффективность в отношении симптомов)	Результаты в исследуемой группе (эффективность в отношении симптомов)
Флуоксетин, 20	Двойное слепое плацебо-контролируемое рандомизированное исследование [34]	72	36%	50%
Венлафаксин, 37,5-150	Двойное слепое плацебо-контролируемое рандомизированное исследование [37]	191	27%	37-61% (чем выше доза, тем больше эффект)
Дулоксетин, 60	Рандомизированное контролируемое исследование [36]	28	- (группа контроля отсутствует)	49,8%
Эсциталопрам, 20	Рандомизированное контролируемое исследование [36]	30	- (группа контроля отсутствует)	53%
Сертралин, 50	Двойное слепое плацебо-контролируемое рандомизированное исследование [35]	62	27%	36%

Ограничения применения, побочные эффекты и лекарственные взаимодействия антидепрессантов в онкологической практике. Другие важные вопросы, связанные с применением антидепрессантов при онкологических заболеваниях, включают побочные эффекты и лекарственные взаимодействия [40, 41]. Препараты, обычно назначаемые онкологическим пациентам, такие как трамадол, прокарбазин и линезолид, повышают риск развития серотонинового синдрома при добавлении серотонинергических антидепрессантов. Данные лекарственные средства также могут усиливать тошноту и симптомы со стороны ЖКТ, а также повышать риск кровотечения у пациентов с тромбоцитопенией

или принимающих антикоагулянты. Возможно развитие гипонатриемии, синдрома отмены и снижение судорожного порога. Флуоксетин по причине длительного периода полувыведения и сильного ингибирующего действия на цитохром CYP2D6 следует применять с осторожностью у онкологических пациентов, которые получают химиотерапию, во избежание возможных лекарственных взаимодействий с противоопухолевыми агентами, которые метаболизируются через систему CYP2D6. Аналогичным образом, пароксетин обладает выраженным ингибирующим эффектом на CYP2D6, а также антихолинэргическими эффектами, которые требуют особого внимания со стороны лечащего врача.

Сертралин, циталопрам и эсциталопрам имеют наименьшее количество лекарственных взаимодействий и являются препаратами выбора в данных условиях. Тамоксифен – селективный модулятор рецепторов эстрогена, используемый для профилактики рецидивов у пациенток с гормонорецепторным раком молочной железы. Фермент цитохром 2D6 (CYP2D6) является основным ферментом, превращающим тамоксифен в его активный метаболит эндоксифен. Генетические вариации в CYP2D6 влияют на превращение тамоксифена в его активную форму; около 7% женщин имеют нефункциональные аллели CYP2D6 и более низкий уровень эндоксифена. Три антидепрессанта – пароксетин, флуоксетин и дулоксетин – являются сильными ингибиторами CYP2D6; они могут вмешиваться в метаболизм тамоксифена [42]. Ретроспективное исследование показало более высокий риск смерти от рака молочной железы среди тех, кто принимал комбинированное лечение тамоксифеном и пароксетином, что изменило практику назначения антидепрессантов многими врачами. Последующие крупные исследования, изучавшие влияние различных фенотипов метаболизма CYP2D6, не выявили никакой связи с контролем заболевания и рецидивами [43, 44]. Позиция актуальных клинических рекомендаций заключается в том, чтобы избегать сильных ингибиторов CYP2D6 (пароксетин), отдавая предпочтение препаратам с отсутствием или слабым ингибированием данного цитохрома (эсциталопрам, венлафаксин), но лечащий врач должен быть внимателен к дальнейшим исследованиям по этому вопросу по мере их появления [45]. При этом ревью 2022 года не выявило разницы в исходах терапии у пациентов, принимающих и не принимающих антидепрессанты (включая пароксетин) совместно с тамоксифеном [46]. Следует отметить, что в российской инструкции в разделе лекарственное взаимодействие указана вся группа СИОЗС как потенциально способная снизить уровень активного метаболита тамоксифена, в связи с чем подоб-

ные назначения следует проводить с большой осторожностью и тщательно документировать.

Антипсихотики. Антипсихотики также являются препаратами, которые уже долгое время используются в онкологической практике. Они применяются для лечения таких психических расстройств, как расстройства настроения, депрессия, тревога; психотических расстройств (делирий и/или психотические симптомы, вызванные приемом некоторых лекарственных препаратов), а также побочных эффектов химиотерапии. Во многих случаях побочные эффекты отдельных антипсихотиков используются для контроля целевых симптомов, как в случае с тошнотой, рвотой или снижением аппетита.

Применение антипсихотиков в лечении коморбидных психических расстройств. При острой тревоге у онкологических пациентов антипсихотики могут быть предпочтительнее бензодиазепинов, поскольку последние повышают риск изменения психического статуса и угнетения дыхания. По аналогичным причинам низкие дозы седативных атипичных антипсихотиков (кветиапина, оланзапина) предпочтительнее гипнотиков для лечения бессонницы [47, 48, 49]. У детей с онкологическими заболеваниями рисперидон и оланзапин показатели свою эффективность и хорошую переносимость в отношении раздражительности и симптомов депрессии [50].

Применение антипсихотиков в отношении симптомов, связанных с онкологическими заболеваниями. Применение галоперидола, левомепромазина и дроперидола для контроля тошноты и рвоты не рекомендовано у онкологических пациентов ввиду недостаточного количества данных об эффективности [51, 52, 53]. В то же время, атипичный антипсихотик оланзапин показал эффективность в лечении тошноты и рвоты, вызванных химиотерапией [54]. Оланзапин в дозе 10 мг значительно уменьшал выраженность тошноты, рвоты и снижал частоту использования купирующей терапии по сравнению с плацебо у онколо-

гических пациентов, проходящих химиотерапию и испытывающих сильные рвотные позывы [55]. В детской онкологии оланзапин при его применении в средней дозе 0,1 мг/кг снижал частоту возникновения рвоты, ассоциированной с химиотерапией. Средний возраст пациентов в выборке составлял 13 лет [56]. Таким образом, применение оланзапина в составе комбинированной терапии для контроля тошноты и рвоты оправдано как у детей, так и у взрослых пациентов с онкологическими заболеваниями. Исследования показывают, что оланзапин снижал потерю веса у онкологических пациентов более чем на 10% и увеличивал потребление пищи [57, 58, 59]. Данное свойство может быть полезным при лечении анорексии, вызванной онкологическим заболеванием.

Более 90% онкологических пациентов в последние дни жизни переживают предсмертный делирий [60, 61]. При этом у 70% развивается беспокойство, возбуждение или агрессивное поведение [62]. Антипсихотики уже на протяжении долгого времени используются в качестве препаратов первой линии для лечения делирия и связанного с ним возбуждения [63, 64]. Среди типичных антипсихотиков галоперидол является одним из наиболее часто используемых препаратов [65]. В опросе, проведенном среди 135 врачей, оказывающих паллиативную помощь в девяти странах, галоперидол считался одним из четырех основных препаратов, которые должны быть доступны во всех учреждениях, оказывающих помощь пациентам с онкологическим заболеванием в терминальном состоянии [66]. Более того, комбинация лоразепама и галоперидола показала лучшие результаты по сравнению с монотерапией галоперидолом в рамках их применения для контроля агитации и субъективной оценки комфорта пациентов [63, 67]. Не только галоперидол, но и хлорпромазин является предпочтительным вариантом для лечения предсмертного делирия. Он блокирует α_1 -адренорецепторы, что может эффективно уменьшить возбуждение [68]. Однако применение га-

лоперидола не рекомендуется при гипоактивном делирии на поздних стадиях в связи с отсутствием эффективности или ухудшением симптоматики, что возможно связано с полиорганной недостаточностью [69]. Также не стоит забывать о высоком риске развития злокачественного нейролептического синдрома, чаще возникающего при назначении галоперидола и других антипсихотиков-антагонистов D2-рецепторов [70]. Недавний систематический обзор показал, что оланзапин и кветиапин являются адекватными альтернативами галоперидолу, особенно у пациентов с выраженными экстрапирамидными симптомами, нуждающихся в седации или имеющих указания на непереносимость галоперидола в анамнезе [71]. Рисперидон также используется при лечении делирия, обладая эффективностью сравнимой с галоперидолом и оланзапином [72, 73].

Ограничения применения, побочные эффекты и лекарственные взаимодействия. Онкологические пациенты подвержены большему риску побочных эффектов в связи с ухудшением общего состояния здоровья. Например, гиповолемия может повысить риск ортостатической гипотензии, приводящей к обморокам и падениям. Внутримышечный способ введения антипсихотиков ассоциирован с риском возникновения гематом у онкологических пациентов с тромбоцитопенией. Проблема нейролептической гиперпролактинемии у пациентов с раком молочной железы, вызывает все большую озабоченность. У пациентов с шизофренией прижизненная распространенность рака молочной железы встречается на 25% чаще, чем в общей популяции [74, 75]. Большинство внутрипротоковых опухолей сверхэкспрессируют рецептор пролактина, и пролактин может способствовать прогрессированию опухоли независимо от статуса рецептора. В недавнем исследовании, проведенном в Финляндии, было показано, что длительное применение антипсихотиков, повышающих уровень пролактина (рисперидон и галоперидол), было связано с повышением риска развития

рака молочной железы [76]. Из антипсихотиков, наиболее часто используемых в онкологической практике, рисперидон и галоперидол чаще всего вызывают гиперпролактинемию, тогда как арипипразол, зипрасидон и кветиапин вызывают минимальное повышение пролактина [77]. Акатизия может развиваться наряду с другими экстрапирамидными симптомами, особенно при сочетании антипсихотиков с антиэметиками. Несмотря на то, что экстрапирамидные симптомы чаще ассоциируются с приемом типичных антипсихотиков, они также могут возникать во время лечения такими атипичными антипсихотиками, как рисперидон и оланзапин, особенно при их применении в высоких дозах [78]. Регулярный мониторинг интервала QT также очень важен, особенно у онкологических пациентов с электролитными нарушениями и принимающих препараты, удлиняющие интервал QT, поскольку его удлинение может predispose к развитию угрожающих жизни желудочковых аритмий [79]. Данный побочный эффект наиболее выражен при лечении тиоридазином, сертиндолом, зипрасидоном, галоперидолом, рисперидоном и оланзапином, хотя всем пациентам, получающим антипсихотические препараты, рекомендуется регулярно проверять интервал QT [80]. Мета-анализ применения антипсихотиков при терапии шизофрении показал, что препаратами, способствующими пролонгированию QT в меньшей степени, являются арипипразол, лurasидон, палиперидон и азенапин [81]. Другие серьезные побочные эффекты, включая инсульт и венозную тромбоэмболию, были описаны в связи с применением атипичных антипсихотиков в популяции пожилых пациентов [82]. Дополнительные опасения при назначении антипсихотиков включают риск метаболического синдрома при длительном применении (т. е. инсулинорезистентность, дислипидемия, ожирение), гипонатриемию, снижение судорожного порога в контексте параллельного применения стероидов, лекарственные взаимодействия, повышение уровня печеночных

трансаминаз и антихолинергическую токсичность (например, запор, сухость во рту, задержка мочи). При назначении антипсихотиков пациентам с делирием есть риск падений и возникновения аспирационных пневмоний [83]. Назначая антипсихотики, следует начинать с минимальных доз с последующим титрованием для более благоприятного исхода [84].

Применение анксиолитиков и гипнотиков в лечении коморбидных психических расстройств у пациентов с онкологическими заболеваниями. Метаанализ 70 исследований показал, что в учреждениях онкологической помощи распространенность расстройства адаптации и тревожных расстройств среди пациентов составляет 19,4% и 10,3% соответственно [1]. Несмотря на то, что серотонинергические антидепрессанты остаются основной группой, применяемой в лечении генерализованной тревоги и профилактики панических атак у онкологических пациентов, лечение также часто включает бензодиазепины короткого и длительного действия. Бензодиазепины часто являются препаратом выбора при острых симптомах тревоги и паники. Такие препараты короткого действия как алпразолам, лоразепам и оксазепам, могут быть полезны при проведении коротких процедур (фобия инъекций, закрытое МРТ) или приступах паники [76]. Клоназепам и диазепам действуют дольше, поэтому могут быть полезными для лечения симптоматической тревоги и бессонницы. Золпидем, зопиклон и залеплон, также известные как “Z-drugs”, являются небензодиазепиновыми препаратами, используемыми для лечения инсомнии у онкологических пациентов. Данная группа препаратов обладает минимальным анксиолитическим эффектом и меньшим риском развития толерантности и нежелательных реакций [85, 86]. Антигистаминный препарат гидроксизин может также назначаться по мере необходимости при симптомах тревоги [24]. Основное преимущество небензодиазепиновых препаратов заключается в том, что они, как правило, не вызывают за-

висимости. В последнее время увеличивается число публикаций, описывающих исследования препарата лемборексанта, являющегося двойным антагонистом рецептора орексина. Ранее лемборексанта показал хорошую эффективность и переносимость у пациентов с инсомнией с затруднениями при засыпании и частыми пробуждениями [87]. В небольшом пилотном исследовании оценивалось применение лемборексанта при нарушениях сна у онкологических пациентов, в том числе с делирием, результаты были аналогичны. Несмотря на ограничения исследования (небольшая выборка, ретроспективная оценка), результаты обнадеживающие и говорят о том, что в будущем применение препарата будет более широким [88].

Применение анксиолитиков и гипнотиков в отношении симптомов, связанных с онкологическими заболеваниями. Бензодиазепины часто используют для лечения психомоторного возбуждения и судорог. При рефрактерности симптомов они используются для паллиативной седативной терапии. Идеальным бензодиазепином для использования в паллиативной помощи является мидазолам по причине скорости наступления эффекта, короткой продолжительности действия и отсутствия выраженного синдрома отмены. Он рассматривается как один из четырех незаменимых препаратов для пациентов в терминальной стадии [89-92]. В комбинации с противорвотными средствами и поведенческими техниками, бензодиазепины также могут быть эффективны при тошноте, связанной с химиотерапией [93]. Аквагенный зуд (интенсивное ощущение царапания после контакта с водой), возникающий при BCR-ABL1-негативных миелопролиферативных новообразованиях, резко снижает качество жизни пациентов с онкологией. Анксиолитик с антигистаминным и антихолинергическим действием гидроскизин может быть эффективен у пациентов с данной патологией [94].

Ограничения применения, побочные эффекты и лекарственные взаимо-

действия. Наиболее распространенные побочные эффекты бензодиазепинов включают седацию, головокружение, падения, угнетение дыхания, нарушение координации и спутанность сознания [76, 93]. У онкологических пациентов бензодиазепины противопоказаны при угнетении дыхания или брадикардии. Некоторые побочные эффекты бензодиазепинов, а именно седация, головокружение и нарушение координации движений, могут способствовать чувству усталости и слабости. В некоторых случаях применение бензодиазепинов может усугублять дезориентацию и нарушение памяти или даже вызывать парадоксальные эффекты (возбуждение, расторможенность) у пациентов с поражением центральной нервной системы [93]. Следует помнить, что длительное применение бензодиазепинов может способствовать развитию толерантности и потере эффективности. Как и большинство психотропных препаратов, бензодиазепины метаболизируются ферментной системой CYP450, что может привести к развитию лекарственных взаимодействий. При комбинировании бензодиазепинов с препаратами, угнетающими центральную нервную систему (например, с опиоидами), важно учитывать их синергические эффекты. Существует потенциальный риск угнетения дыхания в результате комбинированного применения опиоидов и бензодиазепинов. Также существует связь между риском передозировки опиоидов и приемом бензодиазепинов [94, 95]. Не было приведено никаких доказательств прямой связи риска передозировки опиоидов со снотворными препаратами «Z-drugs», однако на основании их сходных фармакологических свойств с бензодиазепинами, можно предположить возможный риск передозировки при совместном использовании с опиоидами [95].

Закключение. Психические расстройства, включая тревогу и депрессию, часто наблюдаются у пациентов с онкологическими заболеваниями. Психотерапия также может эффективно скорректировать симптомы, связанные с основным со-

стоянием и процессом его лечения. Несмотря на возможные побочные эффекты и взаимодействия с другими лекарствами, применение психотропных препаратов оправдано в многих случаях. Правильно подобранные и назначенные психотропные препараты могут значительно улучшить качество жизни и результаты лечения онкологических пациентов.

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. Mitchell AJ, Chan M, Bhatti H, et al. Prevalence of depression, anxiety, and adjustment disorder in oncological, haematological, and palliative-care settings: a meta-analysis of 94 interview-based studies. *The Lancet Oncology*. 2011;12(2):160-174. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70002-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70002-X)
2. Anuk D, Özkan M, Kizir A, et al. The characteristics and risk factors for common psychiatric disorders in patients with cancer seeking help for mental health. *BMC Psychiatry*. 2019;19(1):269. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12888-019-2251-z>
3. Brocken P, Prins JB, Dekhuijzen PNR, et al. The faster the better?—A systematic review on distress in the diagnostic phase of suspected cancer, and the influence of rapid diagnostic pathways. *Psycho-Oncology*. 2012;21(1):1-10. DOI: <https://doi.org/10.1002/pon.1929>
4. Grassi L. Psychiatric and psychosocial implications in cancer care: the agenda of psycho-oncology. *Epidemiology and Psychiatric Sciences*. 2020;29:e89. DOI: <https://doi.org/10.1017/S2045796019000829>
5. Desplenter F, Bond C, Watson M, et al. Incidence and drug treatment of emotional distress after cancer diagnosis: a matched primary care case-control study. *British Journal of Cancer*. 2012;107(9):1644-1651. DOI: <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.364>
6. Hallet J, Davis LE, Isenberg-Grzeda E, et al. Gaps in the Management of Depression Symptoms Following Cancer Diagnosis: A Population-Based Analysis of Prospective Patient-Reported Outcomes. *The Oncologist*. 2020;25(7):e1098-e1108. DOI: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2019-0709>
7. Ng CG, Boks MP, Smeets HM, et al. Prescription patterns for psychotropic drugs in cancer patients; a large population study in the Netherlands. *Psycho-Oncology*. 2013;22(4):762-767. DOI: <https://doi.org/10.1002/pon.3056>
8. Jazzar U, Bergerot CD, Shan Y, et al. Use of psychotropic drugs among older patients with bladder cancer in the United States. *Psycho-Oncology*. 2021;30(6):832-843. DOI: <https://doi.org/10.1002/pon.5641>
9. Sato I, Onishi H, Yamada S, et al. Prevalence and initial prescription of psychotropics in patients with common cancers in Japan, based on a nationwide health insurance claims database. *Psycho-Oncology*. 2018;27(2):450-457. DOI: <https://doi.org/10.1002/pon.4511>
10. Thekdi SM, Trinidad A, Roth A. Psychopharmacology in cancer. *Current Psychiatry Reports*. 2015;17(1):529. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11920-014-0529-x>
11. Henry BJ. Symptom Management in Oncology: Depression and Anxiety. *Seminars in Oncology Nursing*. 2022;38(1):151251. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2022.151251>
12. Grassi L, Caruso R, Hammelef K, et al. Efficacy and safety of pharmacotherapy in cancer-related psychiatric disorders across the trajectory of cancer care: a review. *International Review of Psychiatry*. 2014;26(1):44-62. DOI: <https://doi.org/10.3109/09540261.2013.842542>
13. De Fazio P, Barberi A, Caglioti F, et al. Mental adjustment to cancer: the role of anxious and depressive symptoms under treatment. *International Journal of Psychiatry in Medicine*. 2013;46(4):375-386. DOI: <https://doi.org/10.2190/PM.46.4.d>
14. Strong V, Waters R, Hibberd C, et al. Management of depression for people with cancer (SMaRT oncology 1): a randomised trial. *The Lancet*. 2008;372(9632):40-48. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60991-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60991-5)
15. Holland JC, Romano SJ, Heiligenstein JH, et al. A controlled trial of fluoxetine and desipramine in depressed women with advanced

cancer. *Psycho-Oncology*. 1998;7(4):291-300. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1611\(199807/08\)7:4<291::AID-PON361>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1611(199807/08)7:4<291::AID-PON361>3.0.CO;2-U)

16. Fisch MJ, Loehrer PJ, Kristeller J, et al. Fluoxetine versus placebo in advanced cancer outpatients: a double-blinded trial of the Hoosier Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology*. 2003;21(10):1937-1943. DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.08.025>

17. Tynan RJ, Weidenhofer J, Hinwood M, et al. A comparative examination of the anti-inflammatory effects of SSRI and SNRI antidepressants on LPS stimulated microglia. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2012;26(3):469-479. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.12.011>

18. Mun AR, Lee SJ, Kim GB, et al. Fluoxetine-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Anticancer Research*. 2013;33(9):3691-3697.

19. Laoutidis ZG, Mathiak K. Antidepressants in the treatment of depression/depressive symptoms in cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *BMC Psychiatry*. 2013;13:140. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-244X-13-140>

20. Li M, Kennedy EB, Byrne N, et al. Management of Depression in Patients With Cancer: A Clinical Practice Guideline. *Journal of Oncology Practice*. 2016;12(8):747-756. DOI: <https://doi.org/10.1200/JOP.2016.011072>

21. Caruso R, Nanni MG, Riba MB, et al. The burden of psychosocial morbidity related to cancer: patient and family issues. *International Review of Psychiatry*. 2017;29(5):389-402. DOI: <https://doi.org/10.1080/09540261.2017.1288090>

22. Smith MY, Redd WH, Peyser C, et al. Post-traumatic stress disorder in cancer: a review. *Psycho-Oncology*. 1999;8(6):521-537. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1611\(199911/12\)8:6<521::AID-PON423>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1611(199911/12)8:6<521::AID-PON423>3.0.CO;2-X)

23. Rustad JK, David D, Currier MB. Cancer and post-traumatic stress disorder: diagnosis, pathogenesis and treatment considerations. *Palliative and Supportive Care*. 2012;10(3):213-223. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1478951511000897>

24. Baldwin DS, Anderson IM, Nutt DJ, et al. Evidence-based pharmacological treatment of anxiety disorders, post-traumatic stress disorder and obsessive-compulsive disorder: a revision of the 2005 guidelines from the British Association for Psychopharmacology. *Journal of Psychopharmacology*. 2014;28(5):403-439. DOI: <https://doi.org/10.1177/0269881114525674>

25. Караваева ТА, Васильева АВ, Семиглазова ТЮ. Особенности психофармакотерапии онкологических больных с тревожными расстройствами. *Вопросы онкологии*. 2018;64(5):651-655. DOI: <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2018-64-5-651-655>

26. Spiegel D, Riba MB. Managing anxiety and depression during treatment. *Breast J*. 2015;21(1):97-103. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbj.12355>

27. Lin CY, Cheng ASK, Nejati B, et al. A thorough psychometric comparison between Athens Insomnia Scale and Insomnia Severity Index among patients with advanced cancer. *Journal of Sleep Research*. 2020;29(1):e12891. DOI: <https://doi.org/10.1111/jsr.12891>

28. Jongen JLM, Huijsman ML, Jessurun J, et al. The evidence for pharmacologic treatment of neuropathic cancer pain: beneficial and adverse effects. *Journal of Pain and Symptom Management*. 2013;46(4):581-590. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpainsym-man.2012.10.230>

29. Chapman EJ, Edwards Z, Boland JW, et al. Practice review: Evidence-based and effective management of pain in patients with advanced cancer. *Palliative Medicine*. 2020;34(4):444-453. DOI: <https://doi.org/10.1177/0269216319896955>

30. Gül ŞK, Tepetam H, Gül HL. Duloxetine and pregabalin in neuropathic pain of lung cancer patients. *Brain and Behavior*. 2020;10(3):e01527. DOI: <https://doi.org/10.1002/brb3.1527>

31. Smith EML, Pang H, Cirrincione C, et al. Effect of duloxetine on pain, function, and quality of life among patients with chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy: a randomized clinical trial. *Journal of the American Medical Association*. 2013;309(13):1359-1367. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2013.2813>

32. Matsuoka H, Makimura C, Koyama A, et al. Pilot study of duloxetine for cancer patients with neuropathic pain non-responsive to pregabalin. *Anticancer Research*. 2012;32(5):1805-1809.

33. Morrow PKH, Mattair DN, Hortobagyi GN. Hot flashes: a review of pathophysiology and treatment modalities. *The Oncologist*. 2011;16(11):1658-1664. DOI: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2011-0174>

34. Loprinzi CL, Sloan JA, Perez EA, et al. Phase III evaluation of fluoxetine for treatment of hot flashes. *Journal of Clinical Oncology*.

- 2002;20(6):1578-1583. DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.20.6.1578>
35. Kimmick GG, Lovato J, McQuellon R, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study of sertraline (Zoloft) for the treatment of hot flashes in women with early stage breast cancer taking tamoxifen. *The Breast Journal*. 2006;12(2):114-122. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1075-122X.2006.00218.x>
36. Biglia N, Bounous VE, Susini T, et al. Duloxetine and escitalopram for hot flushes: efficacy and compliance in breast cancer survivors. *European Journal of Cancer Care*. 2018;27(1):e12484. DOI: <https://doi.org/10.1111/ecc.12484>
37. Loprinzi CL, Kugler JW, Sloan JA, et al. Venlafaxine in management of hot flashes in survivors of breast cancer: a randomised controlled trial. *The Lancet*. 2000;356(9247):2059-2063. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03403-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03403-6)
38. Kast RE, Foley KF. Cancer chemotherapy and cachexia: mirtazapine and olanzapine are 5-HT₃ antagonists with good antinausea effects. *European Journal of Cancer Care*. 2007;16(4):351-354. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2354.2006.00760.x>
39. Riechelmann RP, Burman D, Tannock IF, et al. Phase II trial of mirtazapine for cancer-related cachexia and anorexia. *American Journal of Hospice and Palliative Medicine*. 2010;27(2):106-110. DOI: <https://doi.org/10.1177/1049909109345685>
40. Miguel C, Albuquerque E. Drug interaction in psycho-oncology: antidepressants and antineoplastics. *Pharmacology*. 2011;88(5-6):333-339. DOI: <https://doi.org/10.1159/000334738>
41. Turossi-Amorim ED, Camargo B, Nascimento DZ, et al. Potential Drug Interactions Between Psychotropics and Intravenous Chemotherapeutics Used by Patients With Cancer. *Journal of Pharmacy Technology*. 2022;38(3):159-168. DOI: <https://doi.org/10.1177/87551225211073942>
42. Wedret JJ, Tu TG, Paul D, et al. Interactions between antidepressants, sleep aids and selected breast cancer therapy. *Mental Illness*. 2019;11(1):36-38. DOI: <https://doi.org/10.1108/mi.2019.8115>
43. Regan MM, Leyland-Jones B, Bouzyk M, et al. CYP2D6 genotype and tamoxifen response in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: the breast international group 1-98 trial. *Journal of the National Cancer Institute*. 2012;104(6):441-451. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/djs125>
44. Rae JM, Drury S, Hayes DF, et al. CYP2D6 and UGT2B7 genotype and risk of recurrence in tamoxifen-treated breast cancer patients. *Journal of the National Cancer Institute*. 2012;104(6):452-460. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/djs126>
45. Zembutsu H, Sasa M, Kiyotani K, et al. Should CYP2D6 inhibitors be administered in conjunction with tamoxifen? *Expert Review of Anti-cancer Therapy*. 2011;11(2):185-193. DOI: <https://doi.org/10.1586/era.10.228>
46. Bradbury M, Hutton B, Beltran-Bless AA, et al. Time to Update Evidence-Based Guideline Recommendations About Concurrent Tamoxifen and Antidepressant Use? A Systematic Review. *Clinical Breast Cancer*. 2022;22(3):e362-e373. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2021.10.003>
47. Pasquini M, Specia A, Biondi M. Quetiapine for tamoxifen-induced insomnia in women with breast cancer. *Psychosomatics*. 2009;50(2):159-161. DOI: <https://doi.org/10.1176/appi.psy.50.2.159>
48. Prommer E. Olanzapine: palliative medicine update. *American Journal of Hospice and Palliative Medicine*. 2013;30(1):75-82. DOI: <https://doi.org/10.1177/1049909112441241>
49. Šoukalová Z. Olanzapine in oncology palliative care. *Klinická Onkologie*. 2022;35(4):276-283. DOI: <https://doi.org/10.48095/ccko2022276>
50. Peled O, Lavan O, Stein J, et al. Psychopharmacology in the Pediatric Oncology and Bone Marrow Transplant Units: Antipsychotic Medications Palliate Symptoms in Children with Cancer. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*. 2020;30(8):486-494. DOI: <https://doi.org/10.1089/cap.2019.0164>
51. Murray-Brown F, Dorman S. Haloperidol for the treatment of nausea and vomiting in palliative care patients. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2015;2015(11):CD006271. DOI: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006271.pub3>
52. Cox L, Darvill E, Dorman S. Levomepromazine for nausea and vomiting in palliative care. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2015;2015(11):CD009420. DOI: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009420.pub3>
53. Dorman S, Perkins P. Droperidol for treatment of nausea and vomiting in palliative care patients. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2010;10:CD006938. DOI: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006938.pub2>

54. Yoodee J, Permsuwan U, Nimworapan M. Efficacy and safety of olanzapine for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting: A systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2017;112:113-125. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.02.017>
55. Navari RM, Qin R, Ruddy KJ, et al. Olanzapine for the Prevention of Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(2):134-142. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1515725>
56. Flank J, Thackray J, Nielson D, et al. Olanzapine for treatment and prevention of acute chemotherapy-induced vomiting in children: a retrospective, multi-center review. *Pediatric Blood and Cancer*. 2015;62(3):496-501. DOI: <https://doi.org/10.1002/pbc.25286>
57. Okamoto H, Shono K, Nozaki-Taguchi N. Low-dose of olanzapine has ameliorating effects on cancer-related anorexia. *Cancer Management and Research*. 2019;11:2233-2239. DOI: <https://doi.org/10.2147/CMAR.S191330>
58. Naing A, Dalal S, Abdelrahim M, et al. Olanzapine for cachexia in patients with advanced cancer: an exploratory study of effects on weight and metabolic cytokines. *Supportive Care in Cancer*. 2015;23(9):2649-2654. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00520-015-2625-9>
59. Shinjo T, Okada M. Olanzapine use in cancer patients for refractory vomiting. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2006;33(3):349-352. Japanese. DOI: <https://doi.org/10.2217/14750708.3.3.349>
60. Hosie A, Davidson PM, Agar M, et al. Delirium prevalence, incidence, and implications for screening in specialist palliative care inpatient settings: a systematic review. *Palliative Medicine*. 2013;27(6):486-498. DOI: <https://doi.org/10.1177/0269216312457214>
61. Hui D, De La Cruz M, Bruera E. Palliative care for delirium in patients in the last weeks of life: the final frontier. *Journal of Palliative Care*. 2014;30(4):259-264. DOI: <https://doi.org/10.1177/082585971403000403>
62. Hui D, Reddy A, Palla S, et al. Neuroleptic prescription pattern for delirium in patients with advanced cancer. *Journal of Palliative Care*. 2011;27(2):141-147. DOI: <https://doi.org/10.1177/082585971102700210>
63. Hui D, Dev R, Bruera E. Neuroleptics in the management of delirium in patients with advanced cancer. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*. 2016;10(4):316-323. DOI: <https://doi.org/10.1097/SPC.0000000000000236>
64. Gaertner J, Eychmueller S, Leyhe T, et al. Benzodiazepines and/or neuroleptics for the treatment of delirium in palliative care?-a critical appraisal of recent randomized controlled trials. *Annals of palliative medicine*. 2019;8(4):504-515. DOI: <https://doi.org/10.21037/apm.2019.03.06>
65. Prommer E. Role of haloperidol in palliative medicine: an update. *American Journal of Hospice and Palliative Medicine*. 2012;29(4):295-301. DOI: <https://doi.org/10.1177/1049909111423094>
66. Crawford GB, Agar MM, Quinn SJ, et al. Pharmacovigilance in hospice/palliative care: net effect of haloperidol for delirium. *Journal of Palliative Care*. 2013;16(11):1335-1341. DOI: <https://doi.org/10.1089/jpm.2013.0230>
67. Hui D, Frisbee-Hume S, Wilson A, et al. Effect of Lorazepam With Haloperidol vs Haloperidol Alone on Agitated Delirium in Patients With Advanced Cancer Receiving Palliative Care: A Randomized Clinical Trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2017;318(11):1047-1056. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2017.11468>
68. Hasuo H, Kanbara K, Fujii R, et al. Factors Associated with the Effectiveness of Intravenous Administration of Chlorpromazine for Delirium in Patients with Terminal Cancer. *Journal of Palliative Medicine*. 2018;21(9):1257-1264. DOI: <https://doi.org/10.1089/jpm.2017.0669>
69. Okuyama T, Yoshiuchi K, Ogawa A, et al. Current Pharmacotherapy Does Not Improve Severity of Hypoactive Delirium in Patients with Advanced Cancer: Pharmacological Audit Study of Safety and Efficacy in Real World (Phase-R). *The Oncologist*. 2019;24(7):e574-e582. DOI: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2018-0242>
70. Sato I, Onishi H, Kawanishi C, et al. Neuroleptic malignant syndrome in patients with cancer: a systematic review. *BMJ Supportive and Palliative Care*. 2020;10(3):265-270. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmjspcare-2020-002200>
71. Rivière J, van der Mast RC, Vandenberghe J, et al. Efficacy and Tolerability of Atypical Antipsychotics in the Treatment of Delirium: A Systematic Review of the Literature. *Psychosomatics*. 2019;60(1):18-26. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psych.2018.05.011>
72. Mittal D, Jimerson NA, Neely EP, et al. Risperidone in the treatment of delirium: results from a prospective open-label trial. *Journal of Clinical Psychiatry*. 2004;65(5):662-667. DOI: <https://doi.org/10.4088/jcp.v65n0510>

73. Grover S, Kumar V, Chakrabarti S. Comparative efficacy study of haloperidol, olanzapine and risperidone in delirium. *Journal of Psychosomatic Research*. 2011;71(4):277-281. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2011.01.019>
74. Catalá-López F, Suárez-Pinilla M, Suárez-Pinilla P, et al. Inverse and direct cancer comorbidity in people with central nervous system disorders: a meta-analysis of cancer incidence in 577,013 participants of 50 observational studies. *Psychotherapy and Psychosomatics*. 2014;83(2):89-105. DOI: <https://doi.org/10.1159/000356498>
75. Pettersson D, Gissler M, Hällgren J, et al. The overall and sex- and age-group specific incidence rates of cancer in people with schizophrenia: a population-based cohort study. *Epidemiology and Psychiatric Sciences*. 2020;29:e132. DOI: <https://doi.org/10.1017/S204579602000044X>
76. Taipale H, Solmi M, Lähteenvuo M, et al. Antipsychotic use and risk of breast cancer in women with schizophrenia: a nationwide nested case-control study in Finland. *The Lancet Psychiatry*. 2021;8(10):883-891. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(21\)00241-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(21)00241-8)
77. Rahman T, Clevenger CV, Kaklamani V, et al. Antipsychotic treatment in breast cancer patients. *American Journal of Psychiatry*. 2014;171(6):616-621. DOI: <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2013.13050650>
78. Zun LS. Evidence-Based Review Of Pharmacotherapy For Acute Agitation. Part 2: Safety. *Journal of Emergency Medicine*. 2018;54(4):522-532. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jemermed.2017.11.031>
79. Liperoti R, Gambassi G, Lapane KL, et al. Conventional and atypical antipsychotics and the risk of hospitalization for ventricular arrhythmias or cardiac arrest. *Archives of Internal Medicine*. 2005;165(6):696-701. DOI: <https://doi.org/10.1001/archinte.165.6.696>
80. Coppola C, Rienzo A, Piscopo G, et al. Management of QT prolongation induced by anti-cancer drugs: Target therapy and old agents. Different algorithms for different drugs. *Cancer Treatment Reviews*. 2018;63:135-143. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.11.009>
81. Leucht S, Cipriani A, Spineli L, et al. Comparative efficacy and tolerability of 15 antipsychotic drugs in schizophrenia: a multiple-treatments meta-analysis. *The Lancet*. 2013;382(9896):951-962. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60733-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60733-3)
82. Jönsson AK, Schill J, Olsson H, et al. Venous Thromboembolism During Treatment with Antipsychotics: A Review of Current Evidence. *CNS Drugs*. 2018;32(1):47-64. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40263-018-0495-7>
83. Maeda I, Ogawa A, Yoshiuchi K, et al. Safety and effectiveness of antipsychotic medication for delirium in patients with advanced cancer: A large-scale multicenter prospective observational study in real-world palliative care settings. *General Hospital Psychiatry*. 2020;67:35-41. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.genhosppsych.2020.09.001>
84. Yokomichi N, Maeda I, Morita T, et al. Association of Antipsychotic Dose With Survival of Advanced Cancer Patients With Delirium. *Journal of Pain and Symptom Management*. 2022;64(1):28-36. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpainsymman.2022.03.005>
85. Dündar Y, Dodd S, Strobl J, et al. Comparative efficacy of newer hypnotic drugs for the short-term management of insomnia: a systematic review and meta-analysis. *Human Psychopharmacology*. 2004;19(5):305-322. DOI: <https://doi.org/10.1002/hup.594>
86. Terzano MG, Rossi M, Palomba V, et al. New drugs for insomnia: comparative tolerability of zopiclone, zolpidem and zaleplon. *Drug Safety*. 2003;26(4):261-282. DOI: <https://doi.org/10.2165/00002018-200326040-00004>
87. Rosenberg R, Murphy P, Zammit G, et al. Comparison of Lemborexant With Placebo and Zolpidem Tartrate Extended Release for the Treatment of Older Adults With Insomnia Disorder: A Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA network open*. 2019;2(12):e1918254. DOI: <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2019.18254>
88. Terada T, Hirayama T, Sadahiro R, et al. Pilot Study of Lemborexant for Insomnia in Cancer Patients with Delirium. *Journal of Palliative Medicine*. 2022;25(5):797-801. DOI: <https://doi.org/10.1089/jpm.2021.0509>
89. Lindqvist O, Lundquist G, Dickman A, et al. Four essential drugs needed for quality care of the dying: a Delphi-study based international expert consensus opinion. *Journal of Palliative Medicine*. 2013;16(1):38-43. DOI: <https://doi.org/10.1089/jpm.2012.0205>
90. Lo B, Rubenfeld G. Palliative sedation in dying patients: “we turn to it when everything

else hasn't worked." JAMA - Journal of the American Medical Association. 2005;294(14):1810-1816. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.294.14.1810>

91. Calvo-Espinos C, Ruiz de Gaona E, Gonzalez C, et al. Palliative sedation for cancer patients included in a home care program: a retrospective study. Palliative and Supportive Care. 2015;13(3):619-624. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1478951514000200>

92. Lux MR, Protus BM, Kimbrel J, et al. A Survey of Hospice and Palliative Care Physicians Regarding Palliative Sedation Practices. American Journal of Hospice and Palliative Medicine. 2017;34(3):217-222. DOI: <https://doi.org/10.1177/1049909115615128>

93. Testa A, Giannuzzi R, Sollazzo F, et al. Psychiatric emergencies (part II): psychiatric disorders coexisting with organic diseases. European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 2013;17(Suppl 1):65-85.

94. Le Gall-Ianotto C, Verdet R, Nowak E, et al. Rationale and design of the multicentric, double-blind, double-placebo, randomized trial Aprepitant versus Hydroxyzine in association with cytoreductive treatments for patients with myeloproliferative neoplasia suffering from Persistent Aquagenic Pruritus. Trial acronym: APHY PAP. Trials. 2021;22(1):938. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13063-021-05864-8>

95. Atack JR. Anxiolytic compounds acting at the GABA(A) receptor benzodiazepine binding site. Current Drug Targets: CNS and Neurological Disorders. 2003;2(4):213-232. DOI: <https://doi.org/10.2174/1568007033482841>

References

1. Mitchell AJ, Chan M, Bhatti H, et al. Prevalence of depression, anxiety, and adjustment disorder in oncological, haematological, and palliative-care settings: a meta-analysis of 94 interview-based studies. The Lancet Oncology. 2011;12(2):160-174. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70002-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70002-X)

2. Anuk D, Özkan M, Kizir A, et al. The characteristics and risk factors for common psychiatric disorders in patients with cancer seeking help for mental health. BMC Psychiatry. 2019;19(1):269. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12888-019-2251-z>

3. Brocken P, Prins JB, Dekhuijzen PNR, et al. The faster the better? – A systematic review on distress in the diagnostic phase of suspected cancer, and the influence of rapid diagnostic pathways.

Psycho-Oncology. 2012;21(1):1-10. DOI: <https://doi.org/10.1002/pon.1929>

4. Grassi L. Psychiatric and psychosocial implications in cancer care: the agenda of psycho-oncology. Epidemiology and Psychiatric Sciences. 2020;29:e89. DOI: <https://doi.org/10.1017/S2045796019000829>

5. Desplenter F, Bond C, Watson M, et al. Incidence and drug treatment of emotional distress after cancer diagnosis: a matched primary care case-control study. British Journal of Cancer. 2012;107(9):1644-1651. DOI: <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.364>

6. Hallet J, Davis LE, Isenberg-Grzeda E, et al. Gaps in the Management of Depression Symptoms Following Cancer Diagnosis: A Population-Based Analysis of Prospective Patient-Reported Outcomes. The Oncologist. 2020;25(7):e1098-e1108. DOI: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2019-0709>

7. Ng CG, Boks MP, Smeets HM, et al. Prescription patterns for psychotropic drugs in cancer patients; a large population study in the Netherlands. Psycho-Oncology. 2013;22(4):762-767. DOI: <https://doi.org/10.1002/pon.3056>

8. Jazsar U, Bergerot CD, Shan Y, et al. Use of psychotropic drugs among older patients with bladder cancer in the United States. Psycho-Oncology. 2021;30(6):832-843. DOI: <https://doi.org/10.1002/pon.5641>

9. Sato I, Onishi H, Yamada S, et al. Prevalence and initial prescription of psychotropics in patients with common cancers in Japan, based on a nationwide health insurance claims database. Psycho-Oncology. 2018;27(2):450-457. DOI: <https://doi.org/10.1002/pon.4511>

10. Thekdi SM, Trinidad A, Roth A. Psychopharmacology in cancer. Current Psychiatry Reports. 2015;17(1):529. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11920-014-0529-x>

11. Henry BJ. Symptom Management in Oncology: Depression and Anxiety. Seminars in Oncology Nursing. 2022;38(1):151251. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2022.151251>

12. Grassi L, Caruso R, Hammelef K, et al. Efficacy and safety of pharmacotherapy in cancer-related psychiatric disorders across the trajectory of cancer care: a review. International Review of Psychiatry. 2014;26(1):44-62. DOI: <https://doi.org/10.3109/09540261.2013.842542>

13. De Fazio P, Barberi A, Caglioti F, et al. Mental adjustment to cancer: the role of anxious and depressive symptoms under treatment. International Journal of Psychiatry in Medicine.

- 2013;46(4):375-386. DOI: <https://doi.org/10.2190/PM.46.4.d>
14. Strong V, Waters R, Hibberd C, et al. Management of depression for people with cancer (SMaRT oncology 1): a randomised trial. *The Lancet*. 2008;372(9632):40-48. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60991-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60991-5)
15. Holland JC, Romano SJ, Heiligenstein JH, et al. A controlled trial of fluoxetine and desipramine in depressed women with advanced cancer. *Psycho-Oncology*. 1998;7(4):291-300. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1611\(199807/08\)7:4<291::AID-PON361>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1611(199807/08)7:4<291::AID-PON361>3.0.CO;2-U)
16. Fisch MJ, Loehrer PJ, Kristeller J, et al. Fluoxetine versus placebo in advanced cancer outpatients: a double-blinded trial of the Hoosier Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology*. 2003;21(10):1937-1943. DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.08.025>
17. Tynan RJ, Weidenhofer J, Hinwood M, et al. A comparative examination of the anti-inflammatory effects of SSRI and SNRI antidepressants on LPS stimulated microglia. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2012;26(3):469-479. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.12.011>
18. Mun AR, Lee SJ, Kim GB, et al. Fluoxetine-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Anticancer Research*. 2013;33(9):3691-3697.
19. Laoutidis ZG, Mathiak K. Antidepressants in the treatment of depression/depressive symptoms in cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *BMC Psychiatry*. 2013;13:140. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-244X-13-140>
20. Li M, Kennedy EB, Byrne N, et al. Management of Depression in Patients With Cancer: A Clinical Practice Guideline. *Journal of Oncology Practice*. 2016;12(8):747-756. DOI: <https://doi.org/10.1200/JOP.2016.011072>
21. Caruso R, Nanni MG, Riba MB, et al. The burden of psychosocial morbidity related to cancer: patient and family issues. *International Review of Psychiatry*. 2017;29(5):389-402. DOI: <https://doi.org/10.1080/09540261.2017.1288090>
22. Smith MY, Redd WH, Peyser C, et al. Post-traumatic stress disorder in cancer: a review. *Psycho-Oncology*. 1999;8(6):521-537. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1611\(199911/12\)8:6<521::AID-PON423>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1611(199911/12)8:6<521::AID-PON423>3.0.CO;2-X)
23. Rustad JK, David D, Currier MB. Cancer and post-traumatic stress disorder: diagnosis, pathogenesis and treatment considerations. *Palliative and Supportive Care*. 2012;10(3):213-223. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1478951511000897>
24. Baldwin DS, Anderson IM, Nutt DJ, et al. Evidence-based pharmacological treatment of anxiety disorders, post-traumatic stress disorder and obsessive-compulsive disorder: a revision of the 2005 guidelines from the British Association for Psychopharmacology. *Journal of Psychopharmacology*. 2014;28(5):403-439. DOI: <https://doi.org/10.1177/0269881114525674>
25. Karavaeva TA, Vasilyeva AV, Semiglazova TY. The psychopharmacotherapy specific in oncology patients with anxiety disorders. *Voprosy onkologii*. 2018;64(5):651-655. Russian. DOI: <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2018-64-5-651-655>
26. Spiegel D, Riba MB. Managing anxiety and depression during treatment. *Breast J*. 2015;21(1):97-103. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbj.12355>
27. Lin CY, Cheng ASK, Nejati B, et al. A thorough psychometric comparison between Athens Insomnia Scale and Insomnia Severity Index among patients with advanced cancer. *Journal of Sleep Research*. 2020;29(1):e12891. DOI: <https://doi.org/10.1111/jsr.12891>
28. Jongen JLM, Huijsman ML, Jessurun J, et al. The evidence for pharmacologic treatment of neuropathic cancer pain: beneficial and adverse effects. *Journal of Pain and Symptom Management*. 2013;46(4):581-590. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpainsym-man.2012.10.230>
29. Chapman EJ, Edwards Z, Boland JW, et al. Practice review: Evidence-based and effective management of pain in patients with advanced cancer. *Palliative Medicine*. 2020;34(4):444-453. DOI: <https://doi.org/10.1177/0269216319896955>
30. Gül ŞK, Tepetam H, Gül HL. Duloxetine and pregabalin in neuropathic pain of lung cancer patients. *Brain and Behavior*. 2020;10(3):e01527. DOI: <https://doi.org/10.1002/brb3.1527>
31. Smith EML, Pang H, Cirrincione C, et al. Effect of duloxetine on pain, function, and quality of life among patients with chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy: a randomized clinical trial. *Journal of the American Medical Association*. 2013;309(13):1359-1367. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2013.2813>
32. Matsuoka H, Makimura C, Koyama A, et al. Pilot study of duloxetine for cancer patients with neuropathic pain non-responsive to pregabalin. *Anticancer Research*. 2012;32(5):1805-1809.

33. Morrow PKH, Mattair DN, Hortobagyi GN. Hot flashes: a review of pathophysiology and treatment modalities. *The Oncologist*. 2011;16(11):1658-1664. DOI: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2011-0174>
34. Loprinzi CL, Sloan JA, Perez EA, et al. Phase III evaluation of fluoxetine for treatment of hot flashes. *Journal of Clinical Oncology*. 2002;20(6):1578-1583. DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.20.6.1578>
35. Kimmick GG, Lovato J, McQuellon R, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study of sertraline (Zoloft) for the treatment of hot flashes in women with early stage breast cancer taking tamoxifen. *The Breast Journal*. 2006;12(2):114-122. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1075-122X.2006.00218.x>
36. Biglia N, Bounous VE, Susini T, et al. Duloxetine and escitalopram for hot flushes: efficacy and compliance in breast cancer survivors. *European Journal of Cancer Care*. 2018;27(1):e12484. DOI: <https://doi.org/10.1111/ecc.12484>
37. Loprinzi CL, Kugler JW, Sloan JA, et al. Venlafaxine in management of hot flashes in survivors of breast cancer: a randomised controlled trial. *The Lancet*. 2000;356(9247):2059-2063. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03403-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03403-6)
38. Kast RE, Foley KF. Cancer chemotherapy and cachexia: mirtazapine and olanzapine are 5-HT₃ antagonists with good antinausea effects. *European Journal of Cancer Care*. 2007;16(4):351-354. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2354.2006.00760.x>
39. Riechelmann RP, Burman D, Tannock IF, et al. Phase II trial of mirtazapine for cancer-related cachexia and anorexia. *American Journal of Hospice and Palliative Medicine*. 2010;27(2):106-110. DOI: <https://doi.org/10.1177/1049909109345685>
40. Miguel C, Albuquerque E. Drug interaction in psycho-oncology: antidepressants and antineoplastics. *Pharmacology*. 2011;88(5-6):333-339. DOI: <https://doi.org/10.1159/000334738>
41. Turossi-Amorim ED, Camargo B, Nascimento DZ, et al. Potential Drug Interactions Between Psychotropics and Intravenous Chemotherapeutics Used by Patients With Cancer. *Journal of Pharmacy Technology*. 2022;38(3):159-168. DOI: <https://doi.org/10.1177/87551225211073942>
42. Wedret JJ, Tu TG, Paul D, et al. Interactions between antidepressants, sleep aids and selected breast cancer therapy. *Mental Illness*. 2019;11(1):36-38. DOI: <https://doi.org/10.1108/mi.2019.8115>
43. Regan MM, Leyland-Jones B, Bouzyk M, et al. CYP2D6 genotype and tamoxifen response in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: the breast international group 1-98 trial. *Journal of the National Cancer Institute*. 2012;104(6):441-451. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/djs125>
44. Rae JM, Drury S, Hayes DF, et al. CYP2D6 and UGT2B7 genotype and risk of recurrence in tamoxifen-treated breast cancer patients. *Journal of the National Cancer Institute*. 2012;104(6):452-460. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/djs126>
45. Zembutsu H, Sasa M, Kiyotani K, et al. Should CYP2D6 inhibitors be administered in conjunction with tamoxifen? Expert Review of Anti-cancer Therapy. 2011;11(2):185-193. DOI: <https://doi.org/10.1586/era.10.228>
46. Bradbury M, Hutton B, Beltran-Bless AA, et al. Time to Update Evidence-Based Guideline Recommendations About Concurrent Tamoxifen and Antidepressant Use? A Systematic Review. *Clinical Breast Cancer*. 2022;22(3):e362-e373. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2021.10.003>
47. Pasquini M, Specia A, Biondi M. Quetiapine for tamoxifen-induced insomnia in women with breast cancer. *Psychosomatics*. 2009;50(2):159-161. DOI: <https://doi.org/10.1176/appi.psy.50.2.159>
48. Prommer E. Olanzapine: palliative medicine update. *American Journal of Hospice and Palliative Medicine*. 2013;30(1):75-82. DOI: <https://doi.org/10.1177/1049909112441241>
49. Šoukalová Z. Olanzapine in oncology palliative care. *Klinická Onkologie*. 2022;35(4):276-283. DOI: <https://doi.org/10.48095/ccko2022276>
50. Peled O, Lavan O, Stein J, et al. Psychopharmacology in the Pediatric Oncology and Bone Marrow Transplant Units: Antipsychotic Medications Palliate Symptoms in Children with Cancer. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*. 2020;30(8):486-494. DOI: <https://doi.org/10.1089/cap.2019.0164>
51. Murray-Brown F, Dorman S. Haloperidol for the treatment of nausea and vomiting in palliative care patients. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2015;2015(11):CD006271. DOI: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006271.pub3>
52. Cox L, Darvill E, Dorman S. Levomepromazine for nausea and vomiting in palliative

care. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2015;2015(11):CD009420. DOI: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009420.pub3>

53.Dorman S, Perkins P. Droperidol for treatment of nausea and vomiting in palliative care patients. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2010;10:CD006938. DOI: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006938.pub2>

54.Yoodee J, Permsuwan U, Nimworapan M. Efficacy and safety of olanzapine for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting: A systematic review and meta-analysis. Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2017;112:113-125. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.02.017>

55.Navari RM, Qin R, Ruddy KJ, et al. Olanzapine for the Prevention of Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting. New England Journal of Medicine. 2016;375(2):134-142. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1515725>

56.Flank J, Thackray J, Nielson D, et al. Olanzapine for treatment and prevention of acute chemotherapy-induced vomiting in children: a retrospective, multi-center review. Pediatric Blood and Cancer. 2015;62(3):496-501. DOI: <https://doi.org/10.1002/pbc.25286>

57.Okamoto H, Shono K, Nozaki-Taguchi N. Low-dose of olanzapine has ameliorating effects on cancer-related anorexia. Cancer Management and Research. 2019;11:2233-2239. DOI: <https://doi.org/10.2147/CMAR.S191330>

58.Naing A, Dalal S, Abdelrahim M, et al. Olanzapine for cachexia in patients with advanced cancer: an exploratory study of effects on weight and metabolic cytokines. Supportive Care in Cancer. 2015;23(9):2649-2654. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00520-015-2625-9>

59.Shinjo T, Okada M. Olanzapine use in cancer patients for refractory vomiting. Gan To Kagaku Ryoho. 2006;33(3):349-352. Japanese. DOI: <https://doi.org/10.2217/14750708.3.3.349>

60.Hosie A, Davidson PM, Agar M, et al. Delirium prevalence, incidence, and implications for screening in specialist palliative care inpatient settings: a systematic review. Palliative Medicine. 2013;27(6):486-498. DOI: <https://doi.org/10.1177/0269216312457214>

61.Hui D, De La Cruz M, Bruera E. Palliative care for delirium in patients in the last weeks of life: the final frontier. Journal of Palliative Care. 2014;30(4):259-264. DOI:

<https://doi.org/10.1177/082585971403000403>

62.Hui D, Reddy A, Palla S, et al. Neuroleptic prescription pattern for delirium in patients with advanced cancer. Journal of Palliative Care. 2011;27(2):141-147. DOI: <https://doi.org/10.1177/082585971102700210>

63.Hui D, Dev R, Bruera E. Neuroleptics in the management of delirium in patients with advanced cancer. Current Opinion in Supportive and Palliative Care. 2016;10(4):316-323. DOI: <https://doi.org/10.1097/SPC.0000000000000236>

64.Gaertner J, Eychmueller S, Leyhe T, et al. Benzodiazepines and/or neuroleptics for the treatment of delirium in palliative care?-a critical appraisal of recent randomized controlled trials. Annals of palliative medicine. 2019;8(4):504-515. DOI: <https://doi.org/10.21037/apm.2019.03.06>

65.Prommer E. Role of haloperidol in palliative medicine: an update. American Journal of Hospice and Palliative Medicine. 2012;29(4):295-301. DOI: <https://doi.org/10.1177/1049909111423094>

66.Crawford GB, Agar MM, Quinn SJ, et al. Pharmacovigilance in hospice/palliative care: net effect of haloperidol for delirium. Journal of Palliative Care. 2013;16(11):1335-1341. DOI: <https://doi.org/10.1089/jpm.2013.0230>

67.Hui D, Frisbee-Hume S, Wilson A, et al. Effect of Lorazepam With Haloperidol vs Haloperidol Alone on Agitated Delirium in Patients With Advanced Cancer Receiving Palliative Care: A Randomized Clinical Trial. JAMA - Journal of the American Medical Association. 2017;318(11):1047-1056. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2017.11468>

68.Hasuo H, Kanbara K, Fujii R, et al. Factors Associated with the Effectiveness of Intravenous Administration of Chlorpromazine for Delirium in Patients with Terminal Cancer. Journal of Palliative Medicine. 2018;21(9):1257-1264. DOI: <https://doi.org/10.1089/jpm.2017.0669>

69.Okuyama T, Yoshiuchi K, Ogawa A, et al. Current Pharmacotherapy Does Not Improve Severity of Hypoactive Delirium in Patients with Advanced Cancer: Pharmacological Audit Study of Safety and Efficacy in Real World (Phase-R). The Oncologist. 2019;24(7):e574-e582. DOI: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2018-0242>

70.Sato I, Onishi H, Kawanishi C, et al. Neuroleptic malignant syndrome in patients with cancer: a systematic review. BMJ Supportive and Palliative Care. 2020;10(3):265-270. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmjspcare-2020-002200>

71. Rivière J, van der Mast RC, Vandenberghe J, et al. Efficacy and Tolerability of Atypical Antipsychotics in the Treatment of Delirium: A Systematic Review of the Literature. *Psychosomatics*. 2019;60(1):18-26. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psym.2018.05.011>
72. Mittal D, Jimerson NA, Neely EP, et al. Risperidone in the treatment of delirium: results from a prospective open-label trial. *Journal of Clinical Psychiatry*. 2004;65(5):662-667. DOI: <https://doi.org/10.4088/jcp.v65n0510>
73. Grover S, Kumar V, Chakrabarti S. Comparative efficacy study of haloperidol, olanzapine and risperidone in delirium. *Journal of Psychosomatic Research*. 2011;71(4):277-281. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2011.01.019>
74. Catalá-López F, Suárez-Pinilla M, Suárez-Pinilla P, et al. Inverse and direct cancer comorbidity in people with central nervous system disorders: a meta-analysis of cancer incidence in 577,013 participants of 50 observational studies. *Psychotherapy and Psychosomatics*. 2014;83(2):89-105. DOI: <https://doi.org/10.1159/000356498>
75. Pettersson D, Gissler M, Hällgren J, et al. The overall and sex- and age-group specific incidence rates of cancer in people with schizophrenia: a population-based cohort study. *Epidemiology and Psychiatric Sciences*. 2020;29:e132. DOI: <https://doi.org/10.1017/S204579602000044X>
76. Taipale H, Solmi M, Lähteenvuo M, et al. Antipsychotic use and risk of breast cancer in women with schizophrenia: a nationwide nested case-control study in Finland. *The Lancet Psychiatry*. 2021;8(10):883-891. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(21\)00241-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(21)00241-8)
77. Rahman T, Clevenger CV, Kaklamani V, et al. Antipsychotic treatment in breast cancer patients. *American Journal of Psychiatry*. 2014;171(6):616-621. DOI: <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2013.13050650>
78. Zun LS. Evidence-Based Review Of Pharmacotherapy For Acute Agitation. Part 2: Safety. *Journal of Emergency Medicine*. 2018;54(4):522-532. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jemermed.2017.11.031>
79. Liperoti R, Gambassi G, Lapane KL, et al. Conventional and atypical antipsychotics and the risk of hospitalization for ventricular arrhythmias or cardiac arrest. *Archives of Internal Medicine*. 2005;165(6):696-701. DOI: <https://doi.org/10.1001/archinte.165.6.696>
80. Coppola C, Rienzo A, Piscopo G, et al. Management of QT prolongation induced by anticancer drugs: Target therapy and old agents. Different algorithms for different drugs. *Cancer Treatment Reviews*. 2018;63:135-143. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.11.009>
81. Leucht S, Cipriani A, Spineli L, et al. Comparative efficacy and tolerability of 15 antipsychotic drugs in schizophrenia: a multiple-treatments meta-analysis. *The Lancet*. 2013;382(9896):951-962. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60733-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60733-3)
82. Jönsson AK, Schill J, Olsson H, et al. Venous Thromboembolism During Treatment with Antipsychotics: A Review of Current Evidence. *CNS Drugs*. 2018;32(1):47-64. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40263-018-0495-7>
83. Maeda I, Ogawa A, Yoshiuchi K, et al. Safety and effectiveness of antipsychotic medication for delirium in patients with advanced cancer: A large-scale multicenter prospective observational study in real-world palliative care settings. *General Hospital Psychiatry*. 2020;67:35-41. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.genhosppsych.2020.09.001>
84. Yokomichi N, Maeda I, Morita T, et al. Association of Antipsychotic Dose With Survival of Advanced Cancer Patients With Delirium. *Journal of Pain and Symptom Management*. 2022;64(1):28-36. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpainsym-man.2022.03.005>
85. Dündar Y, Dodd S, Strobl J, et al. Comparative efficacy of newer hypnotic drugs for the short-term management of insomnia: a systematic review and meta-analysis. *Human Psychopharmacology*. 2004;19(5):305-322. DOI: <https://doi.org/10.1002/hup.594>
86. Terzano MG, Rossi M, Palomba V, et al. New drugs for insomnia: comparative tolerability of zopiclone, zolpidem and zaleplon. *Drug Safety*. 2003;26(4):261-282. DOI: <https://doi.org/10.2165/00002018-200326040-00004>
87. Rosenberg R, Murphy P, Zammit G, et al. Comparison of Lemborexant With Placebo and Zolpidem Tartrate Extended Release for the Treatment of Older Adults With Insomnia Disorder: A Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA network open*. 2019;2(12):e1918254. DOI: <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2019.18254>
88. Terada T, Hirayama T, Sadahiro R, et al. Pilot Study of Lemborexant for Insomnia in Cancer

Patients with Delirium. *Journal of Palliative Medicine*. 2022;25(5):797-801. DOI: <https://doi.org/10.1089/jpm.2021.0509>

89. Lindqvist O, Lundquist G, Dickman A, et al. Four essential drugs needed for quality care of the dying: a Delphi-study based international expert consensus opinion. *Journal of Palliative Medicine*. 2013;16(1):38-43. DOI: <https://doi.org/10.1089/jpm.2012.0205>

90. Lo B, Rubenfeld G. Palliative sedation in dying patients: "we turn to it when everything else hasn't worked." *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2005;294(14):1810-1816. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.294.14.1810>

91. Calvo-Espinos C, Ruiz de Gaona E, Gonzalez C, et al. Palliative sedation for cancer patients included in a home care program: a retrospective study. *Palliative and Supportive Care*. 2015;13(3):619-624. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1478951514000200>

92. Lux MR, Protus BM, Kimbrel J, et al. A Survey of Hospice and Palliative Care Physicians Regarding Palliative Sedation Practices. *American Journal of Hospice and Palliative Medicine*. 2017;34(3):217-222. DOI: <https://doi.org/10.1177/1049909115615128>

93. Testa A, Giannuzzi R, Sollazzo F, et al. Psychiatric emergencies (part II): psychiatric disorders coexisting with organic diseases. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2013;17(Suppl 1):65-85.

94. Le Gall-Ianotto C, Verdet R, Nowak E, et al. Rationale and design of the multicentric, double-blind, double-placebo, randomized trial Aprepitant versus Hydroxyzine in association with cytoreductive treatments for patients with myeloproliferative neoplasia suffering from Persistent Aquagenic Pruritus. Trial acronym: APHYRAP. *Trials*. 2021;22(1):938. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13063-021-05864-8>

95. Atack JR. Anxiolytic compounds acting at the GABA(A) receptor benzodiazepine binding site. *Current Drug Targets: CNS and Neurological Disorders*. 2003;2(4):213-232. DOI: <https://doi.org/10.2174/1568007033482841>

Статья поступила в редакцию 29 сентября 2022 г.
Поступила после доработки 20 августа 2023 г.
Принята к печати 26 сентября 2023 г.

Received 29 September 2022

Revised 20 August 2023

Accepted 26 September 2023

Информация об авторах

Сергей Сергеевич Потанин, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории психофармакологии ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: potanin_ss@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9180-1940>.

Дарья Сергеевна Цапко, студент ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: ds.tsapko@ya.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5399-7041>.

Евгения Юрьевна Чибикова, врач-психиатр ООО «Нейрология», г. Самара, Российская Федерация, E-mail: nia.chibikova@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4795-594X>.

Алина Маратовна Сайфулина, врач-психиатр ООО «Майндсет», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: amsayfulina@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5867-7116>.

Таисия Алексеевна Лепилкина, кандидат психологических наук, научный сотрудник лаборатории психофармакологии ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: lepilkina@hotmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2640-4658>.

Information about the authors

Sergei S. Potanin, Cand. Sci. (Medicine), Senior Researcher at the Laboratory of Psychopharmacology, Mental Health Research Center, Moscow, Russia, E-mail: potanin_ss@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9180-1940>.

Darya S. Tsapko, Student, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia, E-mail: ds.tsapko@ya.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5399-7041>.

Evgeniia Y. Chibikova, Psychiatrist, Neurologia, Samara, Russia, E-mail: nia.chibikova@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4795-594X>.

Alina M. Sayfulina, Psychiatrist, Mindset, Moscow, Russia, E-mail: amsayfulina@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5867-7116>.

Taissia A. Lepilkina, Cand. Sci. (Psychology), Researcher at the Laboratory of Psychopharmacology, Mental Health Research Center, Moscow, Russia, E-mail: lepilkina@hotmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2640-4658>.



DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-2-0-9

УДК 575

Differential expression of CYP19A1 and lncRNA-CTBP1-AS in the granulosa cells of women with polycystic ovary syndrome

Ruba M. Ali¹ , Svetlana V. Lomteva² , Anzhela A. Aleksandrova^{1,3} ,
Karina Yu. Sagamonova^{2,4} , Artur S. Sagamonov⁴ , Manar N.A. Ammar¹ ,
Tatiana P. Shkurat^{1,3}

¹ Southern Federal University,
105/42 Bolshaya Sadovaya St., Rostov-on-Don, 344006, Russia

² Center for Human Reproduction and IVF,
90 Bodraya St., Rostov-on-Don, 344068, Russia

³ Nauka,
71/63b Chentsova St., Rostov-on-Don, 344037, Russia

⁴ Rostov State Medical University,
29 Nakhichevansky Ave., Rostov-on-Don, 344037, Russia

Corresponding author: Ruba M. Ali (ruba.m.ali@mail.ru)

Abstract

Background: Hyperandrogenism is the basic indicator of polycystic ovarian syndrome (PCOS) and a key factor in its pathological processes. Patients with PCOS have higher testosterone levels along with a decline in the estradiol/testosterone ratio, which may indicate an aromatase dysfunction. **The aim of the study:** Investigating the expression levels of CYP19A1 and lncRNA-CTBP1-AS in the granulosa cells (GCs) of women with and without PCOS. **Materials and methods:** We compared the expression levels of *CYP19A1* and *lncRNA-CTBP1-AS* in granulosa cells from 16 PCOS patients and 20 controls who underwent assisted reproductive technology (ART) treatment at the Center for Human Reproduction and IVF (Rostov-on-Don, Russia) using quantitative real-time PCR. **Results:** We observed a significant downregulation of *CYP19A1* expression in the GCs of PCOS patients, with expression levels approximately 4.7 times lower compared to the control group. Furthermore, we found a positive correlation between *CYP19A1* expression and the E2/T ratio in PCOS patients. Conversely, PCOS patients exhibited a remarkable upregulation of *CTBP1-AS* expression in their GCs, with levels up to 23 times higher than those in the control group. Importantly, we also identified a significant negative correlation between the expression level of *CTBP1-AS* and *CYP19A1* in the GCs of PCOS patients. **Conclusion:** Our results indicate a potential regulatory role of *CTBP1-AS* in *CYP19A1* expression and suggest its involvement in the pathogenesis of PCOS.

Keywords: PCOS; Polycystic ovarian Syndrome; lncRNA; CYP19A1; CTBP1-AS; gene expression

For citation: Ali RM, Lomteva SV, Aleksandrova AA, et al. Differential expression of CYP19A1 and lncRNA-CTBP1-AS in the granulosa cells of women with polycystic ovary syndrome. Research Results in Biomedicine. 2024;10(2):292-302. DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-2-0-9

Introduction. Polycystic ovarian syndrome (PCOS) is a common multifactorial endocrinological disorder, that affects around 4 to 20% of women aged 18 to 44 years [1]. It is thought to be the primary contributor to female infertility due to anovulation [2]. PCOS is highly heterogeneous and diagnosed by the presence of at least two of the following three criteria: hyperandrogenism, the polycystic morphology of the ovaries, and oligo- or anovulation. In PCOS, the steroid hormone imbalance and high levels of the luteinizing hormone (LH) lead to folliculogenesis disturbance and anovulation [3, 4]. During ovarian steroidogenesis, androstenedione and testosterone are synthesized in theca cells by CYP11A1, CYP17A1, and HSD17B, which are then converted to estrone and estradiol, respectively, by aromatase in granulosa cells (GCs) under FSH stimulation [5, 6]. Blood serum and follicular fluid (FF) testosterone and androstenedione levels are higher in PCOS patients compared to non-PCOS women, whereas the estradiol-to testosterone E2/T ratio is lower [7, 8, 9], which may indicate a defect in the estrogen biosynthesis mechanism, i.e., aromatase dysfunction.

Aromatase is the main enzyme responsible for the irreversible conversion of androstenedione and testosterone into estrogen and estradiol, respectively. It is encoded solely by the *CYP19A1* gene, which is located at ch15 q21.2 [10] and is mainly expressed in the ovaries, placenta, testis, adipose tissue, and brain. *CYP19A1* gene is regulated by a complex mechanism, the regulatory region is about 93 kb with more than 10 promoters that are activated differently in a tissue-specific manner [11]. Among these promoters, PII has been shown to be an essential promoter in GCs, and P.I.3 has been identified as a PII enhancer [12].

Recently, studying the role of lncRNAs in transcriptional and post-transcriptional modifications has attracted increasing attention. Dysregulated lncRNAs are involved in various diseases, such as cancer [13, 14], diabetes mellitus [15], cardiovascular diseases [16] and reproductive disorders [17, 18]. While several lncRNAs with altered levels have been observed in plasma, follicular fluid (FF), and

granulosa cells (GCs) of patients with PCOS [19-22], the full understanding of their pathological mechanisms remains elusive.

LncRNA c-terminal binding protein 1 antisense (*CTBP1-AS*) – an androgen receptor modulator – localizes in the antisense (AS) region of *CTBP1* in chr4 p16.3. *CTBP1* consists of 10 exons, while *CTBP1-AS* consists of 2 exons. Both are expressed in almost all tissues. But the expression of *CTBP1-AS* is much lower, according to the UCSC genome browser <https://genome-euro.ucsc.edu/>. Previous studies have revealed the involvement of *CTBP1-AS* in the regulation of androgen metabolism and its association with the androgen receptor (AR) signaling pathway in prostate cancer [23]. Furthermore, other research has identified CTBP1 as a transcriptional regulator of *CYP19* in prostate cancer [24]. Moreover, a recent study has shown overexpression of *CTBP1-AS* in breast cancer [25]. But data on the functional importance of the lncRNA *CTBP1-AS* and its role in the pathological mechanisms of these diseases are sparse.

The aim of the study. Building upon these findings, we hypothesize that *CTBP1-AS*, through its potential interaction with CYP19, may play a role in modulating androgen and estrogen balance and the regulation of androgen metabolism in the granulosa cells of women with PCOS. Therefore, the purpose of this study is to investigate the expression levels of *CTBP1-AS* and *CYP19A1* in granulosa cells of women with PCOS and explore the potential correlation between their expression patterns.

Materials and methods

Study subjects

36 women aged (22-40) years were enrolled in this case-control study. 16 PCOS patients and 20 controls underwent assisted reproductive technologies (ART) treatment at the Center for Human Reproduction and IVF (Rostov-on-Don, Russia), in 2021-2022. PCOS diagnosis was done according to Rotterdam criteria. Patients were diagnosed when they had at least two of the following three criteria: 1) hyperandrogenism confirmed clinically or biochemically; 2) oligo- or anovulation; 3) the polycystic ovarian morphology confirmed by ultrasound with the presence

of > 12 follicles (2-9 mm in diameter) in each ovary, or 20 antral follicles in both ovaries, or an enlarged ovary with a volume > 10 cm³. The control group consists of women who underwent IVF/ICSI due to tubal factor infertility or male infertility. Endocrinological pathologies, such as hyperprolactinemia, Cushing's disease, adrenal hyperplasia, or ovarian tumors, were excluded from both groups.

Blood serum, follicular fluid and granulosa cells collection

Morning blood samples were collected after a fasting period of 12-14 hours. After centrifugation at 3000 rpm for 5 minutes, the serum was separated from the blood samples and stored at -20°C until further analysis. Additionally, follicular fluid samples were aspirated during oocyte aspiration. FF without red blood cells contamination was centrifuged at 3000 rpm for 5 minutes and stored at -20°C until assayed. The granulosa cell samples were collected from follicle fluid in RNA stabilizing solution "IntactRNA" from (Evrogen, Russia) and stored at -80 °C.

The hormonal analysis

Biochemical analyses were conducted on blood samples and follicular fluid samples from 16 PCOS patients and 20 controls. The levels of FSH, LH, estradiol, AMH, and insulin were measured using the Beckman Coulter test systems on the Access 2 automatic analyzer. The total testosterone, DHEA-S, and SHBG levels were quantified using the (Alkor-Bio test systems, Russia) on an Alisey QS automatic immunochemical analyzer. For the measurement of DHEA, the (DBC test system, Russia), was utilized on the same analyzer. Fasting blood plasma glucose was determined using a LabSystem analyzer from Finland, with reagents sourced from Biocon in Germany. The HOMA-IR index was calculated using the formula: $\text{HOMA-IR} = \text{fasting insulin } (\mu\text{U/mL}) \times \text{fasting glucose (mmol/L)} / 22.5$.

Quantitative real-time PCR

The total RNA was extracted from GCs using the "ExtractRNA" kit from (Evrogen, Russia). Synthesis of cDNA from the total RNA was carried out using the reverse transcription kit "MMLV RT kit" from (Evrogen,

Russia). Following the manufacturer's instructions, a total of 20 µl reaction solution containing 6 µl RNA, 1 µl of random primer, and 0.5 µl MMLV revertase. The reaction mixture was prepared using RNase-free water. Then the samples were incubated at 40 °C for 40 min, and finally, to stop the reaction, the mixture was incubated at 70 °C for 10 min.

Real time-PCR was performed to measure the relative expression of *CYP19A1* and *CTBP1-AS* in GCs using the SYBR Green master mix "5X qPCRmix-HS SYBR" from (Evrogen, Russia) and the QuantStudio Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, United States). The 25 µl PCR reaction solution contains 5 µl (1x) qPCRmix-HS SYBR, 1 µl of each primer forward and reverse primers, 2 µl cDNA templates and 16 µl Nuclease-Free Water. PCR conditions were as follows: 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, 60 °C for 10 s, and 72 °C for 20 s. This was followed by high-resolution melting curves of PCR amplicons with temperatures ranging from 60 °C to 95 °C. As internal control, we used GAPDH. All samples were conducted in duplicate. Fold changes were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The sequences of the primers were as follows: *CYP19A1*, forward primer 5'- GA-GAATTCATGCGAGTCTGGA -3'; reverse primer, 5'- CATTATGTGGAACATACTT-GAGGACT -3'. GAPDH, forward primer 5'- GGGAAACTGTGGCGTGAT -3'; reverse primer 5'- GAGTGGGTGTCGCTGTTGA -3'. *CTBP1-AS*, forward primer, 5'- ACAACACAAAGCCCCGGAA -3'; reverse primer, 5'- AGTGAAGAATGGTCTCGCCC -3'.

Statistical analysis

We used GraphPad Prism 7 for our statistical analysis. The comparisons of variables were carried out using a two-tailed unpaired t-test or Unpaired t test with Welch's correction, as appropriate. Correlation analyses were performed using a two-tailed Pearson's correlation coefficient test. The variables were expressed as means ± SEM for each group. Statistical significance was assessed at $p < 0.05$.

Results

Hormonal profiles in blood serum of PCOS patients and controls

Table 1 presents the hormonal characteristics of individuals with PCOS and healthy controls. To assess the androgen profile, we measured total and free testosterone, dehydroepiandrosterone (DHEA), and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) in both groups. As anticipated, the PCOS group exhibited significantly higher levels of serum total and free testosterone and DHEA compared to

the control group. However, the difference in DHEA-S levels between PCOS patients and controls was not statistically significant. Notably, LH, LH/FSH, anti-mullerian hormone (AMH), and BMI were significantly elevated in the PCOS group. Additionally, PCOS patients demonstrated a significant increase in HOMA-IR levels, while SHBG levels were significantly lower. Conversely, no significant differences were observed in FSH and estradiol levels between the two groups.

Table 1

Hormonal profiles in blood serum of PCOS patients and controls

	PCOS	Control	P value
BMI (kg/m ²)	26.26 ± 0.702	21.08 ± 0.498	0.0003
Total testosterone (nmol/l)	2.138 ± 0.152	1.526 ± 0.068	0.001
Free testosterone (pg/ml)	1.921 ± 0.302	1.102 ± 0.125	0.0025
Estradiol (pg/ml)	78.52 ± 7.937	88.53 ± 9.5	0.3581
LH (IU/l)	8.487 ± 0.6384	5.932 ± 0.298	0.0003
FSH (IU/l)	6.195 ± 0.221	6.593 ± 0.1952	0.1015
LH/FSH	1.38 ± 0.1021	0.8732 ± 0.0446	<0.0001
DHEA-S (µg/dl)	213.8 ± 22.52	203.9 ± 18.24	0.6205
AMH (ng/ml)	10.83 ± 0.9158	2.815 ± 0.07954	<0.0001
SHBG (nmol/l)	45.35 ± 3.826	73.41 ± 6.624	0.0002
HOMA-IR	1.987 ± 0.204	0.974 ± 0.128	<0.0001
DHEA (ng/ml)	5.321 ± 0.5841	3.814 ± 0.3315	0.0342

Note: BMI Body mass index; LH luteinizing hormone; FSH follicle-stimulating hormone; DHEA-S Dehydroepiandrosterone sulfate; AMH Anti-Mullerian Hormone; SHBG Sex Hormone Binding Globulin; HOMA-IR insulin resistance level; DHEA dehydroepiandrosterone.

Follicular fluid hormones profile in PCOS patients and controls

We evaluated the differences in testosterone, estradiol, and progesterone levels in the FF between PCOS patients and the control group. The data are presented in Table 2, Fig. 1. Our results showed that PCOS patients had significantly higher testosterone levels ($p = 0.0005$) and lower progesterone levels ($p <$

0.0001) in comparison with the control. While the increase in the FF estradiol levels of PCOS patients is not significant ($p = 0.0716$). However, the E2/T ratio showed a significant difference between both groups ($p < 0.0001$). It was about two times lower in PCOS patients compared to the control group, with a difference between means (515 ± 111.4).

Table 2

Hormonal levels in follicular fluid of PCOS patients and controls

	PCOS Mean ± SD	Control Mean ± SD	P value
Testosterone (ng/ml)	117.4 ± 15.38	45.31 ± 4.794	0.0005****
Estradiol (ng/ml)	15058 ± 1512	11699 ± 918.1	0.0716
Progesterone (ng/ml)	55951 ± 11474	159247 ± 11721	<0.0001****
E2/T	526.8 ± 75.23	1042 ± 76.28	<0.0001****

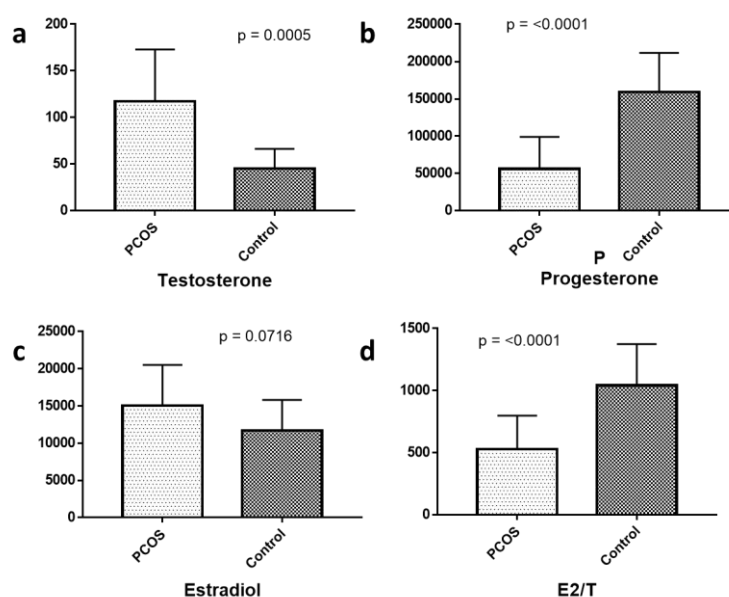


Fig. 1. Distribution of hormones concentrations in the follicular fluid of PCOS patients and controls. (a) Testosterone; (b) Progesterone; (c) Estradiol; (d) Estradiol/Testosterone (E2/T) ratio

CYP19A1 and *CTBP1-AS* expression levels in granulosa cells

We compared the expression levels of *CYP19A1* and *CTBP1-AS* in GCs of 16 PCOS patients and 20 healthy controls. We found that the mRNA levels of *CYP19A1* were significantly decreased by approximately 4.7-fold in PCOS patients' GCs compared to healthy controls ($p = 0.0268$, Fig. 2). Conversely, the expression level of *CTBP1-AS* was found to be predominantly low in GCs of healthy women, with undetectable levels observed in 8 samples, while in PCOS patients, the expression

level of *CTBP1-AS* was significantly elevated, up to 23-fold higher compared to the control group ($p = 0.002676$, Fig. 2). Furthermore, when exploring the correlation between *CYP19A1* and *CTBP1-AS* expression, a negative correlation was observed ($r = -0.6540$), reaching statistical significance ($p = 0.01531$, Fig. 3). These results suggest that the dysregulation of *CTBP1-AS* may play a role in the aberrant expression of *CYP19A1* in PCOS, highlighting its potential involvement in the pathogenesis of PCOS.

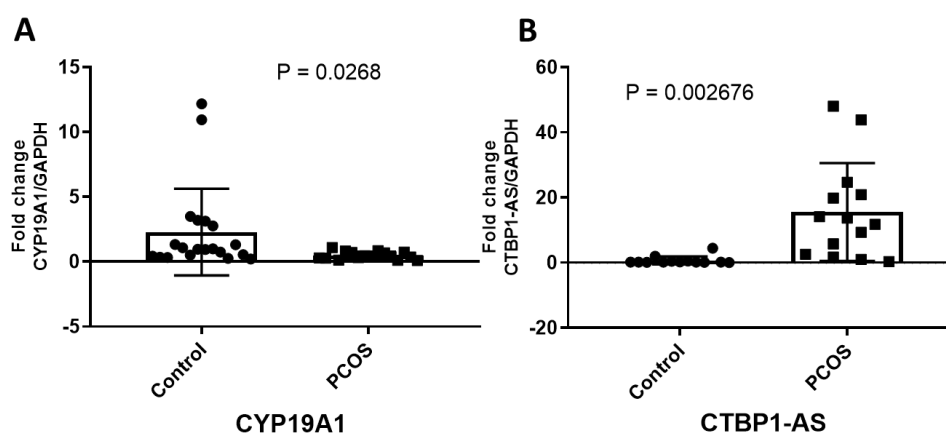


Fig. 2. The relative expression levels of *CYP19A1* (a), and *CTBP1-AS* (b) in GCs of PCOS patients and controls

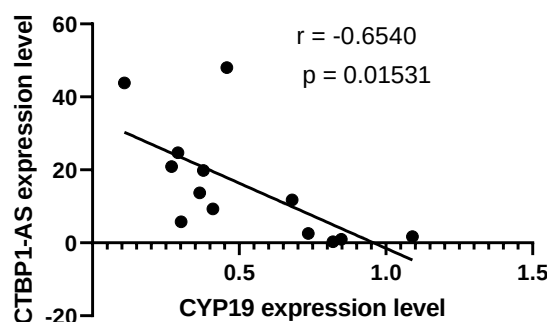


Fig. 3. Correlation analysis between the expression levels of *CYP19A1* and *CTBP1-AS* in the granulosa cells of PCOS patients

Correlation of *CYP19A1* and *CTBP1-AS* expression levels with hormone profiles in serum and follicular fluid of PCOS patients

Analysis of the correlation between *CYP19A1* expression levels in granulosa cells (GCs) of PCOS patients and follicular fluid hormones revealed a negative correlation trend with testosterone ($r = -0.4976$, $p = 0.083$), indicating that higher *CYP19A1* expression was associated with lower testosterone levels. However, this correlation did not reach statistical significance. No significant correlation was observed between *CYP19A1* expression

and estradiol ($r = 0.08306$, $p = 0.7873$). Regarding the estradiol-to-testosterone ratio (E2/T), we observed a significant positive correlation with *CYP19A1* expression in GCs of PCOS patients ($r = 0.8715$, $p = 0.01196$), indicating that decreased *CYP19A1* expression levels were associated with an altered E2/T ratio) (Fig. 4). However, no significant correlations were found between *CYP19A1* expression and serum hormone levels, including testosterone ($r = -0.3708$, $p = 0.2353$), estradiol ($r = 0.09947$, $p = 0.7351$), or E2/T ratio ($r = -0.08645$, $p = 0.8005$) (Fig. 4).

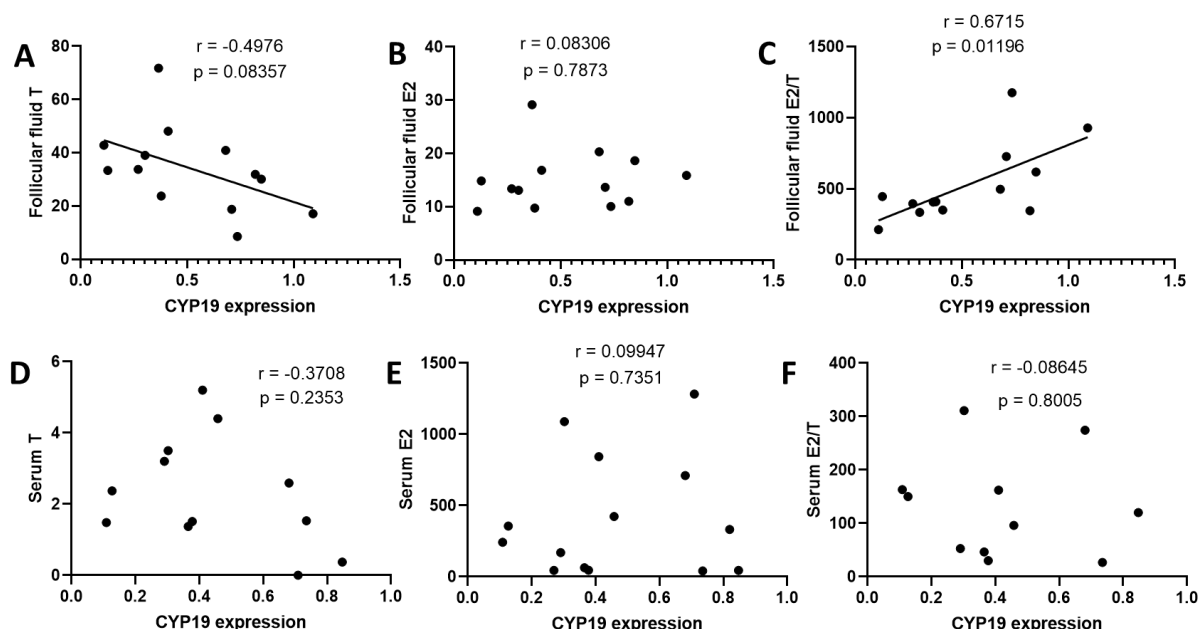


Fig. 4. Correlation of *CYP19A1* expression levels in GCs of PCOS patients with follicular fluid testosterone levels, estradiol levels, and Estradiol/Testosterone (E2/T) (A, B, C), respectively; and with serum testosterone levels, estradiol levels, and Estradiol/Testosterone (E2/T) (D, E, F), respectively

When examining the correlation between *CTBP1-AS* expression levels in granulosa cells (GCs) of PCOS patients and follicular fluid hormones, no significant correlations were observed (Fig. 5). The correlation coefficients for testosterone ($r = 0.08616$, $p = 0.7901$), estradiol ($r = -0.03984$, $p = 0.8924$), and the estradiol-to-testosterone ratio (E2/T) ($r = -0.2964$, $p = 0.3462$) were all close to zero, indicating a lack of association between

CTBP1-AS expression and these hormone levels in follicular fluid. Similarly, when investigating the correlation between *CTBP1-AS* expression levels in GCs of PCOS patients and serum hormone levels, no significant correlations were found (Fig. 5). These findings indicate that *CTBP1-AS* expression in GCs may not directly influence the androgen metabolism and estrogen biosynthesis.

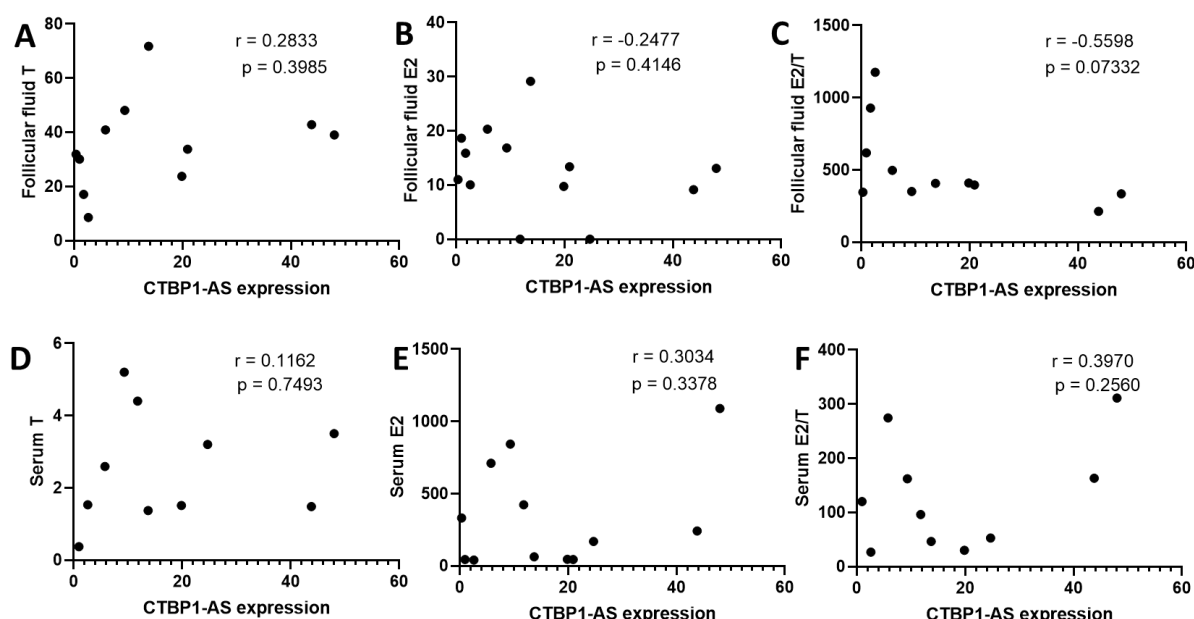


Fig. 5. Correlation of *CTBP1-AS* expression levels in GCs of PCOS patients with follicular fluid testosterone levels, estradiol levels, and Estradiol/Testosterone (E2/T) (A, B, C), respectively; and with serum testosterone levels, estradiol levels, and Estradiol/Testosterone (E2/T) (D, E, F), respectively.

Discussion. Polycystic ovary syndrome is a highly heterogeneous disease. Hyperandrogenism is the main diagnostic criterion of PCOS with an incidence rate of 60-80% [5] and plays an important role in its pathological mechanisms. PCOS patients have increased levels of androstenedione and testosterone in the serum, and dehydroepiandrosterone (DHEA) is also elevated in up to 50% of hyperandrogenic women [26]. It is believed that these circulating androgens are from ovarian sources. It has been shown that there is a subgroup of PCOS patients with elevated levels of testosterone in the FF, despite its normal circulating levels [8]. This hormonal imbalance has a detrimental impact on ovarian function leads

to theca cell hyperplasia, degeneration of GCs, arrest of follicular development at the small antral stage, and anovulation [27]. GCs in polycystic ovaries fail to increase the expression of aromatase, which reduces its capacity to synthesize estrogens. Moreover, evidence shows that polycystic ovaries have an increased capacity to secrete androgens [7]. In PCOS, excessive levels of androgens and a decrease in the E2/T ratio indicate a disruption of androgen metabolism and estrogen biosynthesis, which may indicate insufficient enzymatic activity of aromatase, and this might be due to reduced expression of *CYP19A1* gene, or the presence of an aromatase inhibitor. Our results showed a decrease in *CYP19A1* gene expression in

GCs of PCOS patients by 4.7 times compared to the control group, which is consistent with a study conducted in Indonesia on patients with PCOS. This study showed that the relative level of aromatase mRNA expression in GCs was reduced by 2.6 times in PCOS women with compared to the control [28]. The expression levels of *CYP19A1* in granulosa cells (GCs) of PCOS patients exhibited a negative correlation with testosterone levels and a positive correlation with the E2/T ratio in follicular fluid (FF). However, no significant correlations were observed between *CYP19A1* expression levels and testosterone, estradiol, and E2/T ratio in the blood serum of PCOS patients. This lack of significant correlation suggests that the association between *CYP19A1* expression and hormone levels may be more pronounced within the local follicular fluid environment. *CYP19A1* is primarily expressed in the granulosa cells of ovarian follicles and is involved in the conversion of androgens to estrogens. Therefore, the local correlation between *CYP19A1* expression and follicular fluid hormones may be more evident compared to the systemic circulation of serum hormones. It is also possible that the effects of *CYP19A1* expression on hormone levels are more pronounced at the local level within the follicular microenvironment, potentially influenced by factors specific to the ovarian follicles such as paracrine signaling, local concentrations of factors involved in ovarian steroidogenesis, or feedback mechanisms.

CYP19A1 gene spans a region of about 123 kb, including 30 kb coding region and a 93 kb regulatory region with more than 10 proximal and distal promoters [10, 12]. Each of them is regulated by a specific set of transcription factors, cytokines, or hormones. Although the expression of the *CYP19A1* gene is regulated differently by a complex mechanism in a tissue-specific manner. It encodes the same protein with an identical open reading frame from exon II to X [12]. It has been shown that the ovary-specific promoter (PII) is less active in PCOS GCs. Agarwal and his colleagues suggested that aromatase activity might be regulated locally by aromatase inhibitor com-

pounds in the FF of PCOS patients [29]. According to these data, the expression of 5D-reductase is increased in GCs of PCOS patients, inhibit the aromatase activity competitively by blocking its active sites. *CYP19A1* gene expression can be affected by epigenetic modifications in the regulatory regions. The epigenetic markers including H3K9 di-methylation and H3K9 acetylation as repression and activation markers, respectively, have been studied in the chromatin of PCOS cumulus cells at the proximal promoters of *CYP19A1* (PII and PI.3) [30]. Significant differences in these markers have been shown in PCOS cumulus cells compared to the control, highlighting the crucial role of epigenetic mechanisms in PCOS development [30]. Recent research has focused on investigating the involvement of long non-coding RNAs (lncRNAs) in the pathological mechanisms of PCOS, revealing the upregulation of lncRNA HUPCOS in GCs of PCOS patients. This upregulated lncRNA is associated with hyperandrogenism and androgen excess by inhibiting aromatase expression in GCs [31]. Our results revealed a substantial increase in *CTBP1-AS* gene expression by 23 times in GCs of PCOS patients compared to controls. Notably, *CTBP1-AS* gene expression exhibited a negative correlation with *CYP19A1* gene expression in PCOS patients' GCs, suggesting a potential inhibitory role of *CTBP1-AS* in *CYP19A1* expression and its involvement in hyperandrogenism and PCOS pathogenesis. Moreover, studies conducted on Chinese and Indian populations have linked elevated *CTBP1-AS* expression in serum with PCOS, emphasizing its correlation with androgenic effects and total testosterone levels [32, 33]. However, in our investigation, no significant correlations were observed between *CTBP1-AS* expression levels in GCs of PCOS patients and the levels of testosterone, estradiol, and E2/T ratio in blood serum or follicular fluid (FF). These findings indicate that *CTBP1-AS* expression in GCs may not directly influence androgen metabolism and estrogen biosynthesis. It is plausible that additional factors or regulatory mechanisms are involved in modulating steroidogenesis in PCOS patients. Further

investigations are necessary to unveil the underlying molecular mechanisms driving these associations and better understand the complex interplay between *CTBP1-AS*, hormone levels, and PCOS pathophysiology.

Conclusion. Our study revealed significant dysregulation of *CYP19A1* expression in granulosa cells (GCs) of PCOS patients compared to the control group. This dysregulation was associated with altered hormone levels specifically within the follicular fluid (FF). We also observed an upregulation of *CTBP1-AS* in PCOS patients' GCs, and interestingly, this upregulation showed a negative correlation with *CYP19A1* expression. These findings highlight the potential role of *CTBP1-AS* in modulating *CYP19A1* expression and suggest its involvement in the pathogenesis of PCOS, particularly in relation to hyperandrogenism.

Financial support

This study was funded by the Russian Science Foundation (RSF) grant № 23-15-00464.

Conflict of interests

The authors have no conflict of interest to declare.

References

1. Deswal R, Narwal V, Dang A, et al. The Prevalence of Polycystic Ovary Syndrome: A Brief Systematic Review. *Journal of Human Reproductive Sciences*. 2020;13(4):261-271. DOI: https://doi.org/10.4103/jhrs.JHRS_95_18
2. Collée J, Mawet M, Tébaché L, et al. Polycystic ovarian syndrome and infertility: overview and insights of the putative treatments. *Gynecological Endocrinology*. 2021;37(10):869-874. DOI: <https://doi.org/10.1080/09513590.2021.1958310>
3. Oróstica L, Rosas C, Plaza-Parrochia F, et al. Altered Steroid Metabolism and Insulin Signaling in PCOS Endometria: Impact in Tissue Function. *Current Pharmaceutical Design*. 2016;22(36):5614-5624. DOI: <https://doi.org/10.2174/1381612822666160810111528>
4. Singh S, Pal N, Shubham S, et al. Polycystic Ovary Syndrome: Etiology, Current Management, and Future Therapeutics. *Journal of Clinical Medicine*. 2023;12(4):1454. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm12041454>
5. Ye W, Xie T, Song Y, et al. The role of androgen and its related signals in PCOS. *Journal of cellular and molecular medicine*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2021;25(4):1825-1837. DOI: <https://doi.org/10.1111/jcmm.16205>
6. Jozkowiak M, Piotrowska-Kempisty H, Kobylarek D, et al. Endocrine Disrupting Chemicals in Polycystic Ovary Syndrome: The Relevant Role of the Theca and Granulosa Cells in the Pathogenesis of the Ovarian Dysfunction. *Cells*. 2023;12(1):174. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells12010174>
7. Chen J, Shen S, Tan Y, et al. The correlation of aromatase activity and obesity in women with or without polycystic ovary syndrome. *Journal of ovarian research*. *Journal of Ovarian Research*. 2015;8(1):11. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13048-015-0139-1>
8. Li A, Zhang L, Jiang J, et al. Follicular hyperandrogenism and insulin resistance in polycystic ovary syndrome patients with normal circulating testosterone levels. *Journal of Biomedical Research*. 2018;32(3):208-214. DOI: <https://doi.org/10.7555/JBR.32.20170136>
9. Shabbir S, Khurram E, Moorthi VS, et al. The interplay between androgens and the immune response in polycystic ovary syndrome. *Journal of Translational Medicine*. 2023;21(1):259. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12967-023-04116-4>
10. Lecke SB, Morsch DM, Spritzer PM. CYP19 gene expression in subcutaneous adipose tissue is associated with blood pressure in women with polycystic ovary syndrome. *Steroids*. 2011;76(12):1383-1388. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.07.008>
11. Hashemain Z, Amiri-Yekta A, Khosravifar M, et al. CYP19A1 Promoters Activity in Human Granulosa Cells: A Comparison between PCOS and Normal Subjects. *Cell Journal*. 2022;24(4):170-175. DOI: <https://doi.org/10.22074/CELLJ.2022.7787>
12. Hinshelwood MM, Mendelson CR. Tissue-specific expression of the human CYP19 (aromatase) gene in ovary and adipose tissue of transgenic mice. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2001;79(1-5):193-201. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(01\)00157-1](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(01)00157-1)
13. Tao S, Hou Y, Diao L, et al. Long noncoding RNA study: Genome-wide approaches. *Genes and Diseases*. 2023;10(6):2491-2510. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.10.024>

14. Lim LJ, Jin Y, Yang H, et al. Network of clinically-relevant lncRNAs-mRNAs associated with prognosis of hepatocellular carcinoma patients. *Scientific Reports*. 2020;10(1):11124. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67742-8>
15. Ammar MN, Lipovich L, Shkurat TP, et al. Genetic association of rs564398 polymorphism of the ANRIL long non-coding RNA gene and risk of type 2 diabetes: A meta-analysis. *Meta Gene*. 2022;31:100997. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2021.100997>
16. Sweta S, Dudnakova T, Sudheer S, et al. Importance of Long Non-coding RNAs in the Development and Disease of Skeletal Muscle and Cardiovascular Lineages. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2019;7(2):1-19. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00228>
17. Joshi M, Rajender S. Long non-coding RNAs (lncRNAs) in spermatogenesis and male infertility. *Reproductive biology and endocrinology. Reproductive Biology and Endocrinology*. 2020;18(1):103. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12958-020-00660-6>
18. Geng J, Cui C, Yin Y, et al. lncRNA NEAT1 affects endometrial receptivity by regulating HOXA10 promoter activity. *Cell Cycle*. 2022;21(18):1932-1944. DOI: <https://doi.org/10.1080/15384101.2022.2075198>
19. Huang X, Hao C, Bao H, et al. Aberrant expression of long noncoding RNAs in cumulus cells isolated from PCOS patients. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2016;33(1):111-121. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0630-z>
20. Zhu H-L, Chen Y-Q, Zhang Z-F. Downregulation of lncRNA ZFAS1 and upregulation of microRNA-129 repress endocrine disturbance, increase proliferation and inhibit apoptosis of ovarian granulosa cells in polycystic ovarian syndrome by downregulating HMGB1. *Genomics*. 2020;112(5):3597-3608. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.04.011>
21. Yang R, Chen J, Wang L, et al. lncRNA BANCR participates in polycystic ovary syndrome by promoting cell apoptosis. *Molecular Medicine Reports*. 2019;19(3):1581-1586. DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9793>
22. Jing T, Wu Y, Wan A, et al. Circular RNA as a Novel Regulator and Promising Biomarker in Polycystic Ovary Syndrome. *Biomolecules*. 2023;13(7):1101. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom13071101>
23. Takayama KI, Horie-Inoue K, Katayama S, et al. Androgen-responsive long noncoding RNA CTBP1-AS promotes prostate cancer. *EMBO Journal*. 2013;32(12):1665-1680. DOI: <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.99>
24. Massillo C, Dalton GN, Porretti J, et al. CTBP1/CYP19A1/estradiol axis together with adipose tissue impacts over prostate cancer growth associated to metabolic syndrome. *International Journal of Cancer*. 2019;144(5):1115-1127. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.31773>
25. Cui H, Geng CZ. Molecular mechanisms of long chain non-coding RNA CTBP1-AS in regulation of invasion and migration of breast cancer cells. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. 2019;33(3):773-786.
26. Puurunen J, Piltonen T, Jaakkola P, et al. Adrenal androgen production capacity remains high up to menopause in women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2009;94(6):1973-1978. DOI: <https://doi.org/10.1210/jc.2008-2583>
27. Ashraf S, Nabi M, Rasool SuA, et al. Hyperandrogenism in polycystic ovarian syndrome and role of CYP gene variants: a review. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2019;20:25. DOI: <https://doi.org/10.1186/s43042-019-0031-4>
28. Panghiyangani R, Soeharso P, Pujianto A, et al. CYP19A1 Gene Expression in Patients with Polycystic Ovarian Syndrome. *Journal of Human Reproductive Sciences*. 2020;13(2):100-103. DOI: https://doi.org/10.4103/JHRS.JHRS_142_18
29. Agarwal SK, Judd HL, Magoffin DA. A mechanism for the suppression of estrogen production in polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1996;81(10):3686-3691. DOI: <https://doi.org/10.1210/jcem.81.10.8855823>
30. Hosseini E, Shahhoseini M, Afsharian P, et al. Role of epigenetic modifications in the aberrant CYP19A1 gene expression in polycystic ovary syndrome. *Archives of Medical Science*. 2019;15(4):887-895. DOI: <https://doi.org/10.5114/aoms.2019.86060>
31. Che Q, Liu M, Zhang D, et al. Long Noncoding RNA HUPCOS Promotes Follicular Fluid Androgen Excess in PCOS Patients via Aromatase Inhibition. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2020;105(4):1086-1097. DOI: 10.1210/CLINEM/DGAA060
32. Liu Z, Hao C, Song D, et al. Androgen Receptor Coregulator CTBP1-AS Is Associated With Polycystic Ovary Syndrome in Chinese Women: A Preliminary Study. *Reproductive*

Sciences. 2015;22(7):829. DOI:
<https://doi.org/10.1177/1933719114565037>

33. Nabi M, Andrabi SM, Rasool SUA, et al. Androgen receptor coregulator long noncoding RNA CTBP1-AS is associated with polycystic ovary syndrome in Kashmiri women. *Endocrine*. 2021;75(2):614-622. DOI:
<https://doi.org/10.1007/s12020-021-02894-9>

Received 10 August 2023

Revised 21 October 2023

Accepted 2 November 2023

Information about the authors

Ruba M. Ali, Post-graduate Student in Scientific Specialty 1.5.7 – Genetics, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia, E-mail: ruba.m.ali@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8617-5685>.

Svetlana V. Lomteva, Cand. Sci. (Biology), Geneticist-embryologist, Head of the Embryogenesis Laboratory, Center for Human Reproduction and IVF, Rostov-on-Don, Russia, E-mail: embryolab61@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8791-1936>.

Anzhela A. Aleksandrova, Cand. Sci. (Biology), Associate Professor at the Department of Genetics,

Southern Federal University; Doctor, Nauka, Rostov-on-Don, Russia, E-mail: aalexsandrova@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1948-4995>.

Karina Yu. Sagamonova, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Obstetrician-gynaecologist, Director, Center for Human Reproduction and IVF; Professor at the Department of Obstetrics and Gynecology No. 3, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia, E-mail: k.sagamonova@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2397-2585>.

Artur S. Sagamonov, Student, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia, E-mail: a.sagamonov@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-3668-3417>.

Manar N.A. Ammar, Post-graduate Student in Scientific Specialty 1.5.7 – Genetics, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia, E-mail: manarammarnour@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6913-3969>.

Tatiana P. Shkurat, Doct. Sci. (Biology), Professor, Head of the Department of Genetics, Southern Federal University; General Director, Nauka, Rostov-on-Don, Russia, E-mail: tshkurat@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6197-7374>.



DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-2-1-0

УДК 616-053.9

Связь между когнитивным статусом долгожителей Центрального федерального округа Российской Федерации и социо-экономическими факторами: анализ ассоциаций

В.В. Ерема¹ , А.А. Мамчур¹ , Д.А. Каштанова¹ , М.В. Иванов¹ ,
А.М. Румянцева¹ , А.А. Акопян² , В.С. Юдин¹ , В.В. Макаров¹ ,
А.А. Кескинов¹ , И.Д. Стражеско² , О.Н. Ткачева² , С.А. Краевой¹ ,
С.М. Юдин¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью»,
ул. Погодинская, д. 10, стр. 1, г. Москва, 119121, Российская Федерация

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»,
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997, Российская Федерация
Автор для переписки: В.В. Ерема (dveronika784@gmail.com)

Резюме

Актуальность: В России отмечается тенденция к увеличению количества долгожителей. Одной из наиболее актуальных проблем для данной категории населения является нарушение когнитивных функций мозга, снижающее качество жизни как самих долгожителей, так и их родственников. На сегодняшний момент в клинической практике отсутствуют лекарственные средства, позволяющие эффективно лечить и профилактировать когнитивные нарушения, в связи с чем изучение факторов образа жизни, ассоциированных с данным заболеванием, является важной задачей для разработки подходов к профилактике развития когнитивных нарушений в позднем пожилом возрасте. **Цель исследования:** Определить наличие и характер взаимосвязей между когнитивным статусом и показателями образа жизни долгожителей. **Материалы и методы:** В исследовании приняли участие 2762 долгожителя, проживающих в регионах Центрального федерального округа Российской Федерации, включенные в период с 2019 по 2021 гг. У всех участников был проведен тщательный сбор анамнеза с уточнением информации о семейном положении, образовании, социально-экономическом статусе. Когнитивный статус определялся с помощью шкалы Mini-Mental State Examination (MMSE). Оценка ассоциации факторов с полом участников проводилась с помощью критериев Манна-Уитни и χ^2 -квдрат. Для оценки ассоциации факторов с наличием когнитивных нарушений использовалась логистическая регрессия. **Результаты:** Факторами риска для развития когнитивных нарушений оказались возраст, женский пол, низкий уровень образования и дохода. Протективные

факторы – наличие физической активности, хобби и домашнего животного. Кроме того, у женщин частота когнитивных нарушений прямо коррелировала с продолжительностью менопаузы. По результатам поиска ассоциаций была предложена модель для предсказания развития когнитивных нарушений на основании образа жизни и социально-экономических факторов (ROC AUC=0,687). **Заключение:** Исследование подтвердило взаимосвязь между социально-экономическими факторами, семейным статусом, образом жизни и когнитивными нарушениями у долгожителей. Предложенная модель позволяет заблаговременно оценить риск развития когнитивных нарушений в старческом возрасте и принять меры по коррекции образа жизни для сохранения функций мозга.

Ключевые слова: когнитивные нарушения; долгожители; MMSE; образ жизни; фактор риска

Для цитирования: Ерема ВВ, Мамчур АА, Каштанова ДА, и др. Связь между когнитивным статусом долгожителей Центрального федерального округа Российской Федерации и социально-экономическими факторами: анализ ассоциаций. Научные результаты биомедицинских исследований. 2024;10(2):303-319. DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-2-1-0

Relationship between the cognitive status of the long-living adults of the Central Federal District of the Russian Federation and socioeconomic factors: analysis of associations

Veronika V. Erema¹ , Alexandra A. Mamchur¹ , Daria A. Kashtanova¹ ,
Mikhail V. Ivanov¹ , Antonina M. Rumyantseva¹ , Anna A. Akopyan² ,
Vladimir S. Yudin¹ , Valentin V. Makarov¹ , Anton A. Keskinov¹ ,
Irina D. Strazhesko² , Olga N. Tkacheva² , Sergey A. Kraevoy¹ ,
Sergey M. Yudin¹ 

¹ Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks,
bld. 1, 10 Pogodinskaya St., Moscow, 119121, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University,
1 Ostrovityanov St., Moscow, 117997, Russia

Corresponding author: Veronika V. Erema (dveronika784@gmail.com)

Abstract

Background: In recent years, an increase in the number of long-living adults has been a dominant demographic trend in Russia. This population group is highly susceptible to cognitive dysfunctions. Cognitive impairment disrupts the lives of those affected and puts an immense burden on their caregivers. Currently, there are no clinically applicable therapies or prevention strategies for cognitive impairment. Therefore, it is critically important to determine which lifestyle factors contribute to cognitive decline and to develop well-informed preventive strategies. **The aim of the study:** The study sought to identify the association between cognitive status and lifestyle. **Materials and methods:** The participants (n=2762) were recruited from 2019 to 2021 from the central regions of Russia. Detailed medical/case histories were obtained, including marital status, education, and social and economic background. Mini-Mental State Examination (MMSE) was used to evaluate cognitive status. The Mann-Whitney U test and Chi-squared test were used to test the associations between the

sex and the factors under study. Logistic regression was used to assess the associations between the factors and cognitive impairment. **Results:** Age, sex, lower levels of education, and lower income were risk factors of cognitive impairment. Engaging in physical activity, hobbies, and having a pet were protective against cognitive impairment. In women, cognitive dysfunctions were correlated with the duration of menopause. The predictive model for cognitive dysfunctions based on sex, lifestyle and socioeconomic factors generated (ROC AUC=0.687). **Conclusion:** The findings confirmed that cognitive dysfunctions in long-living adults were associated with the socioeconomic factors, marital status, and lifestyle. The proposed model makes it possible to assess in advance the risk of developing cognitive impairments in old age and take measures to correct lifestyle to preserve brain functions.

Keywords: cognitive impairment; long-living adults; MMSE; lifestyle; risk factor

For citation: Erema VV, Mamchur AA, Kashtanova DA, et al. Relationship between the cognitive status of the long-living adults of the Central Federal District of the Russian Federation and socioeconomic factors: analysis of associations. Research Results in Biomedicine. 2024;10(2):303-319. Russian. DOI: 10.18413/2658-6533-2024-10-2-1-0

Введение. Когнитивные нарушения у лиц старческого возраста являются актуальной проблемой медицины в целом и гериатрии в частности. При достижении возраста 100 лет доля когнитивно сохранных долгожителей составляет всего 15-25% [1]. В целом, распространенность когнитивных нарушений варьирует по результатам различных исследований в зависимости от изучаемой когорты и метода диагностики когнитивных нарушений. Так, в когортном исследовании 2 249 долгожителей в Дании частота выявления когнитивных нарушений (MMSE <23) составила 55% [2]. В итальянском Mugello Study приняли участие 475 долгожителей, среди них менее 21 балла по MMSE набрали около 43% участников [3]. В обсервационном исследовании, проведенном во Франции с участием 512 долгожителей, менее 20 баллов MMSE набрали 24% участников [4]. Когнитивные нарушения в пожилом и старческом возрасте разительно снижают качество жизни самого пациента и его близких, приводят к увеличению зависимости пожилого человека в повседневной жизнедеятельности и к необходимости привлечения родственников или сиделок для оказания помощи. Накладываясь на продолжающееся демографическое старение в развитых странах, дальнейшее развитие ситуации будет оказывать дополнительную нагрузку как на систему здравоохранения, так и на всю эконо-

мику этих стран. В связи с этим перед современной наукой стоит задача снизить частоту наступления когнитивных нарушений с возрастом, которые определяются как генетической предрасположенностью, так факторами окружающей среды и образа жизни [5]. При исследовании ассоциаций между когнитивным статусом и образом жизни было выявлено, что когнитивные нарушения тесно взаимосвязаны с качеством сна [6], с употреблением чая/кофе, курением и физической активностью [7], а также с социальной активностью и семейным статусом [8]. Такие взаимосвязи представляют интерес для определения потенциальных мишеней, на которые можно воздействовать и путем профилактики возможно снизить частоту когнитивных нарушений в будущем.

Несмотря на имеющиеся литературные данные о распространенности и причинах когнитивных нарушений в мире, исследование сохраняет свою актуальность и в России, где на текущий момент долгожители изучены недостаточно. Представленная работа посвящена оценке взаимосвязей наличия когнитивных нарушений в возрасте 90 лет и более и потенциально модифицируемых факторов образа жизни.

Цель исследования. Определить наличие и характер взаимосвязей между когнитивным статусом и показателями образа жизни, социально-экономического и медицинского статуса долгожителей.

Материалы и методы исследования

Проведение исследования и этическое одобрение

Исследование продолжается по настоящее время, для анализа были отобраны данные за период с января 2019 по декабрь 2021 гг. Исследование выполнено на базе обособленного структурного подразделения «Российский геронтологический научно-клинический центр» ФГАОУ ВО РНИМУ им. Пирогова совместно с ФГБУ «ЦСП» ФМБА России. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО РНИМУ им. Пирогова Минздрава России ОСП РГНКЦ, протокол № 30 от 24.12.2019.

Дизайн исследования и формирование выборки

Кросс-секционное неинтервенционное исследование.

Выборка исследования формировалась произвольным способом: поиск участников осуществлялся с привлечением социальных служб, пансионатов для ветеранов труда, геронтологических центров и других гериатрических служб. В исследование включались лица в возрасте 90 лет и старше, предоставившие письменное информированное согласие на участие в исследовании. В общей сложности в исследование включено более 3000 долгожителей. В настоящую работу вошли только те участники, для которых была на момент написания работы проведена оценка когнитивного статуса с использованием Краткой шкалы оценки психического статуса (Mini-Mental State Examination, MMSE) [9]. Эти сведения имелись для 2762 участников. Шкала MMSE для всех участников заполнялась врачом-гериатром с последующей дополнительной оценкой врачом-неврологом. В качестве критерия когнитивного снижения было выбрано количество баллов по шкале MMSE менее 25 [10]. Согласно представленным критериям, количество долгожителей без когнитивных нарушений составило 1361 человек (49,3%), а с когнитивными нарушениями – 1401 человек

(50,7%). Для всех участников был собран подробный социально-демографический анамнез, в том числе оценивался характер работы, уровень образования, увлечения в течение жизни и другие факторы. Дизайн исследования был подробно представлен в ранее опубликованной статье [11]. Мы отбирали факторы, которые потенциально могли бы служить факторами риска для когнитивного снижения, воздействуя на участника в течение большей части его жизни. Уровень физической активности в течение всей своей жизни, доход на пике профессиональной деятельности и характер трудовой деятельности участник определял для себя самостоятельно.

Анализ данных

Анализ данных проводился с помощью языка программирования Python версии 3.9. Оценка ассоциации факторов с полом участников проводилась с помощью критериев Манна-Уитни (для непрерывных переменных) и χ^2 -квадрат (для категориальных переменных). Для оценки ассоциации факторов с наличием когнитивных нарушений использовалась логистическая регрессия (пол и возраст рассматривались в качестве ковариат). Для учета множественного сравнения вводилась поправка Бонферрони. Итоговая модель для предсказания риска развития когнитивных нарушений в возрасте 90 лет и старше также строилась с использованием логистической регрессии. По данным этой модели, вероятность развития когнитивного снижения (P) рассчитывалась следующим образом (1):

$$P = \frac{1}{1 + e^{-f}}, \text{ где } f = \text{const} + \sum_{i=1}^8 \text{coef}_i \cdot x_i \quad (1)$$

Результаты и их обсуждение

Описательная характеристика когорты долгожителей

В анализ вошло 2762 участника, набранных в период с 2019 по 2021 гг. Описательная характеристика когорты долгожителей представлена в таблице 1.

Таблица 1 (начало)
Сравнительная характеристика долгожителей, принявших участие в исследовании
Beginning of Table 1
Comparative characteristics of the long-livers involved in the study

Характеристики		Среди мужчин (n=709)		Среди женщин (n=2053)		p-value *
		Кол-во ответов	Медиана [ДИ] / количество утвердительных ответов (%)	Кол-во ответов	Медиана [ДИ] / количество утвердительных ответов (%)	
Возраст		709	92 [91, 94]	2053	92 [91, 94]	0,04
MMSE		709	24 [21, 27]	2053	23 [19, 26]	6,15*10⁻⁸
Наличие когнитивных нарушений		709	314 (44,3%)	2053	1087 (53%)	7,71*10⁻⁵
Проживание большую часть жизни	В селе	602	43 (7,1%)	1720	130 (7,6%)	0,81
	В городе		559 (92,9%)		1590 (92,4%)	
Проживание сейчас	Один / одна	703	287 (40,8%)	2051	904 (44,1%)	0,005
	В семье		306 (43,5%)		757 (36,9%)	
	В интернате / доме престарелых		110 (15,7%)		390 (19%)	
Семейное положение	Женат / замужем	708	146 (20,6%)	2040	74 (3,6%)	2,1*10⁻⁴⁷
	Вдовец / вдова		541 (76,4%)		1790 (87,7%)	
	Разведен(а)		17 (2,4%)		96 (4,7%)	
	Никогда не был(а) в браке		4 (0,6%)		72 (3,6%)	
	Брак без регистрации		0 (0%)		8 (0,4%)	
Наличие детей		698	648 (92,8%)	2029	1800 (88,7%)	0,002
Количество детей 3 и больше		681	53 (7,8%)	1963	127 (6,5%)	0,273
Образование	Начальное и ниже	697	24 (3,5%)	2033	189 (9,3%)	2,2*10⁻³³
	Неполное среднее, профессионально-техническое (ПТУ) и неполное среднее		49 (7%)		303 (14,9%)	
	Полное среднее образование		79 (11,3%)		384 (18,9%)	
	ПТУ и полное среднее образование		59 (8,5%)		122 (6%)	
	Полное специальное среднее (техникум)		105 (15,1%)		369 (18,1%)	

Таблица 1 (окончание)
End of Table 1

Сравнительная характеристика долгожителей, принявших участие в исследовании
Comparative characteristics of the long-livers involved in the study

Характеристики		Среди мужчин (n=709)		Среди женщин (n=2053)		p-value *
		Кол-во ответов	Медиана [ДИ] / количество утвердительных ответов (%)	Кол-во ответов	Медиана [ДИ] / количество утвердительных ответов (%)	
	Незаконченное высшее (3-4 года в институте)		8 (1,1%)		27 (1,3%)	
	Высшее		324 (46,5%)		609 (30%)	
	Ученая степень		49 (7%)		30 (1,5%)	
Характер работы	Физическая	695	172 (24,8%)	2005	496 (24,7%)	0,0008
	Умственная		227 (32,7%)		800 (40%)	
	Физическая и умственная		296 (42,5%)		709 (35,3%)	
Доход на пике профессиональной деятельности	Низкий	599	18 (3%)	1704	193 (11,3%)	4,13*10⁻²²
	Средний		445 (74,3%)		1354 (79,5%)	
	Высокий		136 (22,7%)		157 (9,2%)	
Возраст начала трудовой деятельности		655	18 [14, 20]	1888	18 [15, 20]	0,04
Возраст окончания трудовой деятельности		628	70 [64, 75]	1878	60 [55, 70]	1,34*10⁻⁵⁹
Религия	Неверующий	690	229 (33,2%)	2013	325 (16,1%)	1,95*10⁻²¹
	Верующий		461 (66,8%)		1688 (83,9%)	
Наличие физической активности в течение жизни		570	301 (52,8%)	1628	600 (36,9%)	4,15*10⁻¹¹
Наличие хобби в течение жизни		575	227 (39,5%)	1647	722 (43,8%)	0,074
Наличие домашнего животного в течение жизни	Наличие сейчас	595	67 (11,3%)	1702	197 (11,6%)	0,721
	Отсутствие в течение всей жизни		388 (65,2%)		1080 (63,4%)	
	Наличие раньше, но отсутствие сейчас		140 (23,5%)		425 (25%)	

Примечание: *Значение порога статистической значимости с учетом поправки Бонферрони на множественное сравнение составляет 0,0016; жирным шрифтом выделены значения p-value ниже порога статистической значимости; ДИ – доверительный интервал.

Note: *The statistical significance threshold taking into account the Bonferroni correction for multiple comparisons is 0.0016; p-values below the statistical significance threshold are highlighted in bold; ДИ – confidence interval.

Общая частота возникновения когнитивных нарушений в изучаемой когорте составила 50,7%. Однако целью данной работы не было определение встречаемости когнитивного снижения в популяции долгожителей в целом, т.к. исследование проводилось по принципу “all-comers”. Количество женщин в исследуемой когорте значительно превышает количество мужчин – 2053 (74,3%) и 709 (25,7%), соответственно. Это косвенно подтверждает факт, что для женщин характерна большая продолжительность жизни. Помимо этого, среди женщин достоверно чаще встречаются вдовы, что может свидетельствовать о том, что женщины в целом живут дольше и чаще их продолжительность жизни превышает продолжительность жизни супруга. Это согласуется с мировыми данными о том, что при различных возраст-ассоциированных нозологиях наблюдается меньшая смертность среди женщин по сравнению с мужчинами в разных возрастных категориях [12].

Однако среди женщин-долгожителей чаще наблюдались когнитивные нарушения, чем среди мужчин-долгожителей (53,0% против 44,3%), это отражалось в более низких баллах MMSE вне зависимости от возраста (Рис. 1). Дополнительно методом логистической регрессии была проведена оценка риска наличия когнитивных нарушений, который оказался у женщин на

37% выше, чем у мужчин ($OR=1,37$, $p\text{-value}=0,0003$). Интересно, что в исследуемой когорте среди мужчин и женщин также были обнаружены различия по ряду факторов, потенциально влияющих на когнитивный статус. Так, женщины достоверно реже имели высшее образование, высокий доход на пике профессиональной деятельности и достаточный уровень физической нагрузки в течение жизни, а также выходили на пенсию раньше мужчин. При этом, женщины чаще являлись верующими и имели преимущественно умственную работу. Описанные тенденции вероятно обусловлены социокультурными факторами, под влиянием которых проходила жизнь нынешних долгожителей, однако они могли быть и причиной дальнейших различий в когнитивном статусе мужчин и женщин (Табл. 1).

Возраст ожидаемо связан со снижением баллов MMSE вне зависимости от пола, однако у женщин тенденция к снижению наблюдается более отчетливо (Рисунок). С увеличением возраста на 1 год риск наличия когнитивных нарушений повышался на 4,5% ($OR=1,045$, $p\text{-value}=0,0077$). Увеличение баллов MMSE в группе участников старше 100 лет, представленное на рисунке 1, связано с небольшим количеством участников этой возрастной группы.

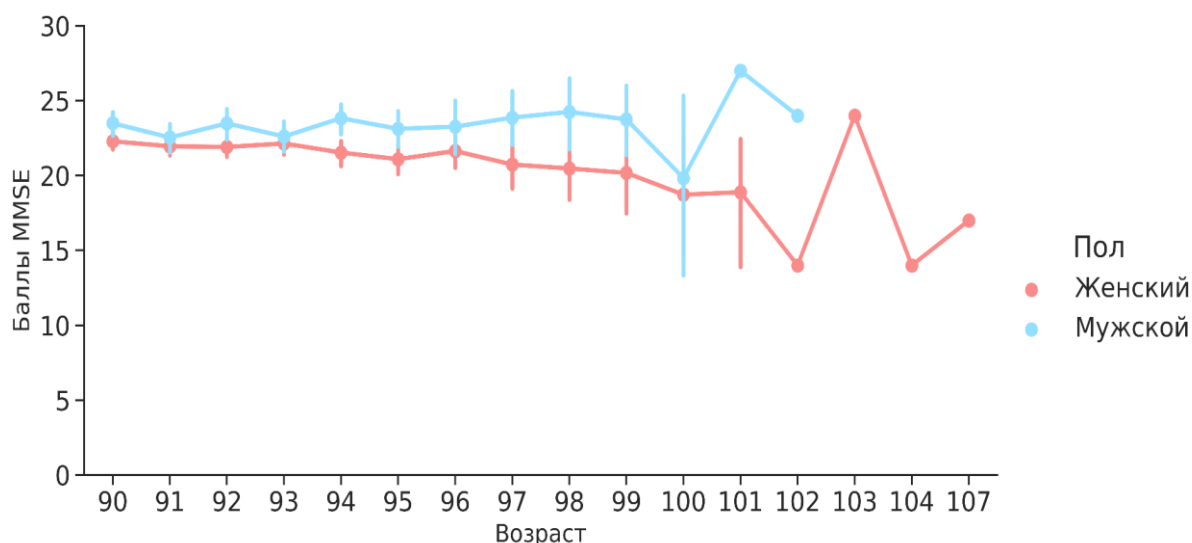


Рис. Распределение баллов MMSE по полу и возрасту
Fig. Distribution of MMSE scores by gender and age

Описанные результаты и ранее опубликованные данные показывают, что для женщин характерна устойчивость ко многим возраст-ассоциированным заболеваниям, за исключением когнитивного снижения. Например, в США за 2011 год женщины умирали по 12 из 15 основных причин смерти реже, чем мужчины. Две причины (инсульт и болезнь Паркинсона) были

приблизительно равны между полами. Однако чаще мужчин женщины умирали только от болезни Альцгеймера [13], что дополнительно подтверждает повышенный риск деменции для женщин. Таким образом, женский пол и возраст являются достоверными факторами риска для возникновения когнитивных нарушений.

Таблица 2

Взаимосвязь семейного положения и когнитивного статуса у долгожителей

Table 2

Relationship between marital status and cognitive status in long-livers

Параметр		Среди когнитивно сниженных n=1661	Среди когнитивно сохранных n=1101	ОШ [ДИ]	p-value (с поправкой на пол и возраст)*
Смерть отца в раннем возрасте (менее 55 лет)		517 (31,1%)	345 (31,3%)	0,99 [0,84, 1,17]	0,938
Смерть матери в раннем возрасте (менее 65 лет)		327 (19,7%)	198 (18%)	1,11 [0,91, 1,35]	0,312
Семейное положение	Женат/замужем	111 (6,7%)	109 (9,9%)	0,75 [0,56, 1,00]	0,053
	Вдовец/вдова	1429 (86%)	902 (81,9%)	1,29 [1,04, 1,59]	0,019
	Разведен(а)	58 (3,5%)	55 (5%)	0,67 [0,46, 0,97]	0,035
	Никогда не был(а) в браке	47 (2,8%)	29 (2,6%)	0,98 [0,61, 1,57]	0,919
	В браке без регистрации	3 (0,2%)	5 (0,5%)	0,38 [0,09, 1,61]	0,190
Наличие детей		1476 (88,9%)	972 (88,3%)	1,11 [0,87, 1,41]	0,407
Наличие 3+ детей		117 (7%)	63 (5,8%)	1,27 [0,92, 1,74]	0,146

Примечание: *Значение порога статистической значимости с учетом поправки Бонферрони на множественное сравнение составляет 0,001; ОШ – отношение шансов; ДИ – доверительный интервал.

Note: *The statistical significance threshold taking into account the Bonferroni correction for multiple comparisons is 0.001; ОШ – odds ratio; ДИ – confidence interval.

Факторы, ассоциированные с когнитивным снижением

В качестве факторов, которые могут быть связаны с когнитивным статусом, мы рассмотрели семейное положение, образ жизни, образование и характер работы (Табл. 2, 3, 4). Также для женщин отдельно учитывались количество беременностей, родов и возраст наступления менопаузы (Табл. 5).

Несмотря на имеющиеся литературные данные, свидетельствующие о том, что

люди, долго живущие одни (в разводе или вдовы/вдовцы) имеют более высокую частоту когнитивных нарушений по сравнению с людьми с недавно распавшимся браком [14], в нашем исследовании таких ассоциаций не было обнаружено (Табл. 2). Более того, ни один из факторов, описывающих семейное положение участников исследования, не показал статистически значимой ассоциации с наличием когнитивного снижения (Табл. 2).

Таблица 3

Взаимосвязь образа жизни и когнитивного статуса у долгожителей

Table 3

Relationship between lifestyle and cognitive status in long-livers

Параметр		Среди когни- тивно сни- женных n=1661	Среди когни- тивно сохранный n=1101	ОШ [ДИ]	p-value (с по- правкой на пол и возраст)*
Проживание большую часть жизни (последние 40 лет)	В селе	104 (7,6%)	69 (7,2%)	0,97 [0,71, 1,32]	0,837
	В городе	1265 (92,4%)	884 (92,8%)	0,8 [0,66, 0,96]	0,0003
Проживание в настоящий мо- мент	Один	667 (40,4%)	514 (46,9%)	0,78 [0,67, 0,92]	0,002
	В семье	633 (38,4%)	430 (39,3%)	0,97 [0,83, 1,14]	0,716
	В интернате/ доме престарелых	349 (21,2%)	151 (13,87%)	1,64 [1,33, 2,03]	3*10⁻⁶
Наличие физической активности в те- чение жизни		462 (35,6%)	439 (48,7%)	0,6 [0,51, 0,71]	7,4*10⁻¹⁰
Наличие хобби в течение жизни		449 (34,4%)	500 (54,6%)	0,45 [0,37, 0,51]	7,8*10⁻²⁴
Наличие домашнего животного сей- час или в течение жизни		419 (31%)	410 (43,4%)	0,57 [0,48, 0,67]	1,8*10⁻¹¹
Религия (любая)		1288 (79%)	861 (78,7%)	0,91 [0,76, 1,1]	0,347

Примечание: *Значение порога статистической значимости с учетом поправки Бонферрони на множественное сравнение составляет 0,001; жирным шрифтом выделены значения p-value ниже порога статистической значимости; ОШ – отношение шансов; ДИ – доверительный интервал.

Note: *The statistical significance threshold taking into account the Bonferroni correction for multiple comparisons is 0.001; p-values below the statistical significance threshold are highlighted in bold; ОШ – odds ratio; ДИ – confidence interval.

Большая часть долгожителей (~92,5%) как в группе сохранных, так и в группе с когнитивными нарушениями проживала последние 40 лет в городе (Табл. 3), что связано с особенностями набора участников исследования. Несмотря на то, что для городских жителей было показано статистически значимое снижение риска наличия когнитивных нарушений, существенный количественный перевес в этой группе по сравнению с проживающими в селе не позволяет говорить о достоверности результатов. Проживание в настоящий момент в интернате или доме престарелых оказалось более характерным для участников с когнитивными нарушениями (Табл.

3), что скорее всего является следствием их нетрудоспособности в связи с описываемым состоянием. Кроме того, когнитивные нарушения реже встречались у людей, которые были физически активны в течение своей жизни и имели домашнее животное (Табл. 3). Роль физической активности в профилактике когнитивных нарушений известна давно [15, 16]. Также важную роль в профилактике деменции играет социальная активность [17]. А наличие животного может способствовать улучшению физической и социальной активности, тем самым внося вклад в профилактику когнитивных нарушений.

Таблица 4

**Взаимосвязь образования и характера трудовой деятельности
с когнитивным статусом у долгожителей**

Table 4

**The relationship between education and the nature of work activity
and the cognitive status in long-livers**

Параметр		Среди когни- тивно сни- женных n=1661	Среди когни- тивно сохран- ных n=1101	ОШ [ДИ]	p-value (с по- правкой на пол и возраст*)
Образование	Начальное и ниже	173 (10,6%)	40 (3,7%)	2,98 [2,09, 4,25]	1,5*10⁻⁹
	Неполное среднее	245 (14,9%)	107 (9,8%)	1,56 [1,23, 1,99]	0,0003
	Полное среднее	321 (19,6%)	142 (13%)	1,56 [1,26, 1,94]	5*10⁻⁵
	ПТУ	120 (7,3%)	61 (5,6%)	1,37 [0,99, 1,88]	0,05
	Техникум	290 (17,7%)	184 (16,9%)	1,04 [0,85, 1,28]	0,68
	Неоконченное выс- шее	19 (1,2%)	16 (1,5%)	0,74 [0,38, 1,45]	0,381
	Высшее	451 (27,5%)	482 (44,1%)	0,49 [0,42, 0,58]	9*10⁻¹⁸
	Учёная степень	20 (1,2%)	59 (5,4%)	0,24 [0,14, 0,4]	5,2*10⁻⁸
Возраст начала трудовой деятельно- сти (увеличение на 1 год)		-	-	1,00 [0,9995, 1,00]	0,996
Характер ра- боты	Преимущественно физическая	508 (31,5%)	160 (14,7%)	2,64 [2,17, 3,22]	9*10⁻²²
	Преимущественно умственная	507 (31,5%)	520 (47,7%)	0,47 [0,40, 0,56]	4,6*10⁻²⁰
	И физическая, и ум- ственная	595 (37%)	410 (37,6%)	0,96 [0,82, 1,12]	0,591
Доход на пике профессио- нальной дея- тельности	Низкий	143 (10,6%)	68 (7,2%)	1,34 [0,99, 1,81]	0,06
	Средний	1073 (79,7%)	726 (75,9%)	0,95 [0,81, 1,11]	0,509
	Высокий	131 (9,7%)	162 (16,9%)	0,52 [0,40, 0,67]	2,2*10⁻⁷
Возраст окончания трудовой деятель- ности (увеличение на 1 год)		-	-	0,9999 [0,9993, 1,00]	0,707

Примечание: *Значение порога статистической значимости с учетом поправки Бонферрони на множественное сравнение составляет 0,001; жирным шрифтом выделены значения p-value ниже порога статистической значимости; ОШ – отношение шансов; ДИ – доверительный интервал.

Note: *The statistical significance threshold taking into account the Bonferroni correction for multiple comparisons is 0.001; p-values below the statistical significance threshold are highlighted in bold; ОШ – odds ratio; ДИ – confidence interval.

Таблица 5

Взаимосвязь между количеством беременностей, родов, возрастом наступления менопаузы и когнитивным статусом у женщин-долгожителей

Table 5

The relationship between the number of pregnancies, births, age at menopause and cognitive status in long-lived women

Параметр	ОШ [ДИ] (при повышении на 1 единицу)	p-value (с поправкой на возраст)*
Количество беременностей	0,9998 [0,9992, 1,00]	0,57
Количество родов	0,9998 [0,998, 1,00]	0,82
Возраст менопаузы	0,9991 [0,9988, 0,9996]	0,0001

Примечание: *Значение порога статистической значимости с учетом поправки Бонферрони на множественное сравнение составляет 0,001; жирным шрифтом выделены значения p-value ниже порога статистической значимости; ОШ – отношение шансов; ДИ – доверительный интервал.

Note: *The statistical significance threshold taking into account the Bonferroni correction for multiple comparisons is 0.001; p-values below the statistical significance threshold are highlighted in bold; ОШ – odds ratio; ДИ – confidence interval.

При анализе взаимосвязей между образованием, характером трудовой деятельности, доходом и когнитивным статусом, наше исследование выявило, что протективными факторами являлись наличие у человека высшего образования и ученой степени, преимущественно умственный характер трудовой деятельности, высокий уровень дохода на пике профессиональной деятельности (Табл. 4). По данным обсервационных исследований давно известно, что уровень образования обратно коррелирует с частотой возникновения когнитивных нарушений, деменции и/или болезнью Альцгеймера [18, 19]. При этом недостаток обнаруженной ассоциации связан с тем, что выбранному методу оценки когнитивного статуса (баллам MMSE) свойственна корреляция с уровнем образования в связи с особенностью формирования самой шкалы MMSE [20].

Однако важно отметить, что когнитивно-стимулирующая деятельность связана не только с формальным образованием, но и с интеллектуальной сложностью работы и вовлечением в различные виды умственной активности в свободное время. Поэтому неудивительно, что умственный характер работы и наличие хобби в течение жизни в нашем исследовании также являлись протективными факторами для

когнитивной функции (Табл. 4). Кроме того, низкий уровень образования довольно часто влечет за собой низкий уровень дохода в профессиональной деятельности, что также явилось фактором риска в нашем исследовании (Табл. 4).

Для 1699 женщин мы дополнительно проанализировали взаимосвязь между когнитивным статусом и анамнестическими данными, отражающими резкие гормональные изменения в организме женщин - количество беременностей, родов и возраст наступления менопаузы (Табл. 5).

При возникновении когнитивных нарушений у женщин значение имел возраст наступления менопаузы – чем позже наступала менопауза, тем реже у женщин наблюдались когнитивные нарушения (Табл. 5). В то же время количество беременностей и родов не показало аналогичных ассоциаций.

Исследователями в данной области рассматривается гипотеза о вовлеченности генов, ответственных за рецепцию эстрогена, в развитие деменции и когнитивных нарушений [21]. Сеть рецепторов эстрогена является одной из основных регуляторных систем мозга. Эстрогены регулируют энергетический метаболизм в мозге, поэтому изменения либо в доступности эстрогена, либо в сети его рецепторов могут влиять на

внутриклеточный сигналинг, функцию нейронной цепи и доступность энергии [22]. Дефицит эстрогена играет роль в процессах, связанных с развитием болезни Альцгеймера, включая процессинг белка-предшественника амилоида с образованием сенильных бляшек, фосфорилирование таубелка с образованием нейрофибриллярных клубков, передачу сигналов Wnt, с транспортом глюкозы в головной мозг и ее метаболизмом [23]. Гормональные изменения в организме женщин, происходящие при наступлении менопаузы, в нашем исследовании показали достаточную статистическую значимость при оценке их ассоциации с когнитивным статусом. Вероятно, эти биохимические процессы, связанные с метаболизмом эстрогена, накладываются на другие описанные факторы риска, тем самым усиливая их эффект. В дальнейшем необходимо проведение рандомизированных исследований, направленных на изучение возможности профилактики когнитивных нарушений путем

назначения заместительной гормональной терапии.

Модель, прогнозирующая возникновение когнитивных нарушений у долгожителей

На основании представленных выше результатов была предложена модель, прогнозирующая возникновение когнитивных нарушений у долгожителей. В качестве предикторов в нее вошли те факторы образа жизни, которые ранее показали статистически значимый эффект (Табл. 2, 3, 4) и были верифицированы в качестве имеющих клиническое значение.

Для построения модели использовались данные о 2134 участниках, из них случайно выбранные 427 человек (20%) использовались в качестве тестовой выборки, остальные - в качестве тренинговой. Полученная модель (Табл. 6) прогнозирует риск развития когнитивных нарушений в возрасте 90 лет и старше по данным об образе жизни (ROC AUC=0,687).

Таблица 6

Модель, прогнозирующая развитие когнитивных нарушения на основе среднесрочных и потенциально модифицируемых факторов риска

Table 6

A model predicting the development of cognitive impairment based on medium-term and potentially modifiable risk factors

	Фактор	0 баллов	1 балл	Коэффициент логистической регрессии	p-value
x ₁	Наличие хобби	да	нет	0,613800	8,46*10 ⁻⁸
x ₂	Наличие домашнего животного	да	нет	0,193924	0,112
x ₃	Наличие высшего образования (в т.ч. неоконченного)	да	нет	0,524920	2,02*10 ⁻⁵
x ₄	Умственная работа	да	нет	0,512858	3,25*10 ⁻⁴
x ₅	Наличие физической активности	да	нет	0,101722	0,422
x ₆	Высокий доход	да	нет	0,371639	0,021
x ₇	Религия	да	нет	0,216354	0,123
x ₈	Пол	мужской	женский	0,153060	0,218
const	Константа	-		-1,013287	3,7*10 ⁻⁸

Преимуществом предложенной модели, позволяющей рассчитать сохранение когнитивной функции при достижении возраста 90 лет и старше, является включение в нее среднесрочных факторов, характеризующих жизнь участников до наступления возраста 90 лет. Относительно невысокий AUC данной модели может быть объяснен тем, что развитие когнитивных нарушений – комплексный фенотип, обусловленный не только перечисленными факторами. Однако разработанная модель позволит выявить риски будущего когнитивного снижения на более раннем этапе и даст возможность при необходимости скорректировать некоторые факторы риска.

Основные ограничения данного исследования - одномоментный дизайн и включение в выборку долгожителей из регионов Центрального федерального округа. Данные регионы характеризуются более высоким уровнем урбанизации, социально-экономическим уровнем, и более доступной медицинской помощью, что делает невозможной экстраполяцию полученных данных на всех долгожителей Российской Федерации.

Заключение. Исследование подтвердило взаимосвязь между социально-экономическими факторами, семейным статусом, образом жизни и когнитивными нарушениями у долгожителей. Основными среднесрочными факторами, ассоциированными с когнитивным статусом долгожителей, были признаны наличие хобби, физической активности, домашнего животного, высшего образования, работы преимущественного умственного характера и высокого уровня дохода на пике профессиональной деятельности, а также приверженность религии. Дополнительным немодифицируемым фактором, который показал высокую значимость ассоциации с когнитивным статусом, явился пол. Предложенная математическая модель позволяет рассчитать риск возникновения когнитивных нарушений на основании наличия или отсутствия факторов риска, тем самым, позволяя вовремя их обнаружить и скорректировать. Данное исследование проведено на

ранее не исследованной крупной выборке долгожителей РФ, что делает его уникальным и открывает возможность для выявления потенциальных факторов риска когнитивных нарушений в данном возрасте и их валидации в дальнейших проспективных исследованиях.

Информация о финансировании

Исследование выполнено при финансовом обеспечении Федерального государственного бюджетного учреждения «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровья» Федерального медико-биологического агентства.

Financial support

The study was carried out with financial support from the Federal State Budgetary Institution "Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks", Federal Medical and Biological Agency.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors have no conflict of interest to declare.

Список литературы

1. Perls T. Dementia-free centenarians. *Experimental Gerontology*. 2004;39(11-12):1587-1593. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2004.08.015>
2. Nybo H, Petersen HC, Gaist D, et al. Predictors of mortality in 2,249 nonagenarians--the Danish 1905-Cohort Survey. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2003;51(10):1365-1373. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1532-5415.2003.51453.x>
3. Molino-Lova R, Sofi F, Pasquini G, et al. The Mugello study, a survey of nonagenarians living in Tuscany: design, methods and participants' general characteristics. *European Journal of Internal Medicine*. 2013;24(8):745-749. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2013.09.008>
4. Herr M, Arvieu JJ, Robine JM, et. al. Health, frailty and disability after ninety: Results of an observational study in France. *Archives of Gerontology and Geriatric*. 2016;66:166-175. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.archger.2016.06.002>

5. Han B, Chen H, Yao Y, et al. Genetic and non-genetic factors associated with the phenotype of exceptional longevity & normal cognition. *Scientific Reports*. 2020;10(1):19140. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75446-2>
 6. Chang-Quan H, Bi-Rong D, Yan Z. Association between sleep quality and cognitive impairment among Chinese nonagenarians/centenarians. *Journal of Clinical Neurophysiology*. 2012;29(3):250-255. DOI: <https://doi.org/10.1097/WNP.0b013e3182570f2e>
 7. Huang C-Q, Dong B-R, Zhang Y-L, et al. Association of cognitive impairment with smoking, alcohol consumption, tea consumption, and exercise among Chinese nonagenarians/centenarians. *Cognitive and Behavioral Neurology*. 2009;22(3):190-196. DOI: <https://doi.org/10.1097/WNN.0b013e3181b2790b>
 8. Wang B, He P, Dong B. Associations between social networks, social contacts, and cognitive function among Chinese nonagenarians/centenarians. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. 2015;60(3):522-527. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.archger.2015.01.002>
 9. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of Psychiatric Research*. 1975;12(3):189-198. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-3956\(75\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0022-3956(75)90026-6)
 10. Клинические рекомендации "Когнитивные расстройства у лиц пожилого и старческого возраста" [Электронный ресурс]. 2022 [дата обращения 09.12.2022]. URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/617_1
 11. Kashtanova DA, Taraskina AN, Erema VV, et al. Analyzing Successful Aging and Longevity: Risk Factors and Health Promoters in 2020 Older Adults. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2022;19(3):8178. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph19138178>
 12. Austad SN, Bartke A. Sex Differences in Longevity and in Responses to Anti-Aging Interventions: A Mini-Review. *Gerontology*. 2015;62(1):40-46. DOI: <https://doi.org/10.1159/000381472>
 13. Kochanek KD, Murphy SL, Xu J. Deaths: Final Data for 2011. *National Vital Statistics Reports*. 2015;63(3):1-120.
 14. Chen Z-C, Wu H, Wang X-D, et al. Association between marital status and cognitive impairment based on a cross-sectional study in China. *International Journal of Geriatric Psychiatry*. 2022;37(1):5649. DOI: <https://doi.org/10.1002/gps.5649>
 15. Kouloutbani K, Karteroliotis K, Politis A. The effect of physical activity on dementia. *Psychiatriki*. 2019;30(2):142-155. Greek. DOI: <https://doi.org/10.22365/jpsych.2019.302.142>
 16. De la Rosa A, Olaso-Gonzalez G, Arc-Chagnaud C, et al. Physical exercise in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Sport and Health Science*. 2020;9(5):394-404. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jshs.2020.01.004>
 17. Friedler B, Crapser J, McCullough L. One is the deadliest number: the detrimental effects of social isolation on cerebrovascular diseases and cognition. *Acta Neuropathologica*. 2015;129(4):493-509. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1377-9>
 18. Norton S, Matthews FE, Barnes DE, et al. Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data. *The Lancet Neurology*. 2014;13(8):788-794. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70136-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70136-X)
 19. Kuiper JS, Zuidersma M, Oude Voshaar RC, et al. Social relationships and risk of dementia: A systematic review and meta-analysis of longitudinal cohort studies. *Ageing Research Reviews*. 2015;22:39-57. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.04.006>
 20. Blesa R, Pujol M, Aguilar M, et al. Clinical validity of the "mini-mental state" for Spanish speaking communities. *Neuropsychologia*. 2001;39(11):1150-1157. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0028-3932\(01\)00055-0](https://doi.org/10.1016/S0028-3932(01)00055-0)
 21. Xing Y, Jia JP, Ji XJ, et al. Estrogen associated gene polymorphisms and their interactions in the progress of Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*. 2013;111:53-74. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.09.006>
 22. Brinton RD, Yao J, Yin F, et al. Perimenopause as a neurological transition state. *Nature Reviews Endocrinology*. 2015;11(7):393-405. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.82>
 23. Villaseca P, Cisternas P, Inestrosa NC. Menopause and development of Alzheimer's disease: Roles of neural glucose metabolism and Wnt signaling. *Frontiers in Endocrinology*. 2022;13:1021796. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1021796>
- ### References
1. Perls T. Dementia-free centenarians. *Experimental Gerontology*. 2004;39(11-12):1587-1593. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2004.09.006>

<https://doi.org/10.1016/j.exger.2004.08.015>

2. Nybo H, Petersen HC, Gaist D, et al. Predictors of mortality in 2,249 nonagenarians--the Danish 1905-Cohort Survey. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2003;51(10):1365-1373. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1532-5415.2003.51453.x>

3. Molino-Lova R, Sofi F, Pasquini G, et al. The Mugello study, a survey of nonagenarians living in Tuscany: design, methods and participants' general characteristics. *European Journal of Internal Medicine*. 2013;24(8):745-749. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2013.09.008>

4. Herr M, Arvieu JJ, Robine JM, et al. Health, frailty and disability after ninety: Results of an observational study in France. *Archives of Gerontology and Geriatric*. 2016;66:166-175. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.archger.2016.06.002>

5. Han B, Chen H, Yao Y, et al. Genetic and non-genetic factors associated with the phenotype of exceptional longevity & normal cognition. *Scientific Reports*. 2020;10(1):19140. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75446-2>

6. Chang-Quan H, Bi-Rong D, Yan Z. Association between sleep quality and cognitive impairment among Chinese nonagenarians/centenarians. *Journal of Clinical Neurophysiology*. 2012;29(3):250-255. DOI: <https://doi.org/10.1097/WNP.0b013e3182570f2e>

7. Huang C-Q, Dong B-R, Zhang Y-L, et al. Association of cognitive impairment with smoking, alcohol consumption, tea consumption, and exercise among Chinese nonagenarians/centenarians. *Cognitive and Behavioral Neurology*. 2009;22(3):190-196. DOI: <https://doi.org/10.1097/WNN.0b013e3181b2790b>

8. Wang B, He P, Dong B. Associations between social networks, social contacts, and cognitive function among Chinese nonagenarians/centenarians. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. 2015;60(3):522-527. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.archger.2015.01.002>

9. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of Psychiatric Research*. 1975;12(3):189-198. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-3956\(75\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0022-3956(75)90026-6)

10. Clinical guidelines "Cognitive disorders in the elderly and senile age" [Internet]. 2022 [cited 2022 Dec 09]. Available from: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/617_1

11. Kashtanova DA, Taraskina AN, Erema VV, et al. Analyzing Successful Aging and

Longevity: Risk Factors and Health Promoters in 2020 Older Adults. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2022;19(3):8178. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph19138178>

12. Austad SN, Bartke A. Sex Differences in Longevity and in Responses to Anti-Aging Interventions: A Mini-Review. *Gerontology*. 2015;62(1):40-46. DOI: <https://doi.org/10.1159/000381472>

13. Kochanek KD, Murphy SL, Xu J. Deaths: Final Data for 2011. *National Vital Statistics Reports*. 2015;63(3):1-120.

14. Chen Z-C, Wu H, Wang X-D, et al. Association between marital status and cognitive impairment based on a cross-sectional study in China. *International Journal of Geriatric Psychiatry*. 2022;37(1):5649. DOI: <https://doi.org/10.1002/gps.5649>

15. Kouloutbani K, Karteroliotis K, Politis A. The effect of physical activity on dementia. *Psychiatriki*. 2019;30(2):142-155. Greek. DOI: <https://doi.org/10.22365/jpsych.2019.302.142>

16. De la Rosa A, Olaso-Gonzalez G, Arc-Chagnaud C, et al. Physical exercise in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Sport and Health Science*. 2020;9(5):394-404. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jshs.2020.01.004>

17. Friedler B, Crapser J, McCullough L. One is the deadliest number: the detrimental effects of social isolation on cerebrovascular diseases and cognition. *Acta Neuropathologica*. 2015;129(4):493-509. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1377-9>

18. Norton S, Matthews FE, Barnes DE, et al. Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data. *The Lancet Neurology*. 2014;13(8):788-794. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70136-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70136-X)

19. Kuiper JS, Zuidersma M, Oude Voshaar RC, et al. Social relationships and risk of dementia: A systematic review and meta-analysis of longitudinal cohort studies. *Ageing Research Reviews*. 2015;22:39-57. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.04.006>

20. Blesa R, Pujol M, Aguilar M, et al. Clinical validity of the "mini-mental state" for Spanish speaking communities. *Neuropsychologia*. 2001;39(11):1150-1157. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0028-3932\(01\)00055-0](https://doi.org/10.1016/S0028-3932(01)00055-0)

21. Xing Y, Jia JP, Ji XJ, et al. Estrogen

associated gene polymorphisms and their interactions in the progress of Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*. 2013;111:53-74. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.09.006>

22. Brinton RD, Yao J, Yin F, et al. Perimenopause as a neurological transition state. *Nature Reviews Endocrinology*. 2015;11(7):393-405. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.82>

23. Villaseca P, Cisternas P, Inestrosa NC. Menopause and development of Alzheimer's disease: Roles of neural glucose metabolism and Wnt signaling. *Frontiers in Endocrinology*. 2022;13:1021796. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1021796>

Статья поступила в редакцию 21 марта 2023 г.
Поступила после доработки 26 сентября 2023 г.
Принята к печати 15 октября 2023 г.

Received 21 March 2023
Revised 26 September 2023
Accepted 15 October 2023

Информация об авторах

Вероника Вячеславовна Ерема, кандидат медицинских наук, аналитик отдела медицинской геномики ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: dveronika784@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0547-3280>.

Александра Александровна Мамчур, аналитик отдела медицинской геномики ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: AMamchur@cspfmmba.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6025-7663>.

Дарья Андреевна Каштанова, кандидат медицинских наук, аналитик отдела медицинской геномики ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: dr.kashtanova@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8977-4384>.

Михаил Вячеславович Иванов, аналитик отдела медицинской геномики ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: MIvanov@cspfmmba.ru, ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-7070-5636>.

Антонина Михайловна Румянцева, аналитик отдела медицинской геномики ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: Rumyantseva@cspfmmba.ru, ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-4830-8057>.

Анна Александровна Акопян, врач-терапевт ОСП «Российский геронтологический научно-клинический центр», ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: a.alexandrova18@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2362-9798>.

Владимир Сергеевич Юдин, кандидат биологических наук, начальник отдела медицинской геномики ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: VYudin@cspfmmba.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9199-6258>.

Валентин Владимирович Макаров, кандидат биологических наук, начальник отдела анализа и прогнозирования медико-биологических рисков здоровью ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: Makarov@cspfmmba.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9495-0266>.

Антон Артурович Кескинов, кандидат медицинских наук, кандидат экономических наук, начальник отдела управления организации проведения научных исследований ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: Keskinov@cspfmmba.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7378-983X>.

Ирина Дмитриевна Стражеско, доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по трансляционной медицине ОСП «Российский геронтологический научно-клинический центр», ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: strazhesko_id@rgnkc.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3657-0676>.

Ольга Николаевна Ткачева, доктор медицинских наук, профессор, член-

корреспондент РАН, директор ОСП «Российский геронтологический научно-клинический центр», ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: tkacheva@rambler.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4193-688X>.

Сергей Александрович Краевой, доктор медицинских наук, первый заместитель генерального директора ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: SKraevoy@cspfmmba.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1775-9235>.

Сергей Михайлович Юдин, доктор медицинских наук, генеральный директор ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью», г. Москва, Российская Федерация, E-mail: yudin@cspmrz.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7942-8004>.

Information about the authors

Veronika V. Erema, Cand. Sci. (Medicine), Analyst at the Department of Medical Genomics, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russia, E-mail: dveronika784@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0547-3280>.

Alexandra A. Mamchur, Analyst at the Department of Medical Genomics, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russia, E-mail: AMamchur@cspfmmba.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6025-7663>.

Daria A. Kashtanova, Cand. Sci. (Medicine), Analyst at the Department of Medical Genomics, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russia, E-mail: dr.kashtanova@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8977-4384>.

Mikhail V. Ivanov, Analyst at the Department of Medical Genomics, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russia, E-mail: MIvanov@cspfmmba.ru, ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-7070-5636>.

Antonina M. Rumyantseva, Analyst at the Department of Medical Genomics, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russia, E-mail: Rumyantseva@cspfmmba.ru, ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-4830-8057>.

Anna A. Akopyan, Physician, Russian Gerontological Scientific and Clinical Center, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia, E-mail: a.alexandrova18@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2362-9798>.

Vladimir S. Yudin, Cand. Sci. (Biology), Head of the Medical Genomics Department, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russia, E-mail: VYudin@cspfmmba.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9199-6258>.

Valentin V. Makarov, Cand. Sci. (Biology), Head of the Department of Analysis and Forecasting of Biomedical Health Risks, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russia, E-mail: Makarov@cspfmmba.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9495-0266>.

Anton A. Keskinov, Cand. Sci. (Medicine), Cand. Sci. (Economy), Head of the Department for the Organization of Scientific Research, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russia, E-mail: Keskinov@cspfmmba.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7378-983X>.

Irina D. Strazhesko, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Deputy Director for Translational Medicine, Russian Gerontological Scientific and Clinical Center, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia, E-mail: strazhesko_id@rgnkc.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3657-0676>.

Olga N. Tkacheva, Doct. Sci. (Medicine), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director, Russian Gerontological Scientific and Clinical Center, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia, E-mail: tkacheva@rambler.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4193-688X>.

Sergey A. Kraevoy, Doct. Sci. (Medicine), First Deputy General Director, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russia, E-mail: SKraevoy@cspfmmba.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1775-9235>.

Sergey M. Yudin, Doct. Sci. (Medicine), General Director, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russia, E-mail: yudin@cspmrz.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7942-8004>.